

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-537260

(P2004-537260A)

(43) 公表日 平成16年12月16日(2004. 12. 16)

(51) Int. Cl. ⁷		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00	Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K	38/00	A 6 1 K	48/00		4 B O 6 3
A 6 1 K	48/00	A 6 1 P	9/00		4 C O 8 4
A 6 1 P	9/00	A 6 1 P	9/10		4 H O 4 5
A 6 1 P	9/10	A 6 1 P	17/02		
		審査請求	未請求	予備審査請求	有 (全 307 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-548129 (P2002-548129)	(71) 出願人	500426135
(86) (22) 出願日	平成13年12月6日 (2001. 12. 6)		サンガモ バイオサイエンシーズ, イン
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月6日 (2003. 6. 6)		コーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/046861		アメリカ合衆国 カリフォルニア 948
(87) 国際公開番号	W02002/046412		04, リッチモンド, キャナル ブー
(87) 国際公開日	平成14年6月13日 (2002. 6. 13)		ルバード 501, スイート エイ10
(31) 優先権主張番号	09/733, 604		0
(32) 優先日	平成12年12月7日 (2000. 12. 7)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	09/736, 083	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成12年12月12日 (2000. 12. 12)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	09/846, 033		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成13年4月30日 (2001. 4. 30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジンクフィンガータンパク質による血管新生の調節

(57) 【要約】

本明細書中で、血管新生を調節するための種々の方法および組成物が提供され、このような方法および組成物は、血管形成の調節が有用な種々の適用において有用であり、その適用としては、虚血および創傷治癒のための処置が挙げられるが、これらに限定されない。特定の方法および組成物は、1つ以上のVEGF遺伝子における特定の標的部位に結合する種々のジンクフィンガータンパク質を用いることによって、この適用を達成する。ジンクフィンガータンパク質をコードする核酸もまた開示される。ジンクフィンガータンパク質および核酸を用いて1つ以上のVEGF遺伝子の発現を調節するための方法もまた、開示される。このような方法はまた、内皮細胞増殖の調節に関与する種々の治療適用に利用され得る。ジンクフィンガータンパク質またはそれらをコードする核酸を含む薬学的組成物もまた、提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的部位に結合するジンクフィンガータンパク質であって、ここで該標的部位は、表 3 または表 4 に特定されるようなヌクレオチド配列を有する、ジンクフィンガータンパク質。

【請求項 2】

ジンクフィンガーの C 2 H 2 クラスの少なくとも 1 つのフィンガーを含む、請求項 1 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 3】

前記標的部位が、表 3 または表 4 の列におけるヌクレオチド配列の 1 つであって、そして該ジンクフィンガーの少なくとも 1 つにおいて、位置 -1 ~ +6 が、該列に特定されるような 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項 2 に記載のジンクフィンガータンパク質。 10

【請求項 4】

3 つのジンクフィンガーのそれぞれにおける位置 -1 ~ +6 が、表 3 の列に特定されるような、第 1、第 2、および第 3 の 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項 3 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のジンクフィンガータンパク質であって、ここで該セグメントが、表 3 に列挙される該ジンクフィンガータンパク質の 1 つについて特定されるアミノ酸配列を有し、ここで、該ジンクフィンガータンパク質は、以下：B V O 1 3 A、E P 1 0 A、G A T A 8 2 Z 7 6 7 8、H B V 3、H P 3 8 4 A、H U M 1 7 A、H U M 1 9 A、M T S 5 A、M X 1 E、P D F 5 A、R A T 2 4 A、S A N 1 6 A、U S X 3 A、V E G F 1、V E G F 1 * 3、V E G F 1 A、V E G F 1 B、V E G F 1 C、V E G F 1 D、V G 1 0 A、V G 1 B、V G 4 A、V G 8 A、V O P 2 8 A - 2、V O P 3 0 A - 4、V O P 3 2 A - 6、V O P 3 2 B - 7、V O P 3 5 A - 1 0、Z E N - 7 A 1、V O P 2 9 A - 3、V O P 3 2 C、V O P 3 2 D、V O P 3 2 E、V O P 3 2 F、V O P 3 2 G、V O P 3 2 H、V O P 3 2 I および V O P 3 2 J からなる群より選択される、ジンクフィンガータンパク質。 20

【請求項 6】

前記ジンクフィンガータンパク質は、6 つのジンクフィンガーを含み、そして該 6 つのジンクフィンガーの少なくとも 1 つにおける位置 -1 ~ +6 が、表 4 に特定されるような 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項 2 に記載のジンクフィンガータンパク質。 30

【請求項 7】

前記ジンクフィンガータンパク質は、6 つのジンクフィンガーを含み、そして該 6 つのジンクフィンガーのそれぞれにおける位置 -1 ~ +6 が、表 4 の列に特定されるような 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項 2 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のジンクフィンガータンパク質であって、ここで前記セグメントが、表 4 に列挙されるような、B V O 1 0 A - 9 A、B V O 1 2 A - 1 1 B および B V O 1 4 B - 1 3 A からなる群より選択されるジンクフィンガータンパク質について特定されるアミノ酸配列を有する、ジンクフィンガータンパク質。 40

【請求項 9】

前記ジンクフィンガータンパク質が、調節ドメインを含む融合タンパク質である、請求項 1 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 10】

前記融合タンパク質が、複数の調節ドメインを含む、請求項 9 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 11】

前記調節ドメインが、活性化ドメインである、請求項 9 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 1 2】

前記活性化ドメインが、(a) VP16、(b) p65、ならびに(c) (a) および(b) の機能的フラグメントからなる群より選択される、請求項 1 1 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 1 3】

前記調節ドメインが、抑制ドメインである、請求項 9 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 1 4】

前記抑制ドメインが、(a) KRAB、(b) メチル結合性ドメインタンパク質 2B、(c) v-ErbA 抑制ドメイン、ならびに(d) (a)、(b) および(c) の機能的フラグメントからなる群より選択される、請求項 1 3 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 1 5】

表 3 または表 4 に特定されるようなヌクレオチド配列を有する標的部に結合するジンクフィンガータンパク質であって、該標的部を含む VEGF 遺伝子を含むゲノムを有する動物に導入される場合、この結合によって、該ジンクフィンガータンパク質は血管新生を調節し得る、ジンクフィンガータンパク質。

【請求項 1 6】

ジンクフィンガーの C₂H₂ クラスの少なくとも 3 つのフィンガーを含む、請求項 1 5 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 1 7】

前記標的部が、表 3 または表 4 の列におけるヌクレオチド配列の 1 つであって、そして前記ジンクフィンガーの少なくとも 1 つにおいて、位置 -1 ~ +6 が、該列に特定されるような 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項 1 6 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 1 8】

前記 3 つのジンクフィンガーのそれぞれにおける位置 -1 ~ +6 が、表 3 の列に特定されるような、第 1、第 2、および第 3 の 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項 1 7 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 1 9】

前記ジンクフィンガータンパク質は、6 つのジンクフィンガーを含み、そして該 6 つのジンクフィンガーの少なくとも 1 つにおける位置 -1 ~ +6 が、表 4 に特定されるような 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項 1 6 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 2 0】

前記ジンクフィンガータンパク質は、6 つのジンクフィンガーを含み、そして該 6 つのジンクフィンガーのそれぞれにおける位置 -1 ~ +6 が、表 4 の列に特定されるような 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項 1 9 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 2 1】

ポリペプチドをコードする核酸であって、ここで該ポリペプチドが、請求項 1 に記載のジンクフィンガーを含む、核酸。

【請求項 2 2】

ポリペプチドをコードする核酸であって、ここで該ポリペプチドが、請求項 4 に記載のジンクフィンガータンパク質を含む、核酸。

【請求項 2 3】

ポリペプチドをコードする核酸であって、ここで該ポリペプチドが、請求項 7 に記載のジンクフィンガータンパク質を含む、核酸。

10

20

30

40

50

【請求項 24】

ポリペプチドをコードする核酸であって、ここで該ポリペプチドが、請求項 9 に記載のジンクフィンガータンパク質を含む、核酸。

【請求項 25】

V E G F 遺伝子の発現を調節するための方法であって、該方法は、ジンクフィンガータンパク質と、細胞内の核酸の標的部位とを接触させる工程を包含し、ここで該標的部位が、表 3 または表 4 に特定されるようなヌクレオチド配列を有し、そして該ジンクフィンガータンパク質の該標的部位への結合が、該細胞での V E G F 遺伝子の発現を調節する、方法。

【請求項 26】

V E G F 遺伝子の複数個のスプライス変体の発現が調節される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

複数個の標的部位が、複数個のジンクフィンガータンパク質に接触され、そして、各ジンクフィンガータンパク質が別個の標的部位に結合する、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記複数個のジンクフィンガータンパク質のそれぞれが、融合タンパク質である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記ジンクフィンガータンパク質のそれぞれが、調節ドメインを含む融合タンパク質である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

それぞれのジンクフィンガータンパク質が、異なる調節ドメインと融合している、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記ジンクフィンガータンパク質が、ジンクフィンガーの C₂ H₂ クラスの少なくとも 3 つのフィンガーを含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 32】

前記 3 つのジンクフィンガーのそれぞれにおける位置 -1 ~ +6 が、表 3 の列に特定されるような、第 1、第 2、および第 3 の 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記ジンクフィンガータンパク質が、6 つのジンクフィンガーを含み、そして該 6 つのジンクフィンガーのそれぞれにおける位置 -1 ~ +6 が、表 4 の列に特定されるような 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

前記ジンクフィンガータンパク質が、調節ドメインを含む融合タンパク質である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 35】

前記方法がさらに、前記ジンクフィンガータンパク質を送達ビヒクルと組み合わせて投与する工程を包含する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記方法がさらに、前記ジンクフィンガータンパク質をコードする核酸を前記細胞内に投与する工程を包含する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 37】

前記投与する工程が、前記核酸を裸の形態で前記細胞内に送達する工程を包含する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記核酸が、発現ベクター内に含まれ、そしてプロモーターに作動可能に連結し、そして投与する工程が、該ベクターを前記細胞内に送達する工程を包含する、請求項 36 に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 39】

前記発現ベクターが、ウイルス発現ベクターである、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記発現ベクターが、レトロウイルス発現ベクター、アデノウイルス発現ベクター、および AAV 発現ベクターからなる群より選択される、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記プロモーターが、誘導性プロモーターである、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 42】

前記調節ドメインが、活性化ドメインを含み、そして前記標的部位への前記ジンクフィンガータンパク質の結合が、前記細胞内での前記 VEGF 遺伝子の転写を活性化する、請求項 34 に記載の方法。 10

【請求項 43】

前記細胞が、細胞の集団である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

VEGF 転写の活性化が、前記細胞の集団での血管形成を活性化する、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記細胞の集団が、細胞培養物である、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記細胞の集団が、哺乳動物被験体に存在する、請求項 44 に記載の方法。 20

【請求項 47】

前記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核酸が、疾患または損傷を処置するに有効な量で投与される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 48】

前記疾患または損傷が、アテローム硬化症、虚血、および関節炎からなる群より選択される、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記被験体が、創傷を有し、そして投与される前記量が該創傷を処置するに効果的である、請求項 47 に記載の方法。 30

【請求項 50】

前記被験体が、潰瘍を有し、そして投与される前記量が該潰瘍を処置するに効果的である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 51】

VEGF 転写の活性化が、前記細胞の集団でのリンパ球生成を活性化する、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 52】

VEGF 転写の活性化が、前記細胞の集団での骨髄発生を活性化する、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 53】

前記活性化ドメインが、(a) VP16、(b) p65、ならびに (c) (a) および (b) の機能的フラグメントからなる群より選択される、請求項 42 に記載の方法。 40

【請求項 54】

前記調節ドメインが、抑制ドメインであって、そして前記標的部位への前記ジンクフィンガータンパク質の結合が、前記細胞内での前記 VEGF 遺伝子の転写を抑制する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 55】

前記細胞が、細胞の集団である、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

VEGF 転写の抑制が、前記細胞の集団での血管形成を抑制する、請求項 55 に記載の方法。 50

法。

【請求項 57】

前記細胞の集団が、細胞培養物である、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 58】

前記細胞の集団が、哺乳動物被験体に存在する、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 59】

前記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核酸が、疾患または損傷を処置するに有効な量で投与される、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

前記疾患が、腫瘍である、請求項 59 に記載の方法。

10

【請求項 61】

前記抑制ドメインが、(a) K R A B、(b) メチル結合性ドメインタンパク質 2 B、(c) v - E r b A 抑制ドメイン、ならびに (d) (a)、(b) および (c) の機能的フラグメントからなる群より選択される、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 62】

前記標的部位が、単一の型の V E G F 遺伝子中に位置し、そして前記ジンクフィンガータンパク質の該標的部位への結合が、前記細胞中の単一の V E G F 遺伝子の発現を調節する、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 63】

前記標的部位が、複数の異なる型の V E G F 遺伝子中に位置し、そして前記ジンクフィンガータンパク質の該標的部位への結合が、複数の V E G F 遺伝子の発現を調節する、請求項 25 に記載の方法。

20

【請求項 64】

請求項 63 に記載の方法であって、ここで前記標的部位が、以下：E P 1 0 A、G A T A 8 2 Z 6 7 8、H B V 3、H P 3 8 4 A、H U M 1 7 A、M T S 5 A、P D F 5 A、U S X 3 A、V E G F 1、V E G F 1 * 3、V E G F 1 A、V G 1 0 A、V G 1 B、V G 4 A、V G 8 A、V O P 2 8 A - 2、V O P 3 0 A - 4、および Z E N - 7 A 1

からなる群より選択されるタンパク質によって結合されるヌクレオチド配列を含む、方法。

30

【請求項 65】

前記標的部位が、V O P 2 8 A - 2 によって認識されるヌクレオチド配列である、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

前記標的部位が、V O P 3 0 A - 4 によって認識されるヌクレオチド配列である、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 67】

血管新生を調節するための方法であって、該方法は、V E G F 遺伝子内に標的部位を含むゲノムを有する動物にジンクフィンガータンパク質を導入する工程を包含し、これによって、該ジンクフィンガータンパク質が該標的部位に結合し、そしてそれによって、該動物での血管新生を調節する、方法。

40

【請求項 68】

前記血管新生の調節が、新規血管形成の阻害を含む、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

前記血管新生の調節が、新規血管形成の刺激を含む、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 70】

前記血管が、高透過性でない、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

前記ジンクフィンガータンパク質が、表 3 または表 4 に特定される標的部位に結合する、請求項 67 に記載の方法。

50

【請求項 7 2】

3つのジンクフィンガーのそれぞれにおける位置-1～+6が、表3の列に特定されるような、第1、第2、および第3の7つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項71に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記ジンクフィンガータンパク質は、6つのジンクフィンガーを含み、そして該6つのジンクフィンガーのそれぞれにおける位置-1～+6が、表4の列に特定されるような7つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項71に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記標的部位が、複数のVEGF遺伝子中に存在し、これによって、前記ジンクフィンガータンパク質は、該複数の遺伝子中の該標的部位に結合し、この結合によって該複数のVEGF遺伝子の発現を調節する、請求項67に記載の方法。 10

【請求項 7 5】

前記導入する工程が、前記動物内に複数のジンクフィンガータンパク質を導入する工程を包含し、それぞれのジンクフィンガータンパク質が同じ遺伝子中の異なる標的部位に結合する、請求項67に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記ジンクフィンガータンパク質のそれぞれが、調節ドメインを含む融合タンパク質である、請求項75に記載の方法。

【請求項 7 7】

それぞれのジンクフィンガータンパク質が、異なる調節ドメインと融合している、請求項76に記載の方法。 20

【請求項 7 8】

虚血の処置の方法であって、該方法は、虚血を有する動物内に、表3または表4に特定された標的部位に結合するジンクフィンガータンパク質を投与する工程を包含し、ここで該ジンクフィンガータンパク質は、虚血を処置するに有効な量で投与される、方法。

【請求項 7 9】

前記動物が、前記標的部位と、該標的部位に結合する前記ジンクフィンガータンパク質とを含むVEGF遺伝子を含むゲノムを有する、請求項78に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記ジンクフィンガータンパク質が、ジンクフィンガーのC₂H₂クラスの少なくとも3つのフィンガーを含む、請求項79に記載の方法。 30

【請求項 8 1】

前記3つのジンクフィンガーのそれぞれにおける位置-1～+6が、表3の列に特定されるような、第1、第2、および第3の7つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項80に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記ジンクフィンガータンパク質は、6つのジンクフィンガーを含み、そして該6つのジンクフィンガーのそれぞれにおける位置-1～+6が、表4の列に特定されるような7つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項80に記載の方法。 40

【請求項 8 3】

VEGF遺伝子の発現の調節因子をスクリーニングするための方法であって、該方法は、以下：

(a) 試験細胞を、ジンクフィンガータンパク質と試験薬剤とに接触させる工程であって、ここで該ジンクフィンガータンパク質は、標的部位に結合する少なくとも1つのジンクフィンガーを含み、該標的部位は、表3または表4で特定されるようなヌクレオチド配列を有する、工程；

(b) 前記試験細胞におけるVEGF遺伝子の発現レベルをベースラインレベルと比較する工程であって、該ベースラインレベルに対する該試験細胞での発現レベルにおける統計学的に有意な差異は、該試験薬剤が、VEGF遺伝子発現の潜在的な調節物質であること 50

を示す、工程
を包含する、方法。

【請求項 8 4】

前記ジンクフィンガーが、活性化ドメインを含む融合タンパク質であり、そして前記試験細胞における、前記ベースラインレベルに対して低レベルの発現は、前記試験薬剤が前記 V E G F 遺伝子の抑制物質であることを示す、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記ジンクフィンガータンパク質が、抑制ドメインを含む融合タンパク質であり、そして前記試験細胞における、前記ベースラインレベルに対して増加した発現レベルは、前記試験薬剤が前記 V E G F 遺伝子の活性化剤であることを示す、請求項 8 3 に記載の方法。

10

【請求項 8 6】

薬学的組成物であって、該組成物は、調節配列に作動可能に結合した請求項 1 4 に記載の核酸および薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含み、ここで、該調節配列が細胞での該核酸の発現を可能にする、薬学的組成物。

【請求項 8 7】

前記核酸が、発現ベクター中に含まれる、請求項 8 6 に記載の薬学的組成物。

【請求項 8 8】

前記発現ベクターが、ウイルス発現ベクターである、請求項 8 7 に記載の薬学的組成物。

【請求項 8 9】

前記発現ベクターが、レトロウイルス発現ベクター、アデノウイルス発現ベクター、および A A V 発現ベクターからなる群より選択される、請求項 8 8 に記載の薬学的組成物。

20

【請求項 9 0】

請求項 1 に記載のジンクフィンガータンパク質および薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含む、薬学的組成物。

【請求項 9 1】

複数個のジンクフィンガーを含むジンクフィンガータンパク質であって、ここで該複数個のジンクフィンガーの少なくとも 1 つが、表 3 または表 4 の列に特定されるような 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、ジンクフィンガータンパク質。

【請求項 9 2】

前記ジンクフィンガータンパク質が、3 つのフィンガーを有するジンクフィンガータンパク質であって、前記少なくとも 1 つのジンクフィンガーが、表 3 の列に特定されるような 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項 9 1 に記載のジンクフィンガータンパク質。

30

【請求項 9 3】

前記ジンクフィンガーの少なくとも 2 つが、表 3 の列に特定されるような 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項 9 2 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 9 4】

前記ジンクフィンガーの 3 つ全てが、表 3 の列に特定されるような 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項 9 3 に記載のジンクフィンガータンパク質。

40

【請求項 9 5】

前記ジンクフィンガータンパク質が、6 つのフィンガーを有するジンクフィンガータンパク質であって、前記少なくとも 1 つのジンクフィンガーが、表 4 の列に特定されるような 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項 9 1 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 9 6】

前記ジンクフィンガーの少なくとも 3 つが、表 4 の列に特定されるような 7 つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項 9 5 に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項 9 7】

50

前記ジンクフィンガーの6つ全てが、表4の列に特定されるような7つの連続するアミノ酸のセグメントによって占められる、請求項96に記載のジンクフィンガータンパク質。

【請求項98】

創傷を処置するための方法であって、該方法は、VEGF遺伝子内に標的部位を含むゲノムを有する動物内にジンクフィンガータンパク質を導入する工程を包含し、これによって、該ジンクフィンガータンパク質は、該標的部位に結合し、このような結合は創傷の治癒を促進する、方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

10

(関連出願の引用)

本願は、2000年12月7日に出願された米国出願第09/733,604号の一部継続出願である、2000年12月12日に出願された米国出願第09/736,083号の一部継続出願である、同時係属中の2001年4月30日に出願された米国出願第09/846,033号の一部継続出願である。これら全ては、全ての目的のために、その全体を参考として本明細書中で援用される。

【0002】

(連邦助成の研究または開発の下でなされた発明の権利に関する説明)

適用しない。

(「配列リスト」、表、または、コンパクトディスクで提出されたコンピュータープログラムリスト付属書に対する参照)

20

適用しない。

【0003】

(背景)

脈管系(時々、脈管樹といわれる)の発達は、2つの主要な工程:脈管形成および新脈管形成を含む。脈管形成は、主要な胚性血管形成が、中胚葉から順番に生じる血管芽細胞および造血前駆細胞のような、初期分化内皮細胞から元々発達する過程である。新脈管形成は、新脈管形成の間に形成される既存の血管から発生する血管から得られる、脈管系の残りの形成をいうために使用される用語である(Risauら(1988)Devel.Biol.,125:441-450)。両過程は、発生的増殖、組織再生および腫瘍増殖を含む種々の細胞増殖過程において重要である。なぜなら、これら全ての過程は、通常の生理学的過程と病理学的過程両方における、所定のそれらの重要な役割のために、血流を必要とするためである。それほど多くない研究努力が、新脈管形成の刺激および調節に関わる因子を同定することに対して向けられてきた。多くの増殖因子が精製され、特徴付けられてきた。そのような因子としては、線維芽細胞増殖因子(FGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、トランスホーミング増殖因子α(TGFα)、および肝細胞増殖因子(HGF)が挙げられる(新脈管形成調節因子の総説について、例えば、Klagsbrunら(1991)Ann.Rev.Physiol.,53:217-39;およびFolkmanら(1992)J.Biol.Chem.,267:10931-934を参照のこと)。必要な栄養素の送達。

30

40

【0004】

従って、新脈管形成は、胚発生、体細胞増殖、および神経系の分化を含む、通常の個体における種々の広範な基本的な生理学的過程において重大な役割を果たす。雌の生殖系において、新脈管形成は、その発達の間卵胞において、排卵後の黄体において、そして妊娠を確立し維持するために胎盤において生じる。さらに、新脈管形成は、創傷および骨折の治癒におけるように、身体の修復過程の一部として生じる。従って、新脈管形成の促進は、血管新生の確立および延長が望ましい状況において有用であり得る。しかし、新脈管形成はまた、増殖するために新規毛細血管の連続的な刺激を必要とする腫瘍のように、多くの病理学的プロセス(おそらく、最も著しくは、腫瘍増殖および腫瘍転移)において重大な因子である。新脈管形成によって影響される他の病理学的プロセスとしては、特に、糖尿

50

病性網膜症、関節症、乾癬および慢性関節リウマチのような、毛細血管における脈管増殖に関連する状態が挙げられる。

【0005】

現在の研究は、内皮細胞特異性増殖因子のファミリーである血管内皮性増殖因子（VEGF）がそれらの同族レセプターが、内皮細胞増殖および内皮細胞分化の刺激を主に引き受けることを示す。これらの因子は、PDGFファミリーのメンバーであり、内皮レセプターチロシンキナーゼ（RTK）を介して、最初に作用するようである。

【0006】

この特定のファミリーの最初に同定されそして十分研究されたメンバーは、血管内皮増殖因子（VEGF）であり、VEGF-Aともいわれる。この特定の増殖因子は、2つの23 kDのサブユニットが、ジスルフィド結合を介して結合される、二量体の糖タンパク質である。異なるmRNAスプライス改変体によってコードされる5つのVEGF-Aアイソフォームは、内皮細胞における有糸分裂誘発の刺激において、同等に効果的であるようにみえるが、細胞表面のプロテオグリカンに対して異なる親和性を有する傾向がある。

10

【0007】

VEGF-Aは、胚の脈管形成の間、新規血管の発生を調節するように作用し、次いで、生涯の後の方の時期において、新脈管形成を調節することにおいて重要な役割を実質的に果たす。単一のVEGF-A対立遺伝子の不活性化によって、胚致死性を生じることを示す研究は、このタンパク質が脈管発達および新脈管形成において有する、重要な役割に関する証拠を提供する（例えば、Carmelietら（1996）Nature 380: 435-439；およびFerraraら（1996）Nature、380: 439-442を参照のこと）。VEGF-Aはまた、単球に対する強い化学誘引物質活性、内皮細胞におけるプラスミノゲンアクチベーターおよびプラスミノゲンアクチベーターインヒビターを誘導する能力、ならびに微小血管透過性を誘導する能力を含む、他の活性を有することを示されている。VEGF-Aはまた、時々、この後者の活性を考慮して血管透過性因子（VPF）ともいわれる。VEGF-Aの単離および特性は、総説されてきた（例えば、Ferraraら（1991）J. Cellular Biochem. 47: 211-218；およびConnolly、J.（1991）J. Cellular Biochem. 47: 219-223を参照のこと）。

20

【0008】

単一VEGF-A遺伝子の選択的mRNAスプライシングは、少なくとも5つのVEGF-Aのアイソフォームを生じる。これらのアイソフォームは、VEGF-A121；VEGF-A145；VEGF-A165；VEGF-A189；およびVEGF-A206といわれる。この名前が示すように、VEGF-A165アイソフォームは、165アミノ酸種で、約46 kDの分子量を有する；このアイソフォームは、通常の細胞および組織に見出される優勢な分子である。VEGF-A165は、塩基性アミノ酸残基が豊富にある、カルボキシ末端領域近辺の44アミノ酸残基を含む。これはまた、ヘパリンおよびヘパリン硫酸に対する親和性を示す。

30

【0009】

VEGF-A121は最短の形態で、VEGF-A165アイソフォームと比較した場合、位置116と159との間の44アミノ酸の欠失を有する。この型は周囲の細胞外マトリクスにおいて、自由に拡散し得る。VEGF-A189は、より長い形態で、VEGF-A165の位置116で24個の高度に塩基性の残基の挿入を有する。VEGF-A206アイソフォームは、VEGF-A165アイソフォームに関して41アミノ酸の挿入を含み、VEGF-A189で見出される24アミノ酸の挿入を含む。VEGF-A121およびVEGF-A165は可溶性タンパク質であり、VEGF-A165が細胞によって分泌される優勢なアイソフォームである。対照的に、VEGF-A189およびVEGF-A206は、たいてい細胞接着型であるようである。これら全てのVEGF-Aのアイソフォームは、生物学的に活性である。

40

【0010】

50

VEGF-B (VEGFともいわれる) は、VEGF-Aと同様の脈管形成特性および他の特性を有するが、VEGF-Aとは異なる組織において分布および発現される。特に、VEGF-Bは心臓で非常に強く発現され、肺では弱くのみ発現される。それに対して、VEGF-Aについては逆である。これは、VEGF-AおよびVEGF-Bが、多くの組織で同時発現されるという事実にも関わらず、機能的な違いを有し得ることを示唆する。VEGF-Bのアミノ酸配列は、VEGF-Aのアミノ酸配列と約44%同一である。VEGF-B遺伝子の選択的なエキソンスプライシングは、167アミノ酸および186アミノ酸のヒトタンパク質をコードする2つのアイソフォームを産出し、それぞれVEGF-B167およびVEGF-B186といわれる。VEGF-B167は、細胞接着を保持する傾向があり、一方、VEGF-B186は、自由に分泌される。これらのアイソフォームの単離および特徴付けは、PCT/US96/02957およびOlssonら(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2576-2581で開示される。

10

【0011】

VEGF-Cはまた、VEGF関連タンパク質(それゆえVRP)またはVEGF-2といわれる。このタンパク質は、VEGF-Aのアミノ酸配列とおよそ30%同一であり、VEGF-A、VEGF-BまたはPLGF(前述)には存在しないN末端延長およびC末端延長を含む。タンパク質は、脈管透過性を含み、内皮の増殖を推進するが、それは、VEGF-Aよりも弱い。その単離および特徴付けは、Joukovら(1996) EMBO J. 15:290-298に開示される。

20

【0012】

VEGF-Dは、ハイブリダイゼーションプローブとして「Soares Breast 3NbHBst」と称されるヒトcDNAライブラリーから得られる、発現された配列タグを用いたスクリーニングによって、ヒト乳房cDNAライブラリー(Clontechから市販される)から単離された(Achenら(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:549-553)。このタンパク質はまた、c-fos誘導増殖因子について、FIGFといわれる。VEGF-D遺伝子は、肺、心臓、小腸および胎児肺中に最も豊富に発現される。このタンパク質は、骨格筋、結腸および脾臓において低いレベルで見出される。その単離および特徴付けは、PCT公報WO98/07832号で議論される。

30

【0013】

最近、いくつかのさらなるVEGF様タンパク質が、orfウイルスの種々の株から同定された。文献において、これらのウイルスVEGFタンパク質は、時々ひとまとめにしてVEGF-Eといわれる。OV NZ2、ORFV2-VEGF、OV-VEGF2、およびVEGF-ENZ2といろいろにいわれる、1つのタンパク質は、orfウイルス株NZ2から単離された(例えば、Lyttle, D. J. ら(1994) J. Virology 68:84-92; およびPCT公報WO00/25805号を参照のこと)。NZ7、OV-VEGF7、VEGF-EおよびVEGF-ENZ7といわれる別のウイルスVEGF様タンパク質は、orfウイルスのNZ7株において見出された。このタンパク質は、強力な有糸分裂促進活性を示すが、VEGF-A165のような、特定のVEGFタンパク質の塩基性ドメインを欠く(例えば、Lyttle, D. J. ら(1994) J. Virology 68:84-92; およびOgawa, S. ら(1998) J. Biol. Chem. 273:31273-31282を参照のこと)。第3のVEGF様タンパク質は、NZ株(特にNZ10株)において同定され、そして、単にNZ10といわれる(例えば、PCT公報WO00/25805号を参照のこと)。さらに別のVEGF様タンパク質は、orfウイルス株D1701において同定され、そして、いくつかの例において、VEGF-ED1701といわれた(例えば、Meyer, M. ら(1999) EMBO J. 18:363-74を参照のこと)。

40

【0014】

これらのウイルスVEGF-E遺伝子に加えて、哺乳動物供給源から単離されたVEGF

50

様増殖因子もまた、VEGF-Eと名づけられた。このVEGF様因子の単離および特徴付けは、PCT公報WO99/47677号で議論される。

【0015】

別のVEGF様タンパク質は、PDGF/VEGF様増殖因子H、または単にVEGF-Hと名づけられた。これは、PCT公報WO00/44903号において議論される。さらなるVEGF様タンパク質としては、VEGF-R（例えば、PCT公報WO99/37671号を参照のこと）といわれるタンパク質およびVEGF-X（例えば、PCT公報WO00/37641号を参照のこと）といわれる別のタンパク質が挙げられる。非常に最近では、VEGF-138といわれるVEGFタンパク質が、Neufeldらによって同定された。VEGFタンパク質に関連する最終タンパク質は、胎盤増殖因子、PlGFである。このタンパク質は、出産間近の胎盤cDNAライブラリーから単離された。このタンパク質のセグメントは、VEGF-Aと高いレベルの相同性を示す。その単離および特徴付けは、Maglioneら（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9267-9271によって記載される。その生物学的機能は、現在よく理解されていない。2つの選択的に転写されたmRNAが、ヒトにおいて同定されている（PlGF-1およびPlGF-2）。

10

【0016】

前述のPDGF/VEGFファミリーのメンバーは、レセプターチロシンキナーゼに結合することによって主に作用する。5つの内皮細胞特異的レセプターチロシンキナーゼが、今までに同定された。すなわち、VEGFR-1（Flt-1ともいわれる）、VEGFR-2（KDR/Flk-1ともいわれる）、VEGFR-3（Flt4）、TieおよびTek/Tie-2である。これらのキナーゼ各々は、シグナル伝達に必要なチロシンキナーゼ活性を有する。VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、TieおよびTek/Tie-2の脈管形成および新脈管形成における、重要な特異的役割は、マウス胚でこれらのレセプターを不活性化する標的化変異によって実証されている。

20

【0017】

VEGF-Aは、高い親和性でVEGFR-1およびVEGFR-2ならびにニューロフィリン1と結合する。ちょうど示されたように、VEGFR-1は、VEGF-Aに結合するが、VEGF-BおよびPlGFとも結合する。VEGF-Cは、VEGFR-3に対するリガンドとして示され、そしてまたVEGFR-2を活性化する（Joukovら（1996）The EMBO Journal 15:290-298）。VEGFR-2とVEGFR-3の両方は、VEGF-Dに結合する。ウイルスVEGFタンパク質（すなわち、ウイルスVEGF-E群）を用いた初期の研究は、これらのタンパク質が、選択的にVEGFR-2に結合するが、VEGFR-1には結合しないことを示す（例えば、Ogawa, S. ら（1998）J. Biol. Chem. 273:31273-31282；およびMeyer, M. ら（1999）18:363-74を参照のこと）。Tek/Tie-2に対するリガンドは、PCT公報WO96/11269号において記載される。Tieに対するリガンドは、まだ同定されていない。種々のVEGFレセプターに関するさらなる詳細は、PCT公報WO00/25805号において提供される。

30

【0018】

最近、130kDa~135kDaのVEGFアイソフォーム特異的レセプターが、精製され、クローン化された（Sokerら（1998）Cell 92:735-745）。証拠は、このVEGFレセプターが、VEGF165のエキソン7にコードされる配列を介してVEGF165アイソフォームに特異的に結合し、そしてこのアイソフォームの配列が、ヘパリンに弱い親和性を示す（Sokerら（1998）Cell、92:735-745）ことを示す。このレセプターはまた、ヒトニューロフィリン-1（NP-1）（神経形態形成の初期段階に関与するレセプター）と同一であることが見出された。PlGFのスプライシング変体の1つ、すなわちPlGF-2は、NP-1と相互作用するようである（Migdalら（1998）J. Biol. Chem. 273:22272-22278）。

40

50

【0019】

従って、種々の細胞増殖因子、特にVEGFタンパク質およびVEGF関連タンパク質が同定された。VEGFタンパク質に結合する特定のレセプターもまた同定されている。しかし、新脈管形成のプロセスを調節するようにVEGFタンパク質およびVEGF関連タンパク質の発現を調節することは、記載されていない。1つ以上の外因性分子を使用して、細胞または細胞の群における新脈管形成のプロセスを調節する能力は、内皮細胞増殖に関する有益な局面を活性化することおよび無益な局面を抑制することにおける有用性を有する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

10

【0020】

(要旨)

種々のジンクフィンガータンパク質(ZFP)およびそのようなタンパク質を使用する方法は、遺伝子発現の調節における使用のために提供される。特定のZFPは、遺伝子内の、特異的標的配列に結合し、それによって新脈管形成を調節するように設計される。ZFPは、融合タンパク質の一部として、調節ドメインに融合され得る。ZFPとの融合について、活性化ドメインまたはリプレッサードメインのいずれかを選択することによって、遺伝子発現の活性化または抑制のいずれかをし得る。従って、ZFPに融合する調節ドメインの適切な選択によって、遺伝子の発現、そして従って、そのような遺伝子に関連する種々の生理学的プロセスを選択的に調節し得る。従って、例えば、新脈管形成を用いて、新脈管形成に影響を及ぼす遺伝子内の標的配列に結合するZFPにアクチベーションドメインを結合することによって、新脈管形成に関連する特定の有益な局面(例えば、虚血の緩和)を強化し得る。対照的に、新脈管形成が有害なプロセス(例えば、血液供給の腫瘍への送達)に関連する場合、リプレッサーに融合するZFPを使用することによって、新脈管形成を減少し得る。それゆえ、新脈管形成に関与する遺伝子へのこの型のZFPの結合は、有意に新脈管形成を減少する。

20

【0021】

提供されるZFPは、1つ以上のジンクフィンガーを含み、表3または表4の列に示されるようなアミノ酸配列を有する、少なくとも1つのフィンガーを有する。これらのZFPとしては、種々のVEGF遺伝子内の特定の配列に結合するZFPが挙げられる。そのような結合は、新脈管形成を調節するために、そして、虚血および適切な血流に依存する種々の他の障害を処置するために使用され得る。表3および表4は、異なるVEGF遺伝子内の特定の標的部位に結合するZFPの大きな集合のアミノ酸配列を示す。ヌクレオチド標的部位は、これらの表の列2に示される。従って、本明細書中で開示される特定のZFPは、表3および表4に特定されるヌクレオチド配列を有する標的部位を認識する。これらのZFPのいくつかは、1~6個のフィンガーを含み(他のZFPは、より多くのフィンガーを有し得るが)、そしてこれらのフィンガーは、表3および表4の列に示されるアミノ酸によって占められる。これらのアミノ酸は、ジンクフィンガーの位置-1から+6を占有し得る。

30

【0022】

本明細書中に提供される特定のZFPは、代表的に9ヌクレオチドを有する標的部位を認識する。一般的に、そのような標的部位は、多重フィンガータンパク質のそれぞれのジンクフィンガー成分によって結合される、3つの標的サブサイトを含む。そのような標的部位の例は、表3に列挙される。認識に関与するジンクフィンガー成分の一部のアミノ酸配列は、列4、6および8に示される。3つのジンクフィンガーを有するいくつかのタンパク質について、これらのフィンガーは、表3に示される7つ連続するアミノ酸の第1、第2および第3のセグメントによって占有される。

40

【0023】

本明細書中に開示される他のZFPは、代表的に18ヌクレオチドを含む標的配列に結合する。これらの標的配列は、6つのフィンガーを含むZFPによって認識され得る。その

50

ような Z F P の例は、表 4 に列挙される。それゆえ、特定の本発明の Z F P は、表 4 に示される 6 フィンガーの Z F P を含み、各々のフィンガーの位置 - 1 ~ + 6 が、表 4 の列に明記される 7 つ連続するアミノ酸のセグメントによって、占有される。

【0024】

上に示されるように、本明細書中で提供される Z F P のいくつかは、新脈管形成を調節するための方法において有用である。いくつかの方法において、新脈管形成の調節は、新規血管形成の阻害を含む。いくつかの方法において、新脈管形成の調節は、新規血管形成の刺激を含む。そのような方法のいくつかにおいて、血管は、非浸透性または非過浸透性である。

【0025】

従って、表 3 または表 4 に明記されるようなヌクレオチド配列を有する標的部位に結合する Z F P もまた提供される。この Z F P が、標的部位を含む V E G F 遺伝子を含むゲノムを有する動物に導入される場合、それによって新規血管形成が調節される。Z F P の前記の型のいずれかは、しばしば調節ドメインを含む融合タンパク質の一部である。この調節ドメインは、アクチベーターまたはリプレッサーであり得る。

【0026】

同様に、本明細書中で提供されるような新脈管形成を調節するための特定の方法は、表 3 または表 4 に明記されるような標的部位に結合する Z F P を標的部位を含む V E G F 遺伝子を含むゲノムを有する動物へ導入する工程を包含する。Z F P の標的部位に対する結合は、動物において新規血管形成の調節を生じる。関連する方法は、細胞内で、核酸の標的 20 部位をジンクフィンガータンパク質と接触させる工程を包含し、ここで、この標的部位は、表 3 または表 4 に明記されるようなヌクレオチド配列を有し、標的部位へのジンクフィンガータンパク質の結合は、細胞内の V E G F 遺伝子の発現を調節する。

【0027】

本明細書中に提供される Z F P は、血管の形成の調節に関連する多くの異なる疾患を処置するために使用され得る。従って、特定の方法は、虚血を処置するために設計される。これらの方法のいくつかは、表 3 または表 4 に明記されるような標的部位に結合する Z F P を、虚血を有する動物に投与する工程を包含し、ここで Z F P は、虚血を処置するための有効量で投与される。Z F P はまた、例えば、創傷の処置、種々の外科的適用ならびにリンパの内皮細胞の増殖および骨髄造血の活性化の増進において使用され得る。他の Z F P 30 は、血管形成の抑制による、所望されていないプロセスを防止する際の使用を見出す。従って、例えば、Z F P は、糖尿病性網膜症、乾癬、関節症および腫瘍増殖の処置において使用され得る。

【0028】

特定の Z F P を選択することによって、生理学的プロセス（例えば、新脈管形成）が調節され得、そして処置を調整し得る範囲を、調整し得る。任意の所定の遺伝子における複数の標的部位が、本明細書中に提供される Z F P によって作用され得、そして、単一の Z F P が、複数の遺伝子中に位置する標的部位に結合し得るので、これが達成され得る。従って、いくつかの方法において、複数の Z F P が投与される。次いで、これらの Z F P は、 40 同じ遺伝子内に位置する異なる標的部位に結合し得る。そのような Z F P は、いくつかの例において、相乗的な効果を有し得る。特定の方法において、複数の融合タンパク質は、異なる調節配列を含む。これとは対照的に、本明細書中に提供されるいくつかの Z F P を使用して、単一の Z F P の投与は、複数の遺伝子の遺伝子発現を調節し得る。なぜなら、各々の遺伝子は、標的配列を含むからである。

【0029】

本明細書中で開示される Z F P をコードするヌクレオチドもまた、本明細書中で提供される。さらに、核酸および／または Z F P を含む薬学的組成物もまた提供される。例えば、特定の組成物は、調節配列に作動可能に連結された本明細書中に記載される Z F P の 1 つをコードする核酸および薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含み、ここで、この調節配列が、細胞中のこの核酸の発現を可能にする。タンパク質ベースの組成物は、本明 50

細書中で開示される Z F P および薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含む。

【0030】

(詳細な説明)

(I. 定義)

分子生物学、生化学、細胞培養、組換えDNA、および関連分野における従来技術の実施は、当業者に周知であり、そして例えば、以下の参考文献中で議論される：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 & Sons、New York、1987および定期的最新版；METHODS IN ENZYMOLOGYシリーズ、Academic Press、San Diego；およびMETHODS IN MOLECULAR BIOLOGY、119巻、「Chromatin Protocols」(P. B. Becker編) Humana Press、Totowa、1999、(これらの全ては、それらの全体において参考として援用される)。

【0031】

用語「ジンクフィンガータンパク質」または「ZFP」とは、亜鉛によって安定化されるDNA結合ドメインを有するタンパク質をいう。個々のDNA結合ドメインは、代表的に「フィンガー」といわれる。ZFPは、少なくとも1つのフィンガー、代表的に、2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたはそれより多いフィンガーを有する。それぞれのフィンガーは、2～4個のDNAの塩基対、代表的には、3個または4個のDNAの塩基対に対して結合する。ZFPは、標的部位または標的セグメントと呼ばれる核酸配列に対して結合する。各フィンガーは、代表的に、約30アミノ酸の、亜鉛キレート化DNA結合サブドメインを含有する。これらのタンパク質の1つのクラス(C2H2クラス)を特徴付ける例示的なモチーフは、-Cys-(X)2-4-Cys-(X)12-His-(X)3-5-His(ここで、Xは任意のアミノ酸である)(配列番号208)である。ジンクフィンガータンパク質のさらなるクラスが公知であり、そして本方法の実施において、ならびに本明細書中に開示される組成物の製造および使用において有用である(例えば、Rhodesら(1993)Scientific American 268:56-65を参照のこと)。研究は、このクラスの1個のジンクフィンガーが、単一のβターンの2つのシステイン残基と共に、亜鉛に配位される2つの不変のヒスチジン残基を含むαヘリックスから構成されることを示してきた(例えば、BergおよびShi、Science 271:1081-1085(1996)を参照のこと)。

【0032】

「標的部位」は、ZFPによって認識される核酸配列である。単一の標的部位は、代表的に、約4～約10個の塩基対を有する。代表的に、2フィンガーのZFPは、4～7個の塩基対標的部位を認識し、3フィンガーのZFPは、6～10個の塩基対標的部位を認識し、6フィンガーのZFPは、2つの隣接する9～10個の塩基対標的部位を認識する。

【0033】

「標的サブサイト」または「サブサイト」は、交差鎖(cross-strand)相互作用を除く、単一のジンクフィンガーによって結合されるDNA標的部位の一部である。従って、交差鎖相互作用の存在しない場合、サブサイトは一般的に3ヌクレオチド長である。交差鎖相互作用を生じる場合において(すなわち、「D-ableサブサイト」、共有に係るWO00/42219を参照のこと)、サブサイトは4ヌクレオチド長であり、そして別の3ヌクレオチドサブサイトもしくは4ヌクレオチドサブサイトと重複する。

【0034】

「Kd」とは、結合分子に対する解離定数、すなわち、所定のアッセイ系(例えば、米国特許第5,789,538号を参照のこと)を使用して測定されるような、所定の条件下(すなわち、[標的]<<Kdの場合)で、その標的に対する化合物の最大半減の結合を与える(すなわち、半数の化合物分子がその標的に結合される)化合物(例えば、ジンク

フィンガータンパク質)の濃度をいう。Kdを測定するために使用されるアッセイ系は、ZFPの実際のKdの最も正確な測定を得るように選択されるべきである。ZFPの実際のKdの正確な測定を与える限り、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に対するKdは、電気泳動度シフトアッセイ(「EMSA」)を使用して測定される。ZFPの純度または活性についての補正がされない場合は、Kdの算出は、所定のZFPの真のKdの過大評価を生じ得る。好ましくは、遺伝子の転写を調節するために使用されるZFPのKdは、約100nM未満、より好ましくは約75nM未満、より好ましくは約50nM未満、最も好ましくは25nM未満である。

【0035】

用語「VEGF遺伝子」とは、一般的に、上記に記載されるような遺伝子のVEGFファミリーのいずれかのメンバー、またはネイティブなVEGFヌクレオチド配列を有するVEGFファミリー由来の遺伝子のコレクション、ならびに起源もしくは調製の様式に関わらず、改変体および改変された形態をいう。これらのVEGF遺伝子は、任意の供給源由来であり得る。代表的に、VEGF遺伝子とは、哺乳動物、特にヒト中のVEGF遺伝子をいう。ネイティブなヌクレオチド配列を有するVEGF遺伝子は、天然から入手されるVEGF遺伝子(すなわち、天然に存在するVEGF遺伝子)と同一なヌクレオチド配列を有する遺伝子である。さらに詳細には、この用語は、以下を含む: VEGF-A(イソ型VEGF-A121、VEGF-A145、VEGF-A165、VEGF-A189、およびVEGF-206を含む); VEGF-B(イソ型VEGF-B167、およびVEGF-B186を含む); VEGF-C; VEGF-D; VEGF-E(「背景」の節に記載されるようなオルフウイルス株由来の種々のVEGF様タンパク質); VEGF-H; VEGF-R; VEGF-X; VEGF-138; およびPLGF(PLGF-1およびPLGF-2の両方)。この用語はまた、特定のイソ型の改変体を含む。例えば、この用語は、イソ型VEGF-145だけでなく、VEGF-145-I、VEGF-145-II、およびVEGF-145-IIIも含む。この用語はまた、対立遺伝子の改変体、選択的エキソンスプライシングから生じる他のイソ型、ネイティブな配列に機能的に等価である形態、およびネイティブなVEGF遺伝子に実質的に同一である核酸を包含する。より詳細には、この用語は、以下のVEGF遺伝子を包含する。

【0036】

VEGF(VEGF-A)は、多くの研究者によって記載されてきた(例えば、Leungら(1989) Science 246:1306-1309; Keckら(1989) Science 246:1309-1312; およびConnら(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2628-2632(これらの各々はその全体において本明細書中に援用される)を参照のこと)。VEGF-A189イソ型は米国特許第5,240,848号に、VEGF-A121イソ型は、米国特許第5,194,596号および同第5,219,739号に;そしてVEGF-A165イソ型は、米国特許第5,332,671号に開示され、これらの各々は、その全体が参考として援用される。

【0037】

VEGF-Bは、PCT公開WO96/26736、米国特許第5,840,693号、米国特許第5,607,918号、および米国特許第5,928,939号に記載され、これらの各々は、その全体が本明細書中に援用される。PCT公開WO96/27007およびWO00/09148、ならびにOlssonら(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2576-2581(これらの各々は、その全体が本明細書中に参考として援用される)もまた参照のこと。

【0038】

VEGF-Cは、Joukovら、(1996) EMBO J. 15:290-298、およびLeeら(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1988-1992、ならびに米国特許第5,935,820号;および米国特許第6,130,071号(これらの各々は、その全体が本明細書中に援用される)に開示される。

米国特許第5, 776, 755号および同第5, 932, 540号、ならびにPCT公開WO95/24473; WO96/39515; WO97/05250; WO97/09427; WO97/17442; WO98/33917; およびWO99/46364 (これらの各々は、その全体が本明細書中に参考として援用される) もまた参照のこと。他の形態は、EP 0 476 983 B1; 米国特許第5, 994, 300号および同第6, 040, 157号; ならびにPCT公開WO00/45835 (これらの各々は、その全体が参考として援用される) において議論される。

【0039】

VEGF-Dは、PCT公開WO98/07832、WO98/24811; およびWO99/33485に記載される。VEGF-Dはさらに、Achenら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:548-553に記載され、上記の各々は、その全体が本明細書中に援用される。EP 0 935 001 A1 (これは、その全体が本明細書中に援用される) もまた参照のこと。

10

【0040】

この用語はまた、本明細書中で集合的にVEGF-Eとして言及される、「背景」の節において記載される種々のウイルス性の形態を含む。このようなウイルス性VEGF様遺伝子は、OVNZ2、ORFV2-VEGF、OV-VEGF2およびVEGF-ENZ2 Aとして文献中に多様に言及される、オルフウイルス株NZ2から単離された遺伝子を含む(例えば、Lyttle, D. J. ら(1994) J. Virology 68:84-92; およびPCT公開WO00/25805を参照のこと)。株NZ7中で同定された遺伝子(NZ7、OV-VEGF7、VEGF-EおよびVEGF-ENZ7と呼ばれる)もまた含まれる。この遺伝子は、Lyttle, D. J. ら(1994) J. Virology 68:84-92; およびOgawa, S. ら(1998) J. Biol. Chem. 273:31273-31282中で議論される。PCT公開WO00/25805に開示されるNZ10もまた含まれる。オルフウイルス株D1701由来の遺伝子もまた含まれる(例えば、Meyerら(1999) EMBO J. 18:363-74 (これは、その全体が本明細書中に参考として援用される))。パラポックスウイルス(parapoxvirus)由来の別のウイルス性VEGF様タンパク質は、PCT公開WO99/50290に開示されている。

20

【0041】

この用語はさらに、VEGF-Eとしても言及されている、哺乳動物のVEGF様タンパク質を含む(例えば、WO99/4767を参照のこと)。

30

【0042】

この用語はまた、PCT公開WO00/44903 (その全体が参考として援用される) で議論される、PDGF/VEGF様増殖因子H、または単にVEGF-Hと呼ばれる遺伝子を含む。VEGF-R (例えば、その全体が参考として援用される、PCT公開WO99/37671を参照のこと) およびVEGF-X (例えば、その全体が本明細書中に参考として援用されるPCT公開WO00/37641を参照のこと) もまた含まれ、同時に、最近同定されたVEGF-138遺伝子も含まれる。胎盤増殖因子(PlGF)の種々のイソ型(PlGF1およびPlGF2)、もさらにこの用語に含まれる。この遺伝子およびこの遺伝子がコードするタンパク質を、単離および特徴付けるための方法は、Maglioneら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9267-9271 (これは、その全体が本明細書中に参考として援用される) に記載される。Birkenhager, R. (1996) Biochem. J. 316:703-707; Kao, Y. (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun. 235:493-498; Kao, Y. (1996) J. Biol. Chem. 271:3154-3162; およびKlauss, M. (1996) J. Biol. Chem. 271:17629-17634 (これらの各々は、その全体が参考として援用される) もまた参照のこと。

40

【0043】

50

上記に記載されるように、用語 V E G F 遺伝子は、ネイティブな配列の V E G F 遺伝子に実質的に同一である核酸を含む。2つ以上の核酸またはポリペプチドに関連して、用語「同一」または「同一性」パーセントとは、例えば以下に記載されるような配列比較アルゴリズムを使用して測定されるような、または目視検査によって測定されるような、最大の一致に対して比較および整列された場合の、同一である2つ以上の配列もしくは部分配列 (s u b s e q u e n c e) をいうか、または同一であるヌクレオチドもしくはアミノ酸残基の特定のパーセンテージを有する2以上の配列または部分配列をいう。

【0044】

2つ以上の核酸またはポリペプチドに関連して、句「実質的に同一」とは、例えば以下に記載されるような配列比較アルゴリズムを使用して測定されるような、または目視検査によって測定されるような、最大の一致に対して比較および整列された場合の、少なくとも75%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、95%以上またはこれらの間任意の整数値のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の同一性を有する2つ以上の配列または部分配列をいう。好ましくは、実質的な同一性は、少なくとも約10残基長、好ましくは約20残基長、より好ましくは約40~60残基長またはそれらの間の任意の整数値の残基長である配列の領域にわたって、好ましくは60~80残基より長い領域にわたって、より好ましくは少なくとも約90~100残基にわたって存在し、そして最も好ましくは、これらの配列は、比較される配列の全長（例えば、ヌクレオチド配列のコード領域のような）にわたって実質的に同一である。

【0045】

配列比較について、代表的に、ある配列が、参照配列として機能し、これに対して、試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを用いる場合、試験配列および参照配列は、コンピュータに入力され、部分配列の座標が指定され、そして必要に応じて、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。次いで、この配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づき、参照配列に対する試験配列についての配列同一性パーセントを算出する。

【0046】

比較のために最適な配列のアライメントは、例えば、S m i t h & W a t e r m a n , A d v . A p p l . M a t h . 2 : 4 8 2 (1 9 8 1) の局所的相同性アルゴリズム、N e e d l e m a n & W u n s c h , J . M o l . B i o l . 4 8 : 4 4 3 (1 9 7 0) の相同性アライメントアルゴリズム、P e a r s o n & L i p m a n , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 5 : 2 4 4 4 (1 9 8 8) の類似性の検索方法、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実行 (W i s c o n s i n G e n e t i c s S o f t w a r e P a c k a g e , G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , 5 7 5 S c i e n c e D r . , M a d i s o n , W I 中の G A P , B E S T F I T , F A S T A , および T F A S T A) 、または目視検査（一般的に、C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , (A u s u b e l , F . M . ら編) J o h n W i l e y & S o n s , I n c . , N e w Y o r k (1 9 8 7 - 1 9 9 9) (補遺 4 6 (1 9 9 9 年 4 月) のような補遺を含む) を参照のこと) によって実施され得る。配列の比較を実施するためのこれらのプログラムの使用は、代表的に、それぞれのプログラムについて特定のデフォルトのパラメータを使用して実施される。

【0047】

配列同一性パーセントおよび配列類似性パーセントを決定するために適切なアルゴリズムの別の例は、A l t s c h u l ら、J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 - 4 1 0 (1 9 9 0) に記載される B L A S T アルゴリズムである。B L A S T 分析を実施するためのソフトウェアは、N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n を通じて一般に入手可能である。このアルゴリズムは、第1に、問い合わせ (q u e r y) 配列中の長さ W の短いワードを同定することによって、高いスコアの配列対 (H S P) を同定することを含み、この短いワードは、そのデータベース配列中の同一の長さのワードと整列した場合、いくらかの正の値の閾値スコア T に一致

するかまたは満たすかのいずれかである。これは、隣接ワードスコア閾値と呼ばれる (Altshulら、前出)。これらの初期隣接ワードヒットは、検索を開始して、これらを含むより長いHSPを見出すためのシードとして機能を果たす。次いで、これらのワードヒットは、累積アライメントスコアが増加され得る限り、各配列に沿って両方の方向に拡張される。累積スコアは、ヌクレオチド配列に関しては、パラメータM (一致する残基対に対する報酬 (reward) スコア; 常に0より大) およびパラメータN (ミスマッチ残基に対するペナルティースコア; 常に0より小) を用いて算出される。アミノ酸配列に関しては、スコアリング行列を使用して累積スコアを算出する。各方向におけるワードヒットの拡張は、以下の場合に停止される: 累積アライメントスコアが、その最大到達値から量Xだけ低下する場合; 1つ以上の負のスコアリング残基アライメントの累積に起因して、累積スコアが0以下になる場合; またはいずれかの配列の末端に到達される場合。配列類似性を決定するために、BLASTプログラムのデフォルトのパラメータが適切である。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列に対して) は、ワード長 (W) 11、期待値 (E) 10、M=5、N=4をデフォルトとして、そして両方の鎖の比較を利用する。アミノ酸配列に対して、BLASTPプログラムは、ワード長 (W) 3、期待値 (E) 10をデフォルトとして、そしてBLOSUM62スコアリング行列を利用する。TBLASTNプログラム (ヌクレオチド配列に対してタンパク質配列を使用する) は、ワード長 (W) 3、期待値 (E) 10をデフォルトとして、そしてBLOSUM62スコアリング行列を利用する (Henikoff & Henikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989) を参照のこと)。

10

20

【0048】

配列同一性パーセントを算出することに加えて、BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計的分析を実施する (例えば、Karlin & Altshul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993) を参照のこと)。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの測定は、2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の間の一致が偶然に生じる確率の指標を提供する、最小和確率 (smallest sum probability) (P(N)) である。例えば、参照核酸に対する試験核酸の比較における最小和確率が、約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、そして最も好ましくは約0.001未満である場合、核酸は、参照配列に対して類似するとみなされる。

30

【0049】

2つの核酸配列が実質的に同一である別の指標は、2つの分子がストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。「実質的にハイブリダイズする」とは、プローブ核酸と標的核酸との間の相補的なハイブリダイゼーションをいい、そしてこれは、最小のミスマッチを含み、このミスマッチは、ハイブリダイゼーション媒体のストリンジェンシーを減少させることによって調節され、標的ポリヌクレオチド配列の所望される検出を達成し得る。句「特異的にハイブリダイズする」とは、その配列が、(例えば、総細胞性) DNAまたはRNAの複雑な混合物に存在する場合、ストリンジェントな条件下で、特定のヌクレオチド配列に対してのみ、分子が結合するか、二重鎖になるかまたはハイブリダイズすることをいう。

40

【0050】

2つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に同一であることのさらなる指標は、以下に記載されるように、第1の核酸によってコードされるポリペプチドが、第2の核酸によってコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応性であるということである。

【0051】

特定のポリヌクレオチド配列の「保存的に改変された改変体」とは、同一もしくは実質的に同一なアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドをいうか、またはポリヌクレオチドがアミノ酸配列をコードしない場合、実質的に同一な配列をいう。遺伝コードの縮重に起因して、多くの機能的に同一の核酸が、任意の所定のポリペプチドをコードする。例えば、コドンCGU、CGC、CGA、CGG、AGA、およびAGGの全ては、アミノ酸ア

50

ルギニンをコードする。従って、アルギニンがあるコドンによって特定されている全ての位置で、このコドンは、コードされるポリペプチドを変更することなしに、これらの記載される対応するコドンのいずれかに変更され得る。このような核酸の改変体は「サイレント改変体」であり、このサイレント改変体は、「保存的に改変された改変体」の一種である。ポリペプチドをコードする、本明細書中に記載される全てのポリヌクレオチド配列はまた、他で言及される場合を除いて、全て可能性のあるサイレント改変体を記載する。当業者は、核酸中のそれぞれのコドン（通常、メチオニンに対する唯一のコドンであるAUGを除いて）が、標準的な技術によって改変されて、機能的に同一の分子を産生し得ることを理解する。従って、ポリペプチドをコードする核酸のそれぞれの「サイレント改変体」は、記載される配列のそれぞれにおいて暗に示されている。

10

【0052】

ポリペプチドは、代表的に、例えば、2つのペプチドが保存的な置換によってのみ異なる場合、第2のポリペプチドに実質的に同一である。タンパク質を記載する場合、「保存的置換」とは、タンパク質の活性を実質的に変更しない、タンパク質のアミノ酸組成における変化をいう。従って、特定のアミノ酸配列の「保存的に改変された改変体」とは、タンパク質活性について重要でないアミノ酸のアミノ酸置換をいうが、または重要なアミノ酸の置換であっても、実質的に活性を変更しないような、類似の特性（例えば、酸性、塩基性、正の荷電性または負の荷電性、極性または非極性など）を有する他のアミノ酸でのアミノ酸の置換をいう。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的な置換の表は、当業者に周知である。例えば、Creighton (1984) Proteins、W. H. Freeman and Companyを参照のこと。さらに、コードされる配列中の単一のアミノ酸もしくは小さな割合のアミノ酸を、変更、付加または欠失する、個々の置換、欠失または付加もまた、「保存的に改変された改変体」である。

20

【0053】

用語「VEGFタンパク質」とは、VEGF遺伝子によってコードされるタンパク質をいい、そしてそのようなタンパク質の機能的等価物を含む。

【0054】

タンパク質、ポリペプチドもしくは核酸の「機能的フラグメント」または「機能的等価物」は、その配列が全長のタンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同一ではないが、全長のタンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同一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な分子より、多いか、少ないかもしくは同じ数の残基を有し得るか、そして／または、1つ以上のアミノ酸またはヌクレオチドの置換を含み得る。核酸の機能（例えば、コード機能、別の核酸にハイブリダイズする能力、調節分子に対する結合）を決定するための方法は、当該分野において周知である。同様に、タンパク質の機能を決定するための方法は、周知である。例えば、ポリペプチドのDNA結合機能は、例えば、フィルター結合、電気泳動度シフト、または免疫沈降アッセイによって決定され得る。Ausubelら、前出を参照のこと。別のタンパク質と相互作用するタンパク質の能力は、例えば、共免疫沈降、ツーハイブリッドアッセイまたは遺伝的および生化学的両方の相補性によって決定され得る。例えば、Fieldsら (1989) Nature 340: 245-246; 米国特許第5, 585, 245号およびPCT WO 98/44350を参照のこと。

30

40

【0055】

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、そして一本鎖または二本鎖の形態のいずれかのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのポリマーをいう。本開示の目的のために、これらの用語は、ポリマーの長さに関して制限するものとして解釈されるべきでない。これらの用語は、天然のヌクレオチドの公知のアナログ、ならびに塩基部分、糖部分および／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。一般的に、特定のヌクレオチドのアナログは、同一の塩基対形成特異性（すなわち、Aのアナログは、Tと塩基対形成する）を有する。従って、用語ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表示であ

50

る。このアルファベット表示は、中央処理装置を有するコンピュータ内のデータベース中に入力され得、そして機能的ゲノミックスおよび相同性検索のようなバイオインフォマティックスの適用のために使用され得る。この用語はさらに、合成的である、天然に存在する、および天然に存在しない、参照核酸と同様な結合特性を有し、そして参照ヌクレオチドと類似の様式で代謝される、公知のヌクレオチドアナログまたは改変された骨格残基もしくは結合を含む核酸を包含する。このようなアナログの例としては、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-オ-メチルリボヌクレオチド、およびペプチド核酸（PNA）が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中において、ヌクレオチド配列は、慣用的な5'-3'方向で示される。

10

【0056】

染色質は、細胞性ゲノムを含む核タンパク質構造である。「細胞性染色質」は、核酸（主に、DNA）およびタンパク質（ヒストンおよび非ヒストン染色体性タンパク質を含む）を含む。真核生物の細胞性染色質の大部分は、ヌクレオソームの形態で存在し、ここで、ヌクレオソームコアは、それぞれ2つのヒストンH2A、H2B、H3およびH4を含む8量体に結合した約150塩基対のDNA；およびヌクレオソームコアの間に伸長するリンカーDNA（生物に依存して変動する長さのDNA）を含む。ヒストンH1の分子は、一般的に、リンカーDNAに結合されている。本開示の目的のために、用語「染色質」は、原核生物および真核生物の両方の全ての型の細胞性核タンパク質を包含することを意味する。細胞性染色質は、染色体性およびエピソーム性の両方の染色質を含む。

20

【0057】

「染色体」は、細胞のゲノムの全てまたは一部分を含有する染色質複合体である。細胞のゲノムは、しばしば、その核型によって特徴付けられ、核型は、細胞のゲノムを含む全ての染色体のコレクションである。細胞のゲノムは、1つ以上の染色体を含有し得る。

【0058】

「エピソーム」は、細胞の染色体性核型の部分ではない核酸を含有する、複製する核酸、核タンパク質複合体または他の構造である。エピソームの例としては、プラスミドおよび特定のウイルスのゲノムが挙げられる。

【0059】

「外因性分子」は、細胞中に通常存在せず、1つ以上の遺伝的方法、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。細胞中の正常な存在は、その細胞の特定の発生段階および環境条件に関して決定される。従って、例えば、筋肉の胚発生の間にのみ存在する分子は、成体筋肉細胞に対しては外因性分子である。外因性分子は、例えば、機能不全の内因性分子の機能するバージョン、または通常に機能する内因性分子の機能不全のバージョンを含み得る。

30

【0060】

外因性分子は、数ある中で、コンビナトリアル化学のプロセスによって生成されるような低分子、もしくはタンパク質、核酸、糖質、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、ポリサッカリドのような高分子、上記分子の任意に改変された誘導体、または1つ以上の上記分子を含有する任意の複合体であり得る。DNAおよびRNAを含む核酸は、一本鎖または二本鎖であり得；直鎖状、分枝状または環状であり得；そして任意の長さの核酸であり得る。核酸には、二重鎖を形成し得る核酸、および三重鎖を形成する核酸が含まれる。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。タンパク質としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：DNA結合タンパク質、転写因子、染色質再構築因子、メチル化DNA結合タンパク質、ポリメラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ジャイレースおよびヘリカーゼ。

40

【0061】

外因性分子は、それが、内因性分子と異なる配列を有する場合、内因性分子と同一の型の

50

分子（例えば、タンパク質または核酸（すなわち、外因性遺伝子））であり得る。細胞中への外因性分子の導入のための方法は、当業者に公知であり、そしてこれらとしては、脂質媒介移入（すなわち、中性脂質およびカチオン性脂質を含むリポソーム）、エレクトロポレーション、直接注入、細胞融合、粒子ボンバードメント、リン酸カルシウム共沈殿、D E A Eーデキストラン媒介移入およびウイルス性ベクター媒介移入が挙げられるが、これらに限定されない。

【0062】

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

【0063】

句「転写開始部位に隣接する」とは、転写開始部位の上流または下流のいずれかに約50塩基以内である標的部位をいう。転写開始部位の「上流」とは、転写開始部位から約50塩基越えて5'側（すなわち、遺伝子の非転写領域内）である標的部位をいう。転写開始部位の「下流」とは、転写開始部位から約50塩基越えて3'側である標的部位をいう。

【0064】

「融合分子」は、2つ以上のサブユニット分子が、連結されている（代表的には、共有結合的に）分子である。これらのサブユニット分子は、同一の化学的な分子の型であり得るか、または異なる化学的な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結合ドメインと転写活性ドメインとの間の融合）および融合核酸（例えば、上記記載の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体、および小溝結合因子（minor groove binder）と核酸との間の融合体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0065】

本開示の目的のために、「遺伝子」は、遺伝子産物（以下を参照のこと）をコードするDNA領域、および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否かに拘らず）を含む。従って、遺伝子としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：プロモーター配列、ターミネーター、翻訳調節配列（例えば、リボソーム結合部位および内部リボソーム侵入（entry）部位）、エンハンサー、サイレンサー、インシュレーター、境界エレメント、複製起点、マトリクス結合部位および遺伝子座制御領域。

【0066】

「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転換をいう。遺伝子産物は、遺伝子の直接的な転写産物（例えば、mRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造RNAまたはRNAの任意の他の型）、またはmRNAの翻訳によって生成されたタンパク質であり得る。遺伝子産物としてはまた、プロセス（例えば、キャップ化、ポリアデニル化、メチル化、および編集）によって改変されたRNA、および、例えば、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADPリボシル化、ミリスチル化、およびグリコシル化によって改変されたタンパク質が挙げられる。

【0067】

「遺伝子活性化」は、遺伝子産物の生成の増加を生じる、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）か、またはタンパク質のいずれかであり得る。従って、遺伝子活性化は、遺伝子の転写および／またはmRNAの翻訳を増大する、それらのプロセスを含む。転写を増大する遺伝子活性化プロセスの例としては、以下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促進するプロセス、転写開始速度を増大するプロセス、転写伸長速度を増大するプロセス、転写のプロセッシビティー（processivity）を増大するプロセス、および転写抑制を軽減するプロセス（例えば、転写リプレッサーの結合のブロックングによって）。遺伝子活性化は、例えば、抑制の阻害、ならびに現在のレベルを超えるための発現の刺激から成り得る。翻訳を増大する遺伝子活性化プロセスの例

10

20

30

40

50

としては、翻訳開始を増大するプロセス、翻訳伸長を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、遺伝子活性化は、遺伝子産物の生成における任意の検出可能な増加を含み、ある場合には約2倍、他の場合には約2倍～約5倍またはその間の任意の整数、また他の場合には約5倍と約10倍との間またはその間の任意の整数、なお他の場合には約10倍と約20倍との間またはその間の任意の整数、時々約20倍と約50倍との間またはその間の任意の整数、他の場合には約50倍と約100との間またはその間の任意の整数、およびなお別の場合には100倍以上の間の、遺伝子産物の生成の増加である。

【0068】

「遺伝子抑制」および「遺伝子発現の阻害」は、遺伝子産物の生成の減少を生じる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が挙げられるが、これらに限定されない）か、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の翻訳を低下させるそれらのプロセスを含む。転写を低下させる遺伝子抑制プロセスの例としては以下が挙げられるが、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、転写開始速度を減少させるプロセス、転写伸長速度を減少するプロセス、転写のプロセッシビティーを減少させるプロセスおよび転写活性化をアンタゴナイズするプロセス（例えば、転写アクチベーターの結合をブロックすることによって）。遺伝子抑制は、例えば、活性化の阻止、ならびに現在のレベルを下回る、発現の阻害から成り得る。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プロセス、翻訳伸長を減少させるプロセス、およびmRNA安定性を減少させるプロセスが挙げられる。転写の抑制は、遺伝子の転写の可逆的不活性化および不可逆的不活性化の両方を含む。一般に、遺伝子抑制は、遺伝子産物の生成における任意の検出可能な減少を含み、ある場合には約2倍、他の場合には約2倍～約5倍またはその間の任意の整数、またさらに他の場合には約5倍と約10倍との間またはその間の任意の整数、なお他の場合には約10倍と約20倍との間またはその間の任意の整数、時々約20倍と約50倍との間またはその間の任意の整数、他の場合には約50倍と約100との間またはその間の任意の整数、ならびになお他の場合には100倍以上の、遺伝子産物の生成の減損である。なお他の場合において、遺伝子抑制は、遺伝子発現の完全な抑制を生じ、その結果、1つの遺伝子産物も検出できない。

【0069】

「調節」は、活性またはプロセスのレベルまたは規模の変化をいう。この変化は、増加または減少のいずれかであり得る。例えば、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。調節は、標的遺伝子の発現によって間接的または直接的に影響され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、以下が挙げられる：RNAレベルまたはタンパク質レベルの変化、タンパク質活性の変化、生成物レベルの変化、下流遺伝子発現の変化、レポーター遺伝子（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、緑色蛍光タンパク質（例えば、MistilliおよびSpectro、Nature Biotechnology 15:961～964（1997）を参照のこと））転写の変化；シグナル伝達、リン酸化および脱リン酸化、レセプターーリガンド相互作用、二次メッセンジャー濃縮物（例えば、cGMP、cAMP、IP3およびCa²⁺）、細胞増殖ならびに新血管形成の変化。これらのアッセイは、インビトロ、インビボおよびエキソビボであり得る。このような機能的効果は、例えば、以下のような当業者に公知である任意の手段によって、測定され得る：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、下流遺伝子発現またはレポーター遺伝子発現の同定（例えば、化学発光、蛍光、比色反応、抗体結合、誘導マーカー、リガンド結合アッセイを介する）；細胞内二次メッセンジャー（例えば、cGMPおよびイノシトール三リン酸（IP3））の変化；細胞内カルシウムレベルの変化；サイトカイン放出など。

【0070】

「調節ドメイン」または「機能的ドメイン」は、DNA結合ドメイン（すなわち、ZFP

）にテザー化された場合、転写調節活性を有するタンパク質またはタンパク質ドメインをいう。典型的に、調節ドメインは、転写調節をもたらすために（例えば、融合分子を形成するために）、ZFPに共有結合または非共有結合される。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。活性化ドメインとしては、核因子κ-BのVP16、VP64およびp65サブユニットが挙げられるが、これらに限定されない。抑制ドメインとしては、KRAB、MBD2Bおよび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としては、例えば、以下が挙げられる：転写因子および補因子（例えば、MAD、ERD、SID、初期増殖応答因子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。アクチベーターおよびリプレッサーは、コアクチベーターおよびコリプレッサーを含む（例えば、Uttleyら、Nature 394:498~502 (1998)を参照のこと）。あるいは、ZFPは、調節ドメインなしで単独で作用して転写調節をもたらす得る。

10

20

30

40

50

【0071】

用語「作動可能に連結された」または「作動的に連結された」は、2つ以上の成分（例えば、配列エレメント）の近位に関して使用され、これらの成分が配列され、その結果、両方の成分は、正常に機能し、そして、これらの成分の少なくとも1つ1つが機能（他の成分の少なくとも1つに対して機能する）を媒介し得る可能性を与える。例として、転写調節配列（例えば、プロモーター）が、1つ以上の転写調節因子の存在または非存在にตอบสนองして、コーディング配列の転写レベルを制御する場合、この転写調節配列は、コーディング配列に作動的に連結される。作動的に連結された転写調節配列は、一般に、コーディング配列とcisで連結するが、そのコーディング配列に直接隣接する必要はない。例えば、エンハンサーは連続していないとしても、このエンハンサーは、そのコーディング配列に作動的に連結される転写調節配列を構成し得る。

【0072】

融合ポリペプチドに関して、用語「作動可能に連結された」または「作動的に連結された」は、成分の各々が、そのように連結されていない場合のように、他の成分との結合において同じ機能を行う事実をいう。例えば、ZFP-DNA結合ドメインが転写活性化ドメイン（または、その機能的フラグメント）に融合されている融合ポリペプチドに関して、融合ポリペプチドにおいてZFP-DNA結合ドメイン部分がその標的部位および／またはその結合部位に結合し得る一方、転写活性化ドメイン（その機能的フラグメント）が転写を活性化し得る場合、ZFP-DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメイン（またはその機能的フラグメント）は、作動的に結合される。

【0073】

用語「組換え」は、細胞に関して使用される場合、その細胞が、外因性の核酸を複製するか、または外因性の核酸によってコードされるペプチドもしくはタンパク質を発現することを示す。組換え細胞は、細胞のネイティブ（非組換え）形態内では見出されない遺伝子を含み得る。組換え細胞はまた、細胞のネイティブ形態において見出される遺伝子を含み、ここで、この遺伝子は改変され、そして人為的手段によってこの細胞内へ再導入される。この用語はまた、細胞から核酸を取出すことなしに改変された細胞に対して内因的である核酸を有する細胞を、含む；このような改変としては、遺伝子置換、部位特異的変異、および関連した技術によって得られる改変が挙げられる。

【0074】

「組換え発現カセット」「発現カセット」または「発現構築物」は、組換え的に、または合成的に生成された核酸構築物であり、この核酸構築物は、このような配列に適合する宿主において、制御エレメントに作動的に連結された構造遺伝子の発現に影響し得る制御エレメントを有する。発現カセットは、少なくともプロモーターを含み、必要に応じて、転写終結シグナルを含む。典型的に、組換え発現カセットは、転写される少なくとも1つの核酸（例えば、所望のポリペプチドをコードする核酸）およびプロモーターを含む。発現に影響を与える点で必要であるかまたは有用であるさらなる因子はまた、本明細書中に記

載されるように、使用され得る。例えば、発現カセットはまた、宿主細胞から発現されたタンパク質の分泌を指向するシグナル配列をコードするヌクレオチド配列を含む。遺伝子の発現に影響する転写終結シグナル、エンハンサーおよび他の核酸配列もまた、発現カセット中に含まれる。

【0075】

「プロモーター」は、転写を指向する核酸制御配列アレイとして定義される。本明細書中で使用する場合、プロモーターは、典型的に、転写開始部位に近位の必要な核酸配列（例えば、特定のRNAポリメラーゼII型プロモーターの場合、TATAエレメント、CCAATボックス、SP-1部位など）を含む。本明細書中で使用する場合、プロモーターはまた、必要に応じて、遠位のエンハンサーエレメントまたはリプレッサーエレメントを含み、これらのエレメントは、転写開始部位から数千塩基対の場所に位置し得る。プロモーターは、しばしば、DNA結合分子（例えば、ポリペプチド（例えば、核レセプター）、Gal4、lacレセプターなど）によるトランス活性化に応答するエレメントを有する。

10

【0076】

「構成的」プロモーターは、大部分の環境条件下および発生的条件下において活性であるプロモーターである。「誘導性」プロモーターは、特定の環境条件下および発生的条件下において活性であるプロモーターである。

【0077】

「弱（weak）プロモーター」とは、EisenbergおよびMcKnight、Mol. Cell. Biol. 5:1940~1947（1985）中に記載されるように、野生型の単純ヘルペスウイルス（「HSV」）チミジンキナーゼ（「tk」）プロモーターまたは変異型HSV tkプロモーターとほぼ同様の活性を有するプロモーターをいう。

20

【0078】

「発現ベクター」は、宿主細胞において特定の核酸の転写を可能にし、そして、必要に応じて宿主細胞において発現ベクターの組み込みまたは複製を可能にする一連の特定の核酸エレメントを用いて、組換え的にまたは合成的に生成される核酸構築物である。発現ベクターは、プラスミド、ウイルス、もしくは核酸フラグメント、またはウイルス由来もしくは非ウイルス由来の一部であり得る。典型的に、発現ベクターは、「発現カセット」を含み、この発現カセットは、プロモーターに作動可能に連結された転写される核酸を含む。用語発現ベクターはまた、プロモーターに作動可能に連結された裸のDNAを含む。

30

【0079】

「宿主細胞」は、発現ベクターまたは核酸を含む細胞を意味し、これらのいずれかは、必要に応じて、ZFPまたはZFP融合タンパク質をコードする。宿主細胞は、典型的に、発現ベクターの複製または発現を補助する。宿主細胞は、原核細胞（例えば、E. coli）もしくは真核細胞（酵母細胞、真菌細胞、原生生物細胞、高等植物細胞、昆虫または両生類細胞）、または哺乳動物細胞（CHO、HeLa、293、COS-1など（例えば、培養細胞（インビトロ）、移植片および初代培養物（インビトロおよびエキソビボ）、およびインビボの細胞））であり得る。

40

【0080】

ある物体に適用する場合、用語「天然に存在する」とは、この物体が、ヒトによって人為的に生成されたものを除いて、天然中に見出され得ることを意味する。

【0081】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーをいうために、本明細書中で交換可能に使用される。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸ならびに然に存在するアミノ酸ポリマーのアナログまたは模倣物であるアミノ酸ポリマーに適用する。ポリペプチドは、例えば、糖タンパク質を形成するための炭水化物残基の添加によって、改変され得る。用語「ポリペプチド」「ペプチド」および「タンパク質」は、糖タンパク質ならびに糖タンパク質を含む。ポ

50

リペプチド配列は、従来のN末端からC末端の方向に、本明細書中で表示される。

【0082】

「部分配列」または「セグメント」は、核酸またはポリペプチドに関して使用される場合、ヌクレオチドまたはアミノ酸（例えば、ポリペプチド）のより長い配列の一部をそれぞれ含むヌクレオチドまたはアミノ酸の配列をいう。

【0083】

用語「虚血」は、特定の領域（例えば、組織または器官）への不適切な血液供給に（通常は閉塞）に起因する局部的貧血の状態を広くいう。虚血は、血流の閉塞に関する種々の疾患（例えば、冠状動脈疾患および末梢血管疾患（*peripheral vascular disease*））に関連し得る。

10

【0084】

「新脈管形成」は、新しい血管が発達するプロセスを広くいう。このプロセスは、既知の血管由来の毛細血管内皮細胞の増殖、移動および組織浸潤に関する。新脈管形成は、正常な生理学のプロセス（例えば、小胞増殖、胚発達および創傷治癒）において、および病態プロセス（例えば、腫瘍増殖および腫瘍転移）において重要である。用語「調節」は、生理学のプロセスの範囲、持続期間、レベルまたは特性における変化をいう。例えば、新脈管形成の調節は、新しい血管の形成の増加または新しい血管形成の減少を含み得る。新脈管形成の調節はまた、非浸透性血管または非高浸透性血管の形成の刺激をいい得る。新脈管形成のための種々のアッセイが、以下に記載される。

【0085】

20

本明細書中で使用する場合、用語「処理すること」および「処理」は、症状の重篤度および／または頻度の減少、症状および／または根本的原因の排除、症状および／またはそれらの根本的原因の発生の予防、ならびに損傷の改善または治療をいう。

【0086】

薬学的組成物の「有効」量（または、「治療有効」量）は、所望の効果を提供するための因子の十分な量であるが非毒性的な量を意味する。この用語は、被験体を処理するのに十分な量をいう。従って、用語治療量は、疾患または全く所望されない任意の他の症状の進行を予防すること、妨げること、遅延すること、または覆すことによって、疾患の状態または症状を治療するのに十分な量をいう。用語予防有効量は、まだ疾患を有していない被験体に与えられた量をいい、従って、予防有効量は、疾患の発症を予防、防御または遅延するのに有効的な量である。

30

【0087】

「創傷」は、任意の組織の外傷を広くいう。創傷は、外傷（例えば、暴力、事故または手術によって引き起こされた）から生じ得る。創傷は、下にある組織に対する損傷を有する上皮層（例えば、皮膚）の裂傷または断裂を含み得る。

【0088】

（I I . 概要）

種々の方法が、新脈管形成を調節するためおよび虚血を処理するために、本明細書中で提供される。ある場合には、このような方法は、細胞または細胞集団（例えば、生物体において）と、1つ以上のVEGF遺伝子中の特定の配列に結合する1つ以上のジンクフィンガータンパク質（ZFP）を接触させることに関する。特定の方法において、あるZFPは投与され、そして、異なるVEGF遺伝子中の標的部位（例えば、VEGF-A、VEGF-BおよびVEGF-C中の標的部位）に結合し得る。他の方法は、特定の遺伝子内の複数の標的部位に結合する複数の異なるZFPを投与することに関する。

40

【0089】

従って、特定の核酸セグメント（標的部位）を特異的に認識および結合し、それによって、1つ以上のVEGF遺伝子の発現を調節するように操作された種々のジンクフィンガータンパク質もまた本明細書中で提供される。1つの実施形態において、ZFPは、VEGF遺伝子の転写を活性化または抑制するようなキメラ転写因子を作製するために、調節ドメインに連結される。このようなZFPを用いて、特定のVEGF遺伝子の発現が増強さ

50

れる；他の特定のZFPを用いて、発現が抑制され得る。一般に、ZFPが結合する標的部位は、VEGF遺伝子の発現の活性化または抑制を生じる部位である。標的部位は、転写開始部位（ヌクレオチドOとして定義される）の近傍、上流および／または下流であり得る。上記で示したように、本ZFPのいくつかは、単一のVEGF遺伝子の発現を調節する。他のZFPは、複数のVEGF遺伝子の発現を調節する。従って、利用される特定のZFP（単数および複数）に依存して、ある者は、1つ以上のVEGF遺伝子が発現されるレベルを調整する。さらに、複数のZFPまたはZFP融合分子（明瞭な標的部位を有する）は、単一のVEGF遺伝子を調節するために使用され得る。

【0090】

標的部位に結合し、そしてVEGF遺伝子の発現（VEGF遺伝子の多様な機能も一緒に）に影響するようなZFPの能力の効果によって、本明細書中で提供されるZFPは、多種多様な適用において使用され得る。一般に、ZFPは、増殖の活性化または抑制のいずれかによって、種々の内皮細胞の増殖を調節するために使用され得る。特定の適用において、ZFPが使用され得、VEGF遺伝子の発現を活性化し、インビトロおよびインビボの両方で、細胞集団中で有利な新脈管形成を誘発する。このような活性化は、例えば、虚血状態の処理において新しい血管および毛細血管の形成を促進するために、利用され得る。例えば、ZFPは、種々の動脈閉塞または静脈閉塞のいずれかを有する個人（例えば、関節硬化症を有する個人）における副行循環の発育を刺激するために使用され得る。ZFPはまた、リンパ球生成（リンパ管の形成）および骨髓造血（骨髓の組織エレメントおよび／または骨髓由来の血球の型の形成）を促進するために使用され得、そして、創傷中の血管および組織の再生のために使用され得る。

【0091】

他の方法は、新脈管形成の抑制に関する。従って、VEGF遺伝子の発現を抑制するために本明細書中で提供される特定のZFPを利用する能力は、他の場合において有用であり得る。例えば、ZFPは内皮の増殖が所望されない場合（例えば、腫瘍に対するさらなる血管の形成をブロックする際、病理学（例えば、糖尿病網膜症および関節炎に関連する病理学的新脈管形成）における微小血管系の増殖を防止する際）に、このような増殖を防ぐために投与され得る。

【0092】

ZFPはまた、治療的適用以外の適用において使用され得る。例えば、ZFPは、VEGF遺伝子発現の活性化または抑制のいずれかに対抗し得る因子をスクリーニングするために使用し得る。ジンクフィンガータンパク質をコードする核酸配列もまた、本明細書中で記載される。さらに、スクリーニング法を介して同定された因子（ZFPをコードする核酸および／またはZFP自身）は、種々の障害（例えば、まさに記載された障害）を処理するための薬学的組成物中で利用され得る。

【0093】

（I I I．遺伝子発現を調節するためのジンクフィンガータンパク質）

（A．一般）

本明細書中で開示されるジンクフィンガータンパク質（ZFP）は、配列特異的様式でDNAに結合し得るタンパク質である。前に示したように、これらのZFPは、種々の適用（新脈管形成の調節を含む）において、および虚血の処理において使用し得る。これらのタンパク質の1クラス（C2H2クラス）を特徴付ける例示的なモチーフは、 $-Cys-(X)_2-4-Cys-(X)_1-2-His-(X)_3-5-His$ （Xは任意のアミノ酸）（配列番号208）である。いくつかの構造研究は、フィンガードメインが2つの不変ヒスチジン残基を含む α ヘリックス、および亜鉛を介して配位される β ターン中の2つの不変システイン残基を含むことを実証した。しかし、本明細書中で提供されるZFPは、この特定のクラスには限定されない。ジンクフィンガータンパク質のさらなるクラスが公知であり、そして、本明細書中で開示される方法および組成物において使用もされ得る（例えば、Rhodesら（1993）Scientific American 268:56~65を参照のこと）。特定のZFPにおいて、単一のフィンガードメインは、

約 30 アミノ酸長である。ジンクフィンガードメインは、DNA 認識にのみならず、RNA 結合およびタンパク質-タンパク質結合にも関連する。

【0094】

Zif268 (マウスの転写因子由来の 3 つのフィンガードメイン) の X 線結晶構造は、同系の DNA 配列を用いた複合体において解析され、そして、各フィンガーが周期的な回転によって次へ重ね合わせられ得るということを示した。この構造は、各フィンガーが 3 塩基対の間隔にわたり DNA と独立して相互作用することを示唆し、この相互作用は、各認識ヘリックス上の 1 位、2 位、3 位および 6 位での側鎖を用いて、それらの各 DNA 三重サブサイトと接触する。Zif268 のアミノ末端は、このアミノ末端が最も接触する DNA 鎖の 3' 末端に位置される。いくつかのジンクフィンガーは、標的セグメントの 4 番目の塩基に結合し得る。ジンクフィンガータンパク質が最も接触する鎖が標的鎖と指定される場合、いくつかのジンクフィンガータンパク質は標的鎖中の 3 つの塩基トリプレット (three base triplet)、および非標的鎖上の 4 番目の塩基に結合する。4 番目の塩基は、3 つの塩基のサブサイトのすぐ 3' の塩基に対して相補的である。

10

【0095】

(B. 例示的な ZFP)

VEGF 遺伝子を含む核酸上の特定の標的部位に結合する ZFP が、本明細書中に開示される。従って、ZFP が本明細書中で提供される標的部位に結合する場合、この ZFP は、アミノ酸組成物に変化している種々の異なる成分のフィンガーを含み得る。いくつかの VEGF 遺伝子における標的部位の位置が表 2 中に与えられ、そして、この標的部位の部分配列が以下の表 3 および表 4 中 (これらの 2 つの表の各々における「標的」と表示された 2 列目中) に記載される。特定の VEGF 遺伝子についての転写開始部位は、まだ正確に確立されていない。従って、以下の VEGF 遺伝子について表 2 中に列挙された位置は、この転写開始部位が以下：

20

【0096】

【数 1】

遺伝子	推定転写開始部位
VEGF A	GenBank 登録 AF095785 の 2363 塩基対
VEGF B	GenBank 登録 U80601 の 400 塩基対
VEGF-C	GenBank 登録 AF020393 の 600 塩基対
VEGF-D	GenBank 登録 U69570 の 18727 塩基対
VEGF-E	GenBank 登録 AC015837 の 30278 塩基対 (アンチセンス)
ウイルス VEGF	GenBank 登録 S67520 の 230 塩基対

30

のような特定の GenBank 登録について示された位置であることを想定する。

【0097】

上記で示したように、標的部位は、転写開始部位 (ヌクレオチド 0 として定義される) の上流または下流に位置し得る。標的部位のいくつかは 9 個のヌクレオチドを含む (表 3 を参照のこと) 一方、他の部位は、18 個のヌクレオチドを含む (表 4 を参照のこと)。これらの標的部位の 1 つの特徴は、ZFP または ZFP および 1 つ以上の調節ドメインを含む融合タンパク質の標的部位への結合は、1 つ以上の VEGF 遺伝子の発現レベルに影響し得るということである。上記で定義したように、本明細書中で提供される ZFP によって調節され得る VEGF 遺伝子としては以下が含まれるが、これらに限定されない：VEGF-A (イソ型である VEGF-A121、VEGF-A145、VEGF-A165、VEGF-A189 および VEGF-A206 を含む)、VEGF-B (イソ型である VEGF-B167 および VEGF-B186 を含む)、VEGF-C、VEGF-D、ウイルス VEGF 様タンパク質 (ウイルス VEGF-E) および哺乳動物 VEGF-E、VEGF-H、VEGF-R、VEGF-X、VEGF-138 および PLGF (PLG

40

50

F-1 および P1GF-2 を含む)。標的部位は、転写開始部位に隣接して位置し得るか、または転写開始部位よりも有意に上流もしくは下流に位置し得る。いくつかの標的部位は単一の VEGF 遺伝子内に位置し得、その結果、ZFP の標的への結合は、単一の VEGF 遺伝子の発現に影響する。他の標的部位は複数の VEGF 遺伝子内に位置し、その結果、単一の ZFP の結合は、複数の遺伝子の発現を調節し得る。さらなる他の場合、各々が同一遺伝子中の標的を認識する複数の ZFP が、使用され得る。

【0098】

標的部位に結合する ZFP は、典型的に、少なくとも 1 つのジンクフィンガーを含むが、複数のジンクフィンガー（例えば、2, 3, 4, 5, 6 以上のフィンガー）を含み得る。通常、ZFP は少なくとも 3 つのフィンガーを含み得る。特定の ZFP は 6 つのフィンガーを含み得る。3 つのフィンガーを含む ZFP は、典型的に 9 または 10 ヌクレオチドを含む標的部位を認識する；6 つのフィンガーを有する ZFP は、18 ~ 20 ヌクレオチドを含む標的部位を認識し得る。ZFP はまた、1 つ以上の調節ドメイン（このドメインは、転写の活性化ドメインまたは抑制ドメインであり得る）を含む融合タンパク質であり得る。

【0099】

表 3 および表 4 は、多くの異なる ZFP のアミノ酸配列、およびその ZFP が結合する対応する標的部位を示す。表 3 は、9 ヌクレオチドを含む標的部位に結合する ZFP を列挙する。この表中の 1 番目の列は、ZFP の内部基準名を列挙する。列 2 は、3 つのフィンガーのジンクフィンガータンパク質によって結合される 9 塩基の標的部位（5' から 3' の方向で記載される標的部位）を含む。標的部位に関して対応する配列番号が、列 3 に記載される。認識に関与する 3 つのジンクフィンガー成分の部分のアミノ酸配列は、列 4、列 6 および列 8 に列挙され、そして、これらに対応する配列番号が、各々、列 5、列 7 および列 9 に各々列挙される。ジンクフィンガーの番号付けの規定は、以下で定義される。列 10 は、いくつかの ZFP/標的部位複合体の解離定数を列挙する。このような定数を決定するための方法は、以下に記載される。クロス鎖の相互作用を除外することで、各フィンガーは、対応する標的配列の範囲内でトリプレットの塩基（標的サブサイト）に結合する。第 1 のフィンガーは標的の 3' 末端から第 1 のトリプレット開始部位に結合し、第 2 のフィンガーは、第 2 のトリプレットに結合し、そして、第 3 のフィンガーは標的配列の第 3 のトリプレット（すなわち最も 5' 側）に結合する。従って、例えば、ZFP BVO 13A の RSDHLAR フィンガー（配列番号 30）（表 3 の 1 番目の列）は 5' GGG 3' に結合し、DRSNLTR フィンガー（配列番号 36）は 5' GAC 3' に結合し、そして、RSDAL TQ フィンガー（配列番号 88）は 5' ATG 3' に結合する。

【0100】

表 4 は、VEGF 遺伝子を標的とする 6 つのフィンガー ZFP の情報を提供する。表 4 は、表 3 と類似の型式であり、列 1 は ZFP の内部標準名を示す。しかし、表 3 とは対照的に、表 4 の列 2 は、6 つのフィンガータンパク質によって認識される 18 塩基の標的部位を示し（ここで、標的はまた 5' から 3' の方向に列挙される）、対応する配列番号を列 3 に列挙する。認識に関与する 6 つのジンクフィンガー成分の部分のアミノ酸配列は、列 4、列 6、列 8、列 10、列 12 および列 14 中に列挙され、関連する配列番号が列 5、列 7、列 9、列 11、列 13 および列 15 に各々記載される。この型の ZFP では、第 1 のフィンガーは標的部位の 3' 末端から第 1 トリプレット開始部位に結合し、第 2 のフィンガーは、第 2 のトリプレットに結合し、第 3 のフィンガーは第 3 のトリプレットに結合し、第 4 のフィンガーは第 4 のトリプレットに結合し、第 5 のフィンガーは第 5 のトリプレットに結合し、そして、第 6 のフィンガーは標的配列の第 6 のトリプレット（すなわち最も 5' 側）に結合する（この場合もクロス鎖の相互作用を除外する）。ここで、BVO 10A-9A と名付けられた ZFP について、第 1 のフィンガー QSSDLRR（配列番号 120）は 5' GCT 3' に結合し、第 2 のフィンガー RSDHLTR（配列番号 123）は 5' GGG 3' に結合し、第 3 のフィンガー DRSA LAR（配列番号 126）

10

20

30

40

50

は5' GTC3'に結合し、第4のフィンガーRSDHLAR（配列番号129）は5' GGG3'に結合し、第5のフィンガーRSDNLAR（配列番号132）は5' GAG3'に結合し、そして、第6のフィンガーRSDALTR（配列番号135）は5' GTG3'に結合する。

【0101】

従って、本明細書中で提供されるZFPについてのいくつかの標的部位、およびこのようなZFPの特定の例が、表3および4に開示される。潜在的な標的部位について試験されたVEGF遺伝子のセグメントまたは領域は、表1に示される。表1に列挙される数は、標的部位を同定するために試験された種々のVEGF遺伝子についての転写開始部位に関する開始塩基および終止塩基(kbp)をいう。負の数は、転写開始部位の上流のkbpをいい、そして正の数は、転写開始部位の下流のkbpをいい、ここで、転写開始部位は、ヌクレオチド0として定義される。標的部位について試験されたVEGF配列としては、VEGF-A（GenBankアクセス番号AF095785を参照のこと）、VEGF-B（GenBankアクセス番号U80601、-0.4kbから+0.32kbを参照のこと）、VEGF-C（GenBankアクセス番号AF020393を参照のこと）およびVEGF-D遺伝子（HSU69570およびHSY12864を参照のこと）についての配列、ならびにPLGF（GenBankアクセス番号AC015837を参照のこと）およびウイルスのVEGF-E遺伝子（GenBankアクセス番号AF106020およびMeyer, M. ら（1999）EMBO J. 18:363-74; GenBankアクセス番号S67520およびLyttle, D. J. ら（1994）J. Virol. 68:84-92; およびGenBankアクセス番号AF091434を参照のこと）についての配列が挙げられる。これらの各遺伝子についての配列を提供する参考文献は、前に列挙される。従って、例えば、表1を参考とすると、標的部位について試験されるVEGF-A遺伝子のヌクレオチド配列は、転写開始部位の2.3kb上流から転写開始部位の1.1kb下流に広がる。

【0102】

種々のVEGF遺伝子における特定のZFPについての標的部位の位置は、表2に要約される。この表における1欄目は、ZFPについての内部基準名であり、そして表3および4の1欄目中の同じ名前に対応する。種々のVEGF遺伝子配列における標的部位の5'末端の位置は、残りの欄に列挙される。さらに、負の数は、転写開始部位（ヌクレオチド0として定義される）の上流のヌクレオチドの数をいい、その一方で、正の数は、転写開始部位の下流のヌクレオチドの数を示す。故に、VEGF-Aヌクレオチド配列においてBVO13A（表2の1列目）と命名されたZFPについての標的部位（5'末端）は、VEGF-Aについての主な転写開始部位の851塩基下流に位置されるヌクレオチドで始まる。特定の標的部位が、複数のVEGF遺伝子中に現れる。例えば、VEGF-Aヌクレオチド配列においてVG4Aと命名されたZFPについての標的部位（5'末端）は、VEGF-Aについての転写開始部位の1083塩基上流に位置されるヌクレオチドで始まる。同じ標的部位（5'末端）はまた、VEGF-Bについての転写開始部位の上流のヌクレオチド31およびVEGF-Cについての転写開始部位の252塩基上流のヌクレオチドで始まる。特定のZFPは、単一のVEGF遺伝子において1つを超える標的部位を有し；例えば、EP10Aは、VEGF-A遺伝子において2つの標的部位を有する（表2を参照のこと）。

【0103】

結果として、前出で示されるように、本明細書中に記載される特定のZFPは、単一のVEGF遺伝子の活性を調節することによって脈管形成を調節するために利用され得、その一方で、他のZFPは、複数の遺伝子の発現を制御するために利用され得る。例えば、VG8AといわれるZFPは、表2に列挙される各VEGF遺伝子について結合部位を有し、従って、種々のVEGF遺伝子の発現を制御するために同時に利用され得る。本明細書中で提供される種々のZFPの賢明な選択および／またはそれらの組合せによって、VEGF遺伝子が調節されるように調整され得る。

【0104】

(I V. Z F Pの特徴)

ジンクフィンガータンパク質は、ジンクフィンガー成分から形成される。例えば、ジンクフィンガータンパク質は、1～37のフィンガーを有し得、通常2、3、4、5または6のフィンガーを有する。ジンクフィンガータンパク質は、標的遺伝子内で比較的小さい部分配列を表す標的部位（時折、標的セグメントといわれる）を認識し、そして結合する。ジンクフィンガータンパク質の各成分フィンガーは、標的部位内のサブサイトに結合し得る。このサブサイトは、同じ鎖（時折、標的鎖といわれる）上にある3つの連続する塩基のトリプレット全てを含む。このサブサイトはまた、標的鎖上の3つの連続する塩基のすぐ3'側の塩基の相補体である反対の鎖上の第4番目の塩基を含んでもよいし、含まなくてもよい。多くのジンクフィンガータンパク質において、ジンクフィンガーは、同じジンクフィンガータンパク質における他のフィンガーに実質的に独立のトリプレットのサブサイトに結合する。従って、複数のフィンガーを含むジンクフィンガータンパク質の結合特異性は、通常ほとんどその成分フィンガーの特異性の凝集体である。例えば、ジンクフィンガータンパク質が、トリプレットXXX、YYYおよびZZZに独立して結合する、第1、第2および第3のフィンガーから形成される場合、このジンクフィンガータンパク質の結合特異性は、3' XXX YYY ZZZ 5'である。

【0105】

N末端からC末端へのジンクフィンガータンパク質におけるフィンガーの相対順序は、標的における3'から5'方向へのトリプレットの相対順序を決定する。例えば、ジンクフィンガータンパク質が、N末端からC末端の、それぞれ5' GAC 3'、5' GTA 3'および5' GGC 3'のトリプレットに独立して結合する、第1、第2および第3のフィンガーを含む場合、ジンクフィンガータンパク質は、標的セグメント3' CAGATGGCGG 5'（配列番号209）に結合する。ジンクフィンガータンパク質が、別の順序（例えば、第2のフィンガー、第1のフィンガー、第3のフィンガー）においてフィンガーを含む場合、ジンクフィンガータンパク質は、異なる順列のトリプレット、例として3' ATGCAGCGG 5'（配列番号210）を含む標的セグメントに結合する。B e r g & S h i、S c i e n c e 271、1081～1086（1996）を参照のこと。いくつかの場合において、その成分フィンガーの凝集体としてのジンクフィンガータンパク質の結合特性の評価は、同じタンパク質における複数のフィンガー結合のコンテキスト依存の相互作用によって影響され得る。

【0106】

2つ以上のジンクフィンガータンパク質は、ジンクフィンガータンパク質成分の凝集体である標的特異性を有するように結合し得る（例えば、K i m & P a b o、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A. 95、2812～2817（1998）を参照のこと）。例えば、XXX、YYYおよびZZZにそれぞれ結合する第1、第2および第3の成分フィンガーを有する第1のジンクフィンガータンパク質は、AAA、BBBおよびCCCへの結合特性を有する第1、第2および第3の成分フィンガーを有する第2のジンクフィンガータンパク質に結合され得る。従って、結合した第1および第2のタンパク質の結合特性は、3' XXXYYYZZZ _____ AAA BBB CCC 5'であり、ここで、下線は、短い介在性領域を示す（典型的には、0～5塩基の任意の型）。この局面において、標的部位は、介在セグメントによって分離される2つの標的セグメントを含むとみなされ得る。

【0107】

結合は、任意の以下のペプチドリンカーを用いて達成され得る。

【0108】

TGEKP：（配列番号211）（L i uら、1997、前出）；（G4S）_n（配列番号212）（K i mら、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A. 93：1156～1160（1996）；GGRRGGGS；（配列番号213）LRQRDGERP；（配列番号214）LRQKDGGGSERP；（配列番号215）LRQKD（

G 3 S) 2 E R P (配列番号 2 1 6)。あるいは、可撓性のリンカーは、DNA 結合部位およびペプチド自体の両方をモデリングし得るコンピュータプログラムを用いてか、またはファージディスプレイ方法によって合理的に設計され得る。さらなるバリエーションにおいて、非共有結合は、2つのジンクフィンガータンパク質と、この2つのジンクフィンガータンパク質のヘテロ二量体形成を促進するドメインとを融合することによって達成され得る。例えば、1つのジンクフィンガータンパク質は、f o s と融合され得、そして他のジンクフィンガータンパク質は j u n と融合され得る (B a r b a s ら、W O 9 5 / 1 1 9 4 3 1 を参照のこと)。

【0109】

2つのジンクフィンガータンパク質の結合は、哺乳動物のゲノム内に特有の結合特異性を与えるために有利である。典型的な哺乳動物の2倍体ゲノムは、 3×10^9 bp からなる。4つのヌクレオチド A、C、G、および T が、ランダムに分布されていると仮定すると、与えられた 9 bp の配列は、約 23, 000 回存在する。従って、絶対的な特異性を有する 9 bp の標的を認識する Z F P は、ゲノム内の約 23, 000 の部位に結合する潜在性を有する。18 bp の配列は、 3.4×10^{10} bp に 1 回存在するか、またはその複雑性が、哺乳動物のゲノムの 10 倍であるランダム DNA 配列中に約 1 回存在する。

【0110】

ジンクフィンガータンパク質の成分フィンガーは、代表的に約 30 のアミノ酸を含み、そして 1 つの実施形態において、以下のモチーフ (N-C) を有する：

C y s - (X) 2 - 4 - C y s - X . X . X . X . X . X . X . X . X . X . X . X . -
H i s - (X) 3 - 5 - H i s - 1 1 2 3 4 5 6 7

単一の β ターンにおける 2 つの不変のヒスチジン残基および 2 つの不変のシステイン残基は、亜鉛原子を介して配位されている (例えば、B e r g & S h i、S c i e n c e 2 7 1、1 0 8 1 - 1 0 8 5 (1 9 9 6) を参照のこと)。上記のモチーフは、ジンクフィンガーに与える結合特異性の領域についての分野における標準である番号付けの慣習を示す。第 1 の不変の H i s 残基の左側 (N 末端側) にあるアミノ酸は、+6 番と指定され、そして左にあるさらに他のアミノ酸は、逐次減少した番号を割当られる。 α ヘリックスは、残基 1 で始まり、そして第 2 の保存されたヒスチジンに続く残基へと伸長する。それ故、ヘリックスの全体は、可変性の長さ (11 残基と 13 残基との間) である。

【0111】

(V. Z F P の設計)

本明細書中で提供される Z F P は、V E G F 遺伝子における選択された標的部位を認識するように設計される (例えば、表 3、4 および 6 に示されるように)。Z F P を設計または選択するプロセスは、代表的にフレームワーク残基の供給源として天然の Z F P を用いて開始する。設計または選択のプロセスは、所望される結合特性を与えるために非保存位置 (すなわち、-1 ~ +6 の位置) を定義するために役立つ。1 つの適切な Z F P は、マウス転写因子 Z i f 2 6 8 の DNA 結合ドメインである。このタンパク質の DNA 結合ドメインは、アミノ酸配列：

Y A C P V E S C D R R F S R S D E L T R H I R I H T G Q K P (F 1) (配列番号 2 1 7)

F Q C R I C M R N F S R S D H L T T H I R T H T G E K P (F 2) (配列番号 2 1 8)

F A C D I C G R K F A R S D E R K R H T K I H L R Q K (F 3) (配列番号 2 1 9) を有し、そして標的 5' G C G T G G G C G 3' (配列番号 2 2 0) に結合する。

【0112】

フレームワーク残基の供給源としての別の適切な天然のジンクフィンガータンパク質は、S p - 1 である。ジンクフィンガータンパク質の構築のために用いられる S p - 1 配列は、S p - 1 転写因子におけるアミノ酸 531 ~ 624 に対応する。この配列は、94 アミノ酸の長さである。S p - 1 のアミノ酸配列は、以下のようである：

【0113】

10

20

30

40

50

【化1】

PGKKKQHICHIOGCGKVYGKTSHLRAHLRWHTGERPFMCTWSYCGKRFTSRDE
LQRHKRTHHTGEKKFACPECPKRFMRSDHLSKHIKTHQNKKG

(配列番号 221)

Sp-1 は、標的部 5' GGG GCG GGG 3' (配列番号 222) に結合する。

【0114】

Sp-1 の代替の形態、Sp-1 コンセンサス配列は、以下のアミノ酸配列を有する：

【0115】

【化2】

meklmgsdPGKKKQHACPECGKSFSKSSHLRAHQRTHTGERPYKCPECGKSFSRSD
ELQRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLSKHQRTHTQNKKG

(配列番号 223)

(小文字は、Shi & Berg, Chemistry and Biology 1, 83-89. (1995) からのリーダー配列である)。Sp-1 コンセンサス配列に対する必要に応じた結合配列は、5' GGGGCGGGG 3' (配列番号 222) である。他の適切な ZFP が、以下に記載される。

【0116】

いくつかのジンクフィンガータンパク質の合理的な設計を助ける多くの置換の法則がある。例えば、ZFP DNA 結合ドメインは、共有に係る WO00/42219; WO00/41566; および 1999 年 11 月 19 日に出願された米国特許出願番号 09/444, 241; 2000 年 3 月 23 日に出願された米国特許出願番号 09/535, 088; 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 6, 140, 466 号; ならびに PCT 公開番号 WO95/19431、WO98/54311、WO00/23464 および WO/27878 に記載されるような特定の標的部 20
 位を認識するために設計および/または選択され得る。1つの実施形態において、ジンクフィンガー DNA 結合ドメインについての標的部 30
 位は、共有に係る WO00/42219 に開示される部位選択の法則に従って同定される。1つの好ましい実施形態において、ZFP は、共有に係る 2000 年 11 月 2
 0 日に 40
 出願された米国特許出願番号 09/716, 637、表題「Iterative Optimization in the Design of Binding Proteins」に記載されるように選択される。WO96/06166; Desjarlais & Berg, PNAS 90, 2256-2260 (1993); Choo & Klug, PNAS 91, 11163-11167 (1994); Desjarlais & Berg, PNAS 89, 7345-7349 (1992); Jamieson ら、Biochemistry 33: 5689-5695 (1994); および Choo ら、WO98/53057, WO98/53058; WO98/53059; WO98/53060 もまた参照のこと。

【0117】

これらの法則の多くは、遍在する転写因子、Sp-1 (Desjarlais および Berg, 1992; 1993) の 3つのフィンガードメインの部位特異的変異誘発によって支持される。これらの法則の 1つは、DNA トリプレットにおける 5' G が、認識ヘリックスの 6 位にアルギニンを取込んでいるジンクフィンガーによって結合され得ることである。別の置換の法則は、サブサイトの間における G が、ジンクフィンガーの 3 位にヒスチジン残基を含むことによって認識され得ることである。さらなる置換の法則は、アスパラギンが、トリプレットの間における A を認識するように取込まれ得、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリンまたはスレオニンが、トリプレットの間における C を認識するように取込まれ得、そして小さい側鎖を有するアミノ酸 (例えば、アラニン) が、トリプレットの間における T を認識するように組み込まれ得ることである。さらなる置換の法 50

10

20

30

40

50

則は、トリプレットサブサイトの3'塩基が、以下のアミノ酸を認識ヘリックスの-1位に取込むことによって認識され得ることである：Gを認識するようにアルギニンを、Aを認識するようにグルタミンを、Cを認識するようにグルタミン酸（またはアスパラギン酸）を、およびTを認識するようにスレオニンを。これらの置換法則は、ジンクフィンガータンパク質の設計において有用であるが、これらは、全ての可能な標的部に配慮しない。さらに、法則の根底にある仮定、すなわちジンクフィンガーにおける特定のアミノ酸が、サブサイトにおける特定の塩基に結合する原因であることは、概算にすぎない。フィンガーにおける近位のアミノ酸の間のコンテキスト依存の相互作用または単一塩基への複数のアミノ酸の結合もしくはその逆は、置換の法則の存在によって予想される結合特異性のバリエーションを生じ得る。従って、特定の実施形態において、予め決定された特異性のZFP-DNA結合ドメインは、共有に係る2000年11月20日に出願された、表題「Iterative Optimization in the Design of Binding Proteins」の米国出願番号09/716,637に記載される方法に従って、得られる。

【0118】

当該分野において公知の任意の適切な方法が、ZFPをコードする核酸を設計および構築するために使用され得る（例えば、ファージディスプレイ、ランダム変異誘発、コンビナトリアルライブラリー、コンピュータ/合理的設計、親和性選択、PCR、cDNAまたはゲノムライブラリーからのクローニング、合成的な構築など）（例えば、米国特許第5,786,538号；Wuら、PNAS 92:344-348 (1995)；Jami 20
esonら、Biochemistry 33:5689-5695 (1994)；Rebar & Pabo, Science 263:671-673 (1994)；Cho & Klug, PNAS 91:11163-11167 (1994)；Choo & Klug, PNAS 91:11168-11172 (1994)；Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993)；Desjarlais & Berg, PNAS 89:7345-7349 (1992)；Pomerantzら、Science 267:93-96 (1995)；Pomerantzら、PNAS 92:9752-9756 (1995)；およびLiuら、PNAS 94:5525-5530 (1997)；Griesman & Pabo, Science 275:657-661 (1997)；Desjarlais & Berg, P 30
NAS 91:11-99-11103 (1994)を参照のこと）。

【0119】

特定の好ましい実施形態において、DNA結合ドメイン（例えば、ZFP-DNA結合ドメイン）の結合特異性は、問題の配列（例えば、細胞のクロマチン中）において接近可能な領域を同定することによって決定される。接近可能な領域は、共有に係る2000年8月28日に出願された「Databases of Accessible Region Sequences；Methods of Preparation and Use Thereof」と表された米国特許出願番号60/228,556に記載されるように決定され得、この開示は、本明細書中で参考として援用される。実施例1もまた参照のこと。次いで、DNA結合ドメインが、接近可能な領域内の標的部に結合するために本明細書中に記載されるように設計および/または選択される。

【0120】

(VI. ジンクフィンガータンパク質の生成)

(A. 合成およびクローニング)

ZFPポリペプチドおよびこのポリペプチドをコードするZFP核酸は、組換え遺伝学の分野において慣用的な技術を用いて作製され得る。一般的方法を開示する基本のテキストとしては、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第2版、1989)；Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990)；およびCurrent Protocols in Molecular 50

Biology (Ausubelら、編 1994) が挙げられる。さらに、約100塩基よりも少ない核酸は、任意の種々の商業的供給源（例えば、The Midland Certified Reagent Company (mcrc@oligos.com)、The Great American Gene Company (http://www.genco.com)、Express Gen Inc. (www.expressgen.com)、Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) からカスタムオーダーされ得る。同様に、ペプチドは、任意の種々の供給源（例えば、Peptidogenic (pkim@ccnet.com)、HTI Bio-products, inc. (http://www.htibio.com)、BMA Biomedicals Ltd (U.K.) Bio. Synthesis, Inc.) からカスタムオーダーされ得る。 10

【0121】

オリゴヌクレオチドは、Van Devanterら、Nucleic Acids Res. 12:6159-6168 (1984) に記載されるように自動化合成機を用いて、最初にBeaucage & Caruthers, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862 (1981) に記載された固相ホスホルアミダイトトリエステル方法に従って、化学的に合成され得る。オリゴヌクレオチドの精製は、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動か、または逆相HPLCのいずれかによる。クローン化された遺伝子の配列および合成オリゴヌクレオチドの配列は、例えば、Wallaceら、Gene 16:21-26 (1981) の二本鎖鋳型の配列決定のためのチェーンターミネーション法を用いたクローニング後、確認され得る。 20

【0122】

2つの代替の方法が、代表的に、新しく設計された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ために使用される。1つのプロトコルは、6つの重複するオリゴヌクレオチドを利用するPCRベースのアセンブリ手段である。3つのオリゴヌクレオチドが、認識ヘリックスの間のDNA結合ドメインの部分をコードする「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、代表的に、全てのジंकフィンガー構築物について一定のままである。他の3つの「特異的な」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、認識ヘリックス上の1位、2位、3位および6位に主にある置換基を含み、これは、それぞれの異なるDNA結合ドメインに特異的である。 30

【0123】

PCR合成は、2工程において実行される。第1に、二本鎖のDNAの鋳型が、低温のアニーリング工程を用いて4サイクルのPCR反応で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）を結合することによって作製され、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「骨格(scaffold)」を形成する。骨格中のギャップは、高忠実度の耐熱性ポリメラーゼによって埋められ、TaqポリメラーゼおよびPfuポリメラーゼの組合せもまた充分である。構築の第2期において、ジंकフィンガーテンプレートは、シャトルベクターまたは直接発現ベクターにクローン化するためにいずれかの末端に制限部位を組込むように設計された外部プライマーによって増幅される。 40

【0124】

新しく設計されたDNA結合タンパク質をクローニングする代替の方法は、所望されるZFPの特定の領域をコードする相補的オリゴヌクレオチドをアニーリングする工程に依存する。この特定の適用は、オリゴヌクレオチドが、最後のライゲーション工程の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設定する前に実行される。簡潔には、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（上記のオリゴ1、2および3）が、その相補的オリゴヌクレオチドと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ルされる。これらの相補的オリゴは、上 50

記のプロトコルにおいてポリメラーゼによって予め埋められた領域を埋めるように設計される。オリゴ1および6に相補的なオリゴヌクレオチドは、以下の工程において選択されたベクターへのクローニングに使用される制限部位に特異的なオーバーハング配列を残すように設計される。第2のアセンブリプロトコルは、以下の局面において、最初のプロトコルと異なる：新しく設計されたZFPをコードする「骨格」は、合成DNAから完全に構成され、これによって、ポリメラーゼ埋め込み工程をはぶき、さらにフラグメントを、増幅を必要としないベクター中にクローン化する。最後に、配列特異的なオーバーハングを残す設計は、挿入フラグメントの制限酵素消化のために必要である。あるいは、ZFP認識ヘリックスに対する変化は、従来の部位特異的な変異誘発方法を用いて作製され得る。

【0125】

10

両方のアセンブリ方法は、新しく設計されたZFPをコードする生じた断片が、ベクター中にライゲーションされることを必要とする。最終的に、ZFPコード配列は、発現ベクター中にクローン化される。通常利用される発現ベクターとしては、改変されたpMAL-c2細菌発現ベクター(New England BioLabs, Beverly, MA)または真核生物発現ベクター、pCDNA(Promega, Madison, WI)が挙げられるが、これらに限定されない。最終構築物は、配列分析によって確認される。

【0126】

当業者に公知のタンパク質精製の任意の適切な方法が、ZFPを精製するために使用され得る(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、発現のために使用され得る。

20

【0127】

細菌株JM109中の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)の発現は、アミロースカラム(New England BioLabs, Beverly, MA)を介して直接精製され得る。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られうる。なぜならば、pMal-c2発現プラスミドにおけるMBP-ZFP融合が、tacプロモーター(New England BioLabs, Beverly, MA)の制御下であるからである。MBP-ZFP融合プラスミドを含む細菌を、 $10\mu\text{M}$ ZnCl_2 、 0.02% グルコースおよび $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンプシリンを含む $2\times\text{YT}$ 培地に接種し、 37°C で振とうする。対数増殖期中期に、IPTGを 0.3mM 添加し、そして培地を振とうする。3時間後、細菌を遠心分離によって収集し、超音波によってか、またはフレンチ圧力細胞またはリゾチームの使用を介して分解し、そして不溶性の材料を、遠心分離によって除いた。MBP-ZFPタンパク質を、アミロース結合樹脂上に捕獲し、 20mM Tris-HCl ($\text{pH}7.5$)、 200mM NaCl 、 5mM DTT および $50\mu\text{M}$ ZnCl_2 を含む緩衝液を用いて強く洗浄し、次いで、本質的に同じ緩衝液中のマルトースで溶出する(精製は、New England BioLabsからの標準的なプロトコルに基づく)。精製されたタンパク質を、定量し、そして生化学的分析のために保存する。

30

40

【0128】

精製されたタンパク質の分解定数(例えば、 K_d)は、代表的に、電気移動度シフトアッセイ(EMSA)(Buratowski & Chodosh, in Current Protocols in Molecular Biology pp. 12.2.1-12.2.7 (Ausubel編、1996)を介して特徴づけされる。親和性は、標識された二本鎖オリゴヌクレオチド標的の固定された量に対して精製された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、代表的に、天然の配列において見出された3bpに近接する天然の結合部位配列を含み、さらに一定の近接する配列を含む。天然の結合部位は、代表的に、3つのフィンガータンパク質について9bpであり、そして6つのフィンガーZFPについて $2\times 9\text{bp}$ +介入塩基である。アニーリングされたオリゴヌ

50

クレオチド標的は、T 4 フェージポリヌクレオチドキナーゼを用いた標的の効果的な標識化を可能にする 1 塩基の 5' オーバーハングを所有する。このアッセイのために、標的を 1 nM 以下の濃度（実際の濃度を、予測される分解定数よりも少なくとも 10 倍低く保つ）にて添加し、精製した ZFP を、種々の濃度で添加し、そして反応を、少なくとも 45 分間平衡まで放置する。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 を含む。

【0129】

平衡化された反応物を、Tris/グリシン緩衝液中で 45 分間予備泳動した 10% ポリアクリルアミドゲル上にロードし、次いで、結合した標識標的および結合していない標識標的を、150 V での電気泳動によって解析する。あるいは、4% のポリアクリルアミド濃縮ゲルを含む 10~20% 勾配 Tris-HCl ゲルが使用され得る。乾燥されたゲルを、オートラジオグラフィーまたはホスホ画像化によって可視化し、そして見かけ上の K_d を、最大の半分の結合を生じるタンパク質濃度を計算することによって測定する。

【0130】

このアッセイはまた、タンパク質調製における活性画分の測定を含み得る。活性画分は、化学量論的なゲルシフトによって測定され、ここで、タンパク質は、高濃度の標的 DNA に対して滴定される。滴定は、標的の 100、50 および 25% で実行される（通常は、マイクロモル濃度レベルで）。

【0131】

(B. フェージディスプレイ)

フェージディスプレイの技術は、所望される標的特異性を有するジンクフィンガータンパク質を生成する非常に経験的な方法を提供する（例えば、Rebar, 米国特許第 5,789,538 号; Choo ら、WO 96/06166; Barbass ら、WO 95/19431 および WO 98/54311; Jamieson ら、前出）。この方法は、合理的な設計と組み合わせてか、または代替として使用され得る。この方法は、変異誘発されたジンクフィンガータンパク質の多様なライブラリーの生成、続いて、親和性選択方法を用いて所望される DNA 結合特性を有するタンパク質の単離を含む。この方法の使用のために、実験者は、代表的に以下のように進める。第一に、ジンクフィンガータンパク質の遺伝子を、変異誘発して、結合特異性および/または親和性について重要な領域に多様性を導入する。代表的な適用において、これは、-1 位、+2 位、+3 位、および +6 位での単一のフィンガー、およびいくつかの場合、付属の位置（例えば、+1 位、+5 位、+8 位、および +10 位）でのランダム化を介して達成される。次に、変異誘発させた遺伝子を、コートタンパク質 pIII をコードする線維状フェージの遺伝子 III との融合物としてフェージベクターまたはフェージミドベクター中にクローン化する。ジンクフィンガータンパク質は、膜輸出シグナルペプチドをコードする遺伝子 III のセグメントと pIII の残りとの間に挿入され、その結果、ジンクフィンガータンパク質は、pIII とアミノ末端融合物または成熟したプロセシングされたタンパク質として発現される。フェージミドベクターを使用する場合、変異誘発されたジンクフィンガー遺伝子はまた、pIII をフェージ粒子中にアセンブリするために必要とされる C 末端領域を最小限コードする短縮型バージョンの遺伝子 III と融合され得る。生じたベクターライブラリーは、E. coli に形質転換され、そしてコートタンパク質 pIII との融合物としてその表面上に種々のジンクフィンガータンパク質を発現する線維状フェージを生産するために使用される。フェージミドベクターが使用される場合、この工程は、ヘルパーフェージを用いた重感染を必要とする。次いで、このフェージライブラリーを、標的の DNA 部位とインキュベートし、そして親和性選択方法を用いて、大量のフェージから高い親和性で標的と結合するフェージを単離する。代表的に、DNA 標的を、固体支持上に固定化し、次いで、最も強固に結合しているフェージの他は全て除去するに十分な条件下で洗浄する。洗浄後、支持体上に残っている任意のフェージを、ジンクフィンガーと DNA の結合を分解する条件下で、溶出を介して回収する。回収したフェージを、新たに E. coli を

感染するために使用し、次いで、これを増幅し、そして新しいバッチのファージ粒子を生産するために使用する。次いで、選択および増幅を、強固な結合物についてファージプールを富化するために必要なだけ何度も繰り返し、その結果、これらは、配列決定および／または配列決定方法を用いて同定され得る。この方法は、p I I I 融合物のために例示されているが、類似の原理が、p V I I I 融合物としてZ F P 改変体をスクリーニングするために使用され得る。

【0132】

特定の実施形態において、特定のジンクフィンガータンパク質によって結合された配列を、タンパク質とランダム化二本鎖オリゴヌクレオチド配列のプールとの間の結合反応（例えば、K d の測定のための条件、前出を参照のこと）を行なうことによって測定する。結合反応は、電気泳動移動度シフトアッセイ（E M S A）によって分析され、ここで、タンパク質-D N A 複合体は、ゲル中で移動が遅れ、そして結合していない核酸から分離され得る。フィンガーに結合しているオリゴヌクレオチドは、ゲルから精製され、そして例えば、ポリメラーゼ連鎖反応によって、増幅される。次いで、この選択（すなわち、結合反応およびE M S A 分析）を、選択されたオリゴヌクレオチド配列を用いて、所望されるだけ何度も繰り返す。この方法において、特定のアミノ酸配列を有するジンクフィンガータンパク質の結合特異性が、測定される。

【0133】

（C. 調節ドメイン）

ジンクフィンガータンパク質は、しばしば、融合タンパク質として外因性ドメイン（またはその機能性フラグメント）とともに発現される。Z F P に加えられるための通常のドメインとしては、例えば、転写因子ドメイン（アクチベーター、リプレッサー、コアクチベーター、コリプレッサー）、サイレンサー、発癌遺伝子（例えば、m y c、j u n、f o s、m y b、m a x、m a d、r e l、e t s、b c l、m y b、m o s のファミリーメンバーなど）；D N A 修復酵素ならびにこれらの関連因子および修飾因子；D N A 再構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）；そしてD N A 改変酵素（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が挙げられる。Z F P が標的遺伝子の発現を抑制するのに使用される場合、Z F P との融合に好ましいドメインは、ヒトK O X - 1 タンパク質由来のK R A B 抑制ドメインである。(Th i e s e n ら、New B i o l o g i s t 2、363-374 (1990)；M a r g o l i n ら、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 91、4509-4513 (1994)；P e n g u e ら、N u c l. A c i d s R e s. 22:2908-2914 (1994)；W i t z g a l l ら、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 91、4514-4518 (1994))。活性化を達成するための好ましいドメインとしては、H S V V P 16 活性化ドメイン（例えば、H a g m a n n ら、J. V i r o l. 71、5952-5962 (1997)を参照のこと）核ホルモンレセプター（例えば、T o r c h i a ら、C u r r. O p i n. C e l l. B i o l. 10:373-383 (1998)を参照のこと）；核因子κ B の p 6 5 サブユニット (B i t k o & B a r i k、J. V i r o l. 72:5610-5618 (1998)およびD o y l e & H u n t、N e u r o r e p o r t 8:2937-2942 (1997))；L i u ら、C a n c e r G e n e T h e r. 5:3-28 (1998))、または、V P 64 のような人工的なキメラ機能性ドメイン (S e i f p a l ら、E M B O J. 11、4961-4968 (1992)) が挙げられる。

【0134】

V E G F 遺伝子中の新規の配列とアクセス可能領域（例えば、D N a s e I 過敏性部位）との同一性は、新脈管形成の調節を促進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、V E G F 遺伝子の1つ以上の調節領域を特異的に標的化するD N A 結合ドメインと機能性（例えば、抑制ま

10

20

30

40

50

たは活性化)ドメインとの間の融合物(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。このように、抑制ドメインまたは活性化ドメインは、DNA結合ドメインによって結合されるVEGF遺伝子中の配列の近くに置かれる。次いで、機能性ドメインの転写調節機能は、VEGF調節配列に作用し得る。

【0135】

さらなる実施形態において、「Targeted Modification of Chromatin Structure,」と表題された共同所有の米国特許出願に記載されるような、標的化されたクロマチンのリモデリングは、DNA結合分子の結合にアクセス可能な細胞内クロマチンにおける1つ以上の部位を産生するのに使用され得る。

【0136】

融合分子は、当業者に周知であるクローニング法および生物化学的な結合方法によって構成される。融合分子は、DNA結合ドメインおよび機能性ドメイン(例えば、転写活性化ドメインまたは転写抑制ドメイン)を含む。融合分子はまた、必要に応じて核局在化シグナル(例えば、SV40媒体T抗原由来のシグナル)およびエピトープタグ(例えば、FLAGおよび赤血球凝集素)を含む。融合タンパク質(およびそれらをコードする核酸)は、翻訳レーディングフレームが、この融合物の成分の間で保存されるように設計される。

【0137】

一方における機能性ドメイン(またはこれらの機能性フラグメント)のポリペプチド成分と他方における非タンパク質DNA結合ドメイン(例えば、抗生物質、インターカレーター(intercalator)、副溝バインダー、核酸)との間の融合物は、当業者に公知の生物化学的結合方法によって構成される。例えば、Pierce Chemical Company(Rockford, IL)のカatalogを参照のこと。副溝バインダーとポリペプチドとの間の融合物を作製する方法および組成物が、記載されている。Mappら(2000)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3930-3935。

【0138】

本明細書中に開示される融合分子は、VEGF遺伝子の標的部位に結合するDNA結合ドメインを含む。特定の実施形態において、この標的部位は、細胞内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、例えば、共同所有された米国特許出願番号第60/228,556号に記載されるように決定され得る。この標的部位が、細胞内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が、発明の名称「Targeted Modification of Chromatin Structure,」の共有にかかる米国特許出願に記載されるように作製され得る。さらなる実施形態において、融合分子のDNA結合ドメインは、その標的部位がアクセス可能な領域にあるか否かにかかわらず、細胞内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。この型の「先駆的な(pioneer)」DNA結合ドメインの例は、特定のステロイドレセプターおよび肝細胞核因子3(HNF3)に見出される。Cordinleyら(1987)Cell 48:261-270; Pinaら(1990)Cell 60:719-731; およびCirilloら(1998)EMBO J. 17:244-254。

【0139】

このような適用のために、融合分子は、当業者に公知のように、薬学的に受容可能なキャリアとともに典型的に処方される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第17版、1985; および共同所有のWO00/42219を参照のこと。

【0140】

融合分子の機能性成分/ドメインは、融合分子が、一旦そのDNA結合ドメインを介して標的配列に結合すると、遺伝子の転写に影響し得る種々の異なる成分のいずれかから選択

10

20

30

40

50

され得る。従って、この機能性成分としては、アクチベーター、リプレッサー、コアクチベーター、コリプレッサー、およびサイレンサーのような種々の転写因子ドメインが挙げられ得るが、これらに限定されない。

【0141】

例えば、遺伝子の発現を抑制するのに使用されるべきDNA結合ドメイン（例えば、ZFP）と融合する例示的な機能性ドメインは、ヒトKOX-1タンパク質由来のKRAB抑制ドメインである。（例えば、Thiesenら、New Biologist 2、363-374（1990）；Margolinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91、4509-4513（1994）；Pengueら、Nucl. Acids Res. 22：2908-2914（1994）；Witzgallら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91、4514-4518（1994）を参照のこと）。別の適切な抑制ドメインは、メチル結合ドメインタンパク質2B（MBD-2B）である（MBDタンパク質の説明のために、Hendrichら（1999）Mamm Genome 10：906-912をまた参照のこと）。別の有用な抑制ドメインは、v-ErbAタンパク質に関連するドメインである。例えば、Dammら（1989）Nature 339：593-597；Evans（1989）Int. J. Cancer Suppl. 4：26-28；Painら（1990）New Biol. 2：284-294；Sapら（1989）Nature 340：242-244；Zenkeら（1988）Cell 52：107-119；およびZenkeら（1990）Cell 61：1035-1049を参照のこと。

【0142】

活性化を達成するための適切なドメインとしては、HSV VP16活性化ドメイン（例えば、Hagmannら、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ら、Curr. Opin. Cell Biol. 10：373-383（1998））；核因子κBのp65サブユニット（Bitko&Barik、J. Virol. 72：5610-5618（1998））およびDoyle&Hunt、Neuroreport 8：2937-2942（1997））；Liuら、Cancer Gene Ther. 5：3-28（1998））、あるいは、VP64のような人工的なキメラ機能性ドメイン（Seifpalら、EMBO J. 11、4961-4968（1992））が挙げられる。

【0143】

さらなる例示的な活性化ドメインとしては、VP16、VP64、p300、CBP、PCAF、SRC1、PvALF、AtHD2AおよびERF-2が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Robyrら（2000）Mol. Endocrinol. 14：329-347；Collingwoodら（1999）J. Mol. Endocrinol. 23：255-275；Leoら（2000）Gene 245：1-11；Manteuffel-Cymborowska（1999）Acta Biochim. Pol. 46：77-89；McKennara（1999）J. Steroid Biochem. 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、OSGAL、HALF-1、C1、AP1、ARF-5、ARF-6、ARF-7、およびARF-8、CPRF1、CPRF4、MYC-RP/GP、およびTRAB1が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Ogawaら（2000）Gene 245：21-29；Okunamiら（1996）Genes Cells 1：87-99；Goffら（1991）Genes Dev. 5：298-309；Choら（1999）Plant Mol. Biol. 40：419-429；Ulmasonら（1999）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96：5844-5849；Sprenger-Hausseisら（2000）Plant J. 22：1-8；Gongら（1999）Plant Mol. Biol.

41:33-44; およびHobora (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:15, 348-15, 353を参照のこと。

【0144】

さらなる例示的な抑制ドメインとしては、KRAB、SID、MBD2、MBD3、DNMTファミリーのメンバー（例えば、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B）、Rb、およびMeCP2が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Birdら (1999) Cell 99:451-454; Tylerら (1999) Cell 99:443-446; Knoepflerら (1999) Cell 99:447-450; およびRobertsonら (2000) Nature Genet. 25:338-342を参照のこと。さらなる例示的な抑制ドメインとしては、ROM2およびAtHD2A
Cell 8:305-321; およびWuら (2000) Plant J. 22:19-27を参照のこと。 10

【0145】

さらなる機能性ドメインは、例えば、共同所有されるWO 00/41566に記載される。

【0146】

(D. 発現ベクター)

選択したZFPをコードする核酸は、複製および／または発現（例えば、Kdの決定）のための原核生物細胞または真核生物細胞に形質転換するための中間ベクターに典型的にクローニングされる。中間ベクターは、ZFP、またはタンパク質の生成物をコードする核酸の貯蔵または操作のための典型的な原核生物ベクター（例えば、プラスミド、またはシャトルベクター、または昆虫ベクター）である。ZFPをコードする核酸はまた、植物細胞、動物細胞、好ましくは哺乳動物細胞またはヒト細胞、真菌細胞、細菌細胞、あるいは原生動物細胞に投与するための発現ベクターに典型的にクローニングされる。 20

【0147】

クローニングされた遺伝子または核酸の発現を得るために、ZFPは、直接転写のためのプロモーターを含む発現ベクターに典型的にサブクローニングされる。適切な細菌プロモーターおよび真核生物プロモーターは、当該分野において周知であり、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第2版、1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); およびCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、1994)に記載される。ZFPを発現するための細菌発現系は、例えば、E. coli、Bacillus sp. およびSalmonella (Palvaら、Gene 22:229-235 (1983)) に関して入手可能である。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、および昆虫細胞についての真核生物発現系は、当該分野において周知であり、また、市販されている。 30

【0148】

ZFP核酸の直接発現に使用されるプロモーターは、特定の用途に依存する。例えば、強い構成性プロモーターは、ZFPの発現および精製に典型的に使用される。対照的に、ZFPが遺伝子調節のためにインビボに投与される場合、構成性プロモーターか、誘導性プロモーターのいずれかが使用され、ZFPの特定の使用に依存する。さらに、ZFPの投与のための好ましいプロモーターは、類似の活性を有するHSV TKまたはプロモーターのような弱いプロモーターであり得る。このプロモーターは、典型的には、トランス活性化に応答性のエレメントをまた、含み得る（例えば、低酸素応答エレメント、Gal4応答エレメント、lac抑制応答エレメント、およびtet調節系およびRU-486系のような低分子制御系（例えば、Gossen & Bujard、PNAS 89:5547 (1992); Oliginoら、Gene Ther. 5:491-496 (1998); Wangら、Gene Ther. 4:432-441 (1997); Neeri 40

ngら、Blood 88:1147-1155 (1996) ; および Rendahlら、Nat. Biotechnol. 16:757-761 (1998) を参照のこと)。

【0149】

プロモーターに加え、発現ベクターは、原核生物または真核生物のいずれかの宿主細胞における核酸の発現に必要な全ての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典型的に含む。従って、典型的な発現カセットは、(例えば、ZFPをコードする核酸配列に) 作動可能に連結されるプロモーター、および(例えば、転写物の有効なポリアダニル化、転写終止部位、リボソーム結合部位、または翻訳終止部位に) 必要とされるシグナルを含む。カセットのさらなるエレメントとしては、例えば、エンハンサー、および外因性スプライシングイントロンシグナルが挙げられ得る。

10

【0150】

細胞内に遺伝子情報を輸送するのに使用される特定の発現ベクターは、ZEPの意図される使用に関して選択される。標準の細菌性発現ベクターとしては、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。好ましい融合タンパク質は、マルトース結合タンパク質「MBP」である。このような融合タンパク質は、ZFPの精製に使用される。エピトープタグはまた、発現をモニタリングするため、ならびに細胞性局在および亜細胞性局在をモニタリングするための好都合な単離方法を提供するための組換えタンパク質に添加され得る(例えば、c-mycまたはFLAG)。

【0151】

真核生物ウイルス由来の調節エレメントを含む発現ベクターは、しばしば、真核生物発現ベクター(例えば、SV40ベクター、パピローマウイルスベクター、およびエプスタインバーウイルス由来のベクター)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、pAV009/A+、pMTO10/A+、pMAMneo-5、バキュロウイルスpDSVE、ならびに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有効であることが示された他のプロモーターの配向下で、タンパク質を発現し得る任意の他のベクターが挙げられる。

20

【0152】

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還元酵素のような安定にトランスフェクトされた細胞株を選択するためのマーカーを有する。ポリヘドリンプロモーターまたは他の強力なバキュロウイルスプロモーターの指向下のZFPコード配列と共に、昆虫細胞においてバキュロウイルスベクターを使用するような高収率の発現系はまた、適切である。

30

【0153】

発現ベクターに典型的に含まれるエレメントとしてはまた、E. coli中で機能するレプリコン、組換えプラスミドを保有する細菌を選択し得る抗生物質耐性をコードする遺伝子、および組換え体配列の挿入を可能にするためのプラスミドの本質的ではない領域における独特な制限部位が挙げられる。

40

【0154】

標準的なトランスフェクション方法は、大量のタンパク質を発現する、細菌細胞株、哺乳動物細胞株、酵母細胞株または昆虫細胞株を産生するのに使用され、次いで、これらの細胞株は、標準的な技術を使用して精製される(例えば、Colleyら、J. Biol. Chem. 264:17619-17622 (1989) ; Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, vol. 182 (Deutscher (編)、1990) 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(例えば、Morrison、J. Bact. 132:349-351 (1977) ; Clark-CurtissおよびCurtiss、Methods in Enzymology 101:347-362

50

(Wuら(編)、1983)を参照のこと)に従って実施される。

【0155】

外来性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周知の手順が、使用され得る。これらの手順としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリブレン、プロトプラスト融合、電気泳動、リポソーム、マイクロインジェクション、裸のDNA、プラスミドベクター、ウイルスベクター(エピソード型および組み込み型の両方)、ならびにクローニングされたゲノムDNA、cDNA、合成DNAまたは他の外来性ゲノム物質を宿主細胞に導入する他の周知の方法のいずれか(例えば、Sambrookら、(前出)を参照のこと)の使用が挙げられる。特定の遺伝子操作の手順を使用して、少なくとも一つの遺伝子を、選択したタンパク質を発現し得る宿主細胞中に首尾よく導入し得ることのみが、必要である。 10

【0156】

(V.I. アッセイ)

一旦ZFPが直上の手順に従って設計および調製されると、この設計されたZFPの活性の最初の評価が行われる。次いで、目的の遺伝子の発現を調節する能力を示すZFPタンパク質は、ZFPが設計された特定の用途に基づくより特定の活性についてさらにアッセイされ得る。従って、例えば、本明細書中で提供されるZFPは、VEGF発現を調節するそれらの能力について最初にアッセイされ得る。次いで、新脈管形成を調節するためにおよび/または虚血を処置するためのZFPの能力のより特定のアッセイが、典型的になされる。これらのより特定のアッセイの説明は、IX章の下方に示される。 20

【0157】

特定のZFPの活性は、例えば、免疫学的アッセイ(例えば、ELISAおよび抗体を用いる免疫組織化学アッセイ)、ハイブリダイゼーションアッセイ(例えば、RNase保護研究、Northern研究、インサイチュハイブリダイゼーション研究、オリゴヌクレオチドアレイ研究)、比色アッセイ、増幅アッセイ、酵素活性アッセイ、腫瘍増殖アッセイ、表現型アッセイなどを使用して、例えば、タンパク質レベルまたはmRNAレベル、産物レベル、酵素活性、腫瘍増殖;転写活性化またはレポーター遺伝子の抑制;セカンドメッセンジャーレベル(例えば、cGMP、cAMP、IP3、DAG、Ca²⁺) ;サイトカイン生成レベルおよびホルモン生成レベル;ならびに新脈管形成を測定することによる、種々のインビトロアッセイおよびインビボアッセイを使用して評価され得る。 30

【0158】

ZFPは、典型的には、培養細胞(例えば、293細胞、CHO細胞、VERO細胞、BHK細胞、HeLa細胞、COS細胞など)を使用してインビトロでの活性について最初に試験される。好ましくは、ヒト細胞が使用される。ZFPは、しばしば、レポーター遺伝子を有する一過性の発現系を使用して、最初に試験され、次いで、標的内因性遺伝子の調節は、インビボおよびエキソビボの両方で、細胞および動物にて試験される。このZFPは、細胞内で組換え的に発現され得るか、動物に移植された細胞内で組換え的に発現され得るか、またトランスジェニック動物において組換え的に発現され得、そして以下に記載の送達ビヒクルを使用して動物または細胞にタンパク質として投与され得る。細胞は、不死化され得るか溶液中であり得るか、動物に注入され得るか、またはトランスジェニック動物もしくは非トランスジェニック動物において天然に存在し得る。 40

【0159】

遺伝子発現の調節は、本明細書中に記載のインビトロアッセイまたはインビボアッセイのうちの1つを使用して試験される。サンプルまたはアッセイは、ZFPで処理され、そして調節の程度を調べるために未処理のコントロールサンプルと比較される。上記のように、内因性遺伝子発現の調節のために、ZFPは、200nM以下のKd、より好ましくは、100nM以下、より好ましくは50nM、最も好ましくは、25nM以下のKdを典型的に有する。

【0160】

ZFPの効果は、上記の任意のパラメータを試験することによって測定され得る。任意の 50

適切な遺伝子発現、表現型、または生理学的な変化が、ZFPの影響を評価するのに使用され得る。機能的な結果が、インタクトな細胞または動物を使用して決定される場合、腫瘍の増殖、創傷治癒、新生血管形成、ホルモン放出、公知の遺伝子マーカーおよび特徴づけされていない遺伝子マーカーの両方に対する転写変化（例えば、ノーザンブロット研究またはオリゴヌクレオチドアレイ研究）、細胞増殖またはpH変化のような細胞代謝における変化、ならびにcGMPのような細胞内セカンドメッセンジャーにおける変化のような種々の効果がまた、測定され得る。

【0161】

内因性遺伝子発現のZFP調節のための好ましいアッセイは、インビトロで実施され得る。1つの好ましいインビトロアッセイ様式において、培養細胞における内因性遺伝子発現のZFP調節は、ELISAアッセイを使用して、タンパク質産物を試験することによって測定される。この試験サンプルは、別の遺伝子を標的化する、ZFPコード配列を欠くベクターまたは関連しないZFPをコードするベクターで処理されるコントロール細胞と比較される。

【0162】

別の実施形態において、内因性遺伝子発現のZFP調節は、標的遺伝子mRNA発現のレベルを測定することによって、インビトロで決定される。遺伝子発現のレベルは、増幅（例えば、PCR、LCR）、またはハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、ノーザンハイブリダイゼーション）、ドットブロッティングならびにRNase保護を使用して測定される。定量的なRT-PCR技術の使用（すなわち、TaqManアッセイと呼ばれる）はまた、転写物のレベルを定量化するのに使用され得る。タンパク質またはmRNAのレベルは、本明細書中に記載されるように、直接的にまたは間接的に標識される検出剤（例えば、蛍光標識される核酸または放射活性標識される核酸、放射活性標識される抗体または酵素学的に標識される抗体など）を使用して検出される。このような方法はまた、Gelfandに対する米国特許第5,210,015号、Livakらに対する米国特許第5,538,848号およびHaalandに対する米国特許第5,863,736号、およびHeid、C. A. ら、Genome Research、6:986-994（1996）；Gibson、U. E. M. ら、Genome Research 6:995-1001（1996）；Holland、P. M. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280、（1991）；およびLivak、K. J. ら、PCR Methods and Applications 357-362（1995）（これらの各々は、その全体が参考として援用される）に記載される。

【0163】

あるいは、レポーター遺伝子系は、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質、CAT、またはβ-galのようなレポーター遺伝子に作動可能に結合されたVEGF遺伝子プロモーターを使用して誘導され得る。このレポーター構築物は、典型的には、培養細胞内に同時トランスフェクトされる。選択したZFPでの処理後、レポーター遺伝子転写、翻訳、または活性の量が、当業者に公知の標準的な技術に従って測定される。

【0164】

内因性遺伝子発現のZFP調節をモニタリングするために有用な好ましいアッセイ様式の別の例は、インビボで実施される。このアッセイは、新生血管形成を介して、腫瘍支持体に含まれるVEGFのような遺伝子を試験するために特に有用である。このアッセイにおいて、選択したZFPを発現する培養腫瘍細胞は、無胸腺症マウス、照射マウス、またはSCIDマウスのような免疫欠損マウスに皮下注射される。適切な期間（好ましくは4～8週間）後、腫瘍の増殖は、例えば、容積もしくはその2つの最大直径によって測定され、コントロールと比較される。腫瘍が、統計学的に有意な減少（例えば、Student T試験を使用して）を示すことは、増殖が阻害されていることを指す。あるいは、腫瘍新生血管形成の程度がまた、測定され得る。内皮細胞特異的抗体を使用する免疫アッセイが、腫瘍の新生血管形成および腫瘍中の血管の数を染色するのに使用される。腫瘍が、血

10

20

30

40

50

管の数に（例えば、Student Tテストを使用して）統計学的に有意な減少を示すということは、新生血管形成が阻害されているということである。

【0165】

トランスジェニック動物および非トランスジェニック動物はまた、インビボでのVEGF遺伝子発現の調節を試験するのに使用される。トランスジェニック動物は、典型的には、選択したZFPを発現する。あるいは、選択したZFPを一過性に発現する動物、またはZFPが送達ビヒクルにて投与される動物が、使用され得る。内因性遺伝子発現の調節は、本明細書中に記載されるアッセイのいずれか1つを使用して試験される。

【0166】

（V I I I . 薬学的組成物）

本明細書中に提供されるZFP、およびより典型的には、これらをコードする核酸は、必要に応じて、薬学的組成物として薬学的に受容可能なキャリアとともに処方され得る。

【0167】

（A . 核酸ベースの組成物）

従来のウイルスベースの遺伝子および非ウイルスベースの遺伝子の移入方法は、哺乳動物細胞または標的組織に本発明のZFPをコードする核酸を導入するために使用され得る。このような方法は、インビトロで、ZFPをコードする核酸を細胞へ投与するのに使用され得る。いくつかの例において、ZFPをコードする核酸は、インビボまたはエキソビボでの遺伝子治療の使用のために投与される。非ウイルスベクター送達系としては、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、DNAウイルスおよびRNAウイルスが挙げられ、これらは、細胞への送達後、エピソーム性ゲノムか組み込まれたゲノムのいずれかを有する。遺伝子治療手段の総説については、Anderson、Science 256 : 808-813 (1992) ; Nabel & Felgner、TIBTECH 11 : 211-217 (1993) ; Mitani & Caskey、TIBTECH 11 : 162-166 (1993) ; Dillon、TIBTECH 11 : 167-175 (1993) ; Miller、Nature 357 : 455-460 (1992) ; Van Brunt、Biotechnology 6 (10) : 1149-1154 (1988) ; Vigne、Restorative Neurology and Neuroscience 8 : 35-36 (1995) ; Kremer & Perricaudet、British Medical Bulletin 51 (1) : 31-44 (1995) ; Haddadら、in Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Boehm (編) (1995) ; およびYura、Gene Therapy 1 : 13-26 (1994) を参照のこと。

【0168】

本明細書中に提供されるZFPをコードする核酸の非ウイルス性送達の方法としては、リポフェクション、マイクロインジェクション、微粒子銃、ビロゾーム、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオンもしくはリポド：核酸結合体、裸のDNA、人工ビリオン、および薬剤で増強させた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 ; および同第4,897,355号に記載され、そしてリポフェクション試薬は、市販されている（例えば、TransfectamTM およびLipofectinTM）。ポリヌクレオチドの有効なレセプター認識リポフェクションに適切なカチオン性リポドおよび中性リポドとしては、Felgner、WO 91/17424、WO 91/16024のリポドが挙げられる。送達は、細胞（エキソビボ投与）または標的組織（インビボ投与）へなされ得る。

【0169】

免疫リポド複合体のような標的化されたリポソームを含むリポド：核酸複合体の調製は、当業者に周知である（例えば、Crystal、Science 270 : 404-410 (1995) ; Blaeseら、Cancer Gene Ther. 2 : 291-2

10

20

30

40

50

97 (1995); Behrら、Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994); Remyら、Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994); Gaoら、Gene Therapy 2:710-722 (1995); Ahmadら、Cancer Res. 52:4817-4820 (1992); 米国特許第4, 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)。

【0170】

操作されたZFPをコードする核酸の送達のためのRNAウイルスベース系またはDNAウイルスベース系の使用は、体内における特定の細胞に対するウイルスの標的化、および核へのウイルスペイロードの輸送のための高度に進化された工程を利用する。ウイルスベクターは、患者に直接的に投与され得る（インビボ）か、またはインビトロで細胞を処理するために使用され得、そして改変された細胞は、患者に投与される（エキソビボ）。ZFPの送達のための従来のウイルスベースの系としては、遺伝子移入のためのレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよび単純ヘルペスウイルスベクターが挙げられ得る。ウイルスベクターは、現在、標的細胞および標的組織への遺伝子移入の最も有効で用途の広い方法である。宿主ゲノムへの組み込みは、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の遺伝子移入方法を用いて可能であり、しばしば、挿入される導入遺伝子の長期間の発現をもたらす。さらに、高い形質転換効率は、多くの異なる細胞型および標的組織において観察される。

【0171】

レトロウイルスの親和性は、外来のエンベロープタンパク質を取りこみ、標的細胞の潜在的な標的集合を拡張することによって変化され得る。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞を形質転換または感染し得、典型的に高いウイルス力価を生成するレトロウイルスベクターである。従って、レトロウイルス遺伝子移入系の選択は、標的組織に依存し得る。レトロウイルスベクターは、6~10 kbまでの外来配列をパッケージングする能力を有するcis作用性長末端反復から構成される。この最小のcis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、これらは永久的な導入遺伝子発現を提供するために標的細胞中に治療遺伝子を組み込むために使用される。広範に使用されるレトロウイルスベクターとしては、マウスの白血病ウイルス（MuLV）、テナガザル様白血病ウイルス（GaLV）、サル免疫不全ウイルス（SIV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、およびこれらの組合せに基づくベクターが挙げられる（例えば、Buchscherら、J. Virol. 66:2731-2739 (1992); Johannら、J. Virol. 66:1635-1640 (1992); Sommerfeltら、Virol. 176:58-59 (1990); Wilsonら、J. Virol. 63:2374-2378 (1989); Millerら、J. Virol. 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700を参照のこと)。

【0172】

ZFPの一過性の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、典型的に使用される。アデノウイルスベースのベクターは、多くの細胞型において非常に高い形質転換効率であり得、細胞分裂を必要としない。このようなベクターによって、高い力価および発現レベルが得られる。このベクターは、比較的単純な系において、大量に生産され得る。アデノ随伴ウイルス（「AAV」）ベクターはまた、標的核酸を用いて細胞を形質転換するために（例えば、核酸およびペプチドのインビトロ生産、ならびにインビボおよびエキソビボの遺伝子治療手段のために）使用され得る（例えば、Westら、Virology 160:38-47 (1987); 米国特許第4, 797, 368号; WO 93/24641; Kotin、Human Gene Therapy 5:793-801 (1994); Muzyczka、J. Clin. Invest. 94:135

1 (1994)を参照のこと)。組換えAAVベクターの構築は、米国特許第5, 173, 414号; Tratschinら、Mol. Cell. Biol. 5: 3251-3260 (1985); Tratschinら、Mol. Cell. Biol. 4: 2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka、PNAS 81: 6466-6470 (1984); および Samulskiら、J. Virol 63: 03822-3828 (1989)を含む、多くの公開物に記載される。

【0173】

特に、少なくとも6つのウイルスベクターアプローチは、断然もっとも頻繁に使用される系であるレトロウイルスベクターとともに、臨床試験において遺伝子移入のために現在利用可能である。全てのそれらのウイルスベクターは、形質導入試薬を生成するためのヘルパー細胞株へ挿入された遺伝子による欠損ベクターの補完を含む、アプローチを利用する。

【0174】

例であるpLASNおよびMFG-Sは、臨床試験に使用されるレトロウイルスベクターである(Dunbarら、Blood 85: 3048-305 (1995); Kohnら、Nat. Med. 1: 1017-102 (1995); Malechら、PNAS 94: 2212133-12138 (1997))。PA317/pLASNは、遺伝子治療試験において使用される第1の治療的ベクターであった(Blaeseら、Science 270: 475-480 (1995))。50%以上の形質導入効率が、MFG-Sパッケージベクターについて確認された(Ellemら、Immunol Immunother. 44(1): 10-20 (1997); Dranoffら、Hum. Gene Ther. 1: 111-2 (1997))。

【0175】

組換えアデノ随伴ウイルスベクター(rAAV)は、欠損および非病原性パルボウイルスのアデノ随伴ウイルス2型に基づいた別の代替の遺伝子送達系である。全てのベクターは、導入遺伝子の発現カセットに隣接するAAVの145bpの逆方向末端反復配列のみを保持する、プラスミドから誘導される。形質導入細胞のゲノムへの組み込みに起因する有効な遺伝子移入および適切な導入遺伝子送達は、このベクター系の重要な特徴である(Wagnerら、Lancet 351: 9117-1702-3 (1998)、Kearnsら、Gene Ther. 9: 748-55 (1996))。

【0176】

複製-欠損組換えアデノウイルスベクター(Ad)は、高い力価で生産され得、そして多数の異なる細胞型に容易に感染するので、結腸癌の遺伝子治療のために主に使用される。ほとんど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E3遺伝子を置換し; 引き続いて複製欠損ベクターを、トランスで欠落した遺伝子機能を供給するヒト293細胞に伝播するように操作される。Adベクターは、インビボで非分裂細胞、分化細胞(例えば肝臓、腎臓および筋肉系組織中に見出させるそれら)を含む多数の組織型に形質導入し得る。通常のAdベクターは、大きな保持能力を有する。臨床試験におけるAdベクターの使用の例は、筋内注射での抗腫瘍性の免疫のためのポリヌクレオチド治療を含む(Stermanら、Hum. Gene Ther. 7: 1083-9 (1998))。臨床試験における遺伝子移入のためのアデノウイルスベクターの使用のさらなる例は、以下に挙げられる: Rosenackerら、Infection 24: 15-10 (1996); Stermanら、Hum. Gene Ther. 9: 71083-1089 (1998); Welshら、Hum. Gene Ther. 2: 205-18 (1995); Alvarezら、Hum. Gene Ther. 5: 597-613 (1997); Topfら、Gene Ther. 5: 507-513 (1998); Stermanら、Hum. Gene Ther. 7: 1083-1089 (1998)。

【0177】

パッケージ細胞は、宿主細胞を感染し得るウイルス粒子の形成のために使用される。この

ような細胞は、アデノウイルスをパッケージする293細胞、そしてレトロウイルスをパッケージするψ2細胞またはPA317細胞を含む。遺伝子治療に使用されるウイルスベクターは、ウイルス粒子中へ核酸ベクターをパッケージする産生細胞株によってたいいて生成される。ベクターは、代表的にパッケージおよび引き続く宿主への組み込みに必要な最小のウイルス配列、発現されるべきタンパク質のため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。不足するウイルス機能は、パッケージ細胞株によって、トランスにおいて供給される。例えば、遺伝子治療において使用されるAAVベクターは、典型的にパッケージすること、そして宿主ゲノムへの組み込みに必要とされる、AAVゲノムからのITR配列のみを有する。ウイルスDNA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細胞株中にパッケージされる。細胞株はまた、ヘルパーとしてアデノウイルスに感染される。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由来の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されない。アデノウイルスとのコンタミネーションは、例えば、アデノウイルスはAAVよりも敏感であるので、例えば、熱治療によって減少し得る。

10

【0178】

多くの遺伝子治療用途において、遺伝子治療ベクターは、特定の組織型に対する高度な特異性で送達されることが望ましい。ウイルスベクターは、ウイルスの外側の表面上のウイルス性コートタンパク質との融合タンパク質としてのリガンドを発現することによって、与えられる細胞型に対する特異性を有するように、典型的に改変される。リガンドは、目的の細胞型上に存在すると公知のレセプターに対する親和性を有するように選択される。例えば、Hanら、PNAS 92:9747-9751(1995)は、モロニーマウス白血病ウイルスは、gp70に融合されるヒトヒレグリン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対にまで拡張され得る。例えば、糸状ファージは、実質的に任意に選ばれる細胞レセプターに対する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）を表示するように操作され得る。上記の記述は、主にウイルスベクターに適用するにもかかわらず、同じ原理が、非ウイルスベクターにも適用され得る。このようなベクターは、特定の標的細胞による取り込みに有利であると考えられる特定の取り込み配列を含むように操作され得る。

20

30

【0179】

遺伝子治療ベクターは、個々の患者への投与（典型的に全身投与）（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下または頭蓋内注入）、または以下に記載されるような局所適用によって、インビボで送達され得る。あるいは、ベクターは、エキソビボで、細胞に送達され得、例えば、細胞が個々の患者（例えば、リンパ球、骨髄吸引、組織バイオプシー）または万能なドナー造血幹細胞から外植され、通常、ベクターを取り込んだ細胞についての選択後に、続いて患者の細胞へ再移植される。

【0180】

診断、研究または遺伝子治療（例えば、トランスフェクトした細胞の宿主生物体への再注入を介して）のためのエキソビボ細胞トランスフェクションは、当業者に周知である。ある実例において、細胞は、被験体生物体から単離され、ZFP核酸（遺伝子またはcDNA）でトランスフェクションされ、そして被験体生物体（例えば、患者）へ再注入し戻される。エキソビボでのトランスフェクトに適した種々の細胞型は、当業者に周知である（例えば、患者からの細胞の単離方法および培養方法の考察については、Freshneyら、Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique（第3編 1994）、およびそこで引用した参考文献を参照のこと）。

40

【0181】

1つの実施形態において、幹細胞は、細胞トランスフェクションおよび遺伝子治療のため

50

にエキソビボの手順で使用される。幹細胞を使用することの利点は、幹細胞が、インビトロで他の細胞型に分化し得るか、または哺乳動物（例えば、その細胞のドナー）へ導入され得る（ここで、幹細胞は骨髓内に移植される）ことである。サイトカイン（例えば、G M - C S F、I F N - γ および T N F - α ）を用いて、臨床的に重要な免疫細胞型へインビトロで C D 3 4 + 細胞を分化するための方法は、公知である（I n a b a ら、J . E x p . M e d . 1 7 6 : 1 6 9 3 - 1 7 0 2 (1 9 9 2) を参照のこと）。

【0182】

幹細胞は、公知の方法を用いて、形質導入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、C D 4 + および C D 8 + (T 細胞)、C D 4 5 + (p a n B 細胞)、G R - 1 (顆粒球) ならびに I a d (分化した抗原提示細胞)) に結合する抗体と共に骨髓細胞をパニングすることによって、骨髓細胞から単離される（I n a b a ら、J . E x p . M e d . 1 7 6 : 1 6 9 3 - 1 7 0 2 (1 9 9 2) を参照のこと）。

【0183】

治療的 Z F P 核酸を含むベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、リポソームなど）はまた、インビボで細胞の形質導入のために、生物体に直接投与され得る。あるいは、裸の D N A が、投与され得る。投与は、血液または組織細胞と分子を最終的に接触させるために通常使用される経路のうちのいずれかによって達成される。このような核酸を投与するために適した方法は、利用可能であり、そして当業者に周知であり、そして1つより多くの経路が、特定の組成物を投与するために使用され得るが、特定の経路が、別の経路より即効性および効果的な反応をしばしば提供し得る。

【0184】

薬学的に受容可能なキャリアは、一部、投与される特定の組成物によって、および組成物を投与するために使用される特定の方法によって決定される。従って、以下に記載されるような、薬学的組成物の広範な種々の適切な処方が存在する（例えば、R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s、第17編、1989を参照のこと）。

【0185】

(B . タンパク質組成物)

ポリペプチド化合物（例えば、本発明の Z F P）の投与における重要な因子は、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切る能力を有する、ことを確実にすることである。細胞膜は、小さい、非イオン性親油性化合物に対して自由に浸透でき、そして極性化合物、高分子および治療的薬剤または診断的薬剤に対して本来浸透できない脂質-タンパク質の二重層で構成される。しかし、細胞膜を横切って Z F P のようなポリペプチドをトランスロケーションする能力を有する、タンパク質および他の化合物（例えば、リポソーム）は、記載されている。

【0186】

例えば、「膜トランスロケーションポリペプチド」は、膜トランスロケーションキャリアとして作用する能力を有する、両親媒性アミノ酸部分配列または疎水性アミノ酸部分配列を有する。1つの実施形態において、ホメオドメインタンパク質は、細胞膜を通過してトランスロケーションする能力を有する。ホメオドメインタンパク質の最も短く内部移行できるペプチド、アンテナペディアは、タンパク質の第3ヘリックス（アミノ酸位置43～58）で見出された（例えば、P r o c h i a n t z、C u r r e n t O p i n i o n i n N e u r o b i o l o g y 6 : 6 2 9 - 6 3 4 (1 9 9 6) を参照のこと）。別の部分配列であるシグナルペプチドの h (疎水性) ドメインは、類似の細胞膜トランスロケーション特性を有することを見出された（例えば、L i n ら、J . B i o l . C h e m . 2 7 0 : 1 4 2 5 5 - 1 4 2 5 8 (1 9 9 5) を参照のこと）。

【0187】

細胞への Z F P の取り込みを促進するための、Z F P に結合し得るペプチド配列の例としては、限定しないが、以下が挙げられる：H I V の t a t タンパク質の11アミノ酸ペプチド；p16タンパク質の84～103アミノ酸に対応する20残基のペプチド配列（F 50

ahraeusら、*Current Biology* 6:84 (1996) を参照のこと) ; アンテナペディアの60アミノ酸長のホメオドメインの、第3ヘリックス (Derossiら、*J. Biol. Chem.* 269:10444 (1994)) ; カポジ線維芽細胞増殖因子 (K-FGF) h領域のようなシグナルペプチドのh領域 (Linら、前出) ; またはHSV由来のVP22トランスロケーションドメイン (ElliotおよびO'Hare、*Cell* 88:223-233 (1997)) 。増強した細胞の取り込みを提供する他の適切な化学成分はまた、ZFPに化学的に結合し得る。

【0188】

毒素分子はまた、細胞膜を通過してポリペプチドを輸送する能力を有する。しばしば、このような分子は、少なくとも2つの部分で構成される (「2成分毒素」と呼ばれる) : トランスロケーションドメインもしくはポリペプチドまたは結合ドメインもしくはポリペプチドおよび分離した毒素ドメインもしくはポリペプチド。典型的に、トランスロケーションドメインまたはポリペプチドは、細胞レセプターに結合し、そして次いで毒素は、細胞内へ輸送される。ウェルチ菌微小毒素、ジフテリア毒素 (DT)、シュードモナス体外毒素A (PE)、百日咳毒素 (PT)、炭疽菌毒素および百日咳アデニレートシクラーゼ (CYA) を含むいくつかの細菌毒素は、内部またはアミノ酸末端融合物として、細胞サイトゾルへペプチドを送達することの試みにおいて使用されている (Aroraら、*J. Biol. Chem.*、268:3334-3341 (1993) ; Perelleら、*Infect. Immun.*、61:5147-5156 (1993) ; Stenmarkら、*J. Cell Biol.* 113:1025-1032 (1991) ; Donnellyら、*PNAS* 90:3530-3534 (1993) ; Carbonettiら、*Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 95:295 (1995) ; Seboら、*Infect. Immun.* 63:3851-3857 (1995) ; Klimpelら、*PNAS U. S. A.* 89:10277-10281 (1992) ; およびNovakら、*J. Biol. Chem.* 267:17186-17193 (1992)) 。

【0189】

このような部分配列は、細胞膜を通過してZFPをトランスロケーションするために使用される。ZFPは、都合よくこのような配列に融合し得るか、またはこのような配列で誘導体化され得る。典型的に、トランスロケーション配列は、融合タンパク質の一部として提供される。任意に、リンカーは、ZFPおよびトランスロケーション配列に連結するために使用され得る。任意の適切なリンカーは、例えば、ペプチドリリンカーが使用され得る。

【0190】

ZFPはまた、リポソームおよびリポソーム誘導体 (例えば、免疫リポソーム) を介して、動物細胞 (好ましくは哺乳動物細胞) へ導入され得る。用語「リポソーム」は、1つ以上の集中的に要求される脂質二重層から構成される、水相をカプセル化する小胞をいう。水相は、代表的に細胞に送達されるべき化合物 (すなわち、ZFP) を含む。リポソームは、原形質膜と融合し、それによってサイトゾル内へ薬物を放出する。あるいは、リポソームは、輸送小胞において細胞によって食菌されるかまたは取り込まれる。エンドソームまたはファゴソーム内で、一旦、リポソームは、輸送小胞の膜と分解するか、または融合するかのいずれかをし、そしてその内容物を放出する。

【0191】

リポソームを介する薬物送達の現法において、リポソームは、最終的に浸透し、そして標的組織または標的細胞にカプセル化した化合物 (この場合、ZFP) を放出する。全身または組織特異性送達のために、これは、例えば、受動的様式において、達成され得、ここでリポソーム二重層は、体内での様々な薬剤の動きを通して、長い間で分解する。あるいは、活性薬物放出は、リポソーム小胞において、浸透性の変化を誘導するための薬剤を使用することを含む。リポソーム膜は、環境が、リポソーム膜の近辺で酸性になる場合、不安定化するように、構築され得る (例えば、PNAS 84:7851 (1987) ; B

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される場合、リポソームが不安定になり、そしてそれらの内容物を放出する。この不安定化は、フソジェネシス (fusogenesis) と呼ばれる。ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) は、多くの「フソジェネシス」系の基礎である。

【0192】

このようなリポソームは、代表的に ZFP および脂質成分 (例えば、予め決定された細胞表面の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任意に含む、中性および／または陽イオン性脂質) を含む。リポソームを調製するための種々の方法は、以下に記載されるように利用可能である: 例えば、Szoka 10
ら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980)、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 公開番号 WO 91/17424、Deamer および Bangham、Biochim. Biophys. Acta 443:629-634 (1976); Fraley 20
ら、PNAS 76:3348-3352 (1979); Hope ら、Biochim. Biophys. Acta 812:55-65 (1985); Mayer ら、Biochim. Biophys. Acta 858:161-168 (1986); Williams ら、PNAS 85:242-246 (1988); Liposomes (Ostro (編)、1983、Chapter 1); Hope ら、Chem. Phys. Lip. 40:89 (1986); Gregoriadis、Liposome Technology (1984) および Lasic、Liposomes: from Physics to Applications (1993)。適切な方法は、例えば、超音波処理、押出し、高圧／均質化、微流動化、界面活性剤透析法、小さいリポソーム小胞のカルシウム誘導融合およびエーテル融合方法 (これらの全ては当業者に周知である) を含む。

【0193】

いくつかの例において、リポソームは、特定の細胞型、組織などに対して特異的である標 30
的化部分を用いて標的化される。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) を用いてリポソームを標的とすることは、以前に記載されている (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)。

【0194】

リポソームに標的化剤を結合するための標準的な方法が、使用され得る。これらの方法は、標的剤の結合のために活性化され得るか、または親油性化合物に誘導体化され得る (例えば、脂質誘導体化ブレオマイシンを)、リポソームの脂質成分 (例えば、ホスファチジルエタノールアミン) への取り込みを一般的に含む。抗体標的化リポソームは、例えば、 40
プロテイン A を取り込むリポソームを用いて構築され得る (Renneisen ら、J. Biol. Chem.、265:16337-16342 (1990) および Leone tt ら、PNAS 87:2448-2451 (1990) を参照のこと)。

【0195】

(C. 投薬量)

ZFP の治療用途のために、患者に投与される用量は、患者において長い時間、十分な有利な治療的応答をもたらすのに十分であるべきである。用量は、利用される特定の ZFP の効力および Kd、標的細胞の核の容積、および患者の状態、ならびに処置されるべき患者の体重または表面積によって決定される。用量のサイズはまた、特定の患者における特定の化合物またはベクターの投与に付随するいずれかの有害な副作用の存在、性質および程度によって決定される。

【0196】

疾患の処置または予防において、投与されるべきZFPの有効な量を決定することにおいて、医師が、ZFPまたはZFPをコードする核酸の循環する血漿レベル、潜在的ZFP毒性、疾患の進行、および抗ZFP抗体の生産を評価する。投与は、単一または分割した用量を介して達成され得る。

【0197】

(D. 組成および投与の様式)

1. 一般

ZFPおよびZFPをコードする核酸は、遺伝子発現の調節のためにおよび下記のような治療的用途または予防的用途のために、患者に直接投与され得る。一般的に、そして本明細書中の考察を考慮して、動物または患者へZFP導入することをいう句は、ZFPまたはZFP融合タンパク質が、導入されることおよび／またはZFPまたはZFP融合タンパク質をコードする核酸が、動物において発現され得る形態で導入されることを意味し得る。例えば、次の章において最も詳細に記載されるように、ZFPおよび／または核酸は、新脈管形成を調節するためおよび虚血処置において使用され得る。 10

【0198】

治療的有效量の投与は、ZFPを処置されるべき組織と最終的に接触させるために通常使用される経路のうちのいずれかによって達成される。ZFPは、好ましくは薬学的受容可能なキャリアと共に、任意の適切な様式で投与される。このような調節因子を投与する適した方法は、利用可能であり、そして当業者に周知であり、そして1つより多くの経路が、特定の組成物を投与するために使用され得るが、特定の経路が、別の経路より即効性および効果的な反応をしばしば提供し得る。 20

【0199】

薬学的に受容可能なキャリアは、一部、投与される特定の組成物によっておよび組成物を投与するために使用される特定の方法によって決定される。従って、薬学的組成物の広範な種々の適切な処方が存在する（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第17編（1985）を参照のこと）。

【0200】

ZFP（単独または他の適切な成分と組み合わせて）は、吸入を介して投与されるエアロゾル処方物中（すなわち、これらは、「噴霧」され得る）に作られ得る。エアロゾル処方物は、加圧受容可能な噴霧剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素など）に配置され得る。 30

【0201】

非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、皮内および皮下経路によって）に適した処方物は、抗酸化物を含み得る、水性および非水性の、等張性の滅菌した注入液、緩衝液、静菌剤、および処方物を意図したレシピエントの血液との等張性にする溶質、懸濁液を含み得る水性および非水性の滅菌した懸濁液、溶解剤、濃化剤、安定剤および防腐剤を含む。開示された方法の実行において、組成物は、例えば、静脈内注入、経口的、局所的、腹腔内、膀胱内、または髄腔内によって投与され得る。化合物の処方は、単一用量（unit-dose）または多用量（multi-dose）用の密封容器（例えば、アンプルおよびバイアル）中に存在し得る。注入溶液および注入懸濁液は、滅菌した粉末、顆粒、および以前に記載された種類の錠剤から調製され得る。 40

【0202】

(2. 例示的な新脈管形成送達を選択)

種々の送達選択は、新脈管形成、従って、例えば虚血状態の処置を調節するための、本明細書中で提供される薬学的組成物の送達のために利用可能である。特定の用途に依存して、組成物は、被験体の特定の場所または組織を標的化され得る。例えば、ある方法において、虚血のような様々な障害を処置するために、心臓の特定の領域へ組成物を送達する。対照的に、他の処置は、一般的な方法において、特定の領域への送達を標的化することを探究することもなく、組成物を投与することを含む。 50

【0203】

多くのアプローチが、特定の領域への薬剤の送達を局在化するために利用され得る。特定のこれらの方法は、体の管腔または組織への送達を含む（例えば、米国特許第5,941,868号；同第6,067,988号；同第6,050,986号；および同第5,997,509；およびPCT公開WO 00/25850；WO 00/04928；99/59666；および99/38559を参照のこと）。送達はまた、心筋内注射または心筋内投与によって達成され得る。このようなアプローチの例としては、以下に開示されるものが挙げられる：米国特許第6,086,582号；同第6,045,565号；同第6,056,969号；および同第5,997,525号；およびPCT公開WO 00/16848；WO 00/18462；WO 00/24452；WO 99/49773およびWO 99/49926。局所的な送達のための他の選択は、心膜内の注射（例えば、米国特許第5,931,810号；同第5,968,010号；および同第5,972,013号を参照のこと）および血管周囲送達を含む。様々な経心筋再脈管（transmyocardial revascular）（TMR）のチャンネル送達アプローチも同様に利用され得る。多くのこれらの方法は、血管再生を行うためにレーザーを利用する。このようなアプローチの考察は、例えば、以下に示される：米国特許第5,925,012号；同第5,976,164号；同第5,993,443号；および同第5,999,678号。他の選択は、動脈内送達および／または冠内送達（例えば、冠状動脈注射（例えば、WO 99/29251を参照のこと））、および血管内投与（例えば、米国特許第6,001,350号；同第6,066,123号；および同第6,048,332；およびPCT公開WO 99/31982；WO 99/33500；およびWO 00/15285を参照のこと）を含む。従って、例えば、心筋へ直接、本明細書に記載されるように、組成物を注射し得る。

【0204】

新脈管形成を調節するための組成物を送達するためのさらなる選択は、静脈内投与または皮下投与、心臓チャンバーアクセス（例えば、米国特許第5,924,424号を参照のこと）および組織工学（米国特許第5,944,754号）を用いての、全身投与を含む。

【0205】

当業者によって公知のほかの送達方法としては、以下に開示される方法が挙げられる：米国特許第5,698,531号；同第5,893,839号；同第5,797,870号；同第5,693,622号；同第5,674,722号；同第5,328,470号；および同第5,707,969。

【0206】

(IX. 用途)

A. 一般

本明細書に開示される標的部位に結合するZFPおよびそれらをコードする核酸は、広範な種々の用途（特に、内皮細胞増殖の調節を含む用途）において利用され得る。このような方法は、一般的に、本明細書中に開示される標的部位のうちの1つに対する結合特異性を有するZPFと、細胞または細胞集団内の核酸の標的部位とを接触させる工程を包含する。例えば、細胞培養物を用いたインビトロでの方法またはインビボでの方法が、行なわれ得る。

【0207】

調節が1つ以上のVEGF遺伝子の活性化を含むような特定の方法が、行なわれる。このような方法は、さらなる内皮細胞の生成が、所望される場合（例えば、動脈妨害または血管妨害のいくつかの型を軽減するための新脈管形成を促進するか、またはリンパ球生成または骨髓造血を活性化する場合）に有用である。他の方法は、このような抑制が、例えば、腫瘍の領域内でのさらなる血管発達を阻害するような有益な効果を提供する場合、内皮細胞増殖を抑制するために行なわれ得る。

【0208】

Z F Pはまた、非治療的用途（例えば、V E G F遺伝子の発現を活性化または抑制する因子を同定するかまたは標的配列を含む標的核酸を検出する、スクリーニング方法）のために使用され得る。

【0209】

B. 治療的用途

1. 新脈管形成の調節

本明細書中で提供されるZ F Pおよびそれらをコードする核酸（例えば、前に記載される薬学的組成物）は、得られるV E G Fタンパク質が、細胞培養物（すなわち、インビトロ用途において）およびインビボの両方で、内皮細胞増殖を活性化する際の増殖因子として作用し得るように、V E G F遺伝子の発現の活性化のために利用され得る。このような活性化は、新しい血管および毛細血管が形成される有用な新脈管形成を促進し得る；活性化はまた、体細胞増殖ならびに脈管の発達および分化を促進し得る。それゆえ、新脈管形成を促進するための特定の方法は、動物へZ F Pを導入する工程を包含する。新脈管形成を調節する遺伝子への活性化ドメインを保有するZ F Pの結合は、新脈管形成のプロセスを増強し得る。特定の方法は、V E G F遺伝子中の標的部位に結合するための本明細書中に記載されるようなZ F Pの使用を含む。Z F Pに融合した活性化ドメインは、1つ以上のV E G F遺伝子の発現を活性化する。

10

【0210】

Z F Pおよび核酸はまた、骨修復、創傷治療を促進することならびに胃潰瘍および／または十二指腸潰瘍の治癒を促進することにおいて有用であり得る。Z F Pおよび核酸はまた、黄体および子宮内膜の発達、妊娠の開始および／または維持において有用な活性化を促進するために利用され得る。関連する方法において、Z F Pおよび核酸の投与はまた、胚形成の補助での有用性を見出す。

20

【0211】

内皮細胞増殖および新脈管形成を評価するための種々のアッセイが、公知である。例えば、内皮細胞増殖アッセイは、F e r r a r aおよびH e n z e l（1989）N a t u r e 380:439-443; G o s p o d a r o w i c zら（1989）P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、86:7311-7315; およびC l a f f e yら（1995）B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a、1246:1-9によって議論される。新脈管形成を促進するためのZ F Pおよび／または核酸の能力は、L e u n gら（1989）S c i e n c e 246:1306-1309によって議論されるように、例えば、ヒヨコの絨毛尿膜中で評価され得る。別の選択は、R a s t i n e j a dら、（1989）C e l l 56:345-355によって議論されるように、ラットの角膜を用いたアッセイを行うことである。他のアッセイは、米国特許第5,840,693号に開示される。さらに、実施例4および図9に開示される組織切片の顕微鏡検査は、新脈管形成のためのアッセイとして使用され得る。それぞれのこれらの方法は、インビボでの新脈管形成の容認されたアッセイであり、そしてその結果はまた、他の系から推定され得る。

30

【0212】

Z F Pおよび／またはそれらをコードする核酸の投与はまた、血管新生の開始または伸張が所望される用途において利用され得る。このような用途の例としては、組織移植または臓器移植後の治療を含む。多くの用途は、虚血状態およびアテローム性動脈硬化症から生じるような種々の型の血流妨害を軽減することを含む。例えば、特定の用途は、組織梗塞または動脈狭窄症（例えば、冠状動脈性心臓病で起こる）において、副行循環を樹立することを含む。副行循環のシミュレーションはまた、深在静脈血栓症、心筋梗塞、虚血肢体（i s c h a e m i c l i m b）および／または産後の脈管問題の処置において有用である。

40

【0213】

多くのアッセイが、虚血を処置するためのZ F Pの能力を評価するために利用され得る。例えば、虚血を研究するための様々な様式が、公知である。これらは、限定しないが、実

50

験的に誘発したラットの後肢の虚血（例えば、Takeshita, S. ら、Circulation (1998) 98:1261-63; および Takeshita, S. ら (1994) Circulation 90 (#5; part II): 228-234 を参照のこと）、部分的に虚血性の後肢のラビットモデル（例えば、Hopkins, S. ら、J. Vasc. Surg. (1998) 27:886-894 を参照のこと）、および慢性的なブタの心筋虚血モデル（例えば、Harada, K. ら、Am. J. Physiol. (1996) 270:886-94; および Hariawala, M. ら、1996、J. Surg. Res. 63:77-82 を参照のこと）を含む。別のアッセイは、後肢虚血のウサギモデルを含む（例えば、Takeshita, S. ら、1994、Circulation 90 (#5; part II): 228-234 を参照のこと）。 10

【0214】

新生血管形成はまた、骨折部位での新しい血管の形成を含む治癒プロセスとして、骨折修復において重要である。従って、ZFP および核酸はまた、骨折の処置において使用され得る。投与の効果を測定するためのアッセイは、公知である。例えば、アテローム性動脈硬化症についてアッセイするため方法は、PCT 公開 WO 00/25805 に考察される。

【0215】

創傷処置は、本明細書中に記載される ZEP、核酸および化合物の投与が有用である別の一般的な適用の型である。ZFP および核酸は、潰瘍、褥瘡および静脈性の潰瘍 (venous ulcer) ならびに火傷のような重要な創傷の処置のために使用され得る。このような潰瘍の例は、糖尿病患者において見られる。ZFP 融合物の使用が、創傷治癒を促進する例が、実施例 4 および図 9 に提供される。 20

【0216】

本明細書中において提供される ZFP および核酸はまた、多様な外科的な適用において、利用され得る。例えば、別の使用法は、植皮が施される火傷部位または外傷部位の準備のために用いられる。同様に、この組成物は、血管移植手術における内皮細胞の形成を促進するために使用され得る。このような手術においては、組成物は、手術の前または間に移植部位に導入され得る。ZFP および核酸は、形成外科において、利用され得、特に火傷領域または別の損傷領域の再形成のために使用され得る。この組成物が利用され得る、別の外科的な状況は、バルーン血管形成術に続く、創傷治癒の手術後においてである。なぜならこのような手術は、内皮細胞の除去または損傷を伴うからである。このような場合の処置は、ZFP または核酸を非経口的なキャリアと組み合わせて含む組成物を使用し得る。 30

【0217】

ZFP およびそれらをコードする核酸もまた、一般的な手術ならびに切断部および裂傷の処置および修復においても使用法が見出されている。このような適用において、ZFP または核酸は、創傷が感染することを阻止するために使用される。局所的な創傷治癒において使用される場合、ZFP または核酸は、ある場合に、処置される部位に直接的に、溶液、スプレー、クリーム、ゲル、軟膏または乾燥散剤の一部として局所的に投与され得る。徐放組成物はまた、特定の型の創傷を処置する際に有用であり得る。 40

【0218】

種々の組成物の有用性を評価するために利用され得る創傷治癒アッセイは、例えば、Schilling ら (1959) Surgery 46:702-710; および Hunt ら (1967) Surgery 114:302-307 よって考察される。別の創傷治癒アッセイは、実施例 4 に開示される。

【0219】

本明細書中で提供される ZFP および核酸はまた、リンパ内皮細胞およびリンパ管の成長促進に利用され得る。さらに、この組成物は、リンパ管形成を刺激するために利用され得る。従って、例えば、この組成物は、リンパ管の再成長または透過性を促進するために投与され得る。この組成物は、臓器移植した患者の処置ならびに手術および癌の処置にしば 50

しば伴う腋窩リンパ管の損失の緩和において有用であり得る。他の関連する適用として、リンパ管の閉塞（例えば、象皮病）およびリンパ管腫（*lymphangios*）が挙げられる。

【0220】

骨髓造血の活性化はまた、特定の本発明のZFPおよび核酸によりなされ得る。例えば、この組成物は、好中球の顆粒球の成長を促進するために使用され得る。このような処置は、例えば、顆粒球減少のような疾患に罹患している患者を処置するために有用であり得る。好中球の顆粒球の産生は、確立した微視的な方法および巨視的な方法によってモニターされ得る。

【0221】

これまでの実験は、マウスにおける単一のマウスVEGF164アイソフォーム（*isoform*）をコードするcDNAの導入が、透過性の血管の形成を導き、この血管は自然出血性であったことを示した（Petersson、A.ら、2000、Lab. Invest. 80:99-115）。略述すると、マウスVEGF164をコードするアデノウイルスベクターが、マウスの耳の皮下に注射された。VEGF164は、このマウスの耳のモデルにおいて出血および脈管内色素の血管外遊出を誘導することが示された。マウスのVEGF164をコードするアデノウイルスを用いて同様に処置されたマウスの耳を比較する場合、ZFPが誘導する新生脈管構造は、自発的には出血せず、そしてEvans Blue dye注入に対しても浸透性ではなかった（実施例6を参照のこと）。

【0222】

（2. VEGF遺伝子発現の抑制）

本明細書中で提供される組成物はまた、種々の治療適用においてVEGF遺伝子の発現を抑制するために利用され得る。1つの共通の適用は、治療上の理由のために破壊されることが望まれる、特定の細胞または組織に対して新脈管形成を減らすかまたは阻害することである。しばしば、このような方法は、腫瘍増殖または転移のような、病理学的な過程に関連する脈管形成事象を妨げるための組成物の投与に関する。他の病理学的なプロセスは、増加した新脈管形成、特に微小血管系の増殖に関連し、糖尿病性網膜症、乾癬および種々の関節障害が挙げられる。従って、特定の本発明の組成物は、これらのプロセスを処置するために利用され得る。

【0223】

（C. 非治療適用）

ZFPおよびそれらをコードする核酸はまた、種々の非治療適用においても利用され得る。このような適用の1つとして、新脈管形成を調節できる新たな因子を同定するためのスクリーニングを含む。特に、ZFPは、VEGF遺伝子の発現のような、遺伝子発現を調節し得る因子の同定のために使用され得る。このような方法は、一般的に、細胞または細胞集団と、表2～3に列挙される標的部位の1つに結合するZFPとを接触させて、1つ以上のVEGFの発現を活性化するかまたは抑制する工程を含む。細胞はまた、試験因子とも接触させられる。次いで、VEGF遺伝子の発現レベルが、決定されそして発現のベースラインレベルと比較される。試験細胞中のVEGF遺伝子の発現レベルのベースラインレベルとの統計学的に有意な差は、試験因子がVEGF遺伝子発現の潜在的なモジュレーターであることを示す。例えば、ZFPが、VEGF遺伝子の発現を活性化する場合、および試験細胞における発現レベルがベースラインレベルより低い場合、証拠は、試験因子がVEGF遺伝子発現のリプレッサーであることを示す。一方、ZFPがVEGF遺伝子の発現を抑制する場合、試験因子は、ZFPによって引き起こされる抑制を軽減し得る潜在的な活性化因子についてスクリーニングされ得る。この方法は、核酸がアッセイにおいて利用される細胞中に発現のための必須調節配列を含む場合、ZFPをコードする核酸を導入することにより変動され得る。このような方法は、ZFPと相互作用し潜在的にその結合を増強するかまたは減少させ、および／または遺伝子上のほかの場所に結合でき、それによって、相乗効果または拮抗効果のどちらかを提供する因子を同定するために使用され得る。

10

20

30

40

50

【0224】

発現のベースラインレベルとは、一般に、実験値または決定された値と比較される値（または値の範囲）をいう。代表的には、ベースライン値は、試験される細胞または個体を用い並行して同一の条件下で個別に処置されるコントロール細胞または個体について決定された値である。ベースライン値はまた、コントロール細胞または個体の集団について確立された統計的な値（例えば、平均値（mean）または平均値（average））であり得る。いま記載されたような細胞のアッセイにおいて、しばしば試験細胞は、ZFPと接触されるかまたはZFPを発現するが、コントロール細胞は接触も発現もしない。

【0225】

相違が、実験誤差のレベルよりも大きい場合、相違は、一般的に統計的に有意であると考えられる。観測された相違の偶発する可能性（p値）が、いくつかの所定のレベルより小さい場合、このような相違はまた、統計的に有意である。従って、統計学的に有意な相違は、0.005未満であり、好ましくは0.01未満であり、最も好ましくは0.001未満であるp値をいい得る。 10

【0226】

他の適用において、ZFPは、サンプル中の標的核酸の配列特異的な検出のための診断法において使用され、本明細書中に提供される標的部位の1つを含む。例として、ZFPは、標的部位を含むmRNAもしくはcDNAの複合体混合物における特定のmRNA種または特定のcDNAの存在を検出するために使用され得る。従って、ZFPは、サンプル中のVEGF遺伝子のコピー数を定量するために使用され得る。 20

【0227】

診断用アッセイの実施のための適切な形式は、ドメインに連結されたZFPを使用し、このドメインに連結されたZFPは、ELISAプレート上へのZFPの固定化を可能にする。固定されたZFPは、結合が起こり得る条件下で、標的核酸を含有することが疑われるサンプルに接触される。代表的には、サンプル中の核酸は、標識される（例えば、PCR増幅の過程において）。あるいは、標識されていないプローブは、第2の標識されたプローブを用いて検出され得る。洗浄の後、標識が結合した核酸が、検出される。

【0228】

以下の実施例は、開示された方法および組成物の特定の局面を単により詳細に説明するために提供され、そしていかなる方法においても、限定するものと解釈されるべきではない。 30

【実施例】

【0229】

（実施例1）

（設計されたジンクフィンガー融合タンパク質のパネルを用いるヒトVEGF遺伝子の調節）

（I. 導入）

遺伝子調節の研究における主要な問題点は、細胞が内因性の染色体遺伝子の特異的な活性化を達成する機構に関する。この問題への取り組みにおいて、合理的に設計された転写機構の構成要素は、本発明者らの遺伝子調節についての理解を試験するための強力な手段を提供し得る（Chattjeeら（1995）Nature 374:820-822；Kimら（1997）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3616-3620；Klagesら（1995）Nature 374、822-823）。特に、人工的な転写因子（所定の遺伝子座の範囲内の新規な配列に標的化されそして実験者が選択する機能ドメインを有する）は、全ての規定された構成要素を使用する所定の活性化プロセスのいずれかの完全な概括の展望を提供するので、特に有用であることを証明し得る。人工的な転写因子はまた、医学および生物工学のような領域において実用的な利益を提供し得る。 40

【0230】

新規の、所望のDNA配列の特異的な認識を達成するために現われてきた、選択されたD 50

NA結合モチーフは、ジンクフィンガーである。これらのジンクフィンガーとしては、はじめに記載されたCys2-His2ジンクフィンガー、ならびに、例えば、Cys4ジンクフィンガーなどのような、さらなる型のジンクフィンガーが挙げられる。例えば、Rhodesら(1993) *Scientific American* 268:56-65を参照のこと。過去十年の間、選択および設計の研究は、このモチーフの適合性を実証し、そして事実上どんなDNA配列に対しても特異的に結合し得るジンクフィンガータンパク質(ZFP)を設計するための簡便で、強力な戦略を作り出してきた。例えば、Chooら(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11,163-11,167; Chooら(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11,168-11,172; Chooら(1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:646(正誤表として出版された); Desjarlaisら(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7345-7349; Desjarlaisら(1992) *Proteins* 12:101-104; Desjarlaisら(1992) *Proteins* 13,272; Desjarlaisら(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2256-2260; Greismanら(1997) *Science* 275:657-661; Jamiesonら(1994) *Biochemistry* 33:5689-5695; Jamiesonら(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12,834-12,839; Liuら(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5525-5530; Rebarら(1994) *Science* 263:671-673; Rebarら(1996) *Meth. Enzymol.* 267:129-149; Segalら(1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2758-2763を参照のこと。より最近、新規の、DNA配列特異性が操作されたZFPが、内因性の染色体遺伝子を調節するための人工転写因子として使用され始めた。例えば、Bartsevichら(2000) *Mol. Pharmacol.* 58:1-10; Beerliら(2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:1495-1500; Zhangら(2000) *J. Biol. Chem.* 275:33,850-33,860を参照のこと。さらに、共有されるPCT WO00/41566も参照のこと。

【0231】

この研究の目的は、血管内皮増殖因子A(VEGF-A)に対する内因性遺伝子を活性化する、ZFPのパネルを同定することであった。VEGF-Aは、胚形成の間および創傷治癒のような成人におけるプロセスの両方において、新しい血管増殖の重要な誘導因子として一般に認識されている内皮細胞特異的マイトジェンである(最近の総説として、Flammeら(1997) *Mech. Dev.* 63:51-60; Ferrara(1999) *J. Mol. Med.* 77:527-543; Yancopoulosら(2000) *Nature* 407:242-248を参照のこと)。脈管形成および新脈管形成の両方におけるVEGF-Aの中心的役割は、VEGF-Aの発現レベルが巧妙に正確な調節機構によって制御されることを明らかに必要とする。マウスにおける研究は、VEGF-Aを、その単一機能不全(haploinsufficiency)が胚の致死率を誘発する恐らく唯一の例である遺伝子として強調してきた(Ferraraら(1996) *Nature* 380:439-442; Carmelietら(1996) *Nature* 380:435-439)。さらに、いくつかの他の研究は、適切なVEGF-Aの機能にはVEGF-A遺伝子により産生される3つの主要なスプライス改変体の適切な相対レベルでの発現を必要とすることを示唆した(Carmelietら、1996 前出; Carmelietら(1999) *Nature Med.* 5:495-502; Grunsteinら(2000) *Mol. Cell. Biol.* 20:7282-7291)。状態および転写因子の多様性は、VEGF-Aの発現の誘導に関与してきた。(Chuaら(1998) *Free Radic. Biol. Med.* 25:891-897; Cohenら(1996) *J. Biol. Chem.* 271:736-741; Dame

rtら(1997) *Biochem. J.* 327:419-423; Diazら(2000) *J. Biol. Chem.* 275:642-650; Ladouxら(1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204:794-798; Ryutora(1996) *J. Biol. Chem.* 271:28, 220-28, 228; Salimathら(2000) *Oncogene* 19:3470-3746)、この中で恐らく最もよく特徴付けられるのは、HIF-1により仲介される低酸素応答である(Levyら(1995) *J. Biol. Chem.* 270:13, 333-13, 340; Liuら(1995) *Circ. Res.* 77:638-643; Forsytheら(1996) *Mol. Cell. Biol.* 16:4604-4613; Kimuraら(2000a) *Blood* 95:189-197)。その高度に調節された性質に一致して、VEGF-A調節不全は、種々の病理状態(腫瘍の増殖、糖尿病性網膜症、ならびに虚血性の心臓および四肢疾患)において役割を果たす。その結果として、VEGF-Aは、設計された人工的な転写因子を使用する親(pro-)および抗(anti-)脈管形成遺伝子治療の両方についての魅力的な標的を提供するようである。

【0232】

この実施例において、発明者らは、操作されたCys2-His2 ZFP、および血管内皮増殖因子A(VEGF-A)の遺伝子を含む内因性染色体遺伝子座の活性化を成し遂げるための染色体構造についての知識を活用してきた。DNAse I過敏症マッピング分析は、VEGF-A遺伝子座の接近可能な領域の同定のために使用された。この分析は、VEGF-Aにおいて別個の4つのDNAse I接触可能領域を同定し、このうち3つは活性化研究のために使用されたHEK293細胞に存在した。次いで、3つのHEK293特異的DNAse I接触可能領域の各々の範囲内の9塩基対配列を認識するために、8つの新規のZFPを、設計し、それらのDNA結合特性の特徴付けを行った。設計された各ZFPは、10nM未満の見かけのKdで意図されたそれらの標的に結合した。次いで、これらのジンクフィンガーを、VP16転写活性化ドメインに連結し(Sadowskiら(1988) *Nature* 335:563-564)、そして内因性VEGF-A遺伝子および約3kbのVEGF-Aプロモーターを含む一過性にトランスフェクトされたネイティブレポーター構築物の両方について転写を活性化するそれらの能力を試験した。この結果は、設計されたZFP-VP16融合物の各々が、内因性VEGF-A遺伝子座およびネイティブレポーター構築物の両方を活性化することを示す。設計されたZFPはまた、NFκBのp65サブユニットに由来する活性化ドメインと連結され(Rubenら(1991) *Science* 251:1490-1493; 誤記訂正は*Science* (1991) 254:11に記載される)、そして、内因性VEGF-A単独およびVP16連結型ZFPとの任意の組合せの両方について転写を活性化する能力について試験した。

【0233】

この戦略は、VEGF-Aの発現を活性化する、7つの9塩基対部位に標的化された、8つの異なるZFPを産生した。特定のZFPに対して、VP16またはp65のどちらかに由来の活性化ドメインとの連結は、標的化される染色体部位に依存して、異なるレベルの活性化を提供する。さらに、VP16-およびp65-連結型ZFP(別個の染色体部位に標的化される)の特定の組合せが、同時トランスフェクト(cotransfected)される場合、観察されるVEGF-Aの活性化は、個々のZFPの活性化レベルに対する相和より高い。最後に、これらの操作された転写因子により達成される活性化のレベルが、低酸素応答の間に獲得されるVEGF-Aレベルを上回り、そしてこの活性化により産生されるVEGF-Aスプライス変体の相対比が、これらの細胞において通常観察される値に非常に近づくことを開示した。

【0234】

(II. 実験手順)

細胞株および細胞培養。これらの研究に使用された不朽化細胞株(HEK293、Hep3BおよびH9c2(2-1))を、American Type Culture C

ollectionから得、そしてヒト初代骨格筋細胞を、Cloneticsから得た。各株を、本質的に提供者が推奨するように維持した。ラット初代心臓筋細胞を、115 U/ml I I型コラゲナーゼおよび0.08%パンクレアチンの溶液を用いる分離により出生後1日目のWistar-Hanラット(Charle River)の心臓から回収。次いで、これらを、不連続なPercoll勾配を用いて精製し、15%の血清を含有する平板培養培地に再懸濁し、次いで、ゼラチンコートプレート上で24時間(平板プレート培養)した。次いで、細胞を、DNase Iマッピング研究への使用に先立って、無血清培地中に24時間~48時間維持した。

【0235】

VEGF-A遺伝子座におけるDNase Iが接近可能なクロマチン領域のマッピング。10
DNase I消化を、1.5分間22℃で行い、そしてDNase Iの濃度を、図1の説明文中に示されるように使用したのを除いて、核を、基本的にZhangら(上述)に記載されるように単離し、そしてDNase I(Worthington)を用いて処理した。次いで、ゲノムDNAの単離、制限酵素消化、およびサザンブロット分析を、酵素およびプローブが、図1についての説明文中に示されるようであったことを除いて、基本的にZhangら(上述)によって記載されるように行った。細胞のクロマチン中の接近可能な領域の同定に関するさらなる開示については、共有に係る米国特許出願番号60/200,590および60/228,556もまた参照のこと。

【0236】

ZFPをコードするポリヌクレオチドの構築；ジンクフィンガータンパク質の合成、精製 20
および結合分析。VEGF-Aに標的化されるZFPをコードする遺伝子を、上記のように構築し、クローン化しそして精製した。例えば、Zhangら(上述)；WO00/41566；およびWO00/42219を参照のこと。略述すると、各3つフィンガータンパク質(three-finger protein)の α -ヘリックス領域および β -シート領域をコードするオリゴヌクレオチドを、PCRを使用して構築し(図2Aおよび図2B)、そして結果として生じるZFP遺伝子の各々を、マルトース結合タンパク質をコードするDNAとの融合物として、pMal-c2プラスミド(New England Biolabs, Beverly, MA)中にクローン化した。次いで、マルトース結合タンパク質-ZFP融合物を、発現させ、そしてアミロースレジン(New England Biolabs, Beverly, MA)を使用してアフィニティー精製した。 30

【0237】

結合研究を、結合反応は、10 pMの標識された標的部位を含み、そして、緩衝液の組成は以下：17 mM Tris、170 mM KCl、1.7 mM MgCl₂、3.5 mM DTT、0.01~0.033 mM ZnCl₂、15%グリセロール、300 μ g/ml ウシ血清アルブミン、0.03% IGEPALであったことを除いて基本的に記載されるように(Zhangら、上述；WO00/41566；およびWO00/42219)行った。さらに、これらの研究のためのZFP濃度を、ZFP調製物の結合が本質的に化学量論的である条件を使用し、ZFP調製物の各々のDNA結合活性を測定することにより直接的に決定した(ZFPおよび標的部位の濃度は100 nMより高い)。この 40
改変されたプロトコルを使用して、SP1ジンクフィンガータンパク質は、その標的部位に対し、以前の研究において決定された親和性(Zhangら、上述)より、有意に高い親和性を示し、そしてこれらの研究における活性に基づくZFPの濃度の評価の使用および新しい結合緩衝液の両方が、見かけのK_dの相違に寄与するようである。

【0238】

ジンクフィンガー融合タンパク質の構築。VEGF-A標的化ジンクフィンガーを、以前に記載されたように(Zhangら、上述；WO00/41566；およびWO00/42219)、SP1骨格に構築し、そしてpCDNA3哺乳動物発現ベクター(Invitrogen, Carlsbad, CA)の中にクローン化した。CMVプロモーターを、哺乳動物細胞において全てのZFPを発現させるために使用した。全てのZFP構築物 50

は、SV40 ラージ T 抗原 (large T antigen) 由来の N 末端核局在化シグナル (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val、配列番号 224) ; ジンクフィンガー DNA-結合ドメイン、活性化ドメイン、および FLAG ペプチド (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys、配列番号 225) を含んだ。ZFP-VP16 融合物は、単純ヘルペスウイルス VP16 活性化ドメイン由来のアミノ酸 413~490 を含んだ (Sadowski ら、上述; Zhang ら、上述; WO00/41566; および WO00/42219)。ZFP-p65 融合体は、活性化ドメインとしてヒト NF-κB 転写因子 p65 サブユニット (アミノ酸 288~548) を有した (Ruben ら、上述)。

【0239】

ヒト VEGF-A レポーター活性化のための ZFP 融合物の活性についてのアッセイ。ヒト VEGF-A プロモーター活性における ZFP の効果を、ヒト VEGF-A プロモーターを含有するルシフェラーゼレポーター構築物を使用することにより測定した。ヒト VEGF-A ルシフェラーゼレポーター構築物 pGLPVFH を、3318 塩基対のヒト VEGF-A プロモーターを含むゲノム DNA フラグメントおよびその隣の配列 (転写開始位置に関して nt -2279~+1039) を pGL3 ベクターの (Promega、Madison、WI) KpnI 部位と NcoI 部位との間の多重 (multiple) クローニング部位へ挿入することによって作製した。VEGF-A 遺伝子の翻訳開始コドン ATG を、この構成物のルシフェラーゼ遺伝子に直接融合した。ヒト胚腎臓細胞 (HEK293) を、DMEM (Dulbecco 改変 Eagle 培地) 中で増殖し、10% のウシ胎仔血清を補い、5% CO₂ インキュベーター中 37℃ で培養した。細胞を、トランスフェクションの 1 日前に、1 ウェルあたり 160,000 細胞の密度で 24 ウェルプレート中にプレートした。レポーター構築物および ZFP-VP16 融合プラスミドを、LipofectAMINE 試薬 (Gibco Life Technologies、Rockville、MD) によってこれらの細胞に同時トランスフェクトし、ここで製造業者の推奨に従って 1.5 μl の LipofectAMINE 試薬、260 ng の VEGF-A レポーター構築物、30 ng の ZFP-VP16 をコードするプラスミド DNA、および 10 ng のコントロール pRL-CMV プラスミド (Promega、Madison、WI) を使用した。トランスフェクションの 16 時間後に培地を取り去り、そして新鮮な培地に交換した。トランスフェクションの 40 時間後に、培地を除去し、そして細胞を、回収し、そして製造業者のプロトコルに従って、Dual-luciferase Assay System (Promega、Madison、WI) を使用してルシフェラーゼレポーター活性をアッセイした。

【0240】

一過性 (transient) トランスフェクションによるヒト細胞中の内因性 VEGF-A 遺伝子上の ZFP 融合物の活性についてのアッセイ。ヒト胚腎臓細胞 (HEK293) を、DMEM (Dulbecco 改変 Eagle 培地) 中で増殖し、10% のウシ胎仔血清を補い、5% CO₂ インキュベーター中 37℃ で培養した。細胞を、1 ウェルあたり 160,000 細胞の密度で 24 ウェルプレート中にプレートした。一日後、ZFP-VP16 融合物をコードするプラスミドを、LipofectAMINE 試薬 (Gibco Life Technologies、Rockville、MD) を用いて細胞中にトランスフェクトし、ここで、1 ウェルあたり 1.5 μl の LipofectAMINE 試薬および 0.3 μg の ZFP プラスミド DNA を、製造業者の推奨に従って使用した。細胞を、50% のコンフルエンスまたは 90% のコンフルエンス、あるいはその間のいずれかの整数の割合でトランスフェクトした。トランスフェクションの 16 時間後に培地を除去し、そして新鮮な培地に置き換えた。トランスフェクションの 40 時間後、培養培地および細胞を回収し、そして VEGF-A の発現についてアッセイした。培養培地中の VEGF-A タンパク質内容物を、ヒト VEGF ELISA キット (R&D Systems、Minneapolis、MN) を用い、製造業者のプロトコルに従ってアッセイした。

10

20

30

40

50

【0241】

ZFPタンパク質発現のウェスタン分析のために、細胞を、Laemmli Sample Loading Bufferを用いて溶解し、そして溶解物を、10%のポリアクリルアミドゲル電気泳動(BioRad、Hercules、CA)によって分析し、その後、設計されたZFPのFLAGエピトープタグを認識する抗FLAG抗体(Sigma、St. Louis、MO)を使用するウェスタンブロッティングによって分析した。ウェスタンブロットを、前に記載したように(Zhangら、前述)ECL(Amersham Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ)を用いて可視化した。

【0242】

VEGF mRNAレベルの定量的RT-PCR分析のために、細胞を、溶解し、そして製造業者の説明書(Qiagen、Valencia、CA)に従い、インカラムDNase処理を用いるRNeasy Total RNA単離キットを使用して全RNAを調製した。25ngのRNAを、前に記載したように(Zhangら、上述)、ABI7700SDS機(Perkin Elmer Applied Biosystems、Foster City、CA)においてTaqman化学を使用するリアルタイム定量RT-PCR分析において使用した。略述すると、Multiscribe Reverse Transcriptase(PE Biosystems、Foster City、CA)を使用して、逆転写を、48℃で30分間行った。95℃での10分の変性
20
に続き、Ampligold DNAポリメラーゼを使用するPCR増幅を、95℃で15秒間および60℃で1分間の40サイクル行った。この結果を、SDSバージョン1.6.3ソフトウェア(PE Biosystems、Foster City、CA)を使用して分析した。Taqman分析に使用したプライマーおよびプローブを、表5に列挙する。これらのプライマーおよびプローブは、ヒトVEGF-A遺伝子の全て公知のスプライス改変体であると認識するが、スプライス改変体の間は、識別しない。

【0243】

【表5】

表5: Taqman分析に使用されるプライマーおよびプローブのヌクレオチド配列

	配列	配列番号
VEGF-A 順方向プライマー	5'-GTGCATTGGAGCCTTGCCTTG-3'	226
VEGF-A 逆方向プライマー	5'-ACTCGATCTCATCAGGGTACTC-3'	227
VEGF-A Taqman プローブ	5'-FAM-CAGTAGCTGCGCTGATAGACATCCA-TAMRA-3'	228
GAPDH 順方向プライマー	5'-CCATGTTTCGTCATGGGTGTGA-3'	229
GAPDH 逆方向プライマー	5'-CATGGACTGTGGTCATGAGT-3'	230
GAPDH Taqman プローブ	5'-FAM-TCCTGCACCACCAACTGCTTAGCA-TAMRA-3'	231
VP16-FLAG 順方向 プライマー	5'-CATGACGATTTCGATCTGGA-3'	232
VP16-FLAG 逆方向 プライマー	5'-CTACTTGTTCATCGTCGTCCTTG-3'	233
VP16-FLAG Taqman プローブ	5'-FAM-ATCGGTAACATCTGCTCAAACCTCGA-TAMRA-3'	234

略語: FAM: 7ミノフルオレイン; TAMRA: テトラフルーロダシ

(VEGF mRNAのRNAプロット分析)

HEK293細胞を、150mmの培養皿で増殖し、そしてpcDNA3ベクターコントロールまたはZFPをコードするプラスミドを用いてトランスフェクトし、ここで製造業
50

者の推奨に従って、LipofectAMINE試薬 (Gibco Life Technologies、Rockville、MD) を使用した。細胞および馴化培地を、トランスフェクションの40時間後に回収した。全てのRNAを、Trizol試薬 (Gibco Life Technologies、Rockville、MD) を使用して細胞から抽出し、その後RNeasy全RNA単離中型調製 (midi-prep) システム (Qiagen、Valencia、CA) を使用した。RNAプロットのための、全てのRNAサンプル (30 µg) を、1.2% のホルムアルデヒドアガロースゲルに分離し、そしてNytran SuperCharge membrane (Schleicher & Schuell、Keene、NH) 上にプロットした。膜を、68℃のUltraspeedTM ハイブリダイゼーション緩衝液 (Ambion、Austin、TX) 中で、³²P-標識したヒトVEGF-A165アンチセンスリボプローブとハイブリダイズした。68℃の0.1×SSC、0.1% SDSを用いた洗浄の後、膜を、フィルムに曝した。同一の膜を、0.1% SDS中で煮沸することにより剥がし、ヒトβ-アクチンアンチセンスリボプローブを用いて再ハイブリダイズした。

【0244】

(VEGF-A mRNAのスプライス改変体の分析)

VEGF-A mRNAの多数のスプライス改変体を検出するために、全RNAサンプル (0.5 µg) を、TitanTM 単一チューブ (one-tube) RT-PCR system (Roche Molecular Biochemicals、Indianapolis、IN) を使用する、20サイクルのRT-PCR反応に供した。使用したプライマーは、以下：

5' - ATGAACCTTTCTGCTGTCCTTGGGTGCATT - 3' (配列番号：235)、および

5' - TCACCGCCTCGGCTTGTCAACAT - 3' (配列番号：236) であった。PCR産物を、3% Nusieve 3:1アガロースゲル (FMC、Rockland、ME) に再溶解し、Nytran SuperCharge membrane (Schleicher & Schuell、Keene、NH) 上にプロットし、そして³²P-標識されたヒトVEGF-A165アンチセンスリボプローブを使用するサザンハイブリダイゼーションによって分析した。VEGF-189、VEGF-165およびVEGF-120についての、予期されるPCR産物のサイズは、それぞれ、630塩基対、576塩基対、および444塩基対であった。

【0245】

(III. 結果)

(VEGF-Aと会合した接近可能なクロマチンの構成的細胞特異的領域) - クロマチンマッピング研究は、腫瘍株および始原細胞を含むヒトおよびラットからの種々の細胞型を包含した。この調査の範囲、および細胞型の選択は、種々のプロ血管形成遺伝子療法およびアンチ血管形成遺伝子療法のための候補ZFPを開発する目的によって動機付けられた。初期の目的は、VEGF-Aプロモーター中の任意の構成的接近可能クロマチン領域、および医療的に関係ある標的組織およびモデル生物に特異的な領域を同定することであった。従って、DNase超感受性分析を、多くの異なる始原細胞および細胞株からのクロマチンに関して実施した。この分析の結果は、VEGF-A遺伝子中またはその近傍に4つの別個の超感受性領域の存在を示す。これらのうち2つは、VEGF-Aプロモーターのほぼ塩基-550および+1を中心にし、試験されたすべての細胞型において変動せずに観察された。図1は、ヒト (図1A) およびラット (図1B) の両方におけるこれら領域を同定する代表的な実験結果を示す。両方の領域は、高解像度で見たときダブレットとして見えた (図1Aおよび1C)。「+1」にあるオープン領域の発見は、幾分予期されていた。なぜなら、超感受性領域は、しばしば、転写開始部位の近傍に観察されているからであり (例えば、Grossら (1988) Ann. Rev. Biochem. 57:159-197を参照のこと)、そしてこの領域は、SP1およびAP-2の標的を含む、VEGF-A活性化に重要であることが示されているいくつかの保存された調節エ

レメントをさらに含むからである。Milaniniら(1998) J. Biol. Chem. 273:18、165-18、172。「-550」領域中の接近可能なクロマチンの観察(ヒトおよびラット両方のクロマチン中)は、幾分より驚くべき結果であった、なぜなら、VEGF-Aプロモーターのこの領域にこれまでマップされた調節エレメントはないからである。しかし、VEGF-Aプロモーターのこの領域が、ヒト、マウスおよびラット間で高い程度の配列保存を示した(図1F、灰色トレース)ことは注目され、保存が、調節エレメントのサイズの配列ブロックに関して評価されるとき、より明確になり(図1F、黒色トレース)、しかもこの領域のDNase I超感受性(および「+1」領域のDNase I超感受性)もまた、ラットとヒト間で保存されている。実際、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を駆動するSV40基礎プロモーターに融合した、この領域を含むDNAフラグメントを含む構築物の分析は、この領域がシスに作用する調節機能を媒介することを示す。この-550領域が本来DNase I消化により感受性であったという可能性は、DNase Iによるこの領域の増加した切断を示さなかった、精製された裸のDNAを用いたコントロールマッピング研究を実施することにより排除された。

10

20

30

40

50

【0246】

-550および+1に見出された構成的超感受性領域に加え、試験された細胞型の1つのサブセットのみに見られた、他の2つの接近可能なクロマチンのストレッチが同定された。これら領域の1つは、VEGF-Aの低酸素症応答エレメント(HRE)の中心にある約300bpを包含し、そしてヒト始原骨格筋細胞中(図1C)およびHep3B細胞株中で観察された。対照的に、この部位は、HEK293細胞中では明瞭に観察されなかった(図1C)。この低酸素症応答エレメントは、VEGF-Aプロモーター中の増加した配列保存の領域を包含し(図1F)、そしてHIFに対する結合部位を含む低酸素によるVEGF-Aの誘導に必要であるいくつかの保存された調節エレメントを含むことが示されている。Ikedaら(1995) J. Biol. Chem. 270:19、761-19、766; Liuら(1995) 上述; Grantら(2000) Biochemistry 39:8187-8192。最後に、HEK293細胞(図1D)、始原骨格筋細胞、およびラット始原心筋細胞(図1B)において、転写開始部位の約500bp下流に、超感受性領域が観察された。興味深いことに、この領域は、推定のSP1調節エレメントを含み、そして代替の転写開始部位に隣接している(図1F)。Akiriら(1998) Oncogene 17:227-236。この領域はまた、レポーター遺伝子の発現をシスに活性化する能力を示した。要約すれば、本発明者らは、VEGF-Aの転写開始部位に対し、約-550、+1、および+500bpに中心のある、HEK293細胞中のDNase Iに接近可能な3つの領域を同定した。

【0247】

(VEGF-Aのオープンクロマチン領域を標的にするZFPの設計および生化学的特徴付け)。上記の超感受性領域の各々内に含まれる配列に結合するZFPを設計した。ジンクフィンガーDNA認識の設計および選択研究は、特徴付けられたトリプレット特異性をもつ、フィンガーの多様なコレクションを生じた。例えば、Elrod-Ericksonら(1998) Structure 6:451-464および上述の参考文献を参照のこと。集合的に、これらのフィンガーは、特定の条件下で、所望の結合性質をもつマルチフィンガータンパク質を得るために混合され、かつ適合され得るトリプレット結合モジュールのディレクトリを提供する。このアプローチを用い、293細胞中で観察された「-550」、「+1」および「+500」オープンクロマチン領域内の部位に標的される一連のZFPを設計し(図2D)、そしてこれらのZFPをコードする遺伝子をアセンブルした。超感受性領域の外側の部位に標的される2つのコントロールZFPをコードする遺伝子もまたアセンブルした。これらZFPの設計は、表3、4および6に示される。これらのZFPは、VEGF-Aの転写開始部位に対するそれらの標的位置に従って命名された。従って、VZ-475およびVZ+590の標的配列中の最初の塩基は、VEGF-A遺伝子の主要な転写開始部位の475塩基対上流および590ヌクレオチド下流にある。これらのZFPの1つは、この領域内に2つの標的部位をもち、そしてこの事実を反

映するために複合名を与えた (VZ + 42 / + 530)。複数のZFPが所定の配列に標的される場合、これは、交互のZFP設計間を区別するために各名前の終わりに小文字の接尾辞の使用により示されている。

【0248】

従前に記載の方法を用い (例えば、同時所有のW000 / 41566およびW000 / 42219、およびZhangら、前述を参照のこと)、ZFP設計をコードする遺伝子をアセンブルし、そしてコードされたタンパク質の各々を組換え形態で発現した (図2A-2C)。次いで、各々のZFPのDNA結合親和性を、ゲルシフトアッセイを用いて特徴付けた。設計されたZFPのすべては、ナノモル範囲であったそれらの意図されたDNA標的に対する見かけの K_d を示した。比較のために、これらの条件下SP1は、そのDNA標的に対し、0.25 nMの見かけの K_d を示した。これらの研究は、各々の設計されたZFPが高親和性でその標的部位を認識することを示した。

10

【0249】

(ZFPによるヒトVEGF-A遺伝子プロモーターの活性化)。設計されたZFPの各々を、VP16転写因子の最小活性化ドメインに融合し、そしてVEGF-Aプロモーターの制御下でレポーター遺伝子を活性化その能力について試験した。融合構築物はまた、N末端核局在化配列およびC末端FLAGエピトープタグを含んだ。レポータープラスミドは、ヒトVEGF-Aプロモーターの制御下ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むように構築した。このレポータープラスミドを用い細胞中に一時的に同時トランスフェクトするとき、設計されたZFP-VP16融合物のすべては、これレポーターを活性化し得た (図3A)。活性化の範囲は、3~15倍の間で変動した。この活性化はZFP依存性であった; Green Fluorescent Protein-VP16融合物は、レポーターを活性化し得なかったからである。図12をまた参照のこと。これらの結果は、設計されたZFPのすべてが染色体外DNAテンプレート上で活性であったことを示す。

20

【0250】

(ZFPを用いる内因性ヒトVEGF-A遺伝子の転写活性化)。これらのZFP-VP16融合物が、内因性染色体遺伝子座からのVEGF-A遺伝子転写の調節においてまた活性であったか否かを試験するために、これら設計されたZFP-VP16融合物を、HEK293細胞中に一時的にトランスフェクトし、そして内因性VEGF-A遺伝子発現に対するそれらの影響を分析した。ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293) は、任意のZFP構築物の不在下で、相対的に低いレベルのVEGF-Aを産生した。図3Cに示されるように、上記のように設計されたZFP-VP16融合物の発現は、ELISAにより測定したとき、培養培地中への高められたレベルのVEGF-Aの分泌を生じた。活性化の範囲は、2~15倍の範囲で変動し、ZFP VZ + 434bが最も活性であった。ZFPにより誘導されるこの増加したVEGF-Aタンパク質の産生は、定量的PCRにより測定したとき、VEGF-A mRNAのレベルにおける2~10倍増加と相関した (図3D)。種々のZFP-VP16融合物は、変動する能力でヒトVEGF-A mRNA転写を活性化し、ZFP VP + 434bが最も活性であった。異なるZFP融合物が、タンパク質レベルのウェスタンブロッティングにより (図3E)、およびmRNA発現に対するTaqmanにより (図3F) 測定したとき、同様のレベルまで発現されたことが見出された。図10および13 (さらなるZFP構築物により誘導されるVEGFタンパク質レベル) および図11 (VEGF mRNAレベルの対応する分析) もまた参照のこと。

30

40

【0251】

VEGF-A遺伝子の接近可能な領域に標的されるZFPの挙動を、非接近可能な領域に標的されるZFPのそれと比較した。これらの研究からの代表的データを図4に示す。試験された4つのすべてのZFPがほぼ等しいレベルまで染色体外レポーター構築物を活性化したが、内因性VEGF-A遺伝子に対する活性に関し、明瞭な食い違いが観察された。接近可能な領域に標的されたZFPは、VEGF-Aを4~5の係数で活性化し、その

50

一方、接近可能な領域の外側の部位に標的されるZFPは、VEGF-A発現レベルにおける認知し得る増加を示さなかった。従って、特定の場合には、設計されるZFPを、細胞クロマチンの設計可能な領域に存在する結合部位に標的することが有利であり得る。

【0252】

(異なる活性化ドメインと融合したZFPによるヒトVEGF-A遺伝子の活性化)。ヒト細胞におけるより高いレベルのZFPによるVEGF-A活性化を達成するために、他の活性化ドメインの性能を試験し、そしてVP16により達成されるそれと比較した。いくつかの設計されたZFPを用いて試験したとき、NF-κBのp65サブユニットからの活性化ドメインの使用がより高いレベルの活性化を提供したことが見出された(図5)。この実験では、いくつかのZFP-p65融合物、例えば、ZFP VZ+434bは、たとえZFP-p65融合タンパク質およびZFP-VP16融合タンパク質が同様のレベルまで細胞中で発現および蓄積されたとしても(図5B)、ZFP-VP16融合物により誘導されるそれよりも3~4倍高いレベルのVEGF-Aタンパク質を誘導した(図5C)。このZFP-p65融合物により誘導されたより高いレベルのVEGF-Aタンパク質産生は、Ta q m a n分析により測定したとき、より高いレベルのVEGF-A mRNA転写と一致した(図5D)。興味深いことに、VZ-8のような、いくつかのZFPについて、p65融合物は、VP16融合物のそれと同様の活性を示した。従って、VP16とp65は、異なる標的部位に依存する活性化機構をもつようである。

【0253】

(ヒトVEGF-A遺伝子の活性化におけるZFP間の相乗作用)。VEGF遺伝子プロモーターの多様な領域を標的にし、そして異なる活性化ドメインに融合したZFPを活性化するセットの利用可能性は、ZFPの異なる活性化ドメインとの組み合わせが、VEGF遺伝子転写の相乗的制御を達成し得るか否かを調査する機会を提供した。この可能性を試験するために、種々のZFP-VP16およびZFP-p65融合物を、ヒトHEK293細胞中に同時トランスフェクトし、そしてVEGFレベルを、ELISAおよびTa q m a nにより測定した。図6に示されるように、ZFPs VZ+434b-VP16およびVZ-573a-p65は、293細胞におけるVEGF産生を、それぞれ8倍および6倍活性化した。しかし、これら2つの融合物を、1:1の比で細胞中に同時トランスフェクトしたとき、VEGF遺伝子活性化のレベル(30倍)は、個々の各々のZFPにより誘導されるレベルと比較して、付加的より多かった。ZFP VZ+434b-p65とVZ-573a-VP16との間の同様の相乗作用もまた観察された。

【0254】

(ZFPによるVEGF誘導の低酸素症により誘導されたVEGF-Aのレベルとの比較)。生理学的に相当するプロセスによるVEGFの活性化に関し、ZFP融合物によるVEGF-A発現の活性化の大きさを評価するために、ZFP融合物により誘導されるVEGFレベルを、低酸素症により誘導されるそれと比較した。試験された多くのZFP融合物について(例えば、ZFP VZ+434b)、ZFPは、低酸素症により誘導されるそれより高いレベルまでVEGF-A発現を活性化し得た。図7に示されるように、低酸素条件下で増殖したHEK293細胞は、通常酸素条件下で増殖した細胞(図7B)におけるより5倍高い定常状態VEGF-A mRNAレベルを有し、そしてVEGF-Aタンパク質は、培養培地中でほぼ400 pg/mlまで蓄積した(10倍増加、図7A)。p65活性化ドメインに融合したZFP VZ+434bは、ほぼ4000 pg/mlまでの培養培地中のVEGFタンパク質の蓄積(図7A)、およびVEGF mRNAレベルにおける20倍の増加(図7B)により証明されるように、低酸素により誘導されるそれより、5~10倍大きいレベルまでVEGF遺伝子の発現を誘導した。この観察はまた、RNAプロット分析により確認された(図7C)。

【0255】

(単一のZFPを用いる複数VEGFスプライス改変体の活性化)。ヒトVEGF-A mRNAのいくつかのスプライス改変体が報告されており、各々は特異的なエキソン付加を含む。F e r r a r a (1999) 上述。主要なVEGF mRNAスプライス改変体

は、VEGF206をほとんど発現せず、胎児肝臓でのみ検出されているが、121、165、および189および206アミノ酸をもつポリペプチドを産生する。設計されるZFPは、天然の染色体プロモーターからの遺伝子転写を活性化したので（上述を参照のこと）、それらは、異なるVEGF-A転写物のすべてを、それらの相対的性質を保存しながら、等しく活性化することが予期される。この考えを確認するために、同じプロモーターからの複数の転写物を活性化するZFP VZ+434bの能力を分析した。スプライス改変体を区別するために、RT-PCRを、異なるスプライシングの領域に隣接するプライマーを、各スプライス改変体について別個のPCR産物が産生されるように用いて実施した。次いでPCR産物を、VEGF165プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションにより分析した。3つのスプライス改変体VEGF-A-189、VEGF-A-165、およびVEGF-A-121を293細胞中で検出し、VEGF-A-165が優先的形態であった。図7Dに示されるように、VP16またはp65融合物のいずれかとして、単一ZFP、VZ+434bの導入は、すべてのスプライス改変体のレベルにおける比例した増加をもたらした。

【0256】

（IV．討論）

この実施例は、そのプロモーター内の多様な標的部位から内因性ヒトVEGF-A遺伝子を活性化し得るZFPのパネルの成功した設計を示す。この実験的アプローチは、VEGF-A遺伝子座のクロマチン構造に関する情報を取り込んだ。なぜなら、特定の状況では、クロマチン構造に関する情報が、ZFP設計原理と組み合わせて用いることができ、内因性遺伝子を特異的に調節し得る人工的転写因子を同定するための効率的手段を提供するからである。本明細書に開示されたいくつかの設計されたZFPは、潜在的なアクチベーターであり、低酸素症による誘導の間に観察されるVEGF-Aレベルを超えるVEGF-Aレベルを生じる。開示された方法および／または開示された組成物の実施には、機構の理解は必要ではないが、DNase I 接近可能な領域に標的される設計されたZFP融合物は、これら領域におそらく結合する天然の転写因子と相乗的に作用し得ることが可能である。

【0257】

本明細書に開示される人工的転写因子のパネルは、VEGF-A遺伝子の多様な部位に標的され、内因性遺伝子座における転写活性化の構造的決定因子を評価するための特異的なツールを提供し、そしていくつかの結果は、クロマチン構造の可能な転写効果を反映する。例えば、ZFPのパネルの異なるメンバーは、染色体外プロモーターレポーター構築物と比較して、内因性VEGF-A遺伝子座の異なるパターンの活性化を示す（図3Bと3Cを比較のこと）。さらに、VP16を実施させるp65活性化ドメインの能力は、位置依存的様式で変動し、VEGF-A遺伝子座内のZFP標的の位置に依存し、相対的活性化レベルは、3の係数を超えて変動し、VEGF-A遺伝子座内のZFP標的の位置に依存する（図5C）。これらの効果は、おそらくは他の調節タンパク質の結合とカップルする、クロマチンにより課せられる構造的文脈から生じる内因性遺伝子座を活性化するために、設計された転写因子の能力に関する制限を反映し得る。それらはまた、異なる活性化ドメインが最適性能のために別個の調節および立体的要求を有するという考えを再強調する。

【0258】

内因性遺伝子座に標的される因子のパネルを生成する能力はまた、種々の適用において実際の利点を提供する。標的遺伝子座のアップまたはダウン調節の影響を研究することで、例えば、遺伝子機能に関する結論は、所望の効果が多くの異なる調節因子を用いて繰り返し観察される場合、最も強力である。さらに、潜在的な医療使用には、複数のZFP候補の利用可能性は、最小の副作用で最適な利益を生じる先導化合物を得るより大きな可能性を提供する。これらタンパク質の使用のさらなる可能性は、転写調節の研究においてにある。例えば、同じ遺伝子座中の任意の部位に複数の活性化ドメインを標的にする能力は、相乗作用の研究において明瞭な適用を有している。この点について、同時トランスフェク

トされたVP16活性化およびp65活性化ドメインを保持するZFPにより媒介される、VEGF発現に対するより大きい付加的効果が、本明細書に開示されている。適切に標的される機能的ドメインのより大きな組み合わせを用いることにより、設計されたZFPは、完全に規定された成分を用いる活性化プロセスの全体的な再構築の見込みを提供し得る。

【0259】

本明細書に開示された研究のさらなる観察は、NF- κ B p65サブユニット (Rubenら、上述) と融合したZFPが、単純ヘルペスウイルスVP16タンパク質の78アミノ酸活性化サブドメイン (Sadowskiら、上述) と同様、またはそれより良好に内因性VEGF遺伝子を活性化することである。VP16およびNF- κ B p65の両方は、強力な酸性活性化ドメインであり、かつ特定の機能的特徴を共有しているが；例えば、ARC/DRIP複合体の召集およびプロモーターDNA上の予備開始複合体の促進されたアセンブリ (Naarら (1999) Nature 398:828-832; Rachezら (1999) Nature 398:824-828)；それらのトランス活性化機構における差異が報告されている。例えば、p300のヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性が、NF- κ Bによる活性化に必要であるがVP16による活性化にはそれほど必須ではないことが示されている。Krausら (1999) Mol. Cell. Biol. 19:8123-8135; Liら (2000) Mol. Cell. Biol. 20:2031-2042。p300の局所的利用可能性または内因性VEGF遺伝子座内のその他の同時アクチベーターが観察された差異を説明し得る可能性がある。

【0260】

最後に、本明細書に開示される設計されたZFPは、生理学的条件下 (例えば、低酸素症) で観察されたそれらに類似する比率で、VEGF-Aの各主要スプライス改変体を上方調節する。これは、最近の研究が適正なイソ形態バランスがVEGF-A機能に重要であることを示唆しているので重要である。Carmelietら (1996) 上述; Carmelietら (1999) 上述; Grunsteinら (2000) 上述。特に、VEGF-Aの165、189および206アミノ酸イソ形態は、増加してより強力なヘパリン結合ドメインを有し、これは、VEGFレセプターに対する提示、および細胞外マトリックスへの結合に関与している。ヘパリン結合能力は、VEGF-A能力の重要な決定因子であり、異なるイソ形態について異なる生物学的活性を生じる。現在、大部分のVEGF-A遺伝子療法試行は、ちょうど一つのVEGF-Aスプライス改変体cDNAまたはタンパク質イソ形態の適用を含む。Isnerら (1996) Lancet 348:370-374; Esakofら (1999) Hum. Gene Ther. 10:2307-2314; Rosengartら (1990a) Ann. Surg. 230:466-470、討論470-472; Rosengartら (1999b) Circulation 100:468-474; Hendelら (2000) Circulation 101:118-121。理想的な遺伝子療法剤は、種々の異なるVEGF-Aイソ形態の天然比率を賦活し得るべきであることが示唆される。従って、本明細書に開示される設計されたZFPを用いるVEGF-Aの活性化は、この点に関して利点を提供し、プロ血管形成遺伝子療法剤の重要な成分を提供する。

【0261】

(実施例2)

(内因性マウスVEGF遺伝子の活性化)

マウスVEGF遺伝子の配列 (GenBank受託番号U41383) を、ZFP標的部位についてサーチし、そして、VG10A/8Aと称するZFPを、転写開始部位の下流の56と73ヌクレオチドとの間の部位に結合するように設計した。この標的部位の配列は、5'-TGAGCGGCGGCAAGCGGAG (配列番号237) である。この標的部位に結合するよう設計された6フィンガーZFPは、認識ヘリックス中に以下のアミノ酸配列をもつ (N末端からC末端方向に進行して) : RSDNLAR (配列番号35) ; RSEDLQR (配列番号159) ; QSGSLTR (配列番号57) ; RSEDLTR

(配列番号 1 2 2) ; R S D E L S R (配列番号 2 3 8) および Q S G H L T K (配列番号 2 3 9)。この 6 フィンガー結合ドメインを、実施例 1 に記載の方法に従って、V P 1 6 活性化ドメインに融合した。この Z F P 融合物をコードするプラスミドを、マウス V E G F プロモーターの制御下のレポーター遺伝子とともにマウス細胞中に同時トランスフェクトし、そしてレポーター遺伝子活性の 2 9 倍活性化を観察した。

【0 2 6 2】

この Z F P 構築物をまた、マウス骨格筋中に注入し、内因性 V E G F 遺伝子の活性化について試験した。プラスミド D N A の 1 m g / m l 溶液の 1 0 0 マイクロリットルを、生きたマウスの四頭筋中の 2 つの異なる部位中に注入した。対側性四頭は、実験注入を受ける筋肉に類似の筋肉中の部位に、Z F P コード配列を欠くプラスミドの 2 つのコントロール注入を受けた。注入針は、注入の同様の深さを確実にするためにマークを付け、そして注入の部位に I n d i a I n k でマークを付けた。

【0 2 6 3】

注入の 3 日後、同一サイズの組織サンプルを、マークを付けた注入部位からパンチパイオプシーにより回収した。この組織サンプルからタンパク質を抽出し、そしてゲル電気泳動により分離した。このゲルをブロットし、そしてこのブロットを抗マウス V E G F 抗体 (R & D S y s t e m s , M i n n e a p o l i s , M N) を用いてプローブした。結果を図 8 に示す。これらの結果は、V E G F の産生が、Z F P - V P 1 6 融合物をコードするプラスミドを注入したマウス筋肉で増加し、しかも V E G F 発現の増加が、注入それ自身に単に起因しないことを示す。

【0 2 6 4】

(実施例 3)

(内因性ラット V E G F 遺伝子の活性化)

ラット V E G F 遺伝子中の部位に標的された Z F P を用い、実施例 2 に記載したのと同様の実験をラットに対して実施した。この Z F P のいくつかは、ヒト V E G F - A 遺伝子中の Z F P 標的部位に相同であり、そしてヒト V E G F - A 遺伝子を活性化することが示された (実施例 1、前述を参照のこと)。これら標的部位およびこれら Z F P の認識ヘリックスの配列は、表 7 中に提供される。Z F P - V P 1 6 融合物を、実施例 2 に記載のマウス注入と同様に、ラット骨格筋血に注入した。抗ラット V E G F 抗体 (R & D S y s t e m s , M i n n e a p o l i s , M N) を用いるイムノブロッティングによる分析は、すべての Z F P 融合物がラット V E G F 産生を活性化し、そして B V O 1 2 A - 1 1 A、B V O 1 4 A - 1 3 B、および V O P 3 2 B が 5 ~ 1 0 倍の間で V E G F 発現の顕著な増加を誘導したことを示した。

【0 2 6 5】

(実施例 4)

(V E G F 標的化 Z F P 融合物を用いる、マウスにおける創傷治癒および血管形成の刺激)

この実施例では、パンチパイオプシー創傷をマウスの両方の四頭筋中に作製した。C M V プロモーターの転写制御下の V G 1 0 A / 8 A Z F P - V P 1 6 融合物をコードするプラスミドを (実施例 2、上述で用いたように)、創傷の 1 つの周縁中に注入し、そして Z F P 結合ドメインをコードする配列を欠くコントロールプラスミドを、対側の創傷中に注入した。3 日後、組織を切除し、そしてヘモシアニン & エオシン染色した薄い切片を顕微鏡で調べた。結果を図 9 に示す。図 9 B は、低倍率画像を示し、そこでは、内成長する組織の縁が、創傷を覆う血栓の下に見られる (頂部左の血栓、内成長する組織の縁が矢印頭により示される)。対照的に、図 9 A に示されるコントロール注入組織では血栓の下に内成長する組織は見られない。図 9 D および 9 F は、高倍率画像を示し、これは、図 9 C および 9 E に示されるコントロール注入組織に比較して、多数の毛細血管断面および赤血球細胞により証明されるように、Z F P 注入組織中の増加した血管形成を示す。

【0 2 6 6】

この実験の結果は、標的された Z F P 融合物による V E G F 遺伝子の活性化が、より速い

創傷治癒および増加した血管形成に至ることを示す。

【0267】

(実施例5)

(単一のZFP融合タンパク質を用いる複数ヒトVEGF遺伝子の調節)

この実施例では、単一ZFP融合物が複数のヒトVEGF遺伝子を調節する能力を試験した。表2に示されるように、VOP28A ZFPおよびVOP30A ZFPは、VEGF-AおよびVEGF-C両遺伝子中に標的部位をもつ。VOP28Aは、VEGF-A遺伝子中-573に、およびVEGF-C遺伝子中+61に標的部位をもち；その一方、VOP30Aは、VEGF-A中+42および+530に、そしてVEGF-C中-481に1つの標的部位をもつ。

10

【0268】

HEK293細胞を、実施例1、上述に記載の方法に従って、VOP28A-VP16融合物またはVOP30A-VP16融合物のいずれかをコードするプラスミドでトランスフェクトした。同時トランスフェクションの40時間後、VEGF-A mRNAを、表5に示すプライマーおよびプローブを用い、実施例1に記載のように、TaqMan（登録商標）により定量した。VEGF-C mRNAは、表8に開示されるプライマーとプローブを用い、実施例1に開示された方法に従って、同じRNAサンプル中で定量した。図14に示される結果は、VOP28AおよびVOP30A融合タンパク質の各々が、VEGF-A mRNAおよびVEGF-C mRNAの両方の産生を活性化することを示す。

20

【0269】

コントロールとして、HEK293細胞を、VOP32B-VP16融合物をコードするプラスミドでトランスフェクトした。VOP32Bは、VEGF-A遺伝子中、+434に標的部位をもつが、VEGF-C遺伝子中に標的部位はもたない。これら細胞では、VEGF-C mRNAレベルに変化はないが、VEGF-A転写の強い活性化が観察された（図14）。

【0270】

これらの結果は、複数のVEGF遺伝子が、単一のZFPにより調節され得、血管形成のより効率的な調節に至ることを示す。

【0271】

30

(実施例6)

(VEGF-標的ZFP融合物を用いるマウス中のVEGFのインビボ誘導、ならびに血管形成および創傷治癒の刺激)

(I. 緒言)

この一連の実験は、適切に設計されたZFP融合タンパク質の、インビボにおけるVEGFの発現を活性化する能力をさらに示すため、およびこのようなタンパク質の、ヒトにおける対応するプロセスのモデルとして用いられるマウスモデル系中の血管形成および創傷治癒を刺激する能力を示すために設計された。

【0272】

操作されたZFPおよび染色体構造の知見を、種々の異なる型の調査に用いて、VEGF Aの選択的な活性化を達成した。実施例1のように、DNase I 超高感度マッピング分析による標的の同定の後、VEGFを刺激する特定のZFPを設計した。これらの最初の実験は、NIH3T3細胞およびC127I細胞の両方における3つの異なるDNase Iの利用可能領域の同定を導いた。ZFPを、各々の細胞型において同定した利用可能領域内の9bpまたは18bpの標的部位のいずれかに結合するように設計した。これらの設計されたZFPの各々は、0.6nM未満の見かけの K_d で、意図する標的に緊密に結合し、かつ天然に存在する転写因子(Sp1)よりも緊密に結合することが示された。

40

【0273】

次いで、1つの設計されたZFPおよびVP16転写活性化ドメインの1つを含む融合タ

50

ンパク質 (Sadowskiら、(1998) Nature 335:563-564) を、それらがC127I細胞中の内因性VEGF-A遺伝子の発現を活性化する能力について、転写およびタンパク質レベルの両方で試験した。以下により十分に記載されるように、その結果は、設計されたZFPが、内因性のVEGF-A位置を活性化し得、そしてそのように作用して、新脈管形成、上皮再形成、および創傷治癒のプロセスを促進することを実証する。

【0274】

(I I 実験手順)

(A. VEGFを調節するジンクフィンガータンパク質の設計)

(マウスVEGF-A位置におけるDNase-I利用可能な染色体領域のマッピング) 10
C127I細胞およびNIH3T3細胞を、American Type Culture Collectionから得、そして実質的に供給者によって推されるように、維持した。核を単離して、そしてDNase-I (Worthington) 消化が22℃で1.5分にわたり、用いるDNase-Iの濃度が図15Aの凡例に示されるようなものであることを除いて、本質的に記述されるように (Zhangら、(2000) J. Biol. Chem. 275:33, 850-33, 860; およびLiuら、(2001) J. Biol. Chem. 276:11, 323-11, 334)、DNase-Iで処理した。次いでゲノムDNAの単離、制限酵素消化、およびサザンブロット分析を、酵素およびプローブが、図15Aに示されるようなものであることを除いて、実質的に記載されるように (Zhangら、前出; およびLiuら、2001、前出) 実施した。 20

【0275】

(ジンクフィンガータンパク質をコードする遺伝子の合成) 3フィンガーZFPmVZ+426およびmVZ+509をコードする遺伝子のアセンブリは、記載されている (Liuら、2001、前出) [その研究において、これらの設計は、各々VZ+434およびVZ+42/+530として示された。]。簡単には、各々の3フィンガータンパク質の α -ヘリックス領域および β -シート領域をコードするオリゴを、PCRを用いて構築し、そして各々の得られたZFP遺伝子を、マルトース結合タンパク質をコードするDNAとの融合物としてpMal-c2プラスミド (New England Biolabs) へとクローニングした。

【0276】

6フィンガータンパク質mVZ+57をコードする遺伝子を構築するために、以下の2つの工程の戦略を用いた。第1に、VZ+57のフィンガー1~3および4~6に対応する3フィンガータンパク質をコードする遺伝子を構築し、そして上記のようにクローニングし、構築物pMal-c2「1~3」およびpMal-c2「4~6」を産生した。次に、これらの2つの遺伝子を、可撓性ペプチドリンカーをコードする短いDNAスペーサーを介して結合させた。これを以下のように達成した: (i) プライマー5' CCC AGA TCTTG GTGATGGCAAGAAAGAAAGCAGCATCCATCTGCCACATCCAG (配列番号241) および5' CCC AAAGCTTA GGATCCACCCCTTCTTGTTCCTGGTGGGT (配列番号242) を用いた「4~6」ZFP遺伝子のPCR; (ii) Bgl I IおよびHind I I Iを用いた、得られたフラグメントの 40
消化 (プライマー中の下線部位); ならびに (iii) BamH I IおよびHind I I I部位へのpMal-c2「1~3」のライゲーション。得られたタンパク質 (VZ+57) は、可撓性ペプチドによって、以下のようなフィンガー3の第2のジンク配位ヒスチジンとフィンガー4の第1のジンク配位システインとの間のアミノ酸配列: HQNKKGSGDGKKKQHIC (配列番号243) と結合された「1~3」および「4~6」の3フィンガーモジュールからなる。

【0277】

(結合の研究) 結合の研究を、緩衝液を以下の最終組成物に改変したことを除いて、実質的に記載されるように (Liuら、(2001) J. Biol. Chem. 276:11, 323~11, 334) 実施した: 10mMのTris、100mMのKCl、1 50

mMのMgCl₂、10mMのDTT、0.01mMのZnCl₂、10%のグリセロール、200μg/mlのウシ血清アルブミン、0.02%のIGEPAL。これらの条件下で、SP1（コントロールとして用いた、転写因子を含む天然に存在するジンクフィンガー）は、以前の研究（Liuら、2001、前出）で決定された親和性よりも有意に高い親和性を示し、そして本発明者らの精製した結合緩衝液の使用が、見かけのK_dの差異に寄与したようである。これらの研究に関するZFP濃度を、各々のZFP調製物のDNA結合活性を、結合が実質的に化学量論的な条件（すなわち、ZFPおよび標的部位の濃度がK_dの50倍よりも高い）を用いて測定することによって直接的に決定した。

【0278】

（レトロウイルスベクターの構築） 本明細書に記載されるレトロウイルスベクターは、pLXSN（内的シミアンウイルス（SV40）のプロモーターの制御下のネオマイシン耐性遺伝子を含む、Moloneyマウス白血病ウイルスベースのベクター）由来である。EcoRI制限部位およびXhoI制限部位を用いて、このジンクフィンガーの発現カセットを、pLXSN中のLTRのすぐ下流に配置した。簡単には、全てのZFP構築物は、SV40ラージT抗原由来のN末端核局在化シグナル（Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val）（配列番号224）、ジンクフィンガーDNA結合ドメイン、アミノ酸413～アミノ酸490までの単純疱疹ウイルスVP16活性化ドメイン、およびFLAGペプチド（Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys）（配列番号225）を含んだ。このLXSNベクターを、293 AMPHO PAKTM細胞株において産生した。このLXSNベクターは、0.5～1.0×10⁶ G418耐性コロニー形成単位の範囲のタイターを有した。ウイルスを含む上清をトランスフェクションの48時間後に収集し、0.45mmのポアサイズのフィルターでろ過し、そして標的細胞の形質導入のために新しいものを用いるか、分割し、そして-80℃で保存した。

【0279】

（レトロウイルス形質導入） AMPHO-PAKTM 293細胞株をClontechから入手し、製造者の推奨に従い、増殖させた。C1271細胞を、American Type Culture Collection（ATCC）から入手し、そして10%のウシ胎児血清を補充したDulbeccoの改変Eagle培地（DMEN）中で増殖させた。この細胞を、6ウェルのプレート中で、2×10⁴細胞/ウェルの密度でプレートし、次いで24時間後に、8μg/mlのポリブレンの存在下で、2.0mlのウイルス含有上清に曝露し、そして37℃のインキュベーターでインキュベートした。このウイルスを24時間後に取り出し、そして新しい培地を添加した。この細胞を、2日後に分離し、そしてG418含有培地を添加した。G418耐性細胞集団を14日後に確立し、そしてELISAによって、VEGF発現について試験した。この細胞を、5×10⁵細胞/ウェルの密度でプレートし、24時間で再形成させ、そして培地を、24時間後にELISAのために収集した。

【0280】

（B. アデノウイルス構築および実験）

（構築） ジンクフィンガータンパク質（ZFP）cDNAをコードする組換えE1A/E1B欠失アデノウイルスベクターを、Ad-Easyシステム（T.-C. Heら、（1998）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95:2509-2514）を用いて産生した。簡単には、VEGFを調節するZFPをコードするcDNAをpAd-Track-CMVシャトルベクターへとサブクロニングした。このベクターは、2つの別のCMVプロモーターを含み、一方は、挿入されたcDNAの発現を指向し、そして他方は、形質導入マーカーの緑色蛍光タンパク質（GFP）の発現を指向する。このシャトルベクターにおいて、緑色蛍光タンパク質およびcDNA発現カセットの両方は、ゲノムアデノウイルス-5配列によって隣接し、ゲノムアデノウイルス-5 DNAでの組換えを可能とする（T.-C. Heら、（1998）前出）。より詳細には、pCDNA MVG（前出の実施例2に記載されるような、ジンクフィンガー結合ドメインVG

10 A / 8 A をコードするプラスミド) ならびに 3 フィンガー構築物 pC V V O P 30 A および pC V V O P 32 B 由来の、Z F P をコードする挿入物を、E c o R I / H i n d I I I を用いて制限消化によって切断し、そしてシャトルプラスミド p A d T r a c k - C M V 中にサブクロニングし、P m e I を用いて線状化した。

【0281】

各々の構築物を、アデノウイルス-5 ゲノムベクター p A d - E a s y - 1 と共に、エレクトロコンピテント (e l e c t r o c o m p e t e n t) な B J 5183 E . c o l i 細菌へと同時エレクトロポレーションした。V E G F を調節する Z F P をコードし、かつ必須のアデノウイルス E 1 A / E 1 B 遺伝子領域について欠失するアデノウイルス-5 ゲノム DNA クローンを、E . c o l i において、Z F P をコードする p A d - T r a c k - C M V シャトルベクターと p A d - E a s y - 1 との間の組換えによって得た。制限マッピングによって、カナマイシン耐性コロニーを、組換え株についてスクリーニングし、そして適切な制限パターンを有するクローンを、リポフェクタミン試薬を用いてヒト胚腎臓 293 細胞 (H E K 293) へとトランスフェクトした。H E K 293 は、E 1 A / E 1 B 遺伝子を含み、そしてこれらの必須タンパク質を、トランスフェクト株中に提供して、複製欠損 E 1 A / E 1 B 欠損アデノウイルス組換え株の産生および増殖を可能とする。これらの組換え株は、E 1 A / E 1 B 遺伝子機能の欠失に起因して正常な哺乳動物細胞中で増殖しない。アデノウイルスストックを、記載されるように、293 細胞中で拡大し、C s C l 超遠心によって精製し、カラム精製またはリン酸緩衝化生理食塩水に対する透析によって脱塩し、H E K 293 単層上で滴定した (例えば、G i o r d a n o ら、(1996) N a t . M e d . 2 : 534-9 ; および G i o r d a n o ら (1997) C i r c u l a t i o n 96 : 400-3 を参照のこと)。アデノウイルスストックを、-80 % で、20 % グリセロール中で保存した。

【0282】

(インビトロ試験) 上記のアデノウイルスベクターが形質導入後に V E G F - A を調節する Z F P の発現を指向し得たことを検証するために、ラット大動脈平滑筋培養細胞 (S M C) における研究を実施した。上記のように、これらの研究に用いられる Z F P 構築物は、F L A G エピトープおよび V P - 16 活性化ドメインの両方を含む。従って、Z F P 構築物のアデノウイルス媒介発現を、F L A G エピトープおよび V P - 16 活性化ドメインに指向される抗体を用いて、S M C において発現されるタンパク質のウェスタンブロット分析によって評価した。簡単には、S M C を、サブコンフルエンスになるまで培養物中で増殖させ、そして Z F P または緑色蛍光タンパク質 (G F P) (コントロール) のいずれかをコードするアデノウイルスベクターを用いて形質導入した。形質導入を、約 5 の感染多重度で実施した。形質導入の 48 時間後に、この細胞を、スクラップし、そしてタンパク質溶解物を、F L A G エピトープ (F i s h e r S c i e n t i f i c) または V P - 16 のいずれかに対して特異的な抗体を用いるウェスタンブロット分析のために得た。

【0283】

(C . V E G F - Z F P による骨格筋および心筋における V E G F - A 遺伝子の誘導)
(プラスミド注射研究) 多数の異なる V E G F - A 調節 Z F P が内因性 V E G F - A 遺伝子の発現を誘導する能力を、ラット骨格筋において、インビボで試験した。最初の研究を、V E G F - A を調節する Z F P 融合タンパク質または DNA 結合ドメインの非存在の同じペプチド配列を有するコントロールタンパク質のいずれかをコードするプラスミド DNA 発現ベクターを用いて実施した。遺伝子発現が C M V プロモーターによって指向される市販のプラスミド (p C D N A - 3 ; C l o n e t e c h) を、Z F P をコードするプラスミドを構築するための骨格として用いた。

【0284】

V E G F - A を調節する Z F P をコードする 50 μ g の精製したプラスミド DNA を、50 μ l のリン酸緩衝化生理食塩水 (P B S) 中に希釈し、そして 1 c c シリンジ中に吸引した。S p r a g u e - D a w l e y ラットの後足の内転筋を覆う皮膚において微小な切

開を作製し、そしてプラスミドDNAを、30ゲージの針を介して、筋肉中に直接注射した。この部位に、プラスミドDNA送達の点で、少量の墨を注射することによって印を付けた。50 μ gのコントロールプラスミドを、同じ方法を用いて、反対側の後足の内転筋中に注射した。プラスミド送達の3日後または6日後に、このラットを、屠殺し、そしてプラスミド注射部位から骨格筋を、直径1cmの細切採取法を用いて、回収した。この筋組織を、氷冷PBS中ですすぎ、そして液体窒素中で急速に冷凍し、次のウェスタンブロッティングによるVEGF-Aタンパク質発現分析に用いた。

【0285】

ZFPに指向されるVEGF-Aタンパク質発現を、類似のアプローチを用いて、心筋においても評価した。簡単には、麻酔し、そして通気したCD-1マウスにおいて、心臓を、左外側の開胸によって曝した。VEGF-ZFPまたはコントロールペプチドのいずれかをコードする50 μ gのプラスミドDNAを、心尖中に、50 μ l容量で注射した。注射を、注射部位の漂白によって記録した。この胸部を閉じ、そしてこの動物の回復を可能とした。注射の3日後、この動物を屠殺し、そして心臓を取り出した。その尖を、はさみ、氷冷PBS中ですすぎ、液体窒素中で急速に冷凍し、そして、次のウェスタンブロッティングによるVEGF-Aタンパク質発現分析に用いた（これらの実験に関するデータは示さず）。類似の技術は、ラットに用いられ得る。

【0286】

（アデノウイルス注射研究） プラスミドDNA注射研究に用いられる方法論に類似する方法論を用いて、VEGF-ZFPをコードするアデノウイルスベクターまたはコントロール（緑色蛍光タンパク質をコードする）アデノウイルスベクターを、CD-1マウスの後足の内転筋中に注射した。50 μ l容量のPBS中の約 5×10^8 pfuのVEGF-ZFPをコードするアデノウイルスを、1ccのシリンジおよび30ゲージの針を用いて、上記のように、内転筋中に注射した。反対の後足の内転筋に、緑色蛍光タンパク質をコードするコントロールアデノウイルスを注射した。アデノウイルス注射の3日後または6日後に、この骨格筋の注射部位を、VEGF-Aタンパク質発現のウェスタンブロット分析のために、上記のように回収した。マウスVEGF-A調節ドメインおよびラットVEGF-A調節ドメイン（VOP 30A、VOP 32B、BVO12）の両方におけるDNA配列に結合するように設計されたVEGF-ZFPについて、インビボでの試験も、ラット後足の内転筋中で、実施した。注射の容量を、100 μ lに増加させたが、これらの研究を、実質的に上記のように実施した。関連する実験も、同じ容量でプラスミドを用いて実施した。

【0287】

（D. マウス耳の新脈管形成アッセイ）

設計されたVEGF-ZFPがインビボで新脈管形成を誘導する能力を試験するために、VEGFを調節するZFPまたはコントロール緑色蛍光タンパク質のいずれかをコードするアデノウイルスベクターの注射後に、マウスの耳における新脈管形成を、評価した（例えば、Pettersson, A. ら、(2000) Laboratory Investigation 80:99-115を参照のこと）。簡単には、1ccのシリンジおよび30ゲージの針を用いて、約25 μ l容量のPBS中の、VEGF-ZFPをコードする約 3×10^8 pfuのアデノウイルスを、マウスの耳に皮下注射した。その反対側の耳に、等量のコントロール（緑色蛍光タンパク質）アデノウイルスを、同様に注射した。注射の3日後および6日後に、この耳を、可視的に検査し、そしてデジタル写真を、同じ設定を用いて、同じ距離で得た。この動物を、屠殺し、この耳を回収し、そして新脈管形成の組織免疫学的分析のためにOTC中に新しいまま冷凍した。

【0288】

（脈管計数） マウスの耳における新脈管形成／血管形成を、内皮細胞に特異的である抗レクチン抗体（Vector Laboratories、Burlingame、CA）を用いて、新鮮なまま凍結した組織の切片で評価した（例えば、Christie、K. N. およびThomson、C. (1989) J. Histochem. Cytoch

em. 37:130、3-1304を参照のこと）。簡単には、冷凍された切片を、アセトンで固定し、PBSですすぎ、そして抗レクチン抗体と共に2時間にわたりインキュベートした。3回の一連の洗浄工程の後、この切片を、アルカリホスファターゼに連結する2次抗体と共に2時間インキュベートし、そしてそのスライドを、市販のアルカリホスファターゼ染色キット（Vecta Inc.）を用いて展開した。脈管数を、切片の同一性に対して盲目的な観察によって抗レクチン免疫染色の顕微鏡分析に基づき、決定した。1つの切片あたり、別々の5つの40×顕微鏡の領域を評価し、領域あたりのレクチン染色された脈管の数を平均した。

【0289】

（E. 創傷治癒）

インビボの機能的生物学的アッセイにおいて、VEGF-Aを調節するZFPが新脈管形成を増加させる能力を評価するために、本発明者らは、皮膚創傷治癒の十分に確立されたモデルを用いた（例えば、Swift, M. E. ら、(1999) Lab Invest. 79:1479-87を参照のこと）。両側の背中に十分再現可能な皮膚創傷を、CD-1マウスにおいて、5mmの細切採取法を用いる5mmの円の皮膚の切開によって作製した。これらの創傷の治癒は、肉芽組織の産生、ケラチノサイトの内方増殖による上皮再形成、および新脈管形成応答を含む。創傷形成のとき、20μl容量のPBS中の約 5×10^8 pfuのVEGF-ZFPをコードするアデノウイルスを、局所的な適用によって、この創傷部位に送達した。その反対側の創傷部位を、緑色蛍光タンパク質をコードするコントロールのアデノウイルスを用いて処理した。

【0290】

5日目に、この創傷部位全体を切開し、そして慎重に二等分し、ホルマリンで固定し、そしてパラフィンブロック中に包埋した。複数の連続する切片を得、そして、組織学的分析および組織免疫学的分析のために用いた。創傷の上皮再形成を、ヘマトキシリンで分析し、そしてエオシン染色した切片を、4×および40×の対物レンズの光学顕微鏡下で評価した。顕微鏡写真の画像を、SPOT CCDカメラを用いて得、そして分析するために、Adobe Photoshopへとインポート（import）した。以下の上皮再形成の2つのパラメータを、評価した：a) 創傷の端部からケラチノサイト内方増殖の先端までの間の距離、およびb) 創傷の反対端部からケラチノサイト増殖の先端の間の距離。全ての測定を、定量的に、コンピューターキャリパを用いて行い、そして全ての切片を、その処理に盲目的な観察によって、評価した。

【0291】

創傷脈管数を、上記の上皮細胞に特異的な抗レクチン抗体を用いた、創傷切片の免疫染色によって決定した。1つの切片あたり5つの別々の顕微鏡の領域（100×の倍率）からの脈管数を計数し、そして1つの切片あたりの結果を平均した。

【0292】

（F. ウェスタンブロット分析）

アデノウイルスZFPまたはコントロールアデノウイルス緑色蛍光タンパク質（GFP）注射の3日後に、ZFP誘導化VEGF発現のウェスタンブロット分析のために、動物を安楽死により殺した。注射部位周辺の骨格筋を、慎重に取り出し、Tris-HCl 50mM (pH 8.0)、NaCl 150mM、SDS 0.1%、NP-40 1%、Na Desoxycholate (0.5%)、およびプロテイナーゼインヒビターを含む溶解緩衝液中で4℃でホモジナイズした。10分間の遠心分離（4℃で10,000g）の後、このタンパク質含有上清画分を、収集し、各々のサンプルの小部分を用いて、タンパク質濃度（BioRad）を決定し、そしてサンプルを、50mMのDTTを含む2倍の充填緩衝液を用いて希釈し（1:1）、そして5分間煮沸して変成させた。等量の総タンパク質を含むサンプルを充填し、そして12%のSDS-PAGEゲル（Tris-グリシン、Novex）を介する電気泳動により分離した。ゲル中のタンパク質を、ニトロセルロース膜に移し、そしてその膜を、マウスモノクローナル抗-VEGF抗体（RDI）に曝露して、VEGF発現のレベルを確認し、ウサギポリクローナル抗-VP16

10

20

30

40

50

抗体 (C l o n e t e c h) に曝露して、Z F P-V P 1 6 融合タンパク質の発現を確認し、そして内部標準としてマウスモノクローナル抗筋肉特異的アクチン抗体 (N C L) に曝露した。T B S Tでの複数回の洗浄の後、このプロットを、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) 結合体化2次抗体と共に室温で、1時間インキュベートし、続いてT B S T洗浄をし、そしてH R P検出のための増加した化学蛍光基質 (P i e r c e) を用いて展開した。

【0293】

(I I I 結果)

(A. マウスV E G F-A位置におけるD N a s e I利用可能領域のマッピング)

Z F P転写調節因子を設計するための戦略は、目的の位置の中の利用可能な領域の優先的な標的化を含む。そのような領域 (これは、D N a s e I高感受性部位のマッピングを介して容易に同定される (G r o s s ら、(1988) A n n . R e v . B i o c h e m . 57:159-197)) は、一般的に、周辺のD N Aの伸長部よりも高分子に対してより利用可能であり、そしてこれらの領域は、しばしば、関連する遺伝子の天然の転写調節因子に対する結合部位を含む。設計したZ F Pを用いるそのような領域の優先的な標的化は、より効果的な調節およびより高い応答の潜在性の両方を生じる傾向にある (L i u ら、(2001) J . B i o l . C h e m . 276:11, 323-11, 334)。従って、本発明者らは、マウスV E G F-A位置においてD N a s e I利用可能領域をマッピングした。N I H 3 T 3細胞株およびC 1 2 7 I細胞株の両方において、本発明者らは、増加されたD N a s e I利用可能性の3つの領域が塩基-550、+1、および+400 (転写開始位置に対する相対的な数字) にほとんど集中したことを観察した (図15Aおよび図15B)。この-550領域および+1領域は、各々、約200塩基対にわたるようであるが、一方で+400領域は、幾分か広くそして約300塩基対を包含する (図15Aおよび図15B)。本発明者らはまた、マウスT M 3細胞株ならびにヒトおよびマウス由来の種々の細胞型 (L i u ら、2001、前出) における、D N a s e I利用可能性の類似のパターンも観察した (データを示さず)。

【0294】

(B. マウスV E G F-Aのクロマチン領域を明らかにするため標的化されたZ F Pの設計および生化学的特徴付け)

本発明者らは、次に、「+1」利用可能領域および「+400」利用可能領域内の標的部位を選択し、そしてこれらの配列を高い親和性で認識するジンクフィンガータンパク質を設計した (図15C)。これを、公知のトリプレット基準物のフィンガーと一緒に連結することによって達成し、所望の配列特異性を有する3フィンガーZ F Pまたは6フィンガーZ F Pのいずれかを産生した。本発明者らのZ F Pの設計を、図15Cに示し、このZ F Pを、マウスV E G F-Aの転写開始位置に関連するこれらの標的位置に従い示す。これら2つの設計 (m V Z + 426およびm V Z + 509) は、3つのフィンガーを含み、そしてヒトおよびマウスにおいて保存される9塩基対の配列を標的化する。本発明者らの第3のZ F P、m V Z + 57は、6つのフィンガーを含み、そしてマウスにおいて存在する (ヒトには存在しない) 18塩基対の配列を標的化する。

【0295】

本発明者らのZ F Pについての遺伝子を構築し (実験手順を参照のこと)、そして各々のタンパク質を発現させ、そして実質的に記載されるように (L i u ら、2001、前出; およびZ h a n g ら、前出) 精製した。次いで、本発明者らは、ゲルシフトアッセイを用いて、各々のZ F PのD N A結合親和性を、特徴付けた。これらの研究のための手順は、改変結合緩衝液を用いたことを除き、実質的に以前に記載されている手順 (L i u ら、2001、前出; およびZ h a n g ら、前出) と同一であった。本発明者らは、本発明者らが設計したZ F Pが、高い親和性 (0.031 n Mの K_d で) で標的に結合することを見出した (図15D)。比較のために、S P 1 (本発明者らの設計物に対する親のZ F P) は、これらの条件下で、そのD N A標的について0.053 n Mの見かけの K_d を示した。

【0296】

(C. ZFPによるマウスVEGF-A位置の活性化)

C127 I細胞株が、本発明者らの設計したZFPによって媒介される活性化を測定する際の発現に対して、VEGF-A発現の相対的に低いバックグラウンドを示すので、本発明者らは、VEGF-A活性化の最初の研究のために、C127 I細胞株を使用することを選択した。これらの研究のために、各々のZFPを、VP16活性化ドメイン、核局在化配列、およびFLAGタグの融合物として、pLXSN (Moloneyマウス白血病ウイルスに基づくベクター) へとクローニングした。次いで、C127 I細胞を、このベクターに曝露し、そして形質導入した細胞集団を、G418を用いて選択した。図16Bに示されるように、本発明者らのZFP-VP16融合物の発現は、VEGF-A mRNAの分析によって決定されるように、VEGF-A位置の活性化を生じ、VEGF-Aメッセージの相対的レベルは、緑色蛍光タンパク質に融合されたVP16活性化ドメインを発現するコントロール構築物と比較して、VZ+426-VP16を4.6倍まで増加させた。本発明者らはまた、ELIZAによって測定される、この培地に分泌されるVEGF-Aタンパク質のレベルにおいて、類似の増加を観察した(図16C)。

【0297】

(D. VEGF結合ZFPによる骨格筋および心筋におけるVEGF-A遺伝子の誘導)

(VEGF-Aを調節するZFPのアデノウイルス媒介発現のインビトロでの特徴づけ)

VEGF-A調節ZFPをコードする組換えアデノウイルス構築物をインビボで試験する前に、このZFPの発現を、ウェスタンブロット分析によって検証した。大動脈平滑筋細胞(SMC)を、VEGF-Aを調節するZFPまたは緑色蛍光タンパク質(GFP)のいずれかをコードするアデノウイルスを用いて形質導入した。形質導入の48時間後、これらの細胞を、リン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し、そしてタンパク質溶解物を調製した。抗VP16抗体または抗FLAGエピトープ抗体のいずれかをを用いるウェスタンブロット分析は、アデノ-VEGF-ZFP形質導入細胞におけるZFP構築物の発現を明らかにしたが、アデノ-緑色蛍光タンパク質(GFP)形質導入細胞におけるZFP構築物の発現は示さなかった(図17A)。

【0298】

(VEGF-Aを調節するジンクフィンガータンパク質VOP30Aをコードする組換えアデノウイルスの注射後のVEGF-Aタンパク質発現) VP16活性化ドメインに融合されたVOP30A ZFP結合ドメインを含む融合タンパク質をコードする、50 μ l容量のリン酸緩衝化生理食塩水中の約 5×10^8 pfuのアデノウイルス(アデノ-VOP30A)を、CD-1マウスの後足内転筋へと注射した。その反対側の後足の内転筋に、コントロールとして、緑色蛍光タンパク質をコードするアデノウイルス(アデノ-GFP)を注射した。この注射の3日後に、注射部位を包含する筋肉を収集し、これを用いて、VEGFタンパク質発現のウェスタンブロット分析のためのタンパク質溶解物を調製した。図17Bに例示されるように、アデノウイルス媒介VOP30A遺伝子発現は、VEGF-Aタンパク質発現の著しい増加によって実証される、インビボでのVEGF-A遺伝子の著しい誘導を生じた。抗VP16抗体を用いるウェスタンブロットティングにより、注射された筋肉におけるVOP30A構築物の発現を検証した。

【0299】

(アデノ-MVGの注射後のマウスにおけるVEGF-Aタンパク質発現の誘導)

アデノ-MVGまたはコントロールとしてのアデノ-GFP(緑色蛍光タンパク質)の骨格筋注射を、直前に示すように達成した。注射の3日後に、VEGF-Aタンパク質発現を、ウェスタンブロットによって評価した。VEGF-Aタンパク質発現の誘導を、図17Cに示されるように観察した。骨格筋タンパク質溶解物の等量の負荷を、アクチンの免疫染色によって検証した。

【0300】

(VEGF-Aを調節するジンクフィンガータンパク質をコードするプラスミドの骨格筋注射の後のラットにおけるVEGF-Aタンパク質発現) Sprague-Dawley

y ラットの後足内転筋中に、ZFPをコードするプラスミド VOP 30A、VOP 32B、BVO 12A、BVO 14Aまたはコントロールプラスミド（ZFP結合ドメインを欠失する）を注射する試験を実施した。全てのプラスミドにおいて、タンパク質発現は、CMVプロモーターによって指向された。遺伝子注射の3日後に、その注射部位を摘出した。図17Dに示されるような、生じたタンパク質溶解物のウェスタンブロット分析の結果は、4種類の全ての構築物によるVEGF-Aタンパク質の誘導を示す。

【0301】

（E．新脈管形成の誘導）

（VEGFを調節するジンクフィンガータンパク質をコードする組換えアデノウイルスの皮下注射は、マウスの耳において新脈管形成を誘導する） VEGF-Aを調節するジンクフィンガータンパク質がインビボで新脈管形成を誘導する能力を評価するために、本発明者らは、マウスの耳中に、VEGFを調節するZFPをコードする組換えアデノウイルスを皮下注射した。25 μ l 容量中の約 5×10^8 pfuを、CD-1マウスの耳中に、皮下注射した。その反対側の耳に、同じ様式で、緑色蛍光タンパク質（GFP）をコードするコントロールのアデノウイルスを注射した。3日後および6日後に、この動物を可視化し、そして耳のデジタル写真を撮影した。図18A～Dに示されるように、VEGF-Aを調節するZFPをコードする遺伝子（VOP 30AまたはVOP 32B）のアデノウイルス媒介送達は、増大した耳の新脈形成を生じた。これらの結果は、図18Eに示されるように、形式的脈管数と関連した。

【0302】

（増加した脈管形成を、VEGF-Aを調節するジンクフィンガータンパク質をコードする遺伝子のアデノウイルス媒介送達後の脈管数によって検証する） ちょうど記載された耳の新脈管形成アッセイにおけるVEGF-Aを調節するZFPをコードする遺伝子のアデノウイルス媒介送達の効果をさらに特徴付けるために、免疫組織化学によって容易にされる脈管計数を、コントロールおよびVEGF-ZFP（VOP 30AまたはVOP 32B）処理されたマウスの耳からの切片で実施した。脈管計数を、処理群に対して盲目的な観察によって実施し、そして40倍の倍率で、切片あたり5つの別々の領域を計数することによって測定し、そしてその値を平均した（3日目に、1群あたりn=5；6日目に1群あたりn=4）。図18Eに示されるように、このアプローチを用いて実施されたアッセイはまた、緑色蛍光タンパク質をコードするアデノウイルス（灰色四角）と比較して、ZFPをコードするアデノウイルス（黒色四角）を注射した耳について脈管形成の有意な増加を見出した。

【0303】

（ZFP構築物による内因性VEGF-A遺伝子の活性化から生じる新脈管構造は、過浸透性ではない。）さらなる耳新脈管形成の研究は、以前に記載されたアプローチ（Thurston, G. ら、2000、Nature Medicine 6:460-463）の改変を使用した。簡単に言えば、ZFPを活性化するVEGF-AまたはマウスVEGF164のいずれかをコードするアデノウイルスベクターを、CD-1マウスの耳に皮下注射した（15 μ l 容積中に 10^8 pfu）。反対側の耳に、GFPをコードするアデノウイルスを注射した。デジタル写真を3日後または6日後に得た。エバンスブルー色素（200 μ l の4%溶液）を尾静脈に注射し、3時間後に、耳での分布を評価し、写真を撮った。次いで、マウスを屠殺し、耳をOTC中に包埋し、液体窒素冷却イソペンタン中で凍らせた。5 μ mの切片を冷アセトン：メタノールで固定し、モノクローナル抗PECAM抗体で免疫染色し、そして以前に記載されるように、管の計数を得た（Giordano, F. J. ら、2001、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:5780-5785）。

【0304】

VEGFは、強力な血管透過性因子であり、マウス耳モデルにおいて、出血および脈管内の色素の血管外遊出を誘導することが示された（Petersson, A. ら、2000、Lab. Invest. 80:99-115）。興味深いことに、マウスVEGF1

64をコードするアデノウイルスで同様に処置された耳と比較する場合、ZFP誘導性の新脈管構造は、自発的には出血性でなく、そして、エバンスブルー色素注入に対して浸透性ではなかった(図22を参照のこと)。他の実験において、アンギオポイエチン(angiotensin)1(より「成熟した」非漏出性新脈管構造の増殖を促進する能力が以前に示された増殖因子)の発現は、VEGF-ZFP処置細胞において誘導されなかった。

【0305】

図22に示されるように、VEGF-A発現のZFP誘導性発現から生じる新脈管構造は、マウスVEGF164 cDNA発現によって生じ、新脈管構造のように過浸透性ではない。

10

【0306】

(F. 加速された創傷治癒)

(皮膚創傷治癒は、ZFPを調節するVEGF-Aによって加速される。)

両側の皮膚創傷を、パンチ生検鉗子を使用して5mmの円形の皮膚を切除することによって、CD-1マウスの背中に生成した。創傷時に、VEGF-A調節ジンクフィンガータンパク質(MVG)をコードするアデノウイルスを傷に局所的に適用した。対側性の創傷を、緑色蛍光タンパク質をコードするコントロールアデノウイルスの局所的適用によって処置した。

【0307】

VEGF-A調節ZFPを用いる処置が、創傷後5日に記録された、再上皮形成の度合いをどのように増加するかということの例が、図19Aおよび図19Bに示される。矢印は、創傷へのケラチノサイトの内殖のリーディングエッジを示す。明らかなように、そして、図19Cのグラフに示されるように、ケラチノサイトの内殖のエッジ間の距離は、VEGF-ZFP処置によって減少する；従って、再上皮形成は増強され、全ての測定を、取り込まれたデジタル画像およびコンピューターカリパープログラムを使用して実行した。グラフに示される値は、相対的単位である。

20

【0308】

(創傷再上皮形成は、VEGF-A調節ZFPを用いた処置によって増強される)

図20Aおよび図20Bに示されるように、創傷へのケラチノサイトのリーディングエッジの内殖は、VEGF-A調節ZFP(MVG)をコードする組換えアデノウイルスの局所的適用によって増強される。図20Aおよび図20Bの左下の矢頭は、創傷エッジをマークし、各々の図の上の矢印は、創傷後5日でのケラチノサイトの内殖の範囲をマークする。この分析は、図19Aおよび図19Bに示されるケラチノサイト内殖錐体間の距離の定量に対して相補的である。

30

【0309】

VEGF-A調節ジンクフィンガータンパク質をコードする組換えアデノウイルスの局所的適用による、皮膚創傷の処置によって、新脈管形成および増加した血管分布が生じる。皮膚創傷を、VEGF-A調節ZFP(MVG)をコードするアデノウイルスまたは緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードするコントロールアデノウイルスのいずれかを用いて、ちょうど記載されるように処置した。創傷を固定し、薄片化し、そして内皮細胞特異的レクチンに対する抗体を用いて免疫染色した。図21Aおよび図21Bに示されるように、コントロール創傷(図21B)に比べて、VEGF-ZFP処置創傷(図21A)における増加した血管分布が存在する。管計数を、デジタル的に取り込まれた画像上で実行し、そして1切片当たり(1群あたりn=6)の5つの高倍率視野の平均を示す。このアプローチを使用した結果(図21Cを参照のこと)は、免疫染色の結果と一致する。

40

【0310】

(I.V. 議論)

この実施例に記載される実験の結果は、本明細書中に記載されるアプローチを使用する、VEGF-A遺伝子のプロモーター領域内の標的部位へ強固に結合し得るZFPを、設計する能力を例示する。特定のZFPは、意図される標的部位に、次いで、天然に存在する

50

転写因子 S P 1 に、より強固に結合することが見出された。これらの Z F P がインビトロで機能する能力は、Z F P をコードする構築物で C 1 2 7 I 細胞をトランスフェクトし、そして、転写しおよび発現されたタンパク質レベルの両方で、V E G F - A の増加した発現を実証することによって、示された。

【0311】

新脈管形成および創傷治癒についての、いくつかの異なる受け入れられるモデル系を使用し、これらの調査からの結果はまた、Z F P が、新脈管形成の調節するために使用され得、従って、血流および血液送達と関連する広範な種々の状態に影響を与えることを示す。より具体的には、前述の結果は、インビボで1つ以上のV E G F 遺伝子の発現を調節し、それによって管形成を調節する適切な結合能力を有するZ F P をコードするプラスミドまたはウイルス構築物を導入することによって、新脈管形成を調節し得ることを示す。この一般的なアプローチの有用性の例として、この実施例で実施される特定のモデル研究の結果は、導入されたZ F P が、創傷再上皮形成および創傷治癒を有意に加速し得ることを示す。そのような有用性は、受け入れられるモデル系を使用し、そして確立された組織学的方法および免疫組織学的方法によって示された。これらの結果を考慮して、この実施例において例示されるアプローチは、新脈管形成の調節に基づく他の処置適用において使用され得ることが期待される。Z F P を使用した、適切な活性化ドメインまたはリプレッサードメインのいずれかの賢明な選択によって、処置される状態の性質に依存して、新脈管形成を選択的に増加または減少し得る。調査のこの特定のセットが、Z F P を細胞に導入するためにウイルス構築物またはプラスミド構築物を使用して実施される場合、上に記載されるような他の送達方法もまた、使用され得る。本明細書中に記載される実施例および実施形態は、例示の目的のためだけのものであり、それを考慮した種々の改変または変化は当業者に提案され、本願の精神および範囲ならびに添付された特許請求の範囲内に含まれるべきであることが理解される。本明細書中に引用される全ての刊行物、特許および特許出願は、各個々の刊行物、特許または特許出願が、参考としてそのように援用されるように、特異的にそして個々に示されるように、全ての目的について同じ範囲まで、その全体が参考として、本明細書によって援用される。

【0312】

【表1】

表 1 潜在的な標的部位について検査されたV E G F 遺伝子の領域¹

A	B ²	C	D	P1GF ²	ウイルス VEGF- E
-2.3	-1.0	-0.60	-1.0	-1.0	-1.23
+1.1	+0.32	+0.51	+1.0	+1.0	+1.62

¹ 数字は、検査された転写開始部位から上流（負の数）または下流（正の数）の半口塩基対の数を示す。

² P1GF配列および-1.0と-0.4との間のV E G F - B配列の部分は、交換に供され得るハイスループットゲノム配列データに基づく。

【0313】

【表2】

10

20

30

40

表 2 VEGF配列における標的部位の位置

ZFP 名	VEGF A	VEGF B	VEGF C	VEGF D	VEGF E (PLDGF)	ウイルス VEGF
BVO 13A	+851					
EP10A	-1083 +534	-31	-252			
GATAS2Z7678	-485	-170			+183	
HBV 3	+779		-245			
HP38 4A	-2248 -1413 -1055 -633	-119	+479 +510	+805	-29 +210	
HUM 17A	-1002 +472				-33	
HUM 19A	-1016					
MTS 5A	-2251				+213	
MX1E	+851					
PDF 5A	+590				-748	
RAT 24A	+711					
SAN 16A	-1954					
USX 3A	+554 +928		-230			
VEGF 1	-8				-454 -348 -36	
VEGF 1*3	-8				-454 -348 -36	
VEGF 1A	-8				-454 -348 -36	
VEGF 1B	-8					
VEGF 1C	-8					
VEGF 1D	-8					
VG 10A	-1412 -354	-774				
VG 1B	-2252	-943				
VG 4A	-1083	-31	-252			
ZFP 名	VEGF A	VEGF B	VEGF C	VEGF D	VEGF E (PLDGF)	ウイルス VEGF

(表 2 の続き)

VG 8A	-2248 -633 -475 -391	-119 -784	+479 +510	+313 +805	-903 -29 -22 +179 +210	+575
VOP 28A-2	-573		+61			
VOP 30A-4	+42 +530		-481			
VOP 32A-6	+434					
VOP 32B-7	+434					
VOP 35A-10	+892					
ZEN-7A 1	-1273 -573	-945	+61		-675	
BVO 10A-9A	+621					
BVO 12A-11B	+806					
BVO 14B-13A	+851					
VOP 29A-3	+5					
VOP 32C	+434					
VOP 32D	+434					
VOP 32E	+434					
VOP 32F	+434					
VOP 32G	+434					
VOP 32H	+434					
VOP 32I	+434					
VOP 32J	+434					

【 0 3 1 4 】

【 表 3 】

表 3 ヒトVEGF 糖鎖修飾化ZFPの修飾部位および認識ヘリックス配列

ZFP 名	糖鎖	SEQ. ID NO	F 1	SEQ. ID NO	F 2	SEQ. ID NO	F 3	SEQ. ID NO	K _d (nM)
BVO 13A	ATGGACGGG	1	RSDHLAR	30	DRSNLTR	59	RSDALITQ	88	<0.2
BP10A	KGGGGCTGG	2	RSDHLTT	31	DRSHLSR	60	RSDHLISK	89	0.35
GATA822678	GAGKRGYG	3	RLDGLAR	32	DRDHLTR	61	RSDNLAR	90	1.8
	GGGGGAGGW	4	QTGHLAR	33	QSGHLAR	62	RSDHLAR	91	3.0
BP38 4A	GDDTGGGGG	5	RSDHLAR	34	RSDHLTT	63	QRAHLAR	92	0.75
HUM 17A	ARGGGGAG	6	RSDNLAR	35	RSDHLAR	64	RSDNLITQ	93	<0.2
HUM 19A	TGGGGAGAC	7	DRSNLTR	36	QSGDLTR	65	RSDHLTT	94	0.02
MTS 5A	TGGGGGTGG	8	RSDHLTT	37	RSDHLTR	66	RSDHLTT	95	0.07
MX1E	ATGGACGGG	9	RSDHLAR	38	DRSNLTR	67	RSDALSA	96	3.4
PDP 5A	GYAGGGGCC	10	DRSSLTR	39	RSDHLAR	68	QSGSLTR	97	.23
RAT 24A	GDGGAAGHC	11	ERGTLAR	40	QSGNLAR	69	RSDALAR	98	<0.2
SAN 16A	ARGGARGGG	12	RSDHLAR	41	QSGNLAR	70	RSDALRQ	99	1.03
UBX 3A	GCCTGGGAG	13	RSDNLTR	42	RSDHLTR	71	DRSDLTR	100	0.06
VEGF 1	GGGGAGGVK	14	TTSNLRR	43	RSSNLQR	72	RSDHLAR	101	2.83
VEGF 1*	GGGGAGGVK	15	TTSNLRR	44	RSSNLQR	73	RSDHLAR	102	3
VEGF 1A	GGGGAGGVK	16	TTSNLRR	45	RSDNLQR	74	RSDHLAR	103	0.2
VEGF 1B	GGGGAGGAT	17	QSSNLAR	46	RSDNLQR	75	RSDHLAR	104	2
VEGF 1C	GGGGVGGAT	18	TTSNLAR	47	RSDNLQR	76	RSDHLAR	105	1
VEGF 1D	GGGGAGGAT	19	QSSNLAR	48	RSDNLQR	77	RSDHLAR	106	2
VG 10A	GAWGGGGC	20	DSGHLAR	49	RSDHLTR	78	QSGNLTR	107	ND
VG 1B	ATGGGGGTG	21	RSDNLTR	50	RSDHLTR	79	RSDALITQ	108	ND
VG 4A	GGGGGCTGG	22	RSDHLTT	51	DRSHLAR	80	RSDHLAR	109	ND
VG 8A	GDGTGGGNN	23	QSSHLAR	52	RSDHLTT	81	RSDHLAR	110	.35
VOP 28A-2	GGGGGCGCT	24	QSSDLAR	53	DRSHLAR	82	RSDHLAR	111	<0.2
VOP 30A-4	GCTGGGGGC	25	DRSHLTR	54	RSDHLTR	83	QSSDLTR	112	<0.2

10

20

30

40

(表3の続き)

2桁 名	標的	SEQ. ID NO	F 1	SEQ. ID NO	P 2	SEQ. ID NO	P 3	SEQ. ID NO	R _d [dB]
VOP 12A-6	GGGGGTGAC	26	DRNLTR	55	MSHLR	84	RSDHLSR	113	<.02
VOP 12B-7	GGGGGTGAC	27	DRNLTR	56	TSGHLR	85	RSDHLSR	114	<.02
VOP 12A-10	GGGGGTGAC	28	DRNLTR	57	QSGHLR	86	QSGHLTR	115	<.02
ZEN-7A-1	GGGGGTGAC	29	QSGHLR	58	QSGHLR	87	RSDHLSR	116	<.02
VOP 12A-3	GGGGGTGAC	344	DRNLTR	51	QSGHLR	113	RSDHLSR	42	<.02
VOP 12-C	GGGGGTGAC	26	DRNLTR	55	TSGHLR	245	RSDHLSR	69	ND
VOP 12-D	GGGGGTGAC	26	DRNLTR	55	TSGHLR	246	RSDHLSR	69	ND
VOP 12-E	GGGGGTGAC	26	DRNLTR	55	TSGHLR	247	RSDHLSR	68	ND
VOP 12-F	GGGGGTGAC	26	DRNLTR	55	TSGHLR	248	RSDHLSR	68	ND
VOP 12-G	GGGGGTGAC	26	DRNLTR	55	TSGHLR	249	RSDHLSR	68	ND
VOP 12-H	GGGGGTGAC	26	DRNLTR	55	TSGHLR	250	RSDHLSR	68	ND
VOP 12-I	GGGGGTGAC	26	DRNLTR	55	TSGHLR	251	RSDHLSR	68	ND
VOP 12-J	GGGGGTGAC	26	DRNLTR	55	TSGHLR	252	RSDHLSR	68	ND

【0315】

【表4】

10

20

30

表 4 ヒトVEGF標的化ZFPの標的部位および認識ヘリックスの配列

ZFP 名	標的	SEQ ID NO	F 1	SEQ ID NO	F 2	SEQ ID NO	F 3	SEQ ID NO	F 4	SEQ ID NO	F 5	SEQ ID NO	F 6	SEQ ID NO
BVO 10A- 9A	GTGGAGGGGTCGGGCT	117	QSDLR	120	RSDLTR	123	DSRLR	126	RSDLR	129	RSDLR	132	RSDLTR	135
BVO 12A- 11B	GGAGAGGGGTCGAGTG	118	RSDLTR	121	QSDLTR	124	HRDLTR	127	RSDLR	130	RSDLR	133	QSDLR	136
BVO 14B- 13A	ATGACGGGCGGCGGTA	119	RSDLTR	122	RSDLTR	125	RSDLR	128	RSDLR	131	DSNLR	134	RSDLTR	137

【 0 3 1 6 】

【 表 6 】

表 6 Vegf 標的化 ZFP

ZFP 名	配列 5'-3'	標的		フィンガー 設計	SEQ ID NO:	見かけの Kd (nM)
		SEQ. ID NO:	サブサイト 5'-3'			
VZ-950	GAAGAGGACc	138	GACc GAGg GAAg	EKANLTR RSDNLTR QRSNLVR	149 150 151	0.18
VZ-573	GGGGGCGCTc	139	GCTc GGGg GGGg	QSSDLRR QSSHLAR RSDHLNR	152 153 154	0.63
VZ-475	GTGTGGGGTt	140	GGTt TGGg GTGt	QSSHLAR RSDHLTT RSDALAR	155 156 157	0.35
SP1 (-76/+527)	GGGGCGGGGg	141	GGGg GCGg GGGg	KTSHLRA RSDHLQR RSDHLNR	158 159 160	0.25
VZ-8	GGGAGGATc	142	GATc GAGg GGGg	TTSNLRN RSSNLQR RSDHLNR	161 162 163	2.83
VZ+42/+530	GCTGGGGGCT/g	143	GGCT/g GGGg GCTg	DRSHLTR RSDHLTR QSSDLTR	164 165 166	<0.02
VZ+434b	GGGGGTGACc	144	GACc GGTg GGGg	DRSNLTR TSGHLNR RSDHLNR	167 168 169	<0.02
VZ+434a	GGGGGTGACc	145	GACc GGTg GGGg	DRSNLTR MSHLSR RSDHLNR	170 171 172	<0.02
VZ+472	AAGGGGAGGg	146	GAGg GGGg AAGg	RSDNLAR RSDHLNR RSDNLTR	173 174 175	0.006
VZ+590	GCAGGGGCGg	147	GCGg GGGg GCAG	DRSHLTR RSDHLNR QSGSLTR	176 177 178	0.23
VZ+892	GCTGGAGCAG	148	GCAG GGGg GCTg	QSGSLTR QSGHLQR QSSDLTR	179 180 181	0.24

10

20

30

【 0 3 1 7 】

【 表 7 】

表 7 ラット VEGF 標的化 ZFP の標的部および認識ヘリックスの配列

ZFP 名	標的	位置	認識ヘリックス
BVO 12A~ 11A	GGAGAGGGGGCCGCACTG (SEQ ID NO: 182)	+785	F1: RSDALTR (SEQ ID NO: 186) F2: QSGDLTR (SEQ ID NO: 187) F3: ERGDLTR (SEQ ID NO: 188) F4: RSDHLAR (SEQ ID NO: 189) F5: RSDNLAR (SEQ ID NO: 190) F6: QSSHAR (SEQ ID NO: 191)
BVO 14A~ 13B	ATGGACGGGTGAGCGGCG (SEQ ID NO: 183)	+830	F1: RSDALTR (SEQ ID NO: 192) F2: RSDHLAR (SEQ ID NO: 193) F3: RSDNLAR (SEQ ID NO: 194) F4: RSDHLAR (SEQ ID NO: 195) F5: DRSNLTR (SEQ ID NO: 196) F6: RSDALTR (SEQ ID NO: 197)
VOP 32A	GGGGGTGAC (SEQ ID NO: 184)	+420	F1: DRSNLTR (SEQ ID NO: 198) F2: MSHLSR (SEQ ID NO: 199) F3: RSDHLAR (SEQ ID NO: 200)
VOP 30A	GCTGGGGGC (SEQ ID NO: 185)	+40 +514	F1: DRSNLTR (SEQ ID NO: 201) F2: RSDHLAR (SEQ ID NO: 202) F3: QSGDLTR (SEQ ID NO: 203)
VOP 32B	GGGGGTGAC (SEQ ID NO: 184)	+420	F1: DRSNLTR (SEQ ID NO: 198) F2: TSGHLAR (SEQ ID NO: 85) F3: RSDHLAR (SEQ ID NO: 200)

10

20

【 0 3 1 8 】

【 表 8 】

表 8: VEGF-C mRNA の分析のために使用されたプローブおよびプライマーのヌクレオチド配列

	配列	SEQ ID NO
VEGF-C- 順方向プライマー	5'-TGCCGATGCATGTCTAAACT-3'	204
VEGF-C- 逆方向プライマー	5'-TGAACAGGTCTCTTCATCCAGC-3'	205
VEGF-C- プローブ	5'-FAM-CAGCAACACTACCACAGTGTCCAGGCA-TAMRA-3'	206

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 3 1 9 】

【 図 1 】 図 1 A ~ 1 F は、 V E G F - A のプロモーターにおける増加したクロマチンのアクセス可能性の領域の分析を示す。図 1 A および 1 B は、構築的なアクセス可能部位の分析を示す。示されたヒト (図 1 A) 細胞またはラット (図 1 B) 細胞由来のクロマチンは、透過された核 (「実験手順」を参照のこと) において DNAse I を用いて部分的に消化された後、示された制限酵素およびプローブを使用するサザンブロット分析された。垂直の棒は、 V E G F - A プロモーター領域におけるゲノム DNA を表わす。かぎ形の矢印は、転写開始部位を示し、そしてチェックマークは 100 b p の単位を示す。制限酵素認識部位の位置は、 V E G F - A 転写の開始部位に関して塩基対で示される。DNA の標準的なフラグメントの 1 セットについての移動パターンは、b p で与えられた各々のフラグメントのサイズとともに、各々のゲルの右側に示される。矢印は、 V E G F - A の転写開始部位に関するアクセス可能なクロマチン領域の位置に対する観察されたバンドの関係を強調するために用いられている。DNAse I の濃度 (W o r t h i n g t o n ユニット / m l) は、以下のものであった: H E K 2 9 3 核 (図 1 A、レーン 1 ~ 4) : 0、7、5、15、60; H E P 3 B 核 (図 1 A、レーン 5 ~ 8) : 0、7、5、15、30; 心筋細胞の核 (図 1 B、レーン 1 ~ 4) : 0、3、75、7、5、15; H 9 c 2 (2 -

40

50

1) 核 (図 1 B、レーン 5 ~ 8) : 0、15、30、60。図 1 C は、H E K 2 9 3 細胞には存在しない、初代骨格筋細胞における V E G F - A 転写開始部位の上流約 1 0 0 0 塩基対にあるアクセス可能な領域の存在を示す実験の結果を示す。核を H E K 2 9 3 細胞またはヒトの初代骨格筋細胞から単離したことを除き、詳細は、図 1 A および図 1 B において同様である ; D N A s e I 濃度 (単位 / m l) は、以下のものであった : H E K 2 9 3 の核 (レーン 1 ~ 5) : 0、7.5、15、30、60 ; 初代骨格筋細胞の核 (レーン 6 ~ 10) : 0、3.75、7.5、15、30。図 1 D は、H E K 2 9 3 細胞における V E G F - A 転写開始部位の 5 0 0 b p 下流にあるアクセス可能な領域の存在を示す実験の結果を示す。詳細は、図 1 A および図 1 B において同様である。D N A s e I 濃度 (ユニット / m l) は、以下のものであった (レーン 1 ~ 5) : 0、15、30、60、120。図 1 E は、これらの研究において観察された D N A s e I のアクセス可能な領域の概要を示す。試験された細胞型は、左側に示されている。与えられた細胞型において特定の開かれた領域の観察は、矢印により示されている。「- 1 0 0 0」および「+ 5 0 0」の部位が試験された細胞の一部分集合においてのみ現れるのに対して、「- 5 5 0」および「+ 1」の高感受性領域は全ての試験された細胞型で存在する。主要な転写開始部位に関する塩基 - 1 0 0 0 から + 1 0 0 0 を含む V E G F - A プロモーターの模式図は、下側で提供される。選択的開始部位 (a l t e r n a t e s t a r t s i t e) が、白抜きの矢印により強調されるのに対して、塗りつぶされた矢印は転写開始の主な部位を示す。鍵となる調節エレメントもまた示される (H R E : 低酸素応答エレメント ; S P 1 転写因子についての結合部位および A P 2 転写因子についての結合部位もまた、示される)。D N A s e I のアクセス可能な領域は地図上で勾配を付けて影を付けられた長方形により示される。図 1 F は、V E G F - A 遺伝子のプロモーター領域におけるヒト、マウス、ラット間の配列保存の程度の分析を示す。灰色の輪郭における各々の点は、その点上に集中された 5 0 b p の表示内でラットおよびマウスにおけるヒト V E G F - A 配列の画分の保存を示す。黒色の輪郭は、5 b p ブロックの画分の保存を示すことを除いて同一である。

【図 2 - 1】図 2 A ~ 2 D は、V E G F - A 標的化 Z F P の構築を標的化するための図式を示す。図 2 A は、D N A 結合 α ヘリックスに連結された 2 つの β シートを含む個々のジックフィンガーの構造を示す概略図を示す。この図式は、P a v l e t i c h ら (1991) S c i e n c e 252 : 809 - 817 に基づいている。オリゴ 1、オリゴ 3 およびオリゴ 5 は、 β シート領域をコードし、そしてオリゴ 2、オリゴ 4、およびオリゴ 6 は、D N A 結合 α ヘリックス領域をコードする。図 2 B は、Z F P をコードする核酸のアセンブリについての図式を示す。6 つの重複するオリゴヌクレオチドが、アニールされ、隙間を満たされ、そして結果として生じる二重鎖が、一対の外部オリゴヌクレオチドを用いて増幅された。次いで、P C R 産物は、K p n I および B a m H I を用いて切断され、そして消化生成は、p M a l C 2 細菌発現ベクターにクローン化された。図 2 C は、マルトース結合タンパク質 - V E G F - A 標的化 Z F P 融合物の概略物の概略図を示す。

【図 2 - 2】図 2 A ~ 2 D は、V E G F - A 標的化 Z F P の構築を標的化するための図式を示す。図 2 D は、転写開始部位の位置 (かぎ型矢印)、H E K 2 9 3 細胞における D N A s e I がアクセス可能な領域 (勾配を付けて黒塗りされた長方形)、および V E G F - A 標的化 Z F P についての標的部位の位置 (垂直な矩形) を示す、ヒト V E G F - A 遺伝子の模式図を示す。各々の Z F P 標的部位の上流にあるほとんどのヌクレオチドの位置は、その下の数により示されている。番号付けは、転写開始部位 (+ 1) に関連している。

【図 3 - 1】図 3 A ~ 3 F は、V E G F - A の D N A s e I がアクセス可能な領域に標的化された Z F P の転写活性化性質の分析を示す。図 3 A は、V E G F - A プロモーターレポーター構築物 (上部) の標的および内因性 V E G F - A の染色体 (下部) の標的の模式図を与える。白丸を用いた内因性プロモーターの位置の適用範囲は、これらの領域におけるヌクレオソームの存在を示す。Z F P 標的は、白い垂直な矩形により示され、そして矢印は下にその対応する Z F P の名前と各々の標的と結合する。図 3 B は、Z F P - V P 1 6 融合物によるヒト V E G F - A プロモーターレポーターの活性化についてのアッセイの結果を示す。Z F P - V P 1 6 融合プラスミドは、ヒト V E G F - A プロモーターの 3.4

k b p フラグメントの制御下にルシフェラーゼ遺伝子を含む V E G F - A レポーター構築物と共に H E K 2 9 3 細胞にコトランスフェクトされ、そしてレポーター活性は、「実験手順」で記載されたようにトランスフェクション 40 時間後にアッセイされた。構築的な R e n i l l a ルシフェラーゼ構築物もまたコトランスフェクトされ、正規化のためのトランスフェクションコントロールとして役に立った。Z F P によるレポーターの活性化の倍数は、Z F P ドメインを欠如する V P 1 6 - F L A G 融合物をコードするコントロールベクターの活性と比較して、正規化したルシフェラーゼのレポーター活性に基づいて計算された。

【図 3 - 2】図 3 A ~ 3 F は、V E G F - A の D N A s e I がアクセス可能な領域に標的化された Z F P の転写活性化性質の分析を示す。図 3 C および 3 D は、Z F P - V P 1 6 融合物による遺伝子内因性ヒト V E G F - A の活性化についてのアッセイの結果を示す。Z F P - V P 1 6 融合物をコードするプラスミドは、「実験手順」で記載されたように L i p o f e c t A M I N E 試薬を介して H E K 2 9 3 細胞にトランスフェクトされた。コントロールベクターは、Z F P の代わりに緑色蛍光タンパク質 (G F P) と融合した V P 1 6 - F L A G を発現した。トランスフェクションの 40 時間後、培養培地および細胞は、収集され、そして内因性 V E G F - A 発現についてアッセイされた。図 3 C は、ヒト V E G F E L I S A キット (R & D S y s t e m, M i n n e a p o l i s, M N) を使用する E L I S A により、培養培地中の V E G F - A タンパク質の含有量の測定の結果を示す。Z F P により誘導された V E G F - A タンパク質生成は、コントロールベクターのものとは比較され、そして活性化の倍数が、プロットされた。図 3 D は、「実験手順」で記載されたように T a q m a n 化学を使用する定量的な R T - P C R により測定された、トランスフェクト細胞における定常状態の V E G F - A の m R N A レベルについてのアッセイの結果を示す。V E G F - A の m R N A のレベルは、G A P D H (グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ) の m R N A のレベルに対して正規化された。

【図 3 - 3】図 3 A ~ 3 F は、V E G F - A の D N A s e I がアクセス可能な領域に標的化された Z F P の転写活性化性質の分析を示す。図 3 E は、操作された Z F P の F L A G エピトープタグを認識する抗 F L A G 抗体 (S i g m a, S t. L o u i s, M O) を用いるタンパク質免疫プロット法 (「ウェスタン」プロットティング) による、トランスフェクトされた細胞における Z F P タンパク質の含有量の分析を示す。図 3 F は、T a q m a n により決定され、そして G A P D H の m R N A レベルに対して正規化されたような、トランスフェクトされた細胞における Z F P の m R N A のレベルの分析の結果を示す。プライマーおよびプローブは、V P 1 6 活性化ドメインおよび F L A G タグをコードする配列を認識するように設計された。

【図 4】図 4 A ~ 4 C は、V E G F - A レポーター構築物および内因性 V E G F - A 遺伝子に対する、V E G F - A 遺伝子のアクセス可能な領域およびアクセス不可能な領域に標的化された、Z F P 融合物の効果の分析を示す。図 4 A は、この実験において使用された V E G F - A プロモーターレポーター構築物 (上部) および内因性 V E G F - A 染色体 (下部) の標的の模式図を提供する。白丸を用いた内因性プロモーター部分の適用範囲は、これらの領域におけるヌクレオソームの存在を示す。Z F P 標的部位は、白い垂直な長方形により示され、そして矢印は下にある Z F P に対応する名前と各々の標的を結びつける。図 4 B は、ヒト V E G F - A プロモーターレポーターの活性化を示す。示された Z F P - V P 1 6 融合プラスミドは、「実験手順」で記載されたように V E G F - A ルシフェラーゼレポーター構築物とコトランスフェクトされた。Z F P によるルシフェラーゼ活性の活性化の倍数は、Z F P ドメインを含まない V P 1 6 - F L A G をコードするコントロールベクターのものとは比較して計算された。図 4 C は、内因性のヒト V E G F - A 遺伝子の活性化を示す。示された Z F P - V P 1 6 融合物をコードするプラスミドは、H E K 2 9 3 細胞にトランスフェクトされ、そして培養培地中に分泌された V E G F - A タンパク質の量は、トランスフェクション 40 時間後、図 3 C の説明文で記載されたように E L I S A により測定された。Z F P により誘導された V E G F - A タンパク質生成は、コントロールベクターのものとは比較され、そして活性化の倍数がプロットされた。

【図5】図5A～5Dは、異なる活性化ドメインを含むZFPによる内因性ヒトVEGF-A遺伝子の活性化を示す。種々のZFPが、VP16活性化ドメインまたはNF-κB (p65)由来の活性化ドメインのいずれかと融合された。全ての融合はまた、C末端FLAGエピトープタグを含んだ。図5Aは、VP16活性化ドメイン(AD)またはp65活性化ドメイン(AD)のいずれかを含む、VEGF-Aに標的化されたZFP融合物の説明図を示す。NLS：核移行配列；ZFP：ジンクフィンガーDNA結合ドメイン；FLAG：Flagエピトープタグ。図5Bは、抗FLAG抗体を用いるウェスタンブロットにより分析された、トランスフェクトされた細胞におけるZFPタンパク質の含有量の分析を示す。トランスフェクトされたZFPドメインの身元が、ゲルの各レーンの上に示されている。図5Cは、ELISAにより測定された、トランスフェクトされた細胞の培養培地におけるVEGF-Aタンパク質の含有量を示す。VP16活性化ドメインを含むZFP融合物のトランスフェクションからの結果が、白抜きの棒により表わされている；p65活性化ドメインを含むZFP融合物のトランスフェクションからの結果が、黒塗りの棒により表わされている。図5Dは、Taqmanによる、トランスフェクトされた細胞における定常状態のVEGF-AのmRNAレベルの測定を示す。VP16活性化ドメインを含むZFP融合物のトランスフェクションからの結果が、白抜きの棒により表される；p65活性化ドメインを含むZFP融合物のトランスフェクションからの結果が、黒塗りの棒により表わされている。

10

【図6】図6A～6Dは、異なる活性化ドメインを含むZFP間の、VEGF-A遺伝子の活性化における、共同性の分析を示す。異なるZFP活性化ドメイン融合物を含むプラスミドが、HEK293細胞に1：1の比率でコトランスフェクトされ、そして内因性VEGF-Aの活性化が、トランスフェクション40時間後測定された。図6Aは、実験の模式図を示す。図6Bは、ELISAによりアッセイされた、培養培地におけるVEGF-Aタンパク質の含有量の分析を示す。図6Cは、Taqmanにより測定された、トランスフェクトされた細胞におけるVEGF-AのmRNAレベルの分析を示す。図6Dは、抗FLAG抗体を用いるウェスタンブロットによる、トランスフェクトされた細胞におけるZFPタンパク質の含有量の分析を示す。

20

【図7-1】図7A～7Dは、ZFP VZ+434bpと低酸素とによる、内因性ヒトVEGF-A遺伝子の活性化の比較を示す。HEK293細胞が、VP16またはp65と融合されたZFP VZ+434bpをコードするプラスミドを用いてトランスフェクトされるか、ZFPを発現しないコントロールベクターを用いてトランスフェクトされるか、または24時間低酸素インキュベーター内で低酸素条件(0.5%O₂)に曝された。内因性VEGF-A遺伝子活性化は、図6および「実験手順」で記載されたように測定された。図7Aは、ELISAにより測定された、培養培地におけるVEGF-Aタンパク質の含有量の分析を示す。図7Bは、Taqmanにより測定され、そして18S RNAのレベルに正規化された、定常状態のVEGF-AのmRNAのレベルの分析を示す。

30

【図7-2】図7A～7Dは、ZFP VZ+434bpと低酸素とによる、内因性ヒトVEGF-A遺伝子の活性化の比較を示す。HEK293細胞が、VP16またはp65と融合されたZFP VZ+434bpをコードするプラスミドを用いてトランスフェクトされるか、ZFPを発現しないコントロールベクターを用いてトランスフェクトされるか、または24時間低酸素インキュベーター内で低酸素条件(0.5%O₂)に曝された。内因性VEGF-A遺伝子活性化は、図6および「実験手順」で記載されたように測定された。図7Cは、32P標識化VEGF165リボプローブを使用するRNAプロット(「ノーザン」)ハイブリダイゼーションによるVEGF-AのmRNAの分析を示す。図7Dは、「実験手順」で記載されたようにRT-PCRおよびサザンハイブリダイゼーションによるVEGF-Aスプライシング改変体の分析を示す。

40

【図8】図8は、ZFPを注射されたマウス四頭筋およびコントロールを注射されたマウス四頭筋におけるVEGFの免疫ブロット法分析を示す。VEGFモノマーおよびVEGFダイマーの位置が示されている。

【図9】図9A～9Fは、ZFP-VP16融合物をコードするプラスミドを注射された

50

マウス由来の創傷組織のH & E染色された薄切片の顕微鏡写真を示す。図9 Aおよび9 Bは、低倍率の顕微鏡写真である；図9 C～9 Fは、高倍率である。図9 A、9 Cおよび9 Eは、コントロールプラスミドを注入された創傷組織の切片を示す。図9 B、9 Dおよび9 Fは、ZFP-V P 16融合物をコードするプラスミドを注射された創傷組織の切片を示す。

【図10】図10は、異なるZFPをコードするプラスミドを用いてトランスフェクトされたHEK 293細胞において、ELISAにより検出された、ヒトVEGF-Aタンパク質のレベルを示す。標的部位の身元およびZFP結合ドメインの身元については表2～4を参照のこと。

【図11】図11は、異なるZFPをコードするプラスミドを用いてトランスフェクトされたHEK 293細胞において、リアルタイムPCR (Taqman) により検出された、ヒトVEGF-AのmRNAのレベルを示す。ZFP結合ドメインの身元については表3および表4を参照のこと。図の下部の部分は、抗FLAG抗体を用いる、トランスフェクトされた細胞におけるZFP発現の免疫ブロット法分析を示す。 10

【図12】図12は、VEGFプロモーターの転写制御下でルシフェラーゼレポーター遺伝子をコードするプラスミドおよび異なるZFPをコードするプラスミドを用いてトランスフェクトされたHEK 293細胞における、レポーター遺伝子活性の分析を示す。ルシフェラーゼ活性の誘導の倍数は、ZFPをコードする配列が緑色蛍光タンパク質をコードする配列により置換された、コントロールプラスミドに対して示される。

【図13】図13は、異なるZFPをコードするプラスミドを用いてトランスフェクトされたHEK 293細胞において、ELISAにより検出された、ヒトVEGF-Aタンパク質のレベルを示す。標的部位の身元およびZFP結合ドメインの身元については表2～4を参照のこと。 20

【図14】図14 A～14 Bは、ZFP-V P 16融合物をコードする異なるプラスミドを用いてトランスフェクトされた細胞における、VEGF-AおよびVEGF-CのmRNAの分析を示す。VEGFのmRNAのレベルは、実施例1で記載されたように分析され、GAPDHのmRNAのレベルに対して正規化された。図14 Aは、VEGF-AのmRNAのレベルの分析を示す；図14 Bは、VEGF-CのmRNAのレベルの分析を示す。トランスフェクトされたZFP結合ドメインの名前（表2を参照のこと）およびその標的部位のおおよその位置が、横軸に沿って示されている。 30

【図15】図15 A～Dは、マウスVEGF-A遺伝子座に標的化されたジンクフィンガータンパク質を用いて行なわれたDNA結合分析の、標的化、設計および結果を図示する。図15 Aは、マウスVEGF-Aプロモーター領域におけるDNase Iがアクセス可能な領域の地図作成の結果を示す。示された細胞株由来の核が、DNase Iを用いて部分的に消化され（「実験手順」を参照のこと）その後Bgl Iおよび示されたプローブを使用するサザンブロット分析された。垂直な棒は、VEGF-A遺伝子座のプロモーター領域を表わす。かぎ型の矢印は、転写開始部位を示し、そしてチェックマークは、100 bpの単位を示す。DNA標準フラグメントの1セットについての移動パターンが、ゲルの右側に示されており、各フラグメントのサイズが塩基対で示されている。矢印は、VEGF-Aの転写開始部位に対するアクセス可能なクロマチン領域の位置に対する、観察されたバンドの関係を強調するために用いられている。レーン1～6におけるDNase Iの濃度 (U/ml) は、以下の通りであった：それぞれ0、32、64、0、8および16。図15 Bは、結合研究の1セットについて用いられたZFP標的部位の位置を示す。ヒトVEGF-A遺伝子の模式図が提供されており、主要な転写開始部位（黒塗りの矢印）の位置および報告された選択的転写開始部位（白抜きの矢印）の位置、ならびにこれらの研究において決定されたDNase Iがアクセス可能な領域（勾配を付けて黒塗りされた長方形）を示す。ZFP標的位置が、垂直な白抜きの長方形により示されている、そして各ZFP標的の最も5'側のヌクレオチドの位置が、その下の数により示される。番号付けは、転写の開始部位に関連している。図15 Cは、ZFP標的配列（それぞれ、配列番号207、144および240）およびフィンガーデザイン（それぞれ、配列番号23 40

9、238、122、57、159、35、64、85、36、112、66および54)を列挙する。ZFPは、標的部位の位置および接尾辞mVZ(マウスVEGF-A ZFPについての)に従い名付けられる。フィンガーデザインは、各フィンガーの α ヘリックスの位置-1~+6のアミノ酸残基の身元を示す。図15Dは、結合親和性のゲルシフトアッセイを示す。各タンパク質の3倍希釈系列が、そのDNA標的(それぞれ、配列番号207、144、240および141)への結合について試験され、レーン10において最も高い濃度でありレーン2において最も低い濃度であった。レーン1は、プローブ単独を含む。このような3つの研究の平均から誘導された見かけのKdが、右に示されている。mVZ+426およびmVZ+509について、Kdは、0.01nMのプローブの使用が、おそらくこれらのタンパク質の親和性の過少評価を導いたので、結合の上限値(< 0.01nM)として提供される。

【図16】図16A~16Cは、C127I細胞におけるマウスVEGF-A遺伝子座のZFP媒介活性化を示す。細胞は、各々のZFP転写アクチベーターまたはZFP DNA結合ドメインに代わって緑色蛍光タンパク質(GFP)で置換されたコントロールタンパク質を発現するレトロウイルスベクターを用いて形質導入された。薬剤耐性についての選択後、結果として生じる細胞集合は、TaqManまたはELISAによりVEGF-Aの発現についてアッセイされた。図16Aは、これらの研究で使用されたZFP転写アクチベーターの模式図である。「NLS」、「ZFP」、「VP16」および「FLAG」は、それぞれ、核局在化シグナル、ZFP結合ドメイン、VP16活性化ドメイン、およびFLAGタグの相対的な位置を示している。構築物の詳細な説明については「実験手順」を参照のこと。図16Bは、TaqManTM分析によるC127I細胞におけるVEGF-A遺伝子座のZFP媒介活性化の測定を示す。VEGF-AのmRNAの発現は、GAPDHのmRNAのレベルに正規化されている。図16Cは、分泌されたVEGF-Aタンパク質のレベルをELISA(R&Dシステム)を介して定量化することによりVEGF-A遺伝子座のZFP媒介活性化の結果を示す。

【図17-1】図17A~17Dは、ZFPによるVEGF-Aの発現の誘導を実証するウェスタンブロットを示す。図17Aは、NLS、ZFP VOP30A、VP16活性化ドメインおよびFLAGエピトープを含む融合タンパク質をコードする組換えアデノウイルス構築物を用いて形質導入された培養平滑筋細胞における、ZFP融合タンパク質の発現を実証するウェスタンブロットの結果を示す。抗VP16抗体および抗FLAG抗体の両方が、示されたように使用された。緑色蛍光タンパク質をコードする組換えアデノウイルスを用いて形質導入された細胞が、コントロールとして使用された。図17Bは、コントロールとしての緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードするアデノウイルスと比較して、VOP30Aをコードする組換えアデノウイルスを用いて注射された場合、CD-1マウスの後肢内転筋でのVEGF-Aの発現における顕著な増加を実証するウェスタンブロットを示す。複製サンプルが示されている。

【図17-2】図17A~17Dは、ZFPによるVEGF-Aの発現の誘導を実証するウェスタンブロットを示す。図17Cは、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードするアデノウイルスのコントロール注射に対するマウス骨格筋へのアデノ-MVGの注射(実施例6を参照のこと)後のVEGF-Aタンパク質の発現の誘導を示すウェスタンブロットである。2つの異なったマウスに、MVGが注射され、2匹の別個のマウスに、記載されたようにコントロールが注射された。アクチンのレベルもまた、ローディングコントロールとして免疫ブロット法によって決定された。図17Dは、ZFP骨格をコードするがDNA認識ドメインを欠如しているコントロールプラスミドと比較して、VEGF-Aを調節するZFP VOP30A、VOP32B、BVO12A、BVO14Aをコードするプラスミドの注射後の、ラット骨格筋におけるVEGF-Aの誘導を示すウェスタンブロット法を示す。

【図18】図18A~Eは、確立されたモデルシステムを使用する新脈管形成の誘導を実証する結果を示す。図18Aおよび18Bは、コントロール(図18A)として緑色蛍光タンパク質(GFP)またはZFP VOP30A(図18B)のいずれかをコードする

組換えアデノウイルスを用いた注射後の、マウスの耳における血管新生の写真である。図 18 C および 18 D は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) (図 18 C) または ZFP VOP 32 B (図 18 D) のいずれかをコードするアデノウイルスを用いていることを除いて、図 18 A および 18 B で示された写真と同様の写真を示す。図 18 E は、図 18 C および 18 D で記載された型のアデノウイルスを用いるマウスの耳の注射の 3 日後または 6 日後のいずれかで、免疫染色技術 (下記の実験手順の節を参照のこと) を使用して決定された、血管の数の図表である。この図表は、増加された血管分布を実証し、そして図 18 A および 18 B で示された結果と一致する。

【図 19】図 19 A ~ 19 C は、ZFP を調節する VEGF-A により皮膚の創傷治癒が加速されることを示す結果を示す。両側の皮膚の創傷が、5 mm の円形の皮膚を切除することにより、CD-1 マウスの背部で生成された。創傷する時点で、VEGF-A を調節するジンクフィンガータンパク質をコードするアデノウイルスまたは緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードするコントロールのアデノウイルスが、局所的に創傷に適用された。創傷はまる 5 日後に切除され、この組織は組織学分析および免疫組織学分析のために固定化されパラフィンで包埋された。図 19 A は、創傷および緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードするアデノウイルスによるその後の処置後の、再上皮化の程度を示す。図 19 B は、アデノウイルス MVG を用いた処置が、創傷後 5 日目に注目された再上皮化の程度をどのように増強するかを示す。矢印は、創傷内のケラチノサイト内殖の先端を示す。この図が示すように、ケラチノサイト内殖の縁の間の距離は、VEGF-ZFP 処置により減少される；したがって再上皮化は増強される。図 19 C は、ZFP (暗い影にしている) をコードするアデノウイルス (暗い影にしている) または緑色蛍光タンパク質 (GFP) (明るい影にしている) をコードするアデノウイルスのどちらかを用いて処置された創傷におけるケラチノサイト内殖の先端の間の距離を要約する図表であり、そしてコントロールと比較して、VEGF-ZFP 処置を用いた処置についての距離の有意な減少を示す。

【図 20】図 20 A および図 20 B は、アデノウイルス MVG を用いた処置により創傷の再上皮化が増強されることを示す。各々の写真における下部の矢印は、創傷の縁を標識しており、そして上部の矢印はコントロール (図 20 B) として、MVG (図 20 B) または緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする組換えアデノウイルスを用いた創傷後 5 日目でのケラチノサイト内殖の程度を標識する。

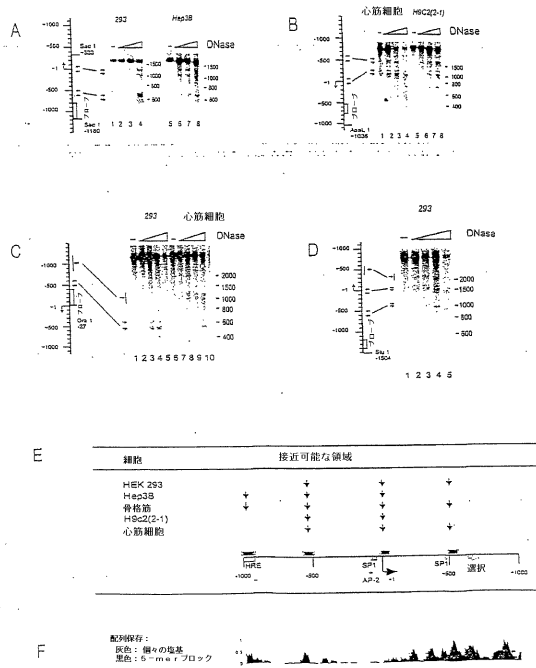
【図 21】図 21 A ~ 21 C は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) (図 21 B) をコードするアデノウイルスと比較して、VEGF-A 調節 ZFP (MVG) をコードする組換えアデノウイルスの局所適用による皮膚の創傷の処置が、血管分布を増加させる (図 21 A) ことを示す。血管の存在は、内皮細胞に特異的な抗体を含む免疫染色を用いて可視化される。図 21 C は、創傷が ZFP (暗い四角) または緑色蛍光タンパク質 (GFP) (明るい四角) をコードするアデノウイルスを用いて処置された場合、デジタル形式で保存された画像をもちいて実施された血管の数の概要を述べる図表である。

【図 22】図 22 は、MVZ+509 により刺激された新脈管形成 (上部および中部の右のパネル) が、エバンスブルー染料の血管外遊出により決定された透過性亢進の新血管系を生じないことを示す (下部の右)。VEGF164 アデノウイルスの改質導入により誘導された新血管系 (左のパネル) は、自発的な出血およびエバンスブルーの血管外遊出を示す。

【図 1】

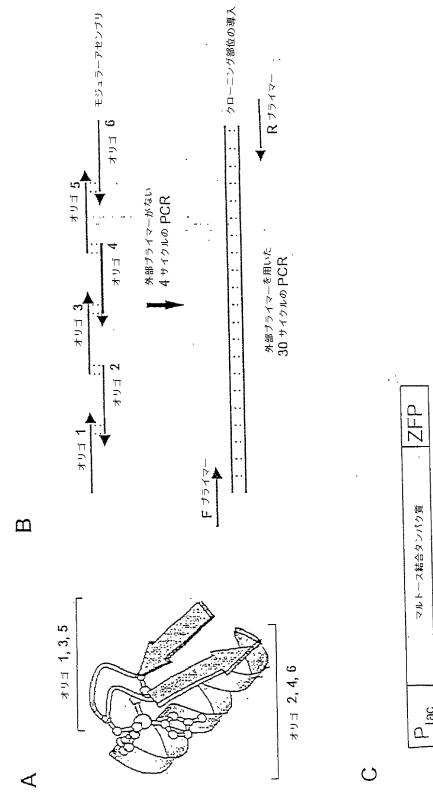
Figure 1

1/27



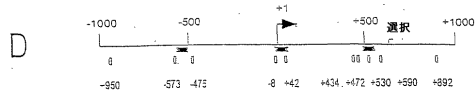
【図 2 - 1】

Figure 2



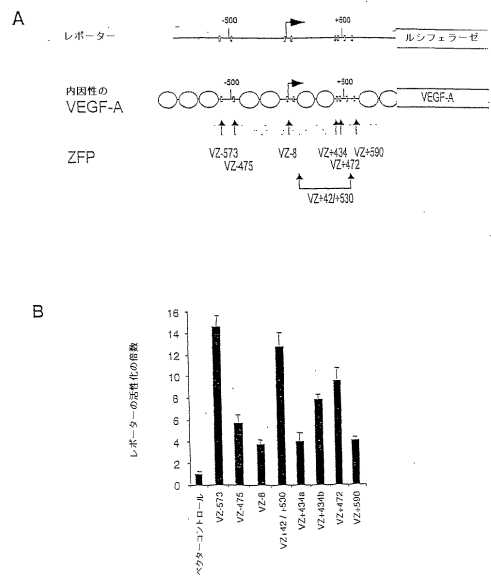
【図 2 - 2】

Figure 2



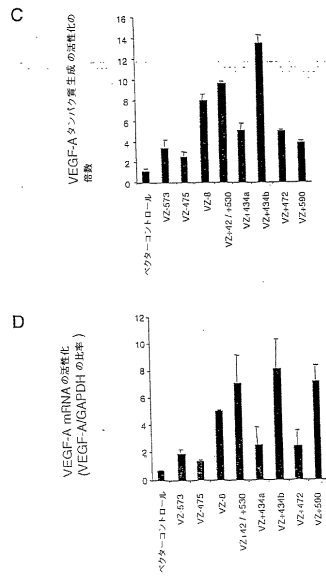
【図 3 - 1】

Figure 3



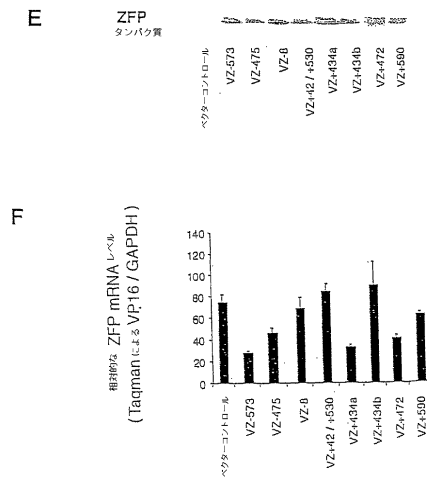
【図 3 - 2】

Figure 3



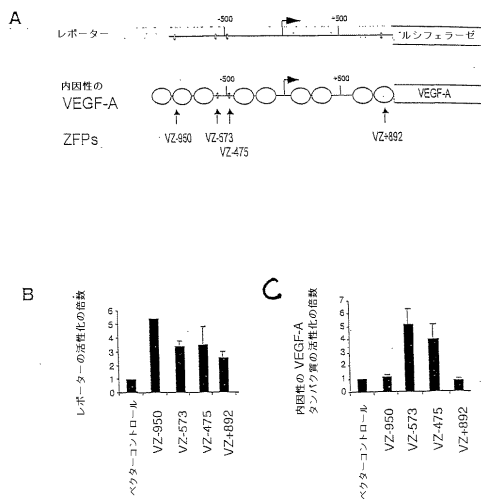
【図 3 - 3】

Figure 3



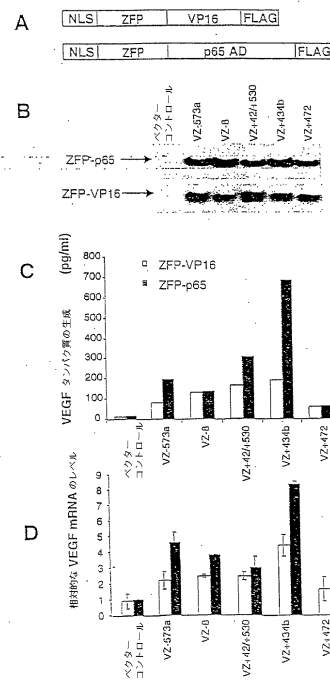
【図 4】

Figure 4

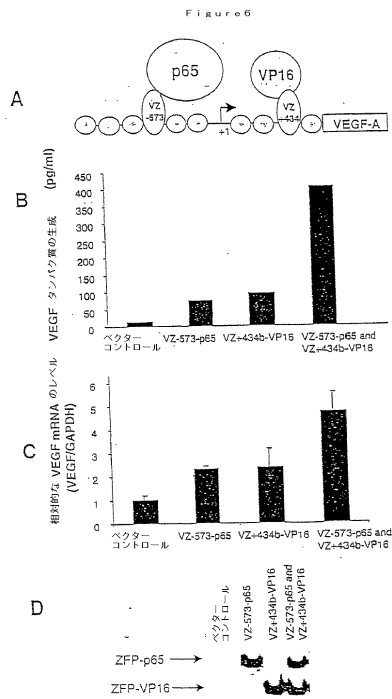


【図 5】

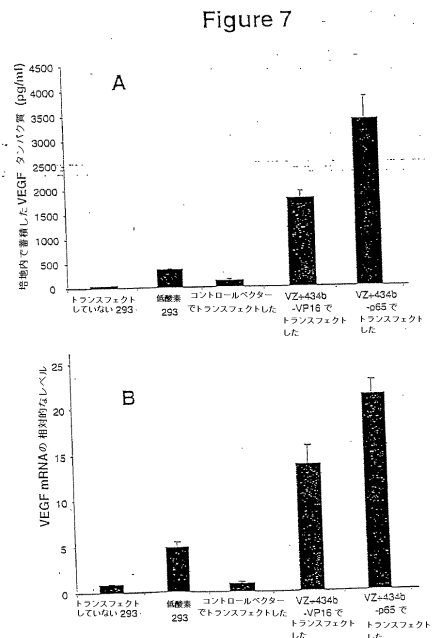
Figure 5



【図 6】

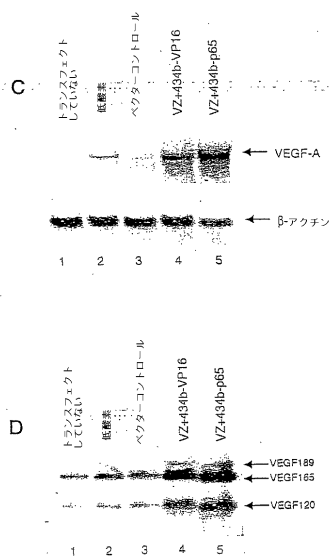


【図 7 - 1】



【図 7 - 2】

Figure 7



【図 8】

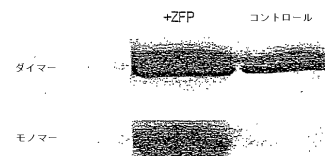


FIG. 8

【図 9】

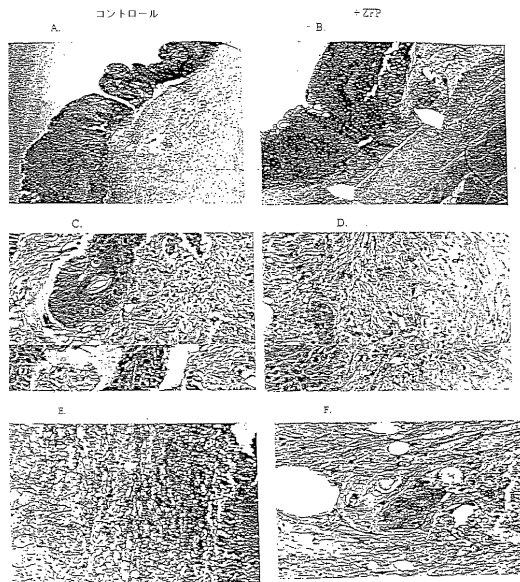
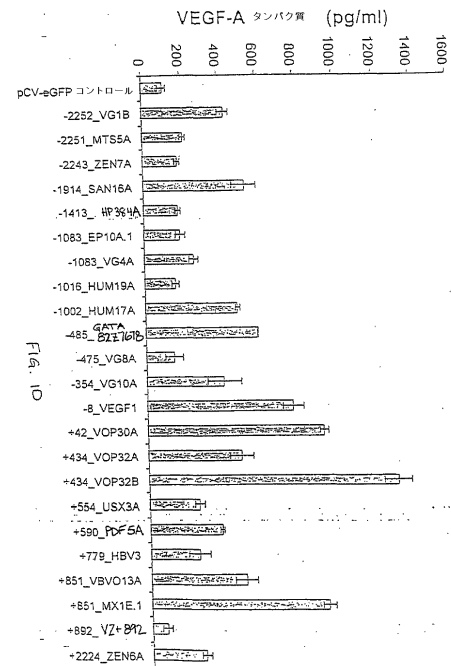
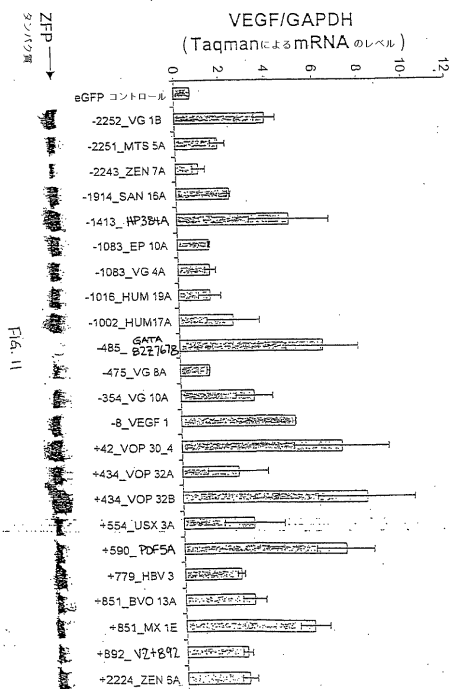


FIG. 9

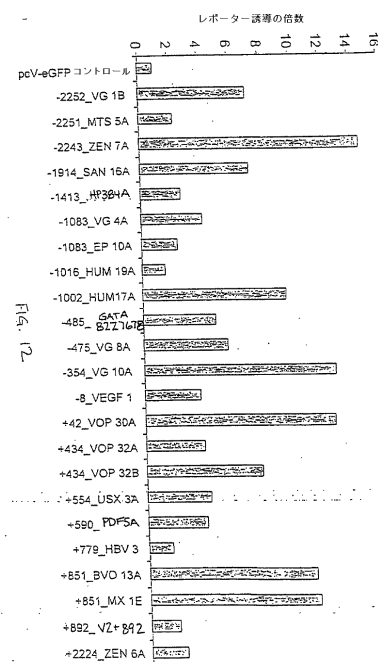
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【図 13】

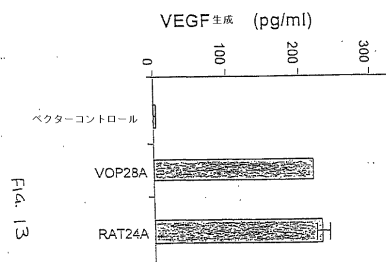


Fig. 13

【図 14】

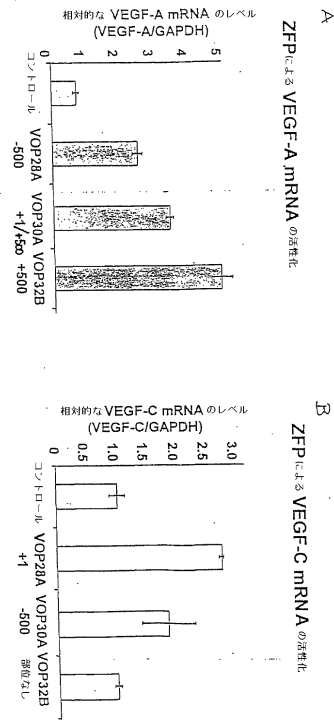
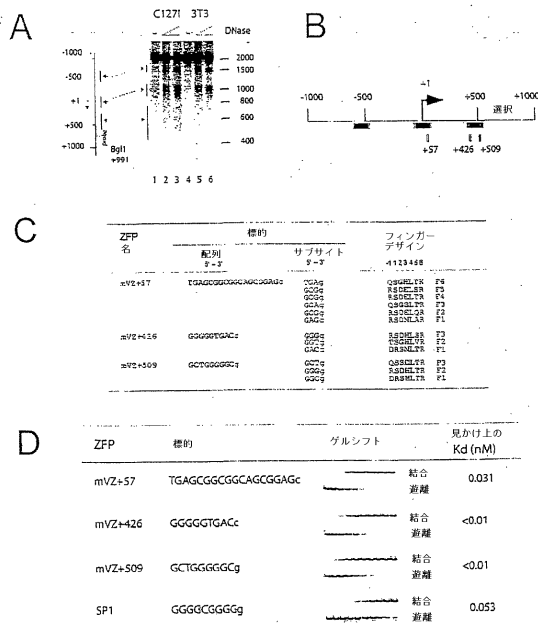


Figure 14

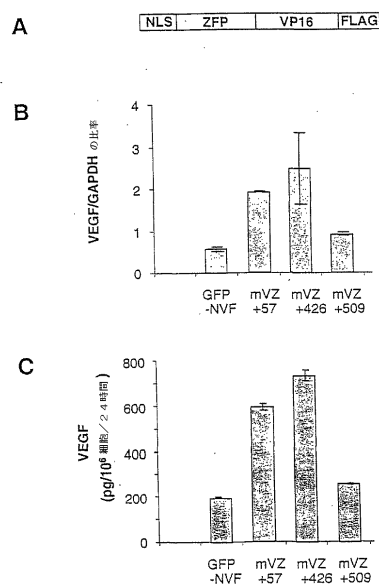
【図 15】

Figure 15



【図 16】

Figure 16



【図 17-1】

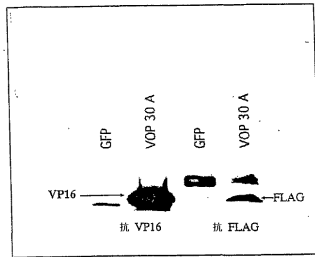


FIG. 17A

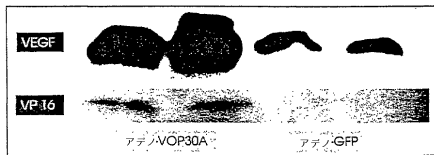


FIG. 17B

【図 17-2】

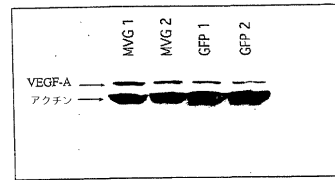


FIG. 17C

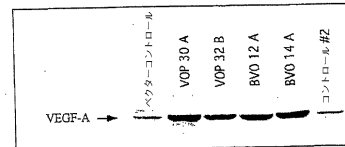


FIG. 17D

【図 18】

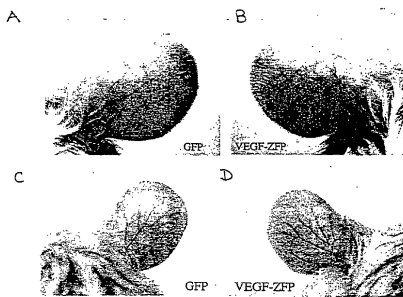


FIG. 18

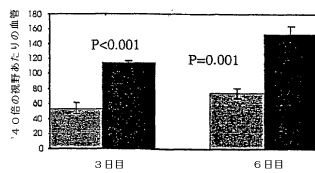


FIG. 18 E

【図 19】

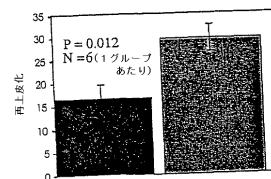
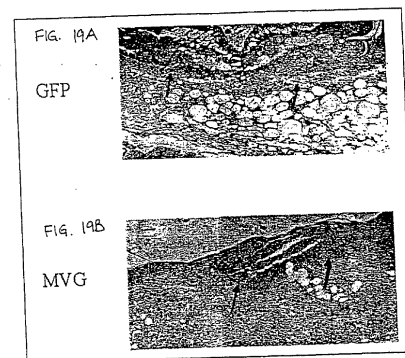


FIG. 19C

【図 20】

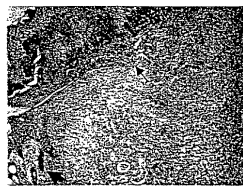
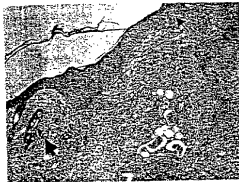
VEGF-ZFP (MVG)
(MVG)

FIG. 20A



GFP コントロール

FIG. 20B

【図 21】

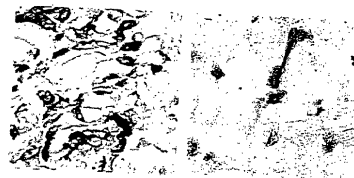


FIG. 21A

FIG. 21B

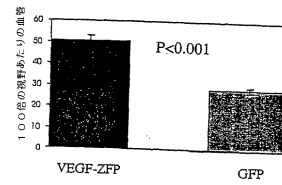


FIG. 21C

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 June 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/46412 A2(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
C07K 14/47, A61K 48/00, 38/17

(21) International Application Number: PCT/US01/46861

(22) International Filing Date: 6 December 2001 (06.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

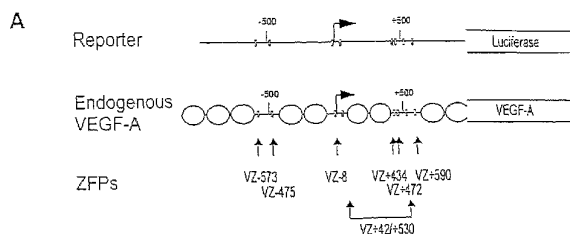
(30) Priority Data:
09/733,604 7 December 2000 (07.12.2000) US
09/736,083 12 December 2000 (12.12.2000) US
09/846,033 30 April 2001 (30.04.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): SANG-
AMO BIOSCIENCES, INC. [US/US]; Point Richmond
Tech Center, 501 Canal Blvd., Suite A100, Richmond, CA
94804 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): REBAR, Edward
[US/US]; 1609 Roger Court, El Cerrito, CA 94530 (US).
JAMIESON, Andrew [GB/US]; 2528 Sutter Street,
San Francisco, CA 94115 (US). LIU, Qiang [US/US];
55 Williams Lane, Foster City, CA 94404 (US). LIU,
Pei-Qi [CN/US]; 2266 Bristlecone Drive, Richmond, CA94803 (US). WOLFFE, Alan [GB/US]; 155 Alice Lane,
Orinda, CA 94563 (US). EISENBERG, Stephen, P.
[US/US]; 5664 Pennsylvania Place, Boulder, CO 80303
(US). JARVIS, Eric [US/US]; 2265 Dartmouth Avenue,
Boulder, CO 80305 (US).(74) Agents: SERAFINI, Andrew, T. et al.; TOWNSEND
AND TOWNSEND AND CREW LLP, Two Embarcadero
Center, 8th Floor, San Francisco, CA 94111 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AT
(utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE
(utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE,
EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: REGULATION OF ANGIOGENESIS WITH ZINC FINGER PROTEINS



(57) Abstract: Provided herein are a variety of methods and compositions for regulating angiogenesis, such methods and compositions being useful in a variety of applications where modulation of vascular formation is useful, including, but not limited to, treatments for ischemia and wound healing. Certain of the methods and compositions accomplish this by using various zinc finger proteins that bind to particular target sites in one or more VEGF genes. Nucleic acids encoding the zinc finger proteins are also disclosed. Methods for modulating the expression of one or more VEGF genes with the zinc finger proteins and nucleic acids are also disclosed. Such methods can also be utilized in a variety of therapeutic applications that involve the regulation of endothelial cell growth. Pharmaceutical compositions including the zinc finger proteins or nucleic acids encoding them are also provided.

WO 02/46412 A2

**Published:**

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

**REGULATION OF ANGIOGENESIS WITH
ZINC FINGER PROTEINS**

CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

[01] This application is a continuation-in-part of copending U.S. Application No. 09/846,033, filed April 30, 2001, which is a continuation-in-part of U.S. Application No. 09/736,083, filed December 12, 2000, which is a continuation-in-part of U.S. Application No. 09/733,604, filed December 7, 2000, all of which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes.

**STATEMENT AS TO RIGHTS TO INVENTIONS MADE UNDER
FEDERALLY SPONSORED RESEARCH OR DEVELOPMENT**

[02] NOT APPLICABLE

**REFERENCE TO A "SEQUENCE LISTING," A TABLE, OR A COMPUTER
PROGRAM LISTING APPENDIX SUBMITTED ON A COMPACT DISK**

[03] NOT APPLICABLE

BACKGROUND

[04] The development of the vascular system (sometimes referred to as the vascular tree) involves two major processes: vasculogenesis and angiogenesis. Vasculogenesis is the process by which the major embryonic blood vessels originally develop from early differentiating endothelial cells such as angioblasts and hematopoietic precursor cells that in turn arise from the mesoderm. Angiogenesis is the term used to refer to the formation of the rest of the vascular system that results from vascular sprouting from the pre-existing vessels formed during vasculogenesis (see, e.g., Risau et al. (1988) Devel. Biol., 125:441-450). Both processes are important in a variety of cellular growth processes including developmental growth, tissue regeneration and tumor growth, as all these processes require blood flow for

Given its key role in both normal physiological and pathological processes, not surprisingly considerable research effort has been directed towards identifying factors involved in the stimulation and regulation of angiogenesis. A number of growth factors have been purified and characterized. Such factors include fibroblast growth factors (FGFs), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor alpha (TGF α), and hepatocyte growth

WO 02/46412

PCT/US01/46861

factor (HGF) (for reviews of angiogenesis regulators, see, e.g., Klagsbrun et al. (1991) *Ann. Rev. Physiol.*, 53:217-39; and Folkman et al. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267:10931-934).the delivery of necessary nutrients.

[05] Thus, angiogenesis plays a critical role in a wide variety of fundamental physiological processes in the normal individual including embryogenesis, somatic growth, and differentiation of the nervous system. In the female reproductive system, angiogenesis occurs in the follicle during its development, in the corpus luteum following ovulation and in the placenta to establish and maintain pregnancy. Angiogenesis additionally occurs as part of the body's repair processes, such as in the healing of wounds and fractures. Thus, promotion of angiogenesis can be useful in situations in which establishment or extension of vascularization is desirable. Angiogenesis, however, is also a critical factor in a number of pathological processes, perhaps most notably tumor growth and metastasis, as tumors require continuous stimulation of new capillary blood vessels in order to grow. Other pathological processes affected by angiogenesis include conditions associated with blood vessel proliferation, especially in the capillaries, such as diabetic retinopathy, arthropathies, psoriasis and rheumatoid arthritis.

[06] Current research indicates that a family of endothelial cell-specific growth factors, the vascular endothelial growth factors (VEGFs), together with their cognate receptors, are primarily responsible for stimulation of endothelial cell growth and differentiation. These factors are members of the PDGF family and appear to act primarily via endothelial receptor tyrosine kinases (RTKs).

[07] The first identified and most well studied member of this particular family is the vascular endothelial growth factor (VEGF), also referred to as VEGF-A. This particular growth factor is a dimeric glycoprotein in which the two 23 kD subunits are joined via a disulfide bond. Five VEGF-A isoforms encoded by distinct mRNA splice variants appear to be equally effective in stimulating mitogenesis in endothelial cells, but tend to have differing affinities for cell surface proteoglycans.

[08] VEGF-A acts to regulate the generation of new blood vessels during embryonic vasculogenesis and then subsequently plays an important role in regulating angiogenesis later in life. Studies showing that inactivation of a single VEGF-A allele results in embryonic lethality provide evidence as to the significant role this protein has in vascular development and angiogenesis (see, e.g., Carmeliet et al. (1996) *Nature* 380: 435-439; and Ferrara et al. (1996) *Nature*, 380: 439-442). VEGF-A has also been shown to have other activities including a strong chemoattractant activity towards monocytes, the ability to induce the

WO 02/46412

PCT/US01/46861

plasminogen activator and the plasminogen activator inhibitor in endothelial cells, and to induce microvascular permeability. VEGF-A is sometimes also referred to as vascular permeability factor (VPF) in view of this latter activity. The isolation and properties of VEGF-A have been reviewed (see, e.g., Ferrara et al. (1991) *J. Cellular Biochem.* 47: 211-218; and Connolly, J. (1991) *J. Cellular Biochem.* 47:219-223).

[09] Alternative mRNA splicing of a single VEGF-A gene gives rise to at least five isoforms of VEGF-A. These isoforms are referred to as VEGF-A121; VEGF-A145; VEGF-A165; VEGF-A189; and VEGF-A206. As the name implies, the VEGF-A165 isoform is a 165 amino acid species and has a molecular weight of approximately 46 kD; this isoform is the predominant molecular form found in normal cells and tissues. VEGF-A165 includes a 44 amino acid region near the carboxyl-terminal region that is enriched in basic amino acid residues. It also exhibits an affinity for heparin and heparin sulfates.

[10] VEGF-A121 is the shortest form, with a deletion of 44 amino acids between positions 116 and 159 as compared to the VEGF A165 isoform. It is freely diffusible in the surrounding extracellular matrix. VEGF-A189 is a longer form with an insertion of 24 highly basic residues at position 116 with respect to VEGF A165. The VEGF-A206 isoform includes insertion of 41 amino acids with respect to the VEGF A165 isoform, including the 24 amino acid insertion found in VEGF-A189. VEGF-A121 and VEGF-A165 are soluble proteins, with VEGF-A165 being the predominant isoform secreted by cells. In contrast, VEGF-A189 and VEGF-A206 appear to be mostly cell-associated. All of these isoforms of VEGF-A are biologically active.

[11] VEGF-B, also referred to as VRF, has similar angiogenic and other properties to those of VEGF-A, but is distributed and expressed in tissues differently from VEGF-A. In particular, VEGF-B is very strongly expressed in heart, and only weakly in lung, whereas the reverse is the case for VEGF-A. This suggests that VEGF-A and VEGF-B, despite the fact that they are co-expressed in many tissues, may have functional differences. The amino acid sequence of VEGF-B is approximately 44% identical to that of VEGF-A. Alternative exon splicing of the VEGF-B gene generates two isoforms encoding human proteins of 167 and 186 amino acids, and referred to as VEGF-B167 and VEGF-B186, respectively. VEGF-B167 tends to remain cell-associated, while VEGF-B186 is freely secreted. The isolation and characteristics of these isoforms are discussed in PCT/US96/02957 and in Olofsson et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2576-2581.

[12] VEGF-C is also referred to as VEGF-related protein (hence VRF) or VEGF-2. The protein is roughly 30% identical to the amino acid sequence of VEGF-A, and includes N-

WO 02/46412

PCT/US01/46861

terminal and C-terminal extensions not present in VEGF-A, VEGF-B or PlGF (infra). Although the protein induces vascular permeability and promotes endothelial growth, it is less potent than VEGF-A. Its isolation and characteristics are disclosed in Joukov et al. (1996) EMBO J. 15: 290-298.

- 5 [13] VEGF-D was isolated from a human breast cDNA library, commercially available from Clontech, by screening with an expressed sequence tag obtained from a human cDNA library designated "Soares Breast 3NbHBst" as a hybridization probe (Achen et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:549-553). The protein is also referred to as FIGF, for c-fos-induced growth factor. The VEGF-D gene is expressed most abundantly in lung, heart, small intestine and fetal lung. It is found at lower levels in skeletal muscle, colon and pancreas. Its isolation and characteristics are discussed in PCT Publication WO 98/07832.
- 10 [14] Recently several additional VEGF-like proteins have been identified from various strains of orf viruses; in the literature these viral VEGF proteins have sometimes been collectively referred to as VEGF-E. One protein, variously referred to as OV NZ2, ORFV2-VEGF, OV-VEGF2, and VEGF-ENZ2 has been isolated from the orf viral strain NZ2 (see, e.g., Lyttle, D. J. et al. (1994) J. Virology 68:84-92; and PCT Publication WO 00/25805). Another viral VEGF-like protein referred to as NZ7, OV-VEGF7, VEGF-E and VEGF-ENZ7 has been found in the NZ7 strain of orf viruses. This protein exhibits potent mitogenic activity but lacks the basic domain of certain VEGF proteins such as VEGF-A165 (see, e.g.,
- 20 Lyttle, D. J. et al. (1994) J. Virology 68:84-92; and Ogawa, S. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:31273-31282). A third VEGF-like protein has been identified in a NZ strain, specifically a NZ10 strain and is referred to simply as NZ10 (see, e.g., PCT Publication WO 00/25805). Yet another VEGF-like protein has been identified in the orf virus strain D1701 and in some instances has been referred to as VEGF-ED1701 (see, e.g., Meyer, M. et al. (1999) EMBO J. 18:363-74).
- 25 [15] In addition to these viral VEGF-E genes, a VEGF-like growth factor isolated from mammalian sources has also been named VEGF-E. The isolation and characterization of this VEGF-like factor is discussed in PCT Publication WO 99/47677.
- [16] Another VEGF-like protein has been termed PDGF/VEGF-Like Growth Factor H, or simply VEGF-H. It is discussed in PCT Publication WO 00/44903. Additional VEGF-like proteins include one called VEGF-R (see, e.g., PCT Publication WO 99/37671) and another referred to as VEGF-X (see, e.g., PCT publication WO 00/37641). Most recently a VEGF protein referred to as VEGF-138 has been identified by Neufeld and others. A final protein related to the VEGF proteins is the Placenta Growth Factor, PlGF. This protein was isolated
- 30

WO 02/46412

PCT/US01/46861

from a term placenta cDNA library. A segment of the protein exhibits high levels of homology with VEGF-A. Its isolation and characteristics are described by Maglione et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9267-9271. Its biological function is presently not well understood. Two alternatively transcribed mRNAs have been identified in humans (P1GF-1 and P1GF-2).

[17] The foregoing PDGF /VEGF family members act primarily by binding to receptor tyrosine kinases. Five endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases have been identified thus far, namely VEGFR-1 (also called Flt-1), VEGFR-2 (also called KDR/Flk-1), VEGFR-3 (Flt4), Tie and Tek/Tie-2. Each of these kinases have the tyrosine kinase activity necessary for signal transduction. The essential, specific role in vasculogenesis and angiogenesis of VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Tie and Tek/Tie-2 has been demonstrated by targeted mutations inactivating these receptors in mouse embryos.

[18] VEGF-A binds VEGFR-1 and VEGFR-2 with high affinity, as well as neuropilin 1. As just indicated, VEGFR-1 binds VEGF-A, but also binds VEGF-B and P1GF. VEGF-C has been shown to be the ligand for VEGFR-3, and it also activates VEGFR-2 (Joukov et al. (1996) The EMBO Journal 15: 290-298). Both VEGFR-2 and VEGFR-3 bind VEGF-D. Initial studies with the viral VEGF proteins (i.e., the viral VEGF-E group) show that these proteins selectively bind VEGFR-2 but not VEGFR-1 (see, e.g., Ogawa, S. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:31273-31282; and Meyer, M. et al. (1999) 18:363-74). A ligand for Tek/Tie-2 has been described in PCT Publication WO 96/11269. The ligand for Tie has not yet been identified. Additional details regarding the various VEGF receptors are provided in PCT Publication WO 00/25805.

[19] Recently, a 130-135 kDa VEGF isoform specific receptor has been purified and cloned (Soker et al. (1998) Cell 92:735-745). The evidence indicates that this VEGF receptor specifically binds to the VEGF165 isoform via the exon 7 encoded sequence of VEGF165, which sequence shows weak affinity for heparin (Soker et al. (1998) Cell, 92:735-745). The receptor has also been found to be identical to human neuropilin-1 (NP-1), a receptor involved in early stage neuromorphogenesis. One of the splice variants of P1GF, namely P1GF-2, also appears to interact with NP-1 (Migdal et al., (1998) J. Biol. Chem. 273: 22272-22278).

[20] Thus, a variety of cell growth factors, in particular VEGF proteins and VEGF-related proteins, have been identified. Certain receptors that bind to the VEGF proteins have also been identified. However, modulation of the expression of VEGF proteins and VEGF-related proteins so as to modulate the process of angiogenesis has not been described. The ability to

WO 02/46412

PCT/US01/46861

modulate the process of angiogenesis in a cell or group of cells, using one or more exogenous molecules, would have utility in activating beneficial aspects associated with endothelial cell growth and in repressing non-beneficial aspects.

SUMMARY

- 5 [21] A variety of zinc finger proteins (ZFPs) and methods utilizing such proteins are provided for use in regulating gene expression. Certain of the ZFPs are designed to bind to specific target sequences within genes and thereby modulate angiogenesis. The ZFPs can be fused to a regulatory domain as part of a fusion protein. By selecting either an activation domain or repressor domain for fusion with the ZFP, one can either activate or repress gene
- 10 expression. Thus, by appropriate choice of the regulatory domain fused to the ZFP, one can selectively modulate the expression of a gene and hence various physiological processes correlated with such genes. Thus, with angiogenesis, for example, by attaching an activation domain to a ZFP that binds to a target sequence within a gene that affects angiogenesis, one can enhance certain beneficial aspects associated with angiogenesis (e.g., alleviation of
- 15 ischemia). In contrast, if angiogenesis is associated with harmful processes (e.g., delivery of blood supply to tumors) one can reduce angiogenesis by using ZFPs that are fused to a repressor. Hence, binding of this type of ZFP to a gene involved in angiogenesis can significantly reduce angiogenesis.
- [22] The ZFPs provided include one or more zinc fingers with at least one finger having an
- 20 amino acid sequence as shown in a row of Table 3 or 4. These ZFPs include those that bind to specific sequences within various VEGF genes. Such binding can be utilized to regulate angiogenesis and treat ischemia and various other disorders dependent upon proper blood flow. Tables 3 and 4 show the amino acid sequences of a large collection of ZFPs that bind to particular target sites within different VEGF genes. The nucleotide target site is shown in
- 25 column 2 of these tables. Thus, certain ZFPs disclosed herein recognize a target site that has a nucleotide sequence as specified in Tables 3 and 4. Some of these ZFPs include 1-6 fingers (although other ZFPs can have more fingers) and these fingers are occupied by the amino acids shown in a row of Table 3 or 4. These amino acids can occupy positions -1 to +6 of a zinc finger.
- 30 [23] Certain of the ZFPs provided herein recognize a target site that typically has 9 nucleotides. In general, such target sites include three target subsites bound by respective zinc finger components of a multifinger protein. Examples of such target sites are listed in Table 3. The amino acid sequences of portions of the zinc finger components involved in

WO 02/46412

PCT/US01/46861

recognition are shown in columns 4, 6 and 8. For some proteins that have three zinc fingers, the fingers are occupied by first, second and third segments of seven contiguous amino acids as shown in Table 3.

5 [24] Other ZFPs that are disclosed herein bind target sequences that typically include 18 nucleotides. These target sequences can be recognized by ZFPs that include six fingers. Examples of such ZFPs are listed in Table 4. Hence, certain of the present ZFPs include the six finger ZFPs shown in Table 4, with positions -1 to +6 in each of the fingers being occupied by a segment of seven contiguous amino acids as specified in a row of Table 4.

10 [25] As indicated above, some of the ZFPs provided herein are useful in methods for modulating angiogenesis. In some methods, the modulation of angiogenesis comprises inhibition of new blood vessel formation. In some methods, the modulation of angiogenesis comprises stimulation of new blood vessel formation. In some such methods the blood vessels are nonpermeable or nonhyperpermeable.

15 [26] Thus, also provided are ZFPs that bind to a target site having a nucleotide sequence as specified in Table 3 or 4, thereby modulating angiogenesis when introduced into an animal having a genome comprising a VEGF gene comprising the target site. Often any of the foregoing types of ZFPs are part of a fusion protein that includes a regulatory domain. This regulatory domain can be an activator or a repressor.

20 [27] In like manner, certain of the methods for modulating angiogenesis as provided herein involve introducing a ZFP that binds to a target site specified in Table 3 or 4 into an animal having a genome comprising a VEGF gene that includes the target site, with binding of the ZFP to the target site resulting in modulation of angiogenesis in the animal. Related methods involve contacting a target site of a nucleic acid within a cell with a zinc finger protein, wherein the target site has a nucleotide sequence as specified in Table 3 or 4 and binding of
25 the zinc finger protein to the target site modulates expression of the VEGF gene in the cell.

[28] The ZFPs provided herein can be used to treat a number of different diseases that are correlated with regulating the formation of blood vessels. Thus, certain methods are designed to treat ischemia. Some of these methods involve administering a ZFP that binds to a target site as specified in Table 3 or 4 into an animal having ischemia, wherein the ZFP is
30 administered in an amount effective to treat ischemia. The ZFPs can also be utilized, for example, in wound treatment, a variety of surgical applications and in promoting the growth of lymphatic endothelial cells and the activation of myelopoiesis. Other ZFPs find use in preventing unwanted processes by repressing vessel formation. Thus, for example, ZFPs can be used in treating diabetic retinopathy, psoriasis, arthropathies and tumor growth.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[29] By selecting certain ZFPs one can tailor the extent to which a physiological process (e.g., angiogenesis) can be modulated and tailor treatment. This can be achieved because multiple target sites in any given gene can be acted upon by the ZFPs provided herein and because a single ZFP can bind to a target site located in a plurality of genes. Thus, in some methods, a plurality of ZFPs are administered. These ZFPs can then bind to different target sites located within the same gene. Such ZFPs can in some instances have a synergistic effect. In certain methods, the plurality of fusion proteins include different regulatory sequences. In contrast, with some of the ZFPs provided herein, administration of a single ZFP can modulate gene expression of multiple genes because each gene includes the target site.

[30] Also provided herein are nucleotides that encode the ZFPs disclosed herein. Additionally, pharmaceutical compositions containing the nucleic acids and/or ZFPs are also provided. For example, certain compositions include a nucleic acid that encodes one of the ZFPs described herein operably linked to a regulatory sequence and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent, wherein the regulatory sequence allows for expression of the nucleic acid in a cell. Protein based compositions include a ZFP as disclosed herein and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[31] Figures 1A-1F show an analysis of regions of enhanced chromatin accessibility in the promoter of VEGF-A.

[32] Figures 1A and 1B show analysis of constitutive accessible sites. Chromatin from the indicated human (Figure 1A) or rat (Figure 1B) cells was partially digested with DNase I in permeabilized nuclei (see "Experimental Procedures"), followed by Southern blot analysis using the indicated restriction enzymes and probes. The vertical bar represents genomic DNA in the VEGF-A promoter region. A hooked arrow denotes the transcription start site, and tick marks indicate units of 100 bp. Positions of restriction enzyme recognition sites are indicated in base pairs relative to the start site of VEGF-A transcription. The migration pattern for a set of DNA standard fragments is indicated at the right side of each gel, with the size of each fragment given in bp. Arrows are used to highlight the relationship of the observed bands to location of accessible chromatin regions relative to the transcription start sites of VEGF-A.

DNase I concentrations (in Worthington Units/ml) were as follows: HEK 293 nuclei (Figure 1A, lanes 1-4): 0, 7.5, 15, 60; HEP3B nuclei (Figure 1A, lanes 5-8): 0, 7.5, 15, 30; cardiac myocyte nuclei (Figure 1B, lanes 1-4): 0, 3.75, 7.5, 15; H9c2(2-1) nuclei (Figure 1B, lanes 5-8): 0, 15, 30, 60.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[33] Figure 1C shows the results of an experiment indicating the presence of an accessible region ~1000 base pairs upstream of the VEGF-A transcription start site in primary skeletal muscle cells but not HEK 293 cells. Details as in Figures 1A and 1B, except that nuclei were isolated from HEK 293 cells or human primary skeletal muscle cells; DNase I concentrations (Units/ml) were as follows: HEK 293 nuclei (lanes 1-5): 0, 7.5, 15, 30, 60; primary skeletal muscle cell nuclei (lanes 6-10): 0, 3.75, 7.5, 15, 30.

[34] Figure 1D shows the results of an experiment indicating the presence of an accessible region 500 bp downstream of the VEGF-A transcription start site in HEK 293 cells. Details as in Figures 1A and 1B. DNase I concentrations (Units/ml) were as follows (lanes 1-5): 0, 15, 30, 60, 120.

[35] Figure 1E shows a summary of DNase I accessible regions observed in these studies. Cell types tested are indicated at left. Observation of a particular open region in a given cell type is denoted by an arrow. The '-550' and '+1' hypersensitive regions occur in all cell types tested, while the '-1000' and '+500' sites appear only in a subset of tested cells. A schematic representation of the VEGF-A promoter, encompassing bases -1000 to +1000 relative to the principal transcription start site, is provided at bottom. The filled arrow denotes the principal site of transcription initiation, while an alternate start site is highlighted by an open arrow. Key regulatory elements are also shown (HRE: hypoxia response element; binding sites for the SP1 and AP2 transcription factors are also shown). DNase I accessible regions are indicated by gradient-shaded rectangles above the map.

[36] Figure 1F shows an analysis of the extent of sequence conservation between man, mouse and rat in the promoter region of the VEGF-A gene. Each point in the gray profile indicates the fractional conservation of human VEGF-A sequence in both rat and mouse within a 50 bp window centered on that point. The black profile is identical except that it indicates the fractional conservation of 5 bp blocks.

[37] Figures 2A-2D show the scheme for targeting construction of VEGF-A targeted ZFPs.

[38] Figure 2A shows a schematic diagram depicting the structure of an individual zinc finger with two β -sheets linked to the DNA-binding α -helix. The diagram is based on Pavletich et al. (1991) Science 252: 809-817. Oligos 1, 3 and 5 encode the β -sheet regions, and oligos 2, 4, and 6 encode the DNA-binding α -helix regions.

[39] Figure 2B shows the scheme for assembly of ZFP-encoding nucleic acids. Six overlapping oligonucleotides were annealed, gaps were filled, and the resulting duplex was amplified using a pair of external oligonucleotides. The PCR products were then cut with

WO 02/46412

PCT/US01/46861

Kpn I and BamHI, and the digestion product was cloned into the pMalC2 bacterial expression vector.

[40] Figure 2C shows a schematic diagram of the maltose binding protein - VEGF-A-targeted ZFP fusions.

5 [41] Figure 2D shows a schematic representation of the human VEGF-A gene, showing the location of transcription initiation sites (hooked arrows), DNase I-accessible regions in HEK293 cells (gradient-filled rectangles), and target site locations for the VEGF-A-targeted ZFPs (vertical rectangles). The position of the upstream-most nucleotide of each ZFP target site is indicated by the number below it. Numbering is relative to the start site of transcription

10 (+1).

[42] Figures 3A-3F show an analysis of the transcriptional activation properties of ZFPs targeted to DNase I-accessible regions of VEGF-A.

[43] Figure 3A gives a schematic representation of the VEGF-A promoter reporter construct (top) and the endogenous VEGF-A chromosomal (bottom) targets. Coverage of portions of the endogenous promoter with white circles indicates the presence of nucleosomes in these regions. ZFP targets are indicated by white vertical rectangles, and arrows connect each target with the name of its corresponding ZFP below.

15 [44] Figure 3B shows results of assay for activation of the human VEGF-A promoter reporter by ZFP-VP16 fusions. ZFP-VP16 fusion plasmids were co-transfected into HEK293 cells with a VEGF-A reporter construct containing a luciferase gene under the control of a 3.4 kbp fragment of the human VEGF-A promoter, and reporter activity was assayed 40 hours post-transfection as described in "Experimental Procedures." A constitutive Renilla luciferase construct was also co-transfected to serve as transfection control for normalization. The fold reporter activation by the ZFPs was calculated based on the normalized luciferase reporter activity, in comparison with that of the control vector which encodes a VP16-FLAG fusion lacking a ZFP domain.

25 [45] Figures 3C and 3D show the results of assays for activation of the endogenous human VEGF-A gene by ZFP-VP16 fusions. Plasmids encoding ZFP-VP16 fusions were transfected into HEK 293 cells via LipofectAMINE reagent as described in "Experimental Procedures."

30 The control vector expressed VP16-FLAG fused with green fluorescent protein (GFP) instead of ZFP. Forty hours after transfection, the culture medium and the cells were harvested and assayed for endogenous VEGF-A expression. Figure 3C shows the results of measurement of VEGF-A protein content in the culture medium, by ELISA using a human VEGF ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). The VEGF-A protein production induced by the ZFPs

WO 02/46412

PCT/US01/46861

was compared with that of the control vector, and the fold activation was plotted. Figure 3D shows results of assays for steady-state VEGF-A mRNA levels in transfected cells, measured by quantitative RT-PCR using Taqman chemistry as described in "Experimental Procedures." The levels of VEGF-A mRNA were normalized with respect to GAPDH (glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase) mRNA levels.

[46] Figure 3E shows analysis of ZFP protein content in the transfected cells by protein immunoblotting ("Western" blotting) using an anti-FLAG antibody (Sigma, St. Louis, MO) which recognizes the FLAG epitope tag of the engineered ZFPs.

[47] Figure 3F shows the results of analysis of levels of ZFP mRNA in transfected cells, as determined by Taqman, and normalized to GAPDH mRNA levels. The primers and probe were designed to recognize the sequence encoding the VP16 activation domain and FLAG tag.

[48] Figures 4A-4C show an analysis of the effects of ZFP fusions, targeted to accessible and inaccessible regions of the VEGF-A gene, on a VEGF-A reporter construct and on the endogenous VEGF-A gene.

[49] Figure 4A provides a schematic representation of the VEGF-A promoter reporter construct (top) and the endogenous VEGF-A chromosomal (bottom) targets used in this experiment. Coverage of portions of the endogenous promoter with white circles indicates the presence of nucleosomes in these regions. ZFP target sites are indicated by white vertical rectangles, and arrows connect each target with the name of its corresponding ZFP below.

[50] Figure 4B shows activation of a human VEGF-A promoter reporter. The indicated ZFP-VP16 fusion plasmids were co-transfected with the VEGF-A-luciferase reporter construct as described in "Experimental Procedures." The fold-activation of luciferase activity by the ZFPs was calculated in comparison with that of a control vector encoding VP16-FLAG without a ZFP domain.

[51] Figure 4C shows activation of the endogenous human VEGF-A gene. Plasmids encoding the indicated ZFP-VP16 fusions were transfected into HEK 293 cells, and the amount of VEGF-A protein secreted into the culture medium, 40 hrs after transfection, was measured by ELISA as described in the legend to Figure 3C. VEGF-A protein production induced by the ZFPs was compared with that of the control vector, and the fold activation was plotted.

[52] Figures 5A-5D show activation of the endogenous human VEGF-A gene by ZFPs with different activation domains. Various ZFPs were fused with either a VP16 activation

WO 02/46412

PCT/US01/46861

domain or the activation domain from NF- κ B (p65). All fusions also contained a C-terminal FLAG epitope tag.

[53] Figure 5A shows schematic diagrams of VEGF-A targeted ZFP fusions containing either a VP16- or a p65 activation domain (AD). NLS: nuclear localization sequence; ZFP: zinc finger DNA-binding domain; FLAG: Flag epitope tag.

[54] Figure 5B shows an analysis of ZFP protein content in transfected cells, analyzed by western blotting using anti-FLAG antibody. Identity of the transfected ZFP domain is indicated above each lane of the gel.

[55] Figure 5C shows VEGF-A protein content in the culture medium of transfected cells, measured by ELISA. Results from transfection of ZFP fusions comprising a VP16 activation domain are represented by open bars; results from transfection of ZFP fusions comprising a p65 activation domain are represented by filled bars.

[56] Figure 5D shows measurement of steady-state VEGF-A mRNA levels in the transfected cells by Taqman. Results from transfection of ZFP fusions comprising a VP16 activation domain are represented by open bars; results from transfection of ZFP fusions comprising a p65 activation domain are represented by filled bars.

[57] Figures 6A-6D show an analysis of cooperativity, in VEGF-A gene activation, between ZFPs with different activation domains. Plasmids containing different ZFP-activation domain fusions were cotransfected at a 1:1 ratio into HEK 293 cells, and endogenous VEGF-A activation was measured 40 hours after transfection.

[58] Figure 6A shows the scheme of the experiment.

[59] Figure 6B shows analysis of VEGF-A protein content in the culture medium, assayed by ELISA.

[60] Figure 6C shows analysis of VEGF-A mRNA levels in transfected cells, measured by Taqman.

[61] Figure 6D shows analysis of ZFP protein contents in the transfected cells, by western blotting using anti-FLAG antibody.

[62] Figures 7A-7D show a comparison of the activation of the endogenous human VEGF-A gene by ZFP VZ+434b and by hypoxia. HEK 293 cells were transfected with plasmids encoding the ZFP VZ+434b fused with VP16 or p65, transfected with a control vector expressing no ZFP, or exposed to hypoxic conditions (0.5% O₂) in a hypoxic incubator for 24 hours. Endogenous VEGF-A gene activation was measured as described in Fig. 6 and "Experimental Procedures."

WO 02/46412

PCT/US01/46861

- [63] Figure 7A show analysis of VEGF-A protein content in the culture medium, measured by ELISA.
- [64] Figure 7B shows analysis of steady-state VEGF-A mRNA levels, measured by Taqman, and normalized to levels of 18S RNA.
- 5 [65] Figure 7C shows analysis of VEGF-A mRNA by RNA blot ("Northern") hybridization using a 32P-labeled VEGF165 riboprobe.
- [66] Figure 7D shows analysis of VEGF-A splice variants by RT-PCR and Southern hybridization as described in "Experimental Procedures."
- [67] Figure 8 shows immunoblot analyses of VEGF in ZFP-injected and control-injected
10 mouse quadriceps muscle. Positions of the VEGF monomer and VEGF dimer are indicated.
- [68] Figure 9A-9F show micrographs of H&E-stained thin sections of wound tissue from a mouse that had been injected with a plasmid encoding a ZFP-VP16 fusion. Figures 9A and 9B are low-power magnification; Figures 9C-9F are high-power. Figures 9A, 9C and 9E show sections of wound tissue that was injected with a control plasmid. Figures 9B, 9D and
15 9F show sections of wound tissue that was injected with a plasmid encoding a ZFP-VP16 fusion.
- [69] Figure 10 shows levels of human VEGF-A protein, detected by ELISA, in HEK 293 cells transfected with different ZFP-encoding plasmids. See Tables 2-4 for the identities of the target sites and ZFP binding domains.
- 20 [70] Figure 11 shows levels of human VEGF-A mRNA, detected by real-time PCR (Taqman), in HEK 293 cells transfected with different ZFP-encoding plasmids. See Tables 3 and 4 for the identities of the ZFP binding domains. The lower portion of the figure shows immunoblot analysis of ZFP expression in transfected cells, using an anti-FLAG antibody.
- [71] Figure 12 shows an analysis of reporter gene activity in HEK 293 cells that were co-
25 transfected with a plasmid encoding a luciferase reporter gene under the transcriptional control of a VEGF promoter and different ZFP-encoding plasmids. Fold-induction of luciferase activity is presented relative to a control plasmid in which ZFP-encoding sequences were replaced by sequences encoding green fluorescent protein.
- [72] Figure 13 shows levels of human VEGF-A protein, detected by ELISA, in HEK 293
30 cells transfected with different ZFP-encoding plasmids. See Tables 2-4 for the identities of the target sites and ZFP binding domains.
- [73] Figures 14A-14B show analysis of VEGF-A and VEGF-C mRNA in cells that had been transfected with different plasmids encoding ZFP-VP16 fusions. VEGF mRNA levels were analyzed and normalized with respect to GAPDH mRNA levels as described in

WO 02/46412

PCT/US01/46861

Example 1. Figure 14A shows analysis of VEGF-A mRNA levels; Figure 14B shows analysis of VEGF-C mRNA levels. The name of the transfected ZFP binding domain (see Table 2) and the approximate location of its target site are indicated along the abscissa.

[74] Figures 15A-D illustrate the targeting, design, and results of DNA binding analyses conducted with zinc finger proteins targeted to the mouse VEGF-A locus.

[75] Figure 15A depicts the results of mapping of DNase I – accessible regions in the mouse VEGF-A promoter region. Nuclei from the indicated cell lines were partially digested with DNase I (see “Experimental Procedures”), followed by Southern blot analysis using Bgl I and the indicated probe. The vertical bar represents the promoter region of the VEGF-A locus. A hooked arrow denotes the transcription start site, and tick marks indicate units of 100 bp. The migration pattern for a set of DNA standard fragments is indicated at the right side of the gel, with the size of each fragment given in base pairs. Arrows are used to highlight the relationship of observed bands to location of accessible chromatin regions relative to the transcription start site of VEGF-A. DNase I concentrations (U/ml) in lanes 1-6 were as follows: 0, 32, 64, 0, 8, and 16, respectively.

[76] Figure 15B shows the location of ZFP target sites used for one set of binding studies. A schematic representation of the human VEGF-A gene is provided, showing the location of the principal (filled arrow) and a reported alternate (open arrow) transcription initiation site, and the DNase I accessible regions (gradient-filled rectangles) determined in these studies. ZFP target locations are indicated by vertical open rectangles, and the position of the 5'-most nucleotide of each ZFP target is indicated by the number below it. Numbering is relative to the start site of transcription.

[77] Figure 15C lists ZFP target sequences (SEQ ID NOS:207, 144, and 240, respectively) and finger designs (SEQ ID NOS:239, 238, 122, 57, 159, 35, 64, 85, 36, 112, 66, and 54, respectively). ZFPs are named according to target site location and the suffix mVZ (for mouse VEGF-A ZFP). Finger designs indicate the identity of amino acid residues at positions -1 to +6 of the alpha helix of each finger.

[78] Figure 15D shows gel-shift assays of binding affinity. A three-fold dilution series of each protein was tested for binding to its DNA target (SEQ ID NOS:207, 144, 240, and 141, respectively), with the highest concentration in lane 10 and the lowest concentration in lane 2. Lane 1 contains probe alone. Apparent K_d 's, derived from the average of 3 such studies, are indicated at right. For mVZ+426 and mVZ+509, K_d 's are provided as upper bounds (<0.01 nM), since the use of 0.01 nM of probe has probably led to an underestimate of the affinity of these proteins.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[79] Figures 16A-16C depict ZFP-mediated activation of the mouse VEGF-A locus in C127I cells. Cells were transduced with retroviral vectors expressing each ZFP transcriptional activator or a control protein in which green fluorescent protein (GFP) was substituted for the ZFP DNA-binding domain. After selection for drug resistance, the resultant cell population was assayed for expression of VEGF-A by TaqMan or ELISA.

[80] Figure 16A is a schematic representation of the ZFP transcriptional activators used in these studies. 'NLS', 'ZFP', 'VP16' and 'FLAG' indicate the relative locations of, respectively, a nuclear localization signal, a ZFP binding domain, VP16 activation domain, and FLAG tag. See "Experimental Procedures" for a detailed description of the constructs.

[81] Figure 16B shows the measurement of ZFP-mediated activation of the VEGF-A locus in C127 I cells by TaqMan™ analysis. Expression of VEGF-A mRNA is normalized to GAPDH mRNA level.

[82] Figure 16C shows results of ZFP-mediated activation of VEGF-A locus by quantitating the level of secreted VEGF-A protein via ELISA (R&D systems).

[83] Figures 17A-17D show Western blots that demonstrate induction of VEGF A expression by ZFPs.

[84] Figure 17A shows the results of a Western blot that demonstrates expression of a ZFP fusion protein in cultured smooth muscle cells transduced with a recombinant adenovirus construct encoding a fusion protein comprising an NLS, ZFP VOP 30A, a VP16 activation domain and a FLAG epitope. Both anti-VP16 and anti-FLAG antibodies were used, as indicated. Cells transduced with a recombinant adenovirus encoding green fluorescent protein were used as control.

[85] Figure 17B presents a Western blot demonstrating a marked increase in VEGF-A expression in the hindlimb adductor muscle of CD-1 mice when injected with recombinant adenovirus encoding VOP 30A as compared to an adenovirus encoding green fluorescent protein (GFP) as control. Duplicate samples are shown.

[86] Figure 17C is a Western blot showing induction of VEGF-A protein expression following injection of adeno-MVG (see Example 6) into mouse skeletal muscle relative to a control injection of an adenovirus encoding green fluorescent protein (GFP). Two different mice were injected with MVG and two separate mice with control as indicated. Levels of actin were also determined on the immunoblot as a loading control.

[87] Figure 17D shows a Western blot illustrating induction of VEGF-A in rat skeletal muscle after injection of plasmids encoding the VEGF-A modulating ZFPs VOP 30A, VOP

WO 02/46412

PCT/US01/46861

32B, BVO12A, BVO14A as compared to a control plasmid encoding a ZFP backbone but lacking the DNA recognition domain.

[88] Figures 18A-E show results demonstrating induction of angiogenesis using an established model system.

5 [89] Figures 18A and 18B are photographs of vascularization in mouse ears following injection with a recombinant adenovirus encoding either green fluorescent protein (GFP) as control (Figure 18A) or a ZFP VOP 30A (Figure 18B).

[90] Figures 18C and 18D show similar photographs as those presented in Figures 18A and 18B but with an adenovirus encoding either green fluorescent protein (GFP) (Figure 10 18C) or ZFP VOP 32 B (Figure 18D).

[91] Figure 18E is a chart of the number of blood vessels as determined using immunostaining techniques (see Experimental Procedures section *infra*) at either three or six days after injection of a mouse ear with adenovirus of the type described in Figures 18C and 18D. The chart demonstrates increased vascularity and is consistent with the results shown in 15 Figures 18A and 18B.

[92] Figures 19A-19C present results showing that cutaneous wound healing is accelerated by VEGF-A regulating ZFPs. Bilateral cutaneous wounds were created in the backs of CD-1 mice by excising a 5 mm circle of skin. At the time of wounding, adenovirus encoding a VEGF-A regulating zinc finger protein or a control adenovirus encoding green fluorescent 20 protein (GFP) was applied topically to the wound. Wounds were excised whole 5 days later, the tissue was fixed and paraffin embedded for histologic and immunohistologic analysis.

[93] Figure 19A illustrates the extent of reepithelialization following wounding and subsequent treatment by adenovirus encoding green fluorescent protein (GFP).

[94] Figure 19B illustrates how treatment with the adenovirus MVG augments the degree 25 of reepithelialization noted at day 5 post-wounding. The arrows denote the leading edge of keratinocyte ingrowth into the wound. As this figure illustrates, the distance between the edges of keratinocyte ingrowth is decreased by VEGF-ZFP treatment; thus reepithelialization is augmented.

[95] Figure 19C is a chart summarizing the distance between leading edges of keratinocyte 30 ingrowth in wounds treated with either adenovirus encoding a ZFP (dark shading) or green fluorescent protein (GFP) (light shading) and shows a significant reduction in distance for treatment with the VEGF-ZFP treatment as compared to the control.

[96] Figures 20A and 20B show that wound reepithelialization is augmented by treatment with the adenovirus MVG. The lower arrowhead in each photograph marks the wound edge

WO 02/46412

PCT/US01/46861

and the upper arrow marks the extent of keratinocyte ingrowth at day 5 post-wounding with a recombinant adenoviruses encoding MVG (Figure 20B) or green fluorescent protein (GFP) as control (Figure 20B).

[97] Figures 21A-21C show that treatment of cutaneous wounds by topical application of recombinant adenovirus encoding a VEGF-A regulating ZFP (MVG) increases vascularity (Figure 21A) as compared to an adenovirus encoding green fluorescent protein (GFP) (Figure 21B). The presence of vessels is visualized with an immunostain containing antibodies specific for endothelial cells. Figure 21C is a chart that summarizes vessel counts performed with digitally captured images when wounds were treated with adenovirus encoding a ZFP (dark box) or green fluorescent protein (GFP) (light box).

[98] Figure 22 shows angiogenesis stimulated by MVZ+509 (top and middle right panels) does not produce a hyperpermeable neovasculature as determined by Evans blue dye extravasation (bottom right). The neovasculature induced by VEGF164 adenovirus transduction (left panels) exhibit spontaneous hemorrhage and Evans blue extravasation.

15 DETAILED DESCRIPTION

I. Definitions

[99] The practice of conventional techniques in molecular biology, biochemistry, cell culture, recombinant DNA, and related fields are well-known to those of skill in the art and are discussed, for example, in the following literature references: Sambrook et al.

20 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 and periodic updates; the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; and METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999, all of which are incorporated by reference in their entirety.

[100] The term "zinc finger protein" or "ZFP" refers to a protein having DNA binding domains that are stabilized by zinc. The individual DNA binding domains are typically referred to as "fingers" A ZFP has least one finger, typically two, three, four, five, six or more fingers. Each finger binds from two to four base pairs of DNA, typically three or four
30 base pairs of DNA. A ZFP binds to a nucleic acid sequence called a target site or target segment. Each finger typically comprises an approximately 30 amino acid, zinc-chelating, DNA-binding subdomain. An exemplary motif characterizing one class of these proteins (C2H2 class) is -Cys-(X)2-4-Cys-(X)12-His-(X)3-5-His (where X is any amino acid) (SEQ

WO 02/46412

PCT/US01/46861

ID NO:208). Additional classes of zinc finger proteins are known and are useful in the practice of the methods, and in the manufacture and use of the compositions disclosed herein (see, e.g., Rhodes et al. (1993) *Scientific American* 268:56-65). Studies have demonstrated that a single zinc finger of this class consists of an alpha helix containing the two invariant histidine residues coordinated with zinc along with the two cysteine residues of a single beta turn (see, e.g., Berg & Shi, *Science* 271:1081-1085 (1996)).

[101] A "target site" is the nucleic acid sequence recognized by a ZFP. A single target site typically has about four to about ten base pairs. Typically, a two-fingered ZFP recognizes a four to seven base pair target site, a three-fingered ZFP recognizes a six to ten base pair target site, and a six fingered ZFP recognizes two adjacent nine to ten base pair target sites.

[102] A "target subsite" or "subsite" is the portion of a DNA target site that is bound by a single zinc finger, excluding cross-strand interactions. Thus, in the absence of cross-strand interactions, a subsite is generally three nucleotides in length. In cases in which a cross-strand interaction occurs (i.e., a "D-able subsite," see co-owned WO 00/42219) a subsite is four nucleotides in length and overlaps with another 3- or 4-nucleotide subsite.

[103] "Kd" refers to the dissociation constant for a binding molecule, i.e., the concentration of a compound (e.g., a zinc finger protein) that gives half maximal binding of the compound to its target (i.e., half of the compound molecules are bound to the target) under given conditions (i.e., when [target] << Kd), as measured using a given assay system (see, e.g., U.S. Patent No. 5,789,538). The assay system used to measure the Kd should be chosen so that it gives the most accurate measure of the actual Kd of the ZFP. Any assay system can be used, as long as it gives an accurate measurement of the actual Kd of the ZFP. In one embodiment, the Kd for a ZFP is measured using an electrophoretic mobility shift assay ("EMSA"). Unless an adjustment is made for ZFP purity or activity, the Kd calculations may result in an overestimate of the true Kd of a given ZFP. Preferably, the Kd of a ZFP used to modulate transcription of a gene is less than about 100 nM, more preferably less than about 75 nM, more preferably less than about 50 nM, most preferably less than about 25 nM.

[104] The term "VEGF gene" refers generally to any member of the VEGF family of genes as described supra or collection of genes from the VEGF family having a native VEGF nucleotide sequence, as well as variants and modified forms regardless of origin or mode of preparation. The VEGF genes can be from any source. Typically, the VEGF genes refer to VEGF genes in mammals, particularly humans. A VEGF gene having a native nucleotide sequence is a gene having the same nucleotide sequence as a VEGF gene as obtained from nature (i.e., a naturally occurring VEGF gene). More specifically, the term includes VEGF-A

WO 02/46412

PCT/US01/46861

(including the isoforms VEGF-A121, VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-A189, and VEGF-A206); VEGF-B (including the isoforms VEGF-B167, and VEGF-B186); VEGF-C; VEGF-D; VEGF-E (various VEGF-like proteins from orf virus strains as described in the Background section); VEGF-H; VEGF-R; VEGF-X; VEGF-138; and P1GF (both P1GF-1 and P1GF-2). The term also includes variants of specific isoforms. For example, the term includes not only the isoform VEGF-145, but also VEGF-145-I, VEGF-145-II, and VEGF-145-III. The term also encompasses allelic variants, other isoforms resulting from alternative exon splicing, forms that are functionally equivalent to native sequences, and nucleic acids that are substantially identical to a native VEGF gene. More specifically, the term encompasses the following VEGF genes.

[105] VEGF (VEGF-A) has been described by a number of researchers (see, e.g., Leung, et al. (1989) Science 246:1306-1309; Keck, et al. (1989) Science 246:1309-1312; and Conn et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2628-2632, each of which is incorporated herein in its entirety). The VEGF-A189 isoform is disclosed in U.S. Patent No. 5,240,848, the VEGF-A121 isoform in U.S. Patent Nos. 5,194,596 and 5,219,739; and the VEGF-A165 isoform in U.S. Patent No. 5,332,671, each of which is incorporated by reference in its entirety.

[106] VEGF-B is described in PCT Publication WO 96/26736, in U.S. Patent No. 5,840,693, U.S. Patent No. 5,607,918, and U.S. Patent No. 5,928,939, each of which is incorporated herein in its entirety. See also, PCT Publications WO 96/27007 and WO 00/09148, and Olofsson et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2576-2581, each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

[107] VEGF-C is disclosed by Joukov et al., (1996) EMBO J. 15:290-298, and Lee et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1988-1992, as well as in U.S. Patent No. 5,935,820; and U.S. Patent No. 6,130,071, each of which is incorporated herein in its entirety. See also U.S. Patent Nos. 5,776,755 and 5,932,540, as well as PCT Publications WO 95/24473; WO 96/39515; WO 97/05250; WO 97/09427; WO 97/17442; WO 98/33917; and WO 99/46364, each of which is incorporated herein by reference in its entirety. Other forms are discussed in EP 0 476 983 B1; U.S. Patent Nos. 5,994,300 and 6,040,157; and PCT publication WO 00/45835, each of which are incorporated by reference in its entirety.

[108] VEGF-D is described in PCT Publications WO 98/07832, WO 98/24811; and WO 99/33485. It is further described by Achen et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:548-553, each of the foregoing being incorporated herein in its entirety. See also EP 0 935 001 A1, which is incorporated herein in its entirety.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

- [109] The term also includes the various viral forms described in the Background section that are collectively referred to herein as VEGF-E. Such viral VEGF-like genes include the gene isolated from the orf viral strain NZ2 that is referred to in the literature variously as OV NZ2, ORFV2-VEGF, OV-VEGF2 and VEGF-ENZ2A (see, e.g., Lyttle, D.J. et al. (1994) *J. Virology* 68:84-92; and PCT Publication WO 00/25805). Also included are the gene
- 5 identified in strain NZ7 (called NZ7, OV-VEGF7, VEGF-E and VEGF-ENZ7). This gene is discussed in Lyttle, D. J. et al. (1994) *J. Virology* 68:84-92; and Ogawa, S. et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:31273-31282. Also included is the NZ10 gene which is disclosed in PCT Publication WO 00/25805. The gene from orf viral strain D1701 is also included (see, e.g.,
- 10 Meyer et al. (1999) *EMBO J.* 18:363-74, which is incorporated herein by reference in its entirety). Another viral VEGF-like protein from para-poxvirus has been disclosed in PCT Publication WO 99/50290.
- [110] The term further includes the mammalian VEGF-like protein that has also been referred to as VEGF-E (see, e.g., WO 99/4767)
- 15 [111] The term also includes the gene called PDGF/VEGF-Like Growth Factor H, or simply VEGF-H that is discussed in PCT Publication WO 00/44903 (incorporated by reference in its entirety). VEGF-R (see, e.g., PCT Publication WO 99/37671, incorporated by reference in its entirety) and VEGF-X (see, e.g., PCT publication WO 00/37641, incorporated herein by reference in its entirety) are also included, as is the recently identified VEGF-138 gene. The
- 20 various isoforms (PIGF1 and PIGF2) of the Placenta Growth Factor, PIGF, are further included in the term. Methods for isolating and characterizing this gene and the protein it encodes are set forth in Maglione et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9267-9271, which is incorporated herein by reference in its entirety. See also, Birkenhager, R. (1996) *Biochem. J.* 316:703-707; Kao, Y. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235:493-498;
- 25 Kao, Y. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:3154-3162; and Klaus, M. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:17629-17634, each of which is incorporated by reference in its entirety.
- [112] As indicated supra, the term VEGF gene includes nucleic acids that are substantially identical to a native sequence VEGF gene. The terms "identical" or percent "identity," in the context of two or more nucleic acids or polypeptides, refer to two or more sequences or
- 30 subsequences that are the same or have a specified percentage of nucleotides or amino acid residues that are the same, when compared and aligned for maximum correspondence, as measured using a sequence comparison algorithm such as those described below for example, or by visual inspection.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[113] The phrase "substantially identical," in the context of two nucleic acids or polypeptides, refers to two or more sequences or subsequences that have at least 75%, preferably at least 85%, more preferably at least 90%, 95% or higher or any integral value therebetween nucleotide or amino acid residue identity, when compared and aligned for maximum correspondence, as measured using a sequence comparison algorithm such as those described below for example, or by visual inspection. Preferably, the substantial identity exists over a region of the sequences that is at least about 10, preferably about 20, more preferable about 40-60 residues in length or any integral value therebetween, preferably over a longer region than 60-80 residues, more preferably at least about 90-100 residues, and most preferably the sequences are substantially identical over the full length of the sequences being compared, such as the coding region of a nucleotide sequence for example.

[114] For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are input into a computer, subsequence coordinates are designated, if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identity for the test sequence(s) relative to the reference sequence, based on the designated program parameters.

[115] Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, e.g., by the local homology algorithm of Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), by the homology alignment algorithm of Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), by the search for similarity method of Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by visual inspection [see generally, Current Protocols in Molecular Biology, (Ausubel, F.M. et al., eds.) John Wiley & Sons, Inc., New York (1987-1999, including supplements such as supplement 46 (April 1999))]. Use of these programs to conduct sequence comparisons are typically conducted using the default parameters specific for each program.

[116] Another example of an algorithm that is suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity is the BLAST algorithm, which is described in Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information. This algorithm involves first identifying high scoring sequence pairs (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence, which either match or satisfy some positive-valued threshold

WO 02/46412

PCT/US01/46861

score T when aligned with a word of the same length in a database sequence. This is referred to as the neighborhood word score threshold (Altschul et al, supra.). These initial neighborhood word hits act as seeds for initiating searches to find longer HSPs containing them. The word hits are then extended in both directions along each sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Cumulative scores are calculated using, for nucleotide sequences, the parameters M (reward score for a pair of matching residues; always > 0) and N (penalty score for mismatching residues; always < 0). For amino acid sequences, a scoring matrix is used to calculate the cumulative score. Extension of the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. For determining sequence similarity the default parameters of the BLAST programs are suitable. The BLASTN program (for nucleotide sequences) uses as defaults a word length (W) of 11, an expectation (E) of 10, M=5, N=-4, and a comparison of both strands. For amino acid sequences, the BLASTP program uses as defaults a word length (W) of 3, an expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix. The TBLASTN program (using protein sequence for nucleotide sequence) uses as defaults a word length (W) of 3, an expectation (E) of 10, and a BLOSUM 62 scoring matrix. (see Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

[117] In addition to calculating percent sequence identity, the BLAST algorithm also performs a statistical analysis of the similarity between two sequences (see, e.g., Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum probability (P(N)), which provides an indication of the probability by which a match between two nucleotide or amino acid sequences would occur by chance. For example, a nucleic acid is considered similar to a reference sequence if the smallest sum probability in a comparison of the test nucleic acid to the reference nucleic acid is less than about 0.1, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

[118] Another indication that two nucleic acid sequences are substantially identical is that the two molecules hybridize to each other under stringent conditions. "Hybridizes substantially" refers to complementary hybridization between a probe nucleic acid and a target nucleic acid and embraces minor mismatches that can be accommodated by reducing the stringency of the hybridization media to achieve the desired detection of the target polynucleotide sequence. The phrase "hybridizing specifically to", refers to the binding,

WO 02/46412

PCT/US01/46861

duplexing, or hybridizing of a molecule only to a particular nucleotide sequence under stringent conditions when that sequence is present in a complex mixture (e.g., total cellular DNA or RNA).

5 [119] A further indication that two nucleic acid sequences or polypeptides are substantially identical is that the polypeptide encoded by the first nucleic acid is immunologically cross reactive with the polypeptide encoded by the second nucleic acid, as described below.

10 [120] "Conservatively modified variations" of a particular polynucleotide sequence refers to those polynucleotides that encode identical or essentially identical amino acid sequences, or where the polynucleotide does not encode an amino acid sequence, to essentially identical sequences. Because of the degeneracy of the genetic code, a large number of functionally identical nucleic acids encode any given polypeptide. For instance, the codons CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, and AGG all encode the amino acid arginine. Thus, at every position where an arginine is specified by a codon, the codon can be altered to any of the corresponding codons described without altering the encoded polypeptide. Such nucleic acid variations are "silent variations," which are one species of "conservatively modified variations." Every polynucleotide sequence described herein which encodes a polypeptide also describes every possible silent variation, except where otherwise noted. One of skill will recognize that each codon in a nucleic acid (except AUG, which is ordinarily the only codon for methionine) can be modified to yield a functionally identical molecule by standard techniques. Accordingly, each "silent variation" of a nucleic acid which encodes a polypeptide is implicit in each described sequence.

15 [121] A polypeptide is typically substantially identical to a second polypeptide, for example, where the two peptides differ only by conservative substitutions. A "conservative substitution," when describing a protein, refers to a change in the amino acid composition of the protein that does not substantially alter the protein's activity. Thus, "conservatively modified variations" of a particular amino acid sequence refers to amino acid substitutions of those amino acids that are not critical for protein activity or substitution of amino acids with other amino acids having similar properties (e.g., acidic, basic, positively or negatively charged, polar or non-polar, etc.) such that the substitutions of even critical amino acids do not substantially alter activity. Conservative substitution tables providing functionally similar amino acids are well-known in the art. See, e.g., Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman and Company. In addition, individual substitutions, deletions or additions which alter, add or delete a single amino acid or a small percentage of amino acids in an encoded sequence are also "conservatively modified variations."

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[122] The term "VEGF protein" refers to a protein encoded by a VEGF gene and includes functional equivalents of such proteins.

[123] A "functional fragment" or "functional equivalent" of a protein, polypeptide or nucleic acid is a protein, polypeptide or nucleic acid whose sequence is not identical to the full-length protein, polypeptide or nucleic acid, yet retains the same function as the full-length protein, polypeptide or nucleic acid. A functional fragment can possess more, fewer, or the same number of residues as the corresponding native molecule, and/or can contain one or more amino acid or nucleotide substitutions. Methods for determining the function of a nucleic acid (e.g., coding function, ability to hybridize to another nucleic acid, binding to a regulatory molecule) are well-known in the art. Similarly, methods for determining protein function are well-known. For example, the DNA-binding function of a polypeptide can be determined, for example, by filter-binding, electrophoretic mobility-shift, or immunoprecipitation assays. See Ausubel et al., *supra*. The ability of a protein to interact with another protein can be determined, for example, by co-immunoprecipitation, two-hybrid assays or complementation, both genetic and biochemical. See, for example, Fields et al. (1989) *Nature* 340:245-246; U.S. Patent No. 5,585,245 and PCT WO 98/44350.

[124] The terms "nucleic acid," "polynucleotide," and "oligonucleotide" are used interchangeably and refer to a deoxyribonucleotide or ribonucleotide polymer in either single- or double-stranded form. For the purposes of the present disclosure, these terms are not to be construed as limiting with respect to the length of a polymer. The terms can encompass known analogues of natural nucleotides, as well as nucleotides that are modified in the base, sugar and/or phosphate moieties. In general, an analogue of a particular nucleotide has the same base-pairing specificity; i.e., an analogue of A will base-pair with T. Thus, the term polynucleotide sequence is the alphabetical representation of a polynucleotide molecule. This alphabetical representation can be input into databases in a computer having a central processing unit and used for bioinformatics applications such as functional genomics and homology searching. The terms additionally encompass nucleic acids containing known nucleotide analogs or modified backbone residues or linkages, which are synthetic, naturally occurring, and non-naturally occurring, which have similar binding properties as the reference nucleic acid, and which are metabolized in a manner similar to the reference nucleotides. Examples of such analogs include, without limitation, phosphorothioates, phosphoramidates, methyl phosphonates, chiral-methyl phosphonates, 2-O-methyl ribonucleotides, and peptide-nucleic acids (PNAs). The nucleotide sequences are displayed herein in the conventional 5'-3' orientation.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[125] Chromatin is the nucleoprotein structure comprising the cellular genome. "Cellular chromatin" comprises nucleic acid, primarily DNA, and protein, including histones and non-histone chromosomal proteins. The majority of eukaryotic cellular chromatin exists in the form of nucleosomes, wherein a nucleosome core comprises approximately 150 base pairs of DNA associated with an octamer comprising two each of histones H2A, H2B, H3 and H4; and linker DNA (of variable length depending on the organism) extends between nucleosome cores. A molecule of histone H1 is generally associated with the linker DNA. For the purposes of the present disclosure, the term "chromatin" is meant to encompass all types of cellular nucleoprotein, both prokaryotic and eukaryotic. Cellular chromatin includes both chromosomal and episomal chromatin.

[126] A "chromosome" is a chromatin complex comprising all or a portion of the genome of a cell. The genome of a cell is often characterized by its karyotype, which is the collection of all the chromosomes that comprise the genome of the cell. The genome of a cell can comprise one or more chromosomes.

[127] An "episome" is a replicating nucleic acid, nucleoprotein complex or other structure comprising a nucleic acid that is not part of the chromosomal karyotype of a cell. Examples of episomes include plasmids and certain viral genomes.

[128] An "exogenous molecule" is a molecule that is not normally present in a cell, but can be introduced into a cell by one or more genetic, biochemical or other methods. Normal presence in the cell is determined with respect to the particular developmental stage and environmental conditions of the cell. Thus, for example, a molecule that is present only during embryonic development of muscle is an exogenous molecule with respect to an adult muscle cell. An exogenous molecule can comprise, for example, a functioning version of a malfunctioning endogenous molecule or a malfunctioning version of a normally-functioning endogenous molecule.

[129] An exogenous molecule can be, among other things, a small molecule, such as is generated by a combinatorial chemistry process, or a macromolecule such as a protein, nucleic acid, carbohydrate, lipid, glycoprotein, lipoprotein, polysaccharide, any modified derivative of the above molecules, or any complex comprising one or more of the above molecules. Nucleic acids include DNA and RNA, can be single- or double-stranded; can be linear, branched or circular; and can be of any length. Nucleic acids include those capable of forming duplexes, as well as triplex-forming nucleic acids. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,176,996 and 5,422,251. Proteins include, but are not limited to, DNA-binding proteins, transcription factors, chromatin remodeling factors, methylated DNA binding

WO 02/46412

PCT/US01/46861

proteins, polymerases, methylases, demethylases, acetylases, deacetylases, kinases, phosphatases, integrases, recombinases, ligases, topoisomerases, gyrases and helicases.

[130] An exogenous molecule can be the same type of molecule as an endogenous molecule, e.g., protein or nucleic acid (i.e., an exogenous gene), providing it has a sequence that is different from an endogenous molecule. Methods for the introduction of exogenous molecules into cells are known to those of skill in the art and include, but are not limited to, lipid-mediated transfer (i.e., liposomes, including neutral and cationic lipids), electroporation, direct injection, cell fusion, particle bombardment, calcium phosphate co-precipitation, DEAE-dextran-mediated transfer and viral vector-mediated transfer.

[131] By contrast, an "endogenous molecule" is one that is normally present in a particular cell at a particular developmental stage under particular environmental conditions.

[132] The phrase "adjacent to a transcription initiation site" refers to a target site that is within about 50 bases either upstream or downstream of a transcription initiation site.

"Upstream" of a transcription initiation site refers to a target site that is more than about 50

bases 5' of the transcription initiation site (i.e., in the non-transcribed region of the gene).

"Downstream" of a transcription initiation site refers to a target site that is more than about 50 bases 3' of the transcription initiation site.

[133] A "fusion molecule" is a molecule in which two or more subunit molecules are linked, typically covalently. The subunit molecules can be the same chemical type of

molecule, or can be different chemical types of molecules. Examples of the first type of fusion molecule include, but are not limited to, fusion polypeptides (for example, a fusion between a ZFP DNA-binding domain and a transcriptional activation domain) and fusion nucleic acids (for example, a nucleic acid encoding the fusion polypeptide described supra).

Examples of the second type of fusion molecule include, but are not limited to, a fusion

between a triplex-forming nucleic acid and a polypeptide, and a fusion between a minor groove binder and a nucleic acid.

[134] A "gene," for the purposes of the present disclosure, includes a DNA region encoding a gene product (see *infra*), as well as all DNA regions which regulate the production of the gene product, whether or not such regulatory sequences are adjacent to coding and/or

transcribed sequences. Accordingly, a gene includes, but is not necessarily limited to, promoter sequences, terminators, translational regulatory sequences such as ribosome binding sites and internal ribosome entry sites, enhancers, silencers, insulators, boundary elements, replication origins, matrix attachment sites and locus control regions.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[135] "Gene expression" refers to the conversion of the information, contained in a gene, into a gene product. A gene product can be the direct transcriptional product of a gene (e.g., mRNA, tRNA, rRNA, antisense RNA, ribozyme, structural RNA or any other type of RNA) or a protein produced by translation of a mRNA. Gene products also include RNAs which are modified, by processes such as capping, polyadenylation, methylation, and editing, and proteins modified by, for example, methylation, acetylation, phosphorylation, ubiquitination, ADP-ribosylation, myristilation, and glycosylation.

[136] "Gene activation" refers to any process that results in an increase in production of a gene product. A gene product can be either RNA (including, but not limited to, mRNA, rRNA, tRNA, and structural RNA) or protein. Accordingly, gene activation includes those processes that increase transcription of a gene and/or translation of a mRNA. Examples of gene activation processes that increase transcription include, but are not limited to, those that facilitate formation of a transcription initiation complex, those that increase transcription initiation rate, those that increase transcription elongation rate, those that increase

processivity of transcription and those that relieve transcriptional repression (by, for example, blocking the binding of a transcriptional repressor). Gene activation can constitute, for example, inhibition of repression as well as stimulation of expression above an existing level. Examples of gene activation processes which increase translation include those that increase translational initiation, those that increase translational elongation and those that increase mRNA stability. In general, gene activation comprises any detectable increase in the production of a gene product, in some instances an increase in production of a gene product by about 2-fold, in other instances from about 2- to about 5-fold or any integer therebetween, in still other instances between about 5- and about 10-fold or any integer therebetween, in yet other instances between about 10- and about 20-fold or any integer therebetween, sometimes between about 20- and about 50-fold or any integer therebetween, in other instances between about 50- and about 100-fold or any integer therebetween, and in yet other instances between 100-fold or more.

[137] "Gene repression" and "inhibition of gene expression" refer to any process which results in a decrease in production of a gene product. A gene product can be either RNA (including, but not limited to, mRNA, rRNA, tRNA, and structural RNA) or protein. Accordingly, gene repression includes those processes which decrease transcription of a gene and/or translation of a mRNA. Examples of gene repression processes which decrease transcription include, but are not limited to, those which inhibit formation of a transcription initiation complex, those which decrease transcription initiation rate, those which decrease

WO 02/46412

PCT/US01/46861

transcription elongation rate, those which decrease processivity of transcription and those which antagonize transcriptional activation (by, for example, blocking the binding of a transcriptional activator). Gene repression can constitute, for example, prevention of activation as well as inhibition of expression below an existing level. Examples of gene repression processes which decrease translation include those which decrease translational initiation, those which decrease translational elongation and those which decrease mRNA stability. Transcriptional repression includes both reversible and irreversible inactivation of gene transcription. In general, gene repression comprises any detectable decrease in the production of a gene product, in some instances a decrease in production of a gene product by about 2-fold, in other instances from about 2- to about 5-fold or any integer therebetween, in yet other instances between about 5- and about 10-fold or any integer therebetween, in still other instances between about 10- and about 20-fold or any integer therebetween, sometimes between about 20- and about 50-fold or any integer therebetween, in other instances between about 50- and about 100-fold or any integer therebetween, in still other instances 100-fold or more. In yet other instances, gene repression results in complete inhibition of gene expression, such that no gene product is detectable.

[138] "Modulation" refers to a change in the level or magnitude of an activity or process. The change can be either an increase or a decrease. For example, modulation of gene expression includes both gene activation and gene repression. Modulation can be assayed by determining any parameter that is indirectly or directly affected by the expression of the target gene. Such parameters include, e.g., changes in RNA or protein levels, changes in protein activity, changes in product levels, changes in downstream gene expression, changes in reporter gene transcription (luciferase, CAT, β -galactosidase, β -glucuronidase, green fluorescent protein (see, e.g., Mistili & Spector, *Nature Biotechnology* 15:961-964 (1997))); changes in signal transduction, phosphorylation and dephosphorylation, receptor-ligand interactions, second messenger concentrations (e.g., cGMP, cAMP, IP₃, and Ca²⁺), cell growth, and neovascularization. These assays can be in vitro, in vivo, and ex vivo. Such functional effects can be measured by any means known to those skilled in the art, e.g., measurement of RNA or protein levels, measurement of RNA stability, identification of downstream or reporter gene expression, e.g., via chemiluminescence, fluorescence, colorimetric reactions, antibody binding, inducible markers, ligand binding assays; changes in intracellular second messengers such as cGMP and inositol triphosphate (IP₃); changes in intracellular calcium levels; cytokine release, and the like.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[139] A "regulatory domain" or "functional domain" refers to a protein or a protein domain that has transcriptional modulation activity when tethered to a DNA binding domain, i.e., a ZFP. Typically, a regulatory domain is covalently or non-covalently linked to a ZFP (e.g., to form a fusion molecule) to effect transcription modulation. Regulatory domains can be activation domains or repression domains. Activation domains include, but are not limited to, VP16, VP64 and the p65 subunit of nuclear factor Kappa-B. Repression domains include, but are not limited to, KRAB MBD2B and v-ErbA. Additional regulatory domains include, e.g., transcription factors and co-factors (e.g., MAD, ERD, SID, early growth response factor 1, and nuclear hormone receptors), endonucleases, integrases, recombinases, methyltransferases, histone acetyltransferases, histone deacetylases etc. Activators and repressors include co-activators and co-repressors (see, e.g., Utley et al., Nature 394:498-502 (1998)). Alternatively, a ZFP can act alone, without a regulatory domain, to effect transcription modulation.

[140] The term "operably linked" or "operatively linked" is used with reference to a juxtaposition of two or more components (such as sequence elements), in which the components are arranged such that both components function normally and allow the possibility that at least one of the components can mediate a function that is exerted upon at least one of the other components. By way of illustration, a transcriptional regulatory sequence, such as a promoter, is operatively linked to a coding sequence if the transcriptional regulatory sequence controls the level of transcription of the coding sequence in response to the presence or absence of one or more transcriptional regulatory factors. An operatively linked transcriptional regulatory sequence is generally joined in cis with a coding sequence, but need not be directly adjacent to it. For example, an enhancer can constitute a transcriptional regulatory sequence that is operatively-linked to a coding sequence, even though they are not contiguous.

[141] With respect to fusion polypeptides, the term "operably linked" or "operatively linked" can refer to the fact that each of the components performs the same function in linkage to the other component as it would if it were not so linked. For example, with respect to a fusion polypeptide in which a ZFP DNA-binding domain is fused to a transcriptional activation domain (or functional fragment thereof), the ZFP DNA-binding domain and the transcriptional activation domain (or functional fragment thereof) are in operative linkage if, in the fusion polypeptide, the ZFP DNA-binding domain portion is able to bind its target site and/or its binding site, while the transcriptional activation domain (or functional fragment thereof) is able to activate transcription.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[142] The term "recombinant," when used with reference to a cell, indicates that the cell replicates an exogenous nucleic acid, or expresses a peptide or protein encoded by an exogenous nucleic acid. Recombinant cells can contain genes that are not found within the native (non-recombinant) form of the cell. Recombinant cells can also contain genes found in the native form of the cell wherein the genes are modified and re-introduced into the cell by artificial means. The term also encompasses cells that contain a nucleic acid endogenous to the cell that has been modified without removing the nucleic acid from the cell; such modifications include those obtained by gene replacement, site-specific mutation, and related techniques.

[143] A "recombinant expression cassette," "expression cassette" or "expression construct" is a nucleic acid construct, generated recombinantly or synthetically, that has control elements that are capable of effecting expression of a structural gene that is operatively linked to the control elements in hosts compatible with such sequences. Expression cassettes include at least promoters and optionally, transcription termination signals. Typically, the recombinant expression cassette includes at least a nucleic acid to be transcribed (e.g., a nucleic acid encoding a desired polypeptide) and a promoter. Additional factors necessary or helpful in effecting expression can also be used as described herein. For example, an expression cassette can also include nucleotide sequences that encode a signal sequence that directs secretion of an expressed protein from the host cell. Transcription termination signals, enhancers, and other nucleic acid sequences that influence gene expression, can also be included in an expression cassette.

[144] A "promoter" is defined as an array of nucleic acid control sequences that direct transcription. As used herein, a promoter typically includes necessary nucleic acid sequences near the start site of transcription, such as, in the case of certain RNA polymerase II type promoters, a TATA element, CCAAT box, SP-1 site, etc. As used herein, a promoter also optionally includes distal enhancer or repressor elements, which can be located as much as several thousand base pairs from the start site of transcription. The promoters often have an element that is responsive to transactivation by a DNA-binding moiety such as a polypeptide, e.g., a nuclear receptor, Gal4, the lac repressor and the like.

[145] A "constitutive" promoter is a promoter that is active under most environmental and developmental conditions. An "inducible" promoter is a promoter that is active under certain environmental or developmental conditions.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[146] A "weak promoter" refers to a promoter having about the same activity as a wild type herpes simplex virus ("HSV") thymidine kinase ("tk") promoter or a mutated HSV tk promoter, as described in Eisenberg & McKnight, Mol. Cell. Biol. 5:1940-1947 (1985).

5 [147] An "expression vector" is a nucleic acid construct, generated recombinantly or synthetically, with a series of specified nucleic acid elements that permit transcription of a particular nucleic acid in a host cell, and optionally integration or replication of the expression vector in a host cell. The expression vector can be part of a plasmid, virus, or nucleic acid fragment, of viral or non-viral origin. Typically, the expression vector includes an "expression cassette," which comprises a nucleic acid to be transcribed operably linked to
10 a promoter. The term expression vector also encompasses naked DNA operably linked to a promoter.

[148] By "host cell" is meant a cell that contains an expression vector or nucleic acid, either of which optionally encodes a ZFP or a ZFP fusion protein. The host cell typically supports the replication or expression of the expression vector. Host cells can be prokaryotic cells such
15 as, for example, E. coli, or eukaryotic cells such as yeast, fungal, protozoal, higher plant, insect, or amphibian cells, or mammalian cells such as CHO, HeLa, 293, COS-1, and the like, e.g., cultured cells (in vitro), explants and primary cultures (in vitro and ex vivo), and cells in vivo.

[149] The term "naturally occurring," as applied to an object, means that the object can be
20 found in nature, as distinct from being artificially produced by humans.

[150] The terms "polypeptide," "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residue is an analog or mimetic of a corresponding naturally
25 occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers. Polypeptides can be modified, e.g., by the addition of carbohydrate residues to form glycoproteins. The terms "polypeptide," "peptide" and "protein" include glycoproteins, as well as non-glycoproteins. The polypeptide sequences are displayed herein in the conventional N-terminal to C-terminal orientation.

[151] A "subsequence" or "segment" when used in reference to a nucleic acid or
30 polypeptide refers to a sequence of nucleotides or amino acids that comprise a part of a longer sequence of nucleotides or amino acids (e.g., a polypeptide), respectively.

[152] The term "ischemia" broadly refers to a condition of localized anemia due to an inadequate blood supply to the particular area (e.g., a tissue or organ), usually due to a

WO 02/46412

PCT/US01/46861

blockage. Ischemia can be associated with a variety of diseases that involve a blockage of blood flow such as coronary artery disease and peripheral vascular disease, for example.

[153] "Angiogenesis" broadly refers to the process of developing new blood vessels. The process involves proliferation, migration and tissue infiltration of capillary endothelial cells from pre-existing blood vessels. Angiogenesis is important in normal physiological processes, including for example, follicular growth, embryonal development and wound healing and in pathological processes such as tumor growth and metastasis. The term "modulation" refers to a change in extent, duration, levels, or properties of a physiologic process. For example modulation of angiogenesis could comprise an increase in the formation of new blood vessels or a decrease in the formation of new blood vessels. Modulation of angiogenesis could also refer to the stimulation of the formation of nonpermeable or nonhyperpermeable blood vessels. Various assays for angiogenesis are described infra.

[154] The terms "treating" and "treatment" as used herein refer to reduction in severity and/or frequency of symptoms, elimination of symptoms and/or underlying cause, prevention of the occurrence of symptoms and/or their underlying cause, and improvement or remediation of damage.

[155] By an "effective" amount (or "therapeutically effective" amount) of a pharmaceutical composition is meant a sufficient, but nontoxic amount of the agent to provide the desired effect. The term refers to an amount sufficient to treat a subject. Thus, the term therapeutic amount refers to an amount sufficient to remedy a disease state or symptoms, by preventing, hindering, retarding or reversing the progression of the disease or any other undesirable symptoms whatsoever. The term prophylactically effective amount refers to an amount given to a subject that does not yet have the disease, and thus is an amount effective to prevent, hinder or retard the onset of a disease.

[156] A "wound" refers broadly to trauma to any tissue. A wound can result from an injury such as caused by violence, accident or surgery. A wound can include laceration or breakage of an epithelial layer (e.g., the skin) with damage to underlying tissue.

II. Overview

[157] A variety of methods are provided herein for modulating angiogenesis and treating ischemia. In some instances, such methods involve contacting a cell or population of cells such as in an organism, with one or more zinc finger proteins (ZFPs) that bind to specific sequences in one or more VEGF genes. In certain methods, one ZFP is administered and is able to bind to a target site in different VEGF genes (e.g., a target site in VEGF-A, VEGF-B

WO 02/46412

PCT/US01/46861

and VEGF-C). Other methods involve administering a plurality of different ZFPs that bind to a multiple target sites within a particular gene.

[158] Thus, also provided herein are a variety of zinc finger proteins that are engineered to specifically recognize and bind to particular nucleic acid segments (target sites), thereby modulating the expression of one or more VEGF genes. In one embodiment, the ZFPs are linked to regulatory domains to create chimeric transcription factors to activate or repress transcription of VEGF genes. With such ZFPs, expression of certain VEGF genes can be enhanced; with certain other ZFPs, expression can be repressed. In general, the target sites to which the ZFPs bind are sites that result in activation or repression of expression of VEGF gene. The target site can be adjacent to, upstream of, and/or downstream of the transcription start site (defined as nucleotide 0). As indicated above, some of the present ZFPs modulate the expression of a single VEGF gene. Other ZFPs modulate the expression of a plurality of VEGF genes. Thus, depending upon the particular ZFP(s) utilized, one can tailor the level at which one or more VEGF genes are expressed. In addition, multiple ZFPs or ZFP fusion molecules, having distinct target sites, can be used to regulate a single VEGF gene.

[159] By virtue of the ability of the ZFPs to bind to target sites and influence expression of VEGF genes, coupled with the diverse functions of VEGF genes, the ZFPs provided herein can be used in a wide variety of applications. In general, the ZFPs can be used to regulate the growth of a variety of endothelial cells, either by activating or repressing growth. In certain applications, the ZFPs can be used to activate expression of VEGF genes to trigger beneficial angiogenesis in cell populations, both in vitro and in vivo. Such activation can be utilized for example to promote the formation of new blood vessels and capillaries in treatments for ischemic conditions. For instance, the ZFPs can be used to stimulate the development of collateral circulation in individuals having any of a variety of arterial or venous obstructions, such as individuals having atherosclerosis. The ZFPs can also be used to promote lymphogenesis (the formation of lymphatic vessels) and myelopoiesis (the formation of the tissue elements of bone marrow and/or types of blood cells derived from bone marrow), and can be used to regenerate blood vessels and tissue in wounds.

[160] Other methods involve repression of angiogenesis. Hence, the ability to utilize certain of the ZFPs provided herein to repress the expression of VEGF genes can be useful in other instances. For example, the ZFPs can be administered to prevent endothelial growth when such growth is undesirable, such as in blocking the formation of additional blood vessels to tumors, in preventing proliferation of the microvascular system in pathologies such as diabetic retinopathy and pathological angiogenesis associated with arthritis.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[161] The ZFPs can also be employed in applications other than therapeutic applications. For instance, the ZFPs can be used to screen for agents capable of countering either activation or repression of VEGF gene expression. Also described herein are nucleic acids that encode the zinc finger proteins. Additionally, agents identified through the screening methods, the
 5 nucleic acids encoding the ZFPs and/or the ZFPs themselves can be utilized in pharmaceutical compositions to treat a variety of disorders, such as those just described.

III. Zinc Finger Proteins for Regulating Gene Expression

A. General

[162] The zinc finger proteins (ZFPs) disclosed herein are proteins that can bind to DNA in
 10 a sequence-specific manner. As indicated supra, these ZFPs can be used in a variety of applications, including modulating angiogenesis and in treatments for ischemia. An exemplary motif characterizing one class of these proteins, the C2H2 class, is -Cys-(X)2-4-Cys-(X)12-His-(X)3-5-His (where X is any amino acid) (SEQ. ID. NO:208). Several structural studies have demonstrated that the finger domain contains an alpha helix containing
 15 the two invariant histidine residues and two invariant cysteine residues in a beta turn coordinated through zinc. However, the ZFPs provided herein are not limited to this particular class. Additional classes of zinc finger proteins are known and can also be used in the methods and compositions disclosed herein (see, e.g., Rhodes, et al. (1993) Scientific American 268:56-65). In certain ZFPs, a single finger domain is about 30 amino acids in
 20 length. Zinc finger domains are involved not only in DNA-recognition, but also in RNA binding and in protein-protein binding.

[163] The x-ray crystal structure of Zif268, a three-finger domain from a murine transcription factor, has been solved in complex with a cognate DNA-sequence and shows that each finger can be superimposed on the next by a periodic rotation. The structure
 25 suggests that each finger interacts independently with DNA over 3 base-pair intervals, with side-chains at positions -1, 2, 3 and 6 on each recognition helix making contacts with their respective DNA triplet subsites. The amino terminus of Zif268 is situated at the 3' end of the DNA strand with which it makes most contacts. Some zinc fingers can bind to a fourth base in a target segment. If the strand with which a zinc finger protein makes most contacts is
 30 designated the target strand, some zinc finger proteins bind to a three base triplet in the target strand and a fourth base on the nontarget strand. The fourth base is complementary to the base immediately 3' of the three base subsite.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

B. Exemplary ZFPs

[164] ZFPs that bind to particular target sites on a nucleic acid that includes a VEGF gene are disclosed herein. Thus, the ZFPs can include a variety of different component fingers of varying amino acid composition, provided the ZFP binds to the target sites provided herein.

- 5 Locations of target sites in several VEGF genes are given in Table 2 and the sequences of the target sites are listed in Tables 3 and 4 below in column 2 labeled "Target" in each of these two tables. Transcription start sites for certain of the VEGF genes have not yet been precisely established. Thus, the site location listed in Table 2 for the following VEGF genes assumes that the transcription start site is at the location indicated for a particular GenBank entry as follows:

Gene	Assumed Transcription Start Site
VEGF A	bp 2363 of GenBank entry AF095785
VEGF B	bp 400 of GenBank entry U80601
VEGF-C	bp 600 of GenBank entry AF020393
15 VEGF-D	bp 18727 of GenBank entry U69570
VEGF-E	bp 30278 (antisense strand) of GenBank entry AC015837
Viral VEGFs	bp 230 of GenBank entry S67520

- [165] As indicated supra, the target sites can be located upstream or downstream of the transcriptional start site (defined as nucleotide 0). Some of the target sites include 9 nucleotides (see Table 3), whereas other sites include 18 nucleotides (see Table 4). One feature of these target sites is that binding of a ZFP, or a fusion protein including a ZFP and one or more regulatory domains, to the target site can affect the level of expression of one or more VEGF genes. As defined supra, VEGF genes that can be regulated by the ZFPs provided herein include, but are not limited to, VEGF-A (including isoforms VEGF-A121, 20 VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-A189, and VEGF-A206), VEGF B (including isoforms VEGF-B167, and VEGF-B186), VEGF C, VEGF D, the viral VEGF-like proteins (viral VEGF-E) and mammalian VEGF-E, VEGF-H, VEGF-R, VEGF-X, VEGF-138 and P1GF (including P1GF-1 and P1GF-2). The target sites can be located adjacent the transcription start site or be located significantly upstream or downstream of the transcription start site.
- 30 Some target sites are located within a single VEGF gene such that binding of a ZFP to the target affects the expression of a single VEGF gene. Other target sites are located within multiple VEGF genes such that the binding of a single ZFP can modulate the expression of multiple genes. In still other instances multiple ZFPs can be used, each recognizing targets in the same gene.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[166] The ZFPs that bind to these target sites typically include at least one zinc finger but can include a plurality of zinc fingers (e.g., 2, 3, 4, 5, 6 or more fingers). Usually, the ZFPs include at least three fingers. Certain of the ZFPs include six fingers. The ZFPs that include three fingers typically recognize a target site that includes 9 or 10 nucleotides; ZFPs having six fingers can recognize target sites that include 18 to 20 nucleotides. The ZFPs can also be fusion proteins that include one or more regulatory domains, which domains can be transcriptional activation or repressor domains.

[167] Tables 3 and 4 show the amino acid sequences of a number of different ZFPs and the corresponding target sites to which they bind. Table 3 lists ZFPs that bind to target sites that include 9 nucleotides. The first column in this table lists an internal reference name of the ZFP. Column 2 includes the 9 base target site bound by a three-finger zinc finger protein, with the target sites listed in 5' to 3' orientation. The corresponding SEQ ID NO. for the target site is listed in column 3. The amino acid sequences of portions of the three zinc finger components involved in recognition are listed in columns 4, 6 and 8, and their corresponding SEQ ID NOs. are listed in columns 5, 7 and 9, respectively. The numbering convention for zinc fingers is defined below. Column 10 lists the dissociation constants for some of the ZFP/target site complexes. Methods for determining such constants are described infra. Excluding cross-strand interactions, each finger binds to a triplet of bases (a target subsite) within a corresponding target sequence. The first finger binds to the first triplet starting from the 3' end of a target site, the second finger binds to the second triplet, and the third finger binds the third (i.e., the 5'-most) triplet of the target sequence. Thus, for example, the RSDHLAR finger (SEQ ID NO30) of the ZFP BVO 13A (first column of Table 3) binds to 5'GGG3', the DRSNLTR finger (SEQ ID NO: 36) binds to 5'GAC3' and the RSDALTQ finger (SEQ ID NO:88) binds to 5'ATG3'.

[168] Table 4 provides information on six-finger ZFPs targeting VEGF genes. Table 4 has a similar format to Table 3, with column 1 indicating the internal reference name of the ZFP. In contrast to Table 3, however, column 2 of Table 4 includes the 18 base target site recognized by a six-finger protein (here, too, targets are listed in a 5' to 3' orientation), with the corresponding SEQ ID NO. listed in column 3. The amino acid sequences of portions of the six zinc finger components involved in recognition are listed in columns 4, 6, 8, 10, 12 and 14, with associated SEQ ID NOs. being listed in columns 5, 7, 9, 11, 13 and 15, respectively. In ZFPs of this type, the first finger binds to the first triplet starting from the 3' end of a target site, the second finger binds to the second triplet, the third finger binds the third triplet, the fourth finger binds to the fourth triplet, the fifth finger binds to the fifth triplet and the sixth

WO 02/46412

PCT/US01/46861

finger binds to the sixth (i.e., the 5'-most) triplet of the target sequence (again excluding cross-strand interactions). Hence, for the ZFP named BVO 10A-9A, the first finger QSSDLRR (SEQ ID NO:120) binds 5'GCT3', the second finger RSDHLTR (SEQ ID NO:123) binds 5'GGG3', the third finger DRSALAR (SEQ ID NO:126) binds 5'GTC3', the fourth finger RSDHLAR (SEQ ID NO: 129) binds 5'GGG3', the fifth finger RSDNLAR (SEQ ID NO:132) binds 5'GAG3' and the sixth finger RSDALTR (SEQ ID NO:135) binds 5'GTG3'.

[169] Accordingly, some of the target sites for the ZFPs provided herein, as well as specific examples of such ZFPs are disclosed in Tables 3 and 4. The segments or regions of the VEGF genes that were examined for potential target sites are indicated in Table 1. The numbers listed in Table 1 refer to the starting and ending base (in kbp) relative to the transcription start site for various VEGF genes that were examined to identify target sites. Negative numbers refer to kbp upstream of the transcription start site and positive numbers refer to kbp downstream of the transcription start site, where the transcription start site is defined as nucleotide 0. The VEGF sequences examined for target sites include the sequences for VEGF-A (see GenBank accession number AF095785), VEGF-B (see GenBank accession number U80601 - from -0.4 kb to +0.32 kb), VEGF-C (see GenBank accession number AF020393) and VEGF-D genes (see, HSU69570 and HSY12864), as well as the sequences for P1GF (see, GenBank accession number AC015837) and viral VEGF-E genes (see, GenBank accession number AF106020 and Meyer, M., et al. (1999) EMBO J. 18:363-74; GenBank accession number S67520 and Lyttle, D.J. et al. (1994) J. Virol. 68:84-92; and GenBank accession number AF091434). References providing the sequences for each of these genes are listed supra. Thus, for example and with reference to Table 1, the nucleotide sequence of the VEGF-A gene examined for target sites extended from 2.3 kb upstream of the transcriptional start site to 1.1 kb downstream of the transcriptional start site.

[170] The location(s) of the target site(s) for a particular ZFP in the various VEGF genes is summarized in Table 2. The first column in this table is an internal reference name for a ZFP and corresponds to the same name in column 1 of Tables 3 and 4. The location of the 5' end of the target site in various VEGF gene sequences is listed in the remaining columns. Again, negative numbers refer to the number of nucleotides upstream of the transcriptional start site (defined as nucleotide 0), whereas positive numbers indicate the number of nucleotides downstream of the transcriptional start site. Hence, the target site (5' end) for the ZFP named BVO 13A (row 1 of Table 2) in the VEGF A nucleotide sequence begins at the nucleotide located 851 bases downstream of the principal transcriptional start site for VEGF A. Certain

WO 02/46412

PCT/US01/46861

target sites appear in multiple VEGF genes. For instance, the target site (5' end) for the ZFP named VG 4A in the VEGF A nucleotide sequence begins at the nucleotide located 1083 bases upstream of the transcriptional start site for VEGF A. The same target site (5' end) also begins at nucleotide 31 upstream of the transcriptional start site for VEGF B and 252 bases upstream of the transcription start site for VEGF C. Certain ZFPs, have more than one target site in a single VEGF gene; e.g., EP 10A has two target sites in the VEGF A gene (see Table 2).

[171] Consequently, as indicated supra, certain ZFPs described herein can be utilized to modulate angiogenesis by modulating the activity of single VEGF genes, while other ZFPs can be utilized to regulate expression of a plurality of genes. The ZFP referred to as VG 8A, for example, has a binding site for each of the VEGF genes listed in Table 2, and thus can be utilized to regulate expression of a variety of VEGF genes simultaneously. By judicious selection of the various ZFPs provided herein and/or combinations thereof, one can tailor which VEGF genes are modulated.

IV. Characteristics of ZFPs

[172] Zinc finger proteins are formed from zinc finger components. For example, zinc finger proteins can have one to thirty-seven fingers, commonly having 2, 3, 4, 5 or 6 fingers. A zinc finger protein recognizes and binds to a target site (sometimes referred to as a target segment) that represents a relatively small subsequence within a target gene. Each component finger of a zinc finger protein can bind to a subsite within the target site. The subsite includes a triplet of three contiguous bases all on the same strand (sometimes referred to as the target strand). The subsite may or may not also include a fourth base on the opposite strand that is the complement of the base immediately 3' of the three contiguous bases on the target strand. In many zinc finger proteins, a zinc finger binds to its triplet subsite substantially independently of other fingers in the same zinc finger protein. Accordingly, the binding specificity of zinc finger protein containing multiple fingers is usually approximately the aggregate of the specificities of its component fingers. For example, if a zinc finger protein is formed from first, second and third fingers that individually bind to triplets XXX, YYY, and ZZZ, the binding specificity of the zinc finger protein is 3'XXX YYY ZZZ5'.

[173] The relative order of fingers in a zinc finger protein from N-terminal to C-terminal determines the relative order of triplets in the 3' to 5' direction in the target. For example, if a zinc finger protein comprises from N-terminal to C-terminal first, second and third fingers that individually bind, respectively, to triplets 5' GAC3', 5' GTA3' and 5' GGC3' then the zinc finger protein binds to the target segment 3' CAGATGCGG5' (SEQ ID NO: 209). If the

WO 02/46412

PCT/US01/46861

zinc finger protein comprises the fingers in another order, for example, second finger, first finger, third finger, then the zinc finger protein binds to a target segment comprising a different permutation of triplets, in this example, 3' ATGCAGCGG5' (SEQ ID NO: 210). See Berg & Shi, Science 271, 1081-1086 (1996). The assessment of binding properties of a zinc finger protein as the aggregate of its component fingers may, in some cases, be influenced by context-dependent interactions of multiple fingers binding in the same protein.

[174] Two or more zinc finger proteins can be linked to have a target specificity that is the aggregate of that of the component zinc finger proteins (see e.g., Kim & Pabo, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 2812-2817 (1998)). For example, a first zinc finger protein having first, second and third component fingers that respectively bind to XXX, YYY and ZZZ can be linked to a second zinc finger protein having first, second and third component fingers with binding specificities, AAA, BBB and CCC. The binding specificity of the combined first and second proteins is thus 3'XXXYYYZZZ__AAABBBCCC5', where the underline indicates a short intervening region (typically 0-5 bases of any type). In this situation, the target site can be viewed as comprising two target segments separated by an intervening segment.

[175] Linkage can be accomplished using any of the following peptide linkers.

[176] T G E K P: (SEQ ID NO:211) (Liu et al., 1997, supra.); (G4S)_n (SEQ ID NO:212) (Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 1156-1160 (1996.); GRRRGGS; (SEQ ID NO:213) LRQRDGERP; (SEQ ID NO:214) LRQKDGGGGERP; (SEQ ID NO:215)

LRQKD(G3S)2ERP (SEQ ID NO:216) Alternatively, flexible linkers can be rationally designed using computer programs capable of modeling both DNA-binding sites and the peptides themselves or by phage display methods. In a further variation, noncovalent linkage can be achieved by fusing two zinc finger proteins with domains promoting heterodimer formation of the two zinc finger proteins. For example, one zinc finger protein can be fused with fos and the other with jun (see Barbas et al., WO 95/119431).

[177] Linkage of two zinc finger proteins is advantageous for conferring a unique binding specificity within a mammalian genome. A typical mammalian diploid genome consists of 3 x 10⁹ bp. Assuming that the four nucleotides A, C, G, and T are randomly distributed, a given 9 bp sequence is present ~23,000 times. Thus a ZFP recognizing a 9 bp target with absolute specificity would have the potential to bind to ~23,000 sites within the genome. An 18 bp sequence is present once in 3.4 x 10¹⁰ bp, or about once in a random DNA sequence whose complexity is ten times that of a mammalian genome.

[178] A component finger of zinc finger protein typically contains about 30 amino acids and, in one embodiment, has the following motif (N-C):

WO 02/46412

PCT/US01/46861

(SEQ ID NO:208)

Cys-(X)2-4-Cys-X.X.X.X.X.X.X.X.X.X-His-(X)3-5-His

-1 1 2 3 4 5 6 7

- [179] The two invariant histidine residues and two invariant cysteine residues in a single beta turn are co-ordinated through zinc atom (see, e.g., Berg & Shi, Science 271, 1081-1085 (1996)). The above motif shows a numbering convention that is standard in the field for the region of a zinc finger conferring binding specificity. The amino acid on the left (N-terminal side) of the first invariant His residue is assigned the number +6, and other amino acids further to the left are assigned successively decreasing numbers. The alpha helix begins at residue 1 and extends to the residue following the second conserved histidine. The entire helix is therefore of variable length, between 11 and 13 residues.

V. Design of ZFPs

- [180] The ZFPs provided herein are engineered to recognize a selected target site in a VEGF gene such as shown in Tables 3, 4 and 6. The process of designing or selecting a ZFP typically starts with a natural ZFP as a source of framework residues. The process of design or selection serves to define nonconserved positions (i.e., positions -1 to +6) so as to confer a desired binding specificity. One suitable ZFP is the DNA binding domain of the mouse transcription factor Zif268. The DNA binding domain of this protein has the amino acid sequence:

20 YACPVESCDRRFSRDELTRHIRHTGQKP (F1) (SEQ ID NO:217)

FQCRICMRNFSRSDHLTTTHRTHTGEKP (F2) (SEQ ID NO:218)

FACDICGRKFARSDEKRRHTKIHLRQK (F3) (SEQ ID NO:219)

and binds to a target 5' GCG TGG GCG 3' (SEQ ID NO:220).

- [181] Another suitable natural zinc finger protein as a source of framework residues is Sp-1. The Sp-1 sequence used for construction of zinc finger proteins corresponds to amino acids 531 to 624 in the Sp-1 transcription factor. This sequence is 94 amino acids in length. The amino acid sequence of Sp-1 is as follows:

PGKKKQHICHQCGKVYGTSHLRAHLRWHTGERPFMCTWSYCGKRFRSDE

25 LQRHQRTHTEKKFACPECPKRFMRSDHLSKHIKTHQNKKG (SEQ ID NO:221)

- 30 [182] Sp-1 binds to a target site 5'GGG GCG GGG3' (SEQ ID No:222).

[183] An alternate form of Sp-1, an Sp-1 consensus sequence, has the following amino acid sequence:

meklmgsdPGKKKQHACPECGKSFSKSSHLRAHQRTHTGERPYKCPECGKSFSRSD

ELQRHQRTHTEKPYKCPECGKSFSRSDHLSKHQRTHQNKKG (SEQ ID NO:223)

WO 02/46412

PCT/US01/46861

(lower case letters are a leader sequence from Shi & Berg, Chemistry and Biology 1, 83-89, (1995). The optimal binding sequence for the Sp-1 consensus sequence is 5'GGGGCGGGG3' (SEQ ID NO:222). Other suitable ZFPs are described below.

[184] There are a number of substitution rules that assist rational design of some zinc finger proteins. For example, ZFP DNA-binding domains can be designed and/or selected to recognize a particular target site as described in co-owned WO 00/42219; WO 00/41566; and U.S. Serial Nos. 09/444,241 filed November 19, 1999; 09/535,088 filed March 23, 2000; as well as U.S. Patents 5,789,538; 6,007,408; 6,013,453; 6,140,081; and 6,140,466; and PCT publications WO 95/19431, WO 98/54311, WO 00/23464 and WO 00/27878. In one embodiment, a target site for a zinc finger DNA-binding domain is identified according to site selection rules disclosed in co-owned WO 00/42219. In a preferred embodiment, a ZFP is selected as described in co-owned U.S. Serial No. 09/716,637, filed November 20, 2000, titled "Iterative Optimization in the Design of Binding Proteins." See also WO 96/06166; Desjarlais & Berg, PNAS 90, 2256-2260 (1993); Choo & Klug, PNAS 91, 11163-11167 (1994); Desjarlais & Berg, PNAS 89, 7345-7349 (1992); Jamieson et al., Biochemistry 33:5689-5695 (1994); and Choo et al., WO 98/53057, WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060.

[185] Many of these rules are supported by site-directed mutagenesis of the three-finger domain of the ubiquitous transcription factor, Sp-1 (Desjarlais and Berg, 1992; 1993). One of these rules is that a 5' G in a DNA triplet can be bound by a zinc finger incorporating arginine at position 6 of the recognition helix. Another substitution rule is that a G in the middle of a subsite can be recognized by including a histidine residue at position 3 of a zinc finger. A further substitution rule is that asparagine can be incorporated to recognize A in the middle of a triplet, aspartic acid, glutamic acid, serine or threonine can be incorporated to recognize C in the middle of a triplet, and amino acids with small side chains such as alanine can be incorporated to recognize T in the middle of a triplet. A further substitution rule is that the 3' base of a triplet subsite can be recognized by incorporating the following amino acids at position -1 of the recognition helix: arginine to recognize G, glutamine to recognize A, glutamic acid (or aspartic acid) to recognize C, and threonine to recognize T. Although these substitution rules are useful in designing zinc finger proteins they do not take into account all possible target sites. Furthermore, the assumption underlying the rules, namely that a particular amino acid in a zinc finger is responsible for binding to a particular base in a subsite is only approximate. Context-dependent interactions between proximate amino acids in a finger or binding of multiple amino acids to a single base or vice versa can cause

WO 02/46412

PCT/US01/46861

variation of the binding specificities predicted by the existing substitution rules. Accordingly, in certain embodiments, a ZFP DNA-binding domain of predetermined specificity is obtained according to the methods described in co-owned U.S. Serial No. 09/716,637, filed November 20, 2000, titled "Iterative Optimization in the Design of Binding Proteins."

- 5 [186] Any suitable method known in the art can be used to design and construct nucleic acids encoding ZFPs, e.g., phage display, random mutagenesis, combinatorial libraries, computer/rational design, affinity selection, PCR, cloning from cDNA or genomic libraries, synthetic construction and the like. (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,786,538; Wu et al., PNAS 92:344-348 (1995); Jamieson et al., Biochemistry 33:5689-5695 (1994); Rebar & Pabo, 10 Science 263:671-673 (1994); Choo & Klug, PNAS 91:11163-11167 (1994); Choo & Klug, PNAS 91: 11168-11172 (1994); Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993); Desjarlais & Berg, PNAS 89:7345-7349 (1992); Pomerantz et al., Science 267:93-96 (1995); Pomerantz et al., PNAS 92:9752-9756 (1995); and Liu et al., PNAS 94:5525-5530 (1997); Griesman & Pabo, Science 275:657-661 (1997); Desjarlais & Berg, PNAS 91:11-99-11103 (1994)).
- 15 [187] In certain preferred embodiments, the binding specificity of a DNA-binding domain (e.g., a ZFP DNA-binding domain) is determined by identifying accessible regions in the sequence in question (e.g., in cellular chromatin). Accessible regions can be determined as described in co-owned U.S. Patent Application Serial No. 60/228,556 entitled "Databases of Accessible Region Sequences; Methods of Preparation and Use Thereof," filed August 28, 20 2000, the disclosure of which is hereby incorporated by reference herein. See also Example 1. A DNA-binding domain is then designed and/or selected as described herein to bind to a target site within the accessible region

VI. Production of Zinc Finger Proteins

A. Synthesis and Cloning

- 25 [188] ZFP polypeptides and nucleic acids encoding the same can be made using routine techniques in the field of recombinant genetics. Basic texts disclosing general methods include Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed. 1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); and Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994)). In addition, nucleic acids less than about 30 100 bases can be custom ordered from any of a variety of commercial sources, such as The Midland Certified Reagent Company (mcrc@oligos.com), The Great American Gene Company (<http://www.genco.com>), ExpressGen Inc. (www.expressgen.com), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA). Similarly, peptides can be custom ordered from any of a

WO 02/46412

PCT/US01/46861

variety of sources, such as PeptidoGenic (pkim@ccnet.com), HTI Bio-products, inc. (<http://www.htibio.com>), BMA Biomedicals Ltd (U.K.), Bio.Synthesis, Inc.

[189] Oligonucleotides can be chemically synthesized according to the solid phase phosphoramidite triester method first described by Beaucage & Caruthers, Tetrahedron Letts.

5 22:1859-1862 (1981), using an automated synthesizer, as described in Van Devanter et al., Nucleic Acids Res. 12:6159-6168 (1984). Purification of oligonucleotides is by either denaturing polyacrylamide gel electrophoresis or by reverse phase HPLC. The sequence of the cloned genes and synthetic oligonucleotides can be verified after cloning using, e.g., the chain termination method for sequencing double-stranded templates of Wallace et al., Gene
10 16:21-26 (1981).

[190] Two alternative methods are typically used to create the coding sequences required to express newly designed DNA-binding peptides. One protocol is a PCR-based assembly procedure that utilizes six overlapping oligonucleotides. Three oligonucleotides correspond to "universal" sequences that encode portions of the DNA-binding domain between the

15 recognition helices. These oligonucleotides typically remain constant for all zinc finger constructs. The other three "specific" oligonucleotides are designed to encode the recognition helices. These oligonucleotides contain substitutions primarily at positions -1, 2, 3 and 6 on the recognition helices making them specific for each of the different DNA-binding domains.

[191] The PCR synthesis is carried out in two steps. First, a double stranded DNA template
20 is created by combining the six oligonucleotides (three universal, three specific) in a four cycle PCR reaction with a low temperature annealing step, thereby annealing the oligonucleotides to form a DNA "scaffold." The gaps in the scaffold are filled in by high-fidelity thermostable polymerase, the combination of Taq and Pfu polymerases also suffices. In the second phase of construction, the zinc finger template is amplified by external primers
25 designed to incorporate restriction sites at either end for cloning into a shuttle vector or directly into an expression vector.

[192] An alternative method of cloning the newly designed DNA-binding proteins relies on annealing complementary oligonucleotides encoding the specific regions of the desired ZFP. This particular application requires that the oligonucleotides be phosphorylated prior to the
30 final ligation step. This is usually performed before setting up the annealing reactions. In brief, the "universal" oligonucleotides encoding the constant regions of the proteins (oligos 1, 2 and 3 of above) are annealed with their complementary oligonucleotides. Additionally, the "specific" oligonucleotides encoding the finger recognition helices are annealed with their respective complementary oligonucleotides. These complementary oligos are designed to fill

WO 02/46412

PCT/US01/46861

in the region which was previously filled in by polymerase in the above-mentioned protocol. Oligonucleotides complementary to oligos 1 and 6 are engineered to leave overhanging sequences specific for the restriction sites used in cloning into the vector of choice in the following step. The second assembly protocol differs from the initial protocol in the following aspects: the "scaffold" encoding the newly designed ZFP is composed entirely of synthetic DNA thereby eliminating the polymerase fill-in step, additionally the fragment to be cloned into the vector does not require amplification. Lastly, the design of leaving sequence-specific overhangs eliminates the need for restriction enzyme digests of the inserting fragment. Alternatively, changes to ZFP recognition helices can be created using conventional site-directed mutagenesis methods.

[193] Both assembly methods require that the resulting fragment encoding the newly designed ZFP be ligated into a vector. Ultimately, the ZFP-encoding sequence is cloned into an expression vector. Expression vectors that are commonly utilized include, but are not limited to, a modified pMAL-c2 bacterial expression vector (New England BioLabs, Beverly, MA) or an eukaryotic expression vector, pcDNA (Promega, Madison, WI). The final constructs are verified by sequence analysis.

[194] Any suitable method of protein purification known to those of skill in the art can be used to purify ZFPs (see, Ausubel, supra, Sambrook, supra). In addition, any suitable host can be used for expression, e.g., bacterial cells, insect cells, yeast cells, mammalian cells, and the like.

[195] Expression of a zinc finger protein fused to a maltose binding protein (MBP-ZFP) in bacterial strain JM109 allows for straightforward purification through an amylose column (New England BioLabs, Beverly, MA). High expression levels of the zinc finger chimeric protein can be obtained by induction with IPTG since the MBP-ZFP fusion in the pMal-c2 expression plasmid is under the control of the tac promoter (New England BioLabs, Beverly, MA). Bacteria containing the MBP-ZFP fusion plasmids are inoculated into 2xYT medium containing 10 μ M ZnCl₂, 0.02% glucose, plus 50 μ g/ml ampicillin and shaken at 37 °C. At mid-exponential growth IPTG is added to 0.3 mM and the cultures are allowed to shake. After 3 hours the bacteria are harvested by centrifugation, disrupted by sonication or by passage through a french pressure cell or through the use of lysozyme, and insoluble material is removed by centrifugation. The MBP-ZFP proteins are captured on an amylose-bound resin, washed extensively with buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM DTT and 50 μ M ZnCl₂, then eluted with maltose in essentially the same buffer

WO 02/46412

PCT/US01/46861

(purification is based on a standard protocol from New England BioLabs. Purified proteins are quantitated and stored for biochemical analysis.

[196] The dissociation constant of a purified protein, e.g., K_d , is typically characterized via electrophoretic mobility shift assays (EMSA) (Buratowski & Chodosh, in Current Protocols in Molecular Biology pp. 12.2.1-12.2.7 (Ausubel ed., 1996)). Affinity is measured by titrating purified protein against a fixed amount of labeled double-stranded oligonucleotide target. The target typically comprises the natural binding site sequence flanked by the 3 bp found in the natural sequence and additional, constant flanking sequences. The natural binding site is typically 9 bp for a three-finger protein and 2 x 9 bp + intervening bases for a six finger ZFP. The annealed oligonucleotide targets possess a 1 base 5' overhang which allows for efficient labeling of the target with T4 phage polynucleotide kinase. For the assay the target is added at a concentration of 1 nM or lower (the actual concentration is kept at least 10-fold lower than the expected dissociation constant), purified ZFPs are added at various concentrations, and the reaction is allowed to equilibrate for at least 45 min. In addition the reaction mixture also contains 10 mM Tris (pH 7.5), 100 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $ZnCl_2$, 5 mM DTT, 10% glycerol, 0.02% BSA.

[197] The equilibrated reactions are loaded onto a 10% polyacrylamide gel, which has been pre-run for 45 min in Tris/glycine buffer, then bound and unbound labeled target is resolved by electrophoresis at 150V. Alternatively, 10-20% gradient Tris-HCl gels, containing a 4% polyacrylamide stacking gel, can be used. The dried gels are visualized by autoradiography or phosphorimaging and the apparent K_d is determined by calculating the protein concentration that yields half-maximal binding.

[198] The assays can also include a determination of the active fraction in the protein preparations. Active fraction is determined by stoichiometric gel shifts in which protein is titrated against a high concentration of target DNA. Titrations are done at 100, 50, and 25% of target (usually at micromolar levels).

B. Phage Display

[199] The technique of phage display provides a largely empirical means of generating zinc finger proteins with a desired target specificity (see e.g., Rebar, US 5,789,538; Choo et al., WO 96/06166; Barbas et al., WO 95/19431 and WO 98/543111; Jamieson et al., supra). The method can be used in conjunction with, or as an alternative to rational design. The method involves the generation of diverse libraries of mutagenized zinc finger proteins, followed by the isolation of proteins with desired DNA-binding properties using affinity selection methods. To use this method, the experimenter typically proceeds as follows. First, a gene for

WO 02/46412

PCT/US01/46861

a zinc finger protein is mutagenized to introduce diversity into regions important for binding specificity and/or affinity. In a typical application, this is accomplished via randomization of a single finger at positions -1, +2, +3, and +6, and sometimes accessory positions such as +1, +5, +8 and +10. Next, the mutagenized gene is cloned into a phage or phagemid vector as a fusion with gene III of a filamentous phage, which encodes the coat protein pIII. The zinc finger gene is inserted between segments of gene III encoding the membrane export signal peptide and the remainder of pIII, so that the zinc finger protein is expressed as an amino-terminal fusion with pIII or in the mature, processed protein. When using phagemid vectors, the mutagenized zinc finger gene may also be fused to a truncated version of gene III encoding, minimally, the C-terminal region required for assembly of pIII into the phage particle. The resultant vector library is transformed into *E. coli* and used to produce filamentous phage which express variant zinc finger proteins on their surface as fusions with the coat protein pIII. If a phagemid vector is used, then this step requires superinfection with helper phage. The phage library is then incubated with a target DNA site, and affinity selection methods are used to isolate phage which bind target with high affinity from bulk phage. Typically, the DNA target is immobilized on a solid support, which is then washed under conditions sufficient to remove all but the tightest binding phage. After washing, any phage remaining on the support are recovered via elution under conditions which disrupt zinc finger - DNA binding. Recovered phage are used to infect fresh *E. coli*, which is then amplified and used to produce a new batch of phage particles. Selection and amplification are then repeated as many times as is necessary to enrich the phage pool for tight binders such that these may be identified using sequencing and/or screening methods. Although the method is illustrated for pIII fusions, analogous principles can be used to screen ZFP variants as pVIII fusions.

[200] In certain embodiments, the sequence bound by a particular zinc finger protein is determined by conducting binding reactions (see, e.g., conditions for determination of K_d , supra) between the protein and a pool of randomized double-stranded oligonucleotide sequences. The binding reaction is analyzed by an electrophoretic mobility shift assay (EMSA), in which protein-DNA complexes undergo retarded migration in a gel and can be separated from unbound nucleic acid. Oligonucleotides which have bound the finger are purified from the gel and amplified, for example, by a polymerase chain reaction. The selection (i.e. binding reaction and EMSA analysis) is then repeated as many times as desired, with the selected oligonucleotide sequences. In this way, the binding specificity of a zinc finger protein having a particular amino acid sequence is determined.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

C. Regulatory Domains

- [201] Zinc finger proteins are often expressed with an exogenous domain (or functional fragment thereof) as fusion proteins. Common domains for addition to the ZFP include, e.g., transcription factor domains (activators, repressors, co-activators, co-repressors), silencers, oncogenes (e.g., myc, jun, fos, myb, max, mad, rel, ets, bcl, myb, mos family members etc.); DNA repair enzymes and their associated factors and modifiers; DNA rearrangement enzymes and their associated factors and modifiers; chromatin associated proteins and their modifiers (e.g. kinases, acetylases and deacetylases); and DNA modifying enzymes (e.g., methyltransferases, topoisomerases, helicases, ligases, kinases, phosphatases, polymerases, endonucleases) and their associated factors and modifiers. A preferred domain for fusing with a ZFP when the ZFP is to be used for repressing expression of a target gene is a KRAB repression domain from the human KOX-1 protein (Thiesen et al., *New Biologist* 2, 363-374 (1990); Margolin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4509-4513 (1994); Pengue et al., *Nucl. Acids Res.* 22:2908-2914 (1994); Witzgall et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4514-4518 (1994). Preferred domains for achieving activation include the HSV VP16 activation domain (see, e.g., Hagmann et al., *J. Virol.* 71, 5952-5962 (1997)) nuclear hormone receptors (see, e.g., Torchia et al., *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:373-383 (1998)); the p65 subunit of nuclear factor kappa B (Bitko & Barik, *J. Virol.* 72:5610-5618 (1998) and Doyle & Hunt, *Neuroreport* 8:2937-2942 (1997)); Liu et al., *Cancer Gene Ther.* 5:3-28 (1998)), or artificial chimeric functional domains such as VP64 (Seifpal et al., *EMBO J.* 11, 4961-4968 (1992)).
- [202] The identification of novel sequences and accessible regions (e.g., DNase I hypersensitive sites) in VEGF genes allows for the design of fusion molecules which facilitate modulation of angiogenesis. Thus, in certain embodiments, the compositions and methods disclosed herein involve fusions between a DNA-binding domain specifically targeted to one or more regulatory regions of a VEGF gene and a functional (e.g., repression or activation) domain (or a polynucleotide encoding such a fusion). In this way, the repression or activation domain is brought into proximity with a sequence in the VEGF gene that is bound by the DNA-binding domain. The transcriptional regulatory function of the functional domain is then able to act on VEGF regulatory sequences.
- [203] In additional embodiments, targeted remodeling of chromatin, as disclosed in co-owned U.S. patent application entitled "Targeted Modification of Chromatin Structure," can be used to generate one or more sites in cellular chromatin that are accessible to the binding of a DNA binding molecule.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[204] Fusion molecules are constructed by methods of cloning and biochemical conjugation that are well-known to those of skill in the art. Fusion molecules comprise a DNA-binding domain and a functional domain (e.g., a transcriptional activation or repression domain).

5 Fusion molecules also optionally comprise nuclear localization signals (such as, for example, that from the SV40 medium T-antigen) and epitope tags (such as, for example, FLAG and hemagglutinin). Fusion proteins (and nucleic acids encoding them) are designed such that the translational reading frame is preserved among the components of the fusion.

[205] Fusions between a polypeptide component of a functional domain (or a functional fragment thereof) on the one hand, and a non-protein DNA-binding domain (e.g., antibiotic, 10 intercalator, minor groove binder, nucleic acid) on the other, are constructed by methods of biochemical conjugation known to those of skill in the art. See, for example, the Pierce Chemical Company (Rockford, IL) Catalogue. Methods and compositions for making fusions between a minor groove binder and a polypeptide have been described. Mapp et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3930-3935.

15 [206] The fusion molecules disclosed herein comprise a DNA-binding domain which binds to a target site in a VEGF gene. In certain embodiments, the target site is present in an accessible region of cellular chromatin. Accessible regions can be determined as described, for example, in co-owned U.S. Patent Application Serial No. 60/228,556. If the target site is not present in an accessible region of cellular chromatin, one or more accessible regions can 20 be generated as described in co-owned U.S. patent application entitled "Targeted Modification of Chromatin Structure." In additional embodiments, the DNA-binding domain of a fusion molecule is capable of binding to cellular chromatin regardless of whether its target site is in an accessible region or not. For example, such DNA-binding domains are capable of binding to linker DNA and/or nucleosomal DNA. Examples of this type of 25 "pioneer" DNA binding domain are found in certain steroid receptor and in hepatocyte nuclear factor 3 (HNF3). Cordingley et al. (1987) Cell 48:261-270; Pina et al. (1990) Cell 60:719-731; and Cirillo et al. (1998) EMBO J. 17:244-254.

[207] For such applications, the fusion molecule is typically formulated with a pharmaceutically acceptable carrier, as is known to those of skill in the art. See, for example, 30 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1985; and co-owned WO 00/42219.

[208] The functional component/domain of a fusion molecule can be selected from any of a variety of different components capable of influencing transcription of a gene once the fusion molecule binds to a target sequence via its DNA binding domain. Hence, the functional

WO 02/46412

PCT/US01/46861

component can include, but is not limited to, various transcription factor domains, such as activators, repressors, co-activators, co-repressors, and silencers.

- [209] An exemplary functional domain for fusing with a DNA-binding domain such as, for example, a ZFP, to be used for repressing expression of a gene is a KRAB repression domain from the human KOX-1 protein (see, e.g., Thiesen et al., *New Biologist* 2, 363-374 (1990); Margolin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4509-4513 (1994); Pengue et al., *Nucl. Acids Res.* 22:2908-2914 (1994); Witzgall et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4514-4518 (1994). Another suitable repression domain is methyl binding domain protein 2B (MBD-2B) (see, also Hendrich et al. (1999) *Mamm Genome* 10:906-912 for description of MBD proteins).
- 10 Another useful repression domain is that associated with the v-ErbA protein. See, for example, Damm, et al. (1989) *Nature* 339:593-597; Evans (1989) *Int. J. Cancer Suppl.* 4:26-28; Pain et al. (1990) *New Biol.* 2:284-294; Sap et al. (1989) *Nature* 340:242-244; Zenke et al. (1988) *Cell* 52:107-119; and Zenke et al. (1990) *Cell* 61:1035-1049.
- [210] Suitable domains for achieving activation include the HSV VP16 activation domain (see, e.g., Hagmann et al., *J. Virol.* 71, 5952-5962 (1997)) nuclear hormone receptors (see, e.g., Torchia et al., *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:373-383 (1998)); the p65 subunit of nuclear factor kappa B (Bitko & Barik, *J. Virol.* 72:5610-5618 (1998) and Doyle & Hunt, *Neuroreport* 8:2937-2942 (1997)); Liu et al., *Cancer Gene Ther.* 5:3-28 (1998)), or artificial chimeric functional domains such as VP64 (Scifpal et al., *EMBO J.* 11, 4961-4968 (1992)).
- 20 [211] Additional exemplary activation domains include, but are not limited to, VP16, VP64, p300, CBP, PCAF, SRC1, PvalF, AthD2A and ERF-2. See, for example, Robyr et al. (2000) *Mol. Endocrinol.* 14:329-347; Collingwood et al. (1999) *J. Mol. Endocrinol.* 23:255-275; Leo et al. (2000) *Gene* 245:1-11; Manteuffel-Cymborowska (1999) *Acta Biochim. Pol.* 46:77-89; McKenna et al. (1999) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69:3-12; Malik et al. (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25:277-283; and Lemon et al. (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:499-504.
- 25 Additional exemplary activation domains include, but are not limited to, OsGAI, HALF-1, C1, AP1, ARF-5, -6, -7, and -8, CPRF1, CPRF4, MYC-RP/GP, and TRAB1. See, for example, Ogawa et al. (2000) *Gene* 245:21-29; Okanami et al. (1996) *Genes Cells* 1:87-99; Goff et al. (1991) *Genes Dev.* 5:298-309; Cho et al. (1999) *Plant Mol. Biol.* 40:419-429; Ulimason et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5844-5849; Sprenger-Haussels et al. (2000) *Plant J.* 22:1-8; Gong et al. (1999) *Plant Mol. Biol.* 41:33-44; and Hobo et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:15,348-15,353.
- 30 [212] Additional exemplary repression domains include, but are not limited to, KRAB, SID, MBD2, MBD3, members of the DNMT family (e.g., DNMT1, DNMT3A, DNMT3B), Rb,

WO 02/46412

PCT/US01/46861

and McCP2. See, for example, Bird et al. (1999) Cell 99:451-454; Tyler et al. (1999) Cell 99:443-446; Knoepfler et al. (1999) Cell 99:447-450; and Robertson et al. (2000) Nature Genet. 25:338-342. Additional exemplary repression domains include, but are not limited to, ROM2 and AtHD2A. See, for example, Chern et al. (1996) Plant Cell 8:305-321; and Wu et al. (2000) Plant J. 22:19-27.

[213] Additional functional domains are disclosed, for example, in co-owned WO 00/41566.

D. Expression Vectors

[214] The nucleic acid encoding the ZFP of choice is typically cloned into intermediate vectors for transformation into prokaryotic or eukaryotic cells for replication and/or expression, e.g., for determination of K_d. Intermediate vectors are typically prokaryote vectors, e.g., plasmids, or shuttle vectors, or insect vectors, for storage or manipulation of the nucleic acid encoding ZFP or production of protein. The nucleic acid encoding a ZFP is also typically cloned into an expression vector, for administration to a plant cell, animal cell,

preferably a mammalian cell or a human cell, fungal cell, bacterial cell, or protozoal cell.

[215] To obtain expression of a cloned gene or nucleic acid, a ZFP is typically subcloned into an expression vector that contains a promoter to direct transcription. Suitable bacterial and eukaryotic promoters are well known in the art and described, e.g., in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed. 1989); Kriegl, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); and Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994). Bacterial expression systems for expressing the ZFP are available in, e.g., *E. coli*, *Bacillus* sp., and *Salmonella* (Palva et al., Gene 22:229-235 (1983)). Kits for such expression systems are commercially available. Eukaryotic expression systems for mammalian cells, yeast, and insect cells are well known in the art and are also commercially available.

[216] The promoter used to direct expression of a ZFP nucleic acid depends on the particular application. For example, a strong constitutive promoter is typically used for expression and purification of ZFP. In contrast, when a ZFP is administered in vivo for gene regulation, either a constitutive or an inducible promoter is used, depending on the particular use of the ZFP. In addition, a preferred promoter for administration of a ZFP can be a weak promoter, such as HSV TK or a promoter having similar activity. The promoter typically can also include elements that are responsive to transactivation, e.g., hypoxia response elements, Gal4 response elements, lac repressor response element, and small molecule control systems such as tet-regulated systems and the RU-486 system (see, e.g., Gossen & Bujard, PNAS

WO 02/46412

PCT/US01/46861

89:5547 (1992); Oligino et al., Gene Ther. 5:491-496 (1998); Wang et al., Gene Ther. 4:432-441 (1997); Neering et al., Blood 88:1147-1155 (1996); and Rendahl et al., Nat. Biotechnol. 16:757-761 (1998)).

- [217] In addition to the promoter, the expression vector typically contains a transcription unit or expression cassette that contains all the additional elements required for the expression of the nucleic acid in host cells, either prokaryotic or eukaryotic. A typical expression cassette thus contains a promoter operably linked, e.g., to the nucleic acid sequence encoding the ZFP, and signals required, e.g., for efficient polyadenylation of the transcript, transcriptional termination, ribosome binding sites, or translation termination.
- 10 Additional elements of the cassette may include, e.g., enhancers, and exogenous spliced intronic signals.
- [218] The particular expression vector used to transport the genetic information into the cell is selected with regard to the intended use of the ZFP. Standard bacterial expression vectors include plasmids such as pBR322 based plasmids, pSKF, pET23D, and commercially available fusion expression systems such as GST and LacZ. A preferred fusion protein is the maltose binding protein, "MBP." Such fusion proteins are used for purification of the ZFP. Epitope tags can also be added to recombinant proteins to provide convenient methods of isolation, for monitoring expression, and for monitoring cellular and subcellular localization, e.g., c-myc or FLAG.
- 20 [219] Expression vectors containing regulatory elements from eukaryotic viruses are often used in eukaryotic expression vectors, e.g., SV40 vectors, papilloma virus vectors, and vectors derived from Epstein-Barr virus. Other exemplary eukaryotic vectors include pMSG, pAV009/A+, pMTO10/A+, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE, and any other vector allowing expression of proteins under the direction of the SV40 early promoter, SV40 late promoter, metallothionein promoter, murine mammary tumor virus promoter, Rous sarcoma virus promoter, polyhedrin promoter, or other promoters shown effective for expression in eukaryotic cells.
- 25 [220] Some expression systems have markers for selection of stably transfected cell lines such as thymidine kinase, hygromycin B phosphotransferase, and dihydrofolate reductase.
- 30 High yield expression systems are also suitable, such as using a baculovirus vector in insect cells, with a ZFP encoding sequence under the direction of the polyhedrin promoter or other strong baculovirus promoters.
- [221] The elements that are typically included in expression vectors also include a replicon that functions in *E. coli*, a gene encoding antibiotic resistance to permit selection of bacteria

WO 02/46412

PCT/US01/46861

that harbor recombinant plasmids, and unique restriction sites in nonessential regions of the plasmid to allow insertion of recombinant sequences.

[222] Standard transfection methods are used to produce bacterial, mammalian, yeast or insect cell lines that express large quantities of protein, which are then purified using standard techniques (see, e.g., Colley et al., J. Biol. Chem. 264:17619-17622 (1989); Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990)). Transformation of eukaryotic and prokaryotic cells are performed according to standard techniques (see, e.g., Morrison, J. Bact. 132:349-351 (1977); Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology 101:347-362 (Wu et al., eds, 1983).

[223] Any of the well known procedures for introducing foreign nucleotide sequences into host cells may be used. These include the use of calcium phosphate transfection, polybrene, protoplast fusion, electroporation, liposomes, microinjection, naked DNA, plasmid vectors, viral vectors, both episomal and integrative, and any of the other well known methods for introducing cloned genomic DNA, cDNA, synthetic DNA or other foreign genetic material into a host cell (see, e.g., Sambrook et al., supra). It is only necessary that the particular genetic engineering procedure used be capable of successfully introducing at least one gene into the host cell capable of expressing the protein of choice.

VII. Assays

[224] Once a ZFP has been designed and prepared according to the procedures just set forth, an initial assessment of the activity of the designed ZFP is undertaken. ZFP proteins showing the ability to modulate the expression of a gene of interest can then be further assayed for more specific activities depending upon the particular application for which the ZFPs have been designed. Thus, for example, the ZFPs provided herein can be initially assayed for their ability to modulate VEGF expression. More specific assays of the ability of the ZFP to modulate angiogenesis and/or to treat ischemia are then typically undertaken. A description of these more specific assays are set forth infra in section IX.

[225] The activity of a particular ZFP can be assessed using a variety of in vitro and in vivo assays, by measuring, e.g., protein or mRNA levels, product levels, enzyme activity, tumor growth; transcriptional activation or repression of a reporter gene; second messenger levels (e.g., cGMP, cAMP, IP3, DAG, Ca²⁺); cytokine and hormone production levels; and neovascularization, using, e.g., immunoassays (e.g., ELISA and immunohistochemical assays with antibodies), hybridization assays (e.g., RNase protection, Northern, in situ hybridization, oligonucleotide array studies), colorimetric assays, amplification assays, enzyme activity assays, tumor growth assays, phenotypic assays, and the like.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[226] ZFPs are typically first tested for activity in vitro using cultured cells, e.g., 293 cells, CHO cells, VERO cells, BHK cells, HeLa cells, COS cells, and the like. Preferably, human cells are used. The ZFP is often first tested using a transient expression system with a reporter gene, and then regulation of the target endogenous gene is tested in cells and in animals, both

5 in vivo and ex vivo. The ZFP can be recombinantly expressed in a cell, recombinantly expressed in cells transplanted into an animal, or recombinantly expressed in a transgenic animal, as well as administered as a protein to an animal or cell using delivery vehicles described below. The cells can be immobilized, be in solution, be injected into an animal, or be naturally occurring in a transgenic or non-transgenic animal.

10 [227] Modulation of gene expression is tested using one of the in vitro or in vivo assays described herein. Samples or assays are treated with a ZFP and compared to untreated control samples, to examine the extent of modulation. As described above, for regulation of endogenous gene expression, the ZFP typically has a K_d of 200 nM or less, more preferably 100 nM or less, more preferably 50 nM, most preferably 25 nM or less.

15 [228] The effects of the ZFPs can be measured by examining any of the parameters described above. Any suitable gene expression, phenotypic, or physiological change can be used to assess the influence of a ZFP. When the functional consequences are determined using intact cells or animals, one can also measure a variety of effects such as tumor growth, wound healing, neovascularization, hormone release, transcriptional changes to both known and uncharacterized genetic markers (e.g., Northern blots or oligonucleotide array studies), changes in cell metabolism such as cell growth or pH changes, and changes in intracellular second messengers such as cGMP.

20 [229] Preferred assays for ZFP regulation of endogenous gene expression can be performed in vitro. In one preferred in vitro assay format, ZFP regulation of endogenous gene expression in cultured cells is measured by examining protein production using an ELISA assay. The test sample is compared to control cells treated with a vector lacking ZFP-encoding sequences or a vector encoding an unrelated ZFP that is targeted to another gene.

25 [230] In another embodiment, ZFP regulation of endogenous gene expression is determined in vitro by measuring the level of target gene mRNA expression. The level of gene expression is measured using amplification, e.g., using PCR, LCR, or hybridization assays, e.g., Northern hybridization, dot blotting and RNase protection. The use of quantitative RT-PCR techniques (i.e., the so-called TaqMan assays) can also be utilized to quantitate the level of transcript. The level of protein or mRNA is detected using directly or indirectly labeled detection agents, e.g., fluorescently or radioactively labeled nucleic acids, radioactively or

WO 02/46412

PCT/US01/46861

enzymatically labeled antibodies, and the like, as described herein. Such methods are also described in U.S. Pat Nos. 5,210,015 to Gelfand, 5,538,848 to Livak, et al., and 5,863,736 to Haaland, as well as Heid, C.A., et al., Genome Research, 6:986-994 (1996); Gibson, U.E.M., et al., Genome Research 6:995-1001 (1996); Holland, P. M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

5 USA 88:7276-7280, (1991); and Livak, K.J., et al., PCR Methods and Applications 357-362 (1995), each of which is incorporated by reference in its entirety.

[231] Alternatively, a reporter gene system can be devised using a VEGF gene promoter operably linked to a reporter gene such as luciferase, green fluorescent protein, CAT, or β -gal. The reporter construct is typically co-transfected into a cultured cell. After treatment with
10 the ZFP of choice, the amount of reporter gene transcription, translation, or activity is measured according to standard techniques known to those of skill in the art.

[232] Another example of a preferred assay format useful for monitoring ZFP regulation of endogenous gene expression is performed in vivo. This assay is particularly useful for examining genes such as VEGF involved in tumor support via neovascularization. In this
15 assay, cultured tumor cells expressing the ZFP of choice are injected subcutaneously into an immune compromised mouse such as an athymic mouse, an irradiated mouse, or a SCID mouse. After a suitable length of time, preferably 4-8 weeks, tumor growth is measured, e.g., by volume or by its two largest dimensions, and compared to the control. Tumors that have statistically significant reduction (using, e.g., Student's T test) are said to have inhibited
20 growth. Alternatively, the extent of tumor neovascularization can also be measured.

Immunoassays using endothelial cell specific antibodies are used to stain for vascularization of the tumor and the number of vessels in the tumor. Tumors that have a statistically significant reduction in the number of vessels (using, e.g., Student's T test) are said to have inhibited neovascularization.

25 [233] Transgenic and non-transgenic animals are also used for examining regulation of VEGF gene expression in vivo. Transgenic animals typically express the ZFP of choice. Alternatively, animals that transiently express the ZFP of choice, or to which the ZFP has been administered in a delivery vehicle, can be used. Regulation of endogenous gene expression is tested using any one of the assays described herein.

30 VIII. Pharmaceutical Compositions

[234] The ZFPs provided herein, and more typically the nucleic acids encoding them, can optionally be formulated with a pharmaceutically acceptable carrier as a pharmaceutical composition.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

A. Nucleic Acid Based Compositions

- [235] Conventional viral and non-viral based gene transfer methods can be used to introduce nucleic acids encoding the present ZFPs in mammalian cells or target tissues. Such methods can be used to administer nucleic acids encoding ZFPs to cells in vitro. In some instances, the nucleic acids encoding ZFPs are administered for in vivo or ex vivo gene therapy uses. Non-viral vector delivery systems include DNA plasmids, naked nucleic acid, and nucleic acid complexed with a delivery vehicle such as a liposome. Viral vector delivery systems include DNA and RNA viruses, which have either episomal or integrated genomes after delivery to the cell. For a review of gene therapy procedures, see Anderson, *Science* 256:808-813 (1992); Nabel & Felgner, *TIBTECH* 11:211-217 (1993); Mitani & Caskey, *TIBTECH* 11:162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11:167-175 (1993); Miller, *Nature* 357:455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6(10):1149-1154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51(1):31-44 (1995); Haddada et al., in *Current Topics in Microbiology and Immunology* 15 Doerfler and Böhm (eds) (1995); and Yu et al., *Gene Therapy* 1:13-26 (1994).
- [236] Methods of non-viral delivery of nucleic acids encoding the ZFPs provided herein include lipofection, microinjection, biolistics, virosomes, liposomes, immunoliposomes, polycation or lipid:nucleic acid conjugates, naked DNA, artificial virions, and agent-enhanced uptake of DNA. Lipofection is described in e.g., US 5,049,386, US 4,946,787; and US 4,897,355 and lipofection reagents are sold commercially (e.g., Transfectam™ and Lipofectin™). Cationic and neutral lipids that are suitable for efficient receptor-recognition lipofection of polynucleotides include those of Felgner, WO 91/17424, WO 91/16024. Delivery can be to cells (ex vivo administration) or target tissues (in vivo administration).
- [237] The preparation of lipid:nucleic acid complexes, including targeted liposomes such as immunolipid complexes, is well known to one of skill in the art (see, e.g., Crystal, *Science* 270:404-410 (1995); Blaese et al., *Cancer Gene Ther.* 2:291-297 (1995); Behr et al., *Bioconjugate Chem.* 5:382-389 (1994); Remy et al., *Bioconjugate Chem.* 5:647-654 (1994); Gao et al., *Gene Therapy* 2:710-722 (1995); Ahmad et al., *Cancer Res.* 52:4817-4820 (1992); U.S. Pat. Nos. 4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085, 4,837,028, and 4,946,787).
- [238] The use of RNA or DNA viral based systems for the delivery of nucleic acids encoding engineered ZFP take advantage of highly evolved processes for targeting a virus to specific cells in the body and trafficking the viral payload to the nucleus. Viral vectors can be

WO 02/46412

PCT/US01/46861

administered directly to patients (in vivo) or they can be used to treat cells in vitro and the modified cells are administered to patients (ex vivo). Conventional viral based systems for the delivery of ZFPs can include retroviral, lentivirus, adenoviral, adeno-associated and herpes simplex virus vectors for gene transfer. Viral vectors are currently the most efficient and versatile method of gene transfer in target cells and tissues. Integration in the host genome is possible with the retrovirus, lentivirus, and adeno-associated virus gene transfer methods, often resulting in long term expression of the inserted transgene. Additionally, high transduction efficiencies have been observed in many different cell types and target tissues.

[239] The tropism of a retrovirus can be altered by incorporating foreign envelope proteins, expanding the potential target population of target cells. Lentiviral vectors are retroviral vector that are able to transduce or infect non-dividing cells and typically produce high viral titers. Selection of a retroviral gene transfer system can therefore depend on the target tissue. Retroviral vectors are comprised of cis-acting long terminal repeats with packaging capacity for up to 6-10 kb of foreign sequence. The minimum cis-acting LTRs are sufficient for replication and packaging of the vectors, which are then used to integrate the therapeutic gene into the target cell to provide permanent transgene expression. Widely used retroviral vectors include those based upon murine leukemia virus (MuLV), gibbon ape leukemia virus (GaLV), Simian Immuno deficiency virus (SIV), human immuno deficiency virus (HIV), and combinations thereof (see, e.g., Buchscher et al., *J. Virol.* 66:2731-2739 (1992); Johann et al., *J. Virol.* 66:1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., *Virol.* 176:58-59 (1990); Wilson et al., *J. Virol.* 63:2374-2378 (1989); Miller et al., *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700).

[240] In applications where transient expression of the ZFP is preferred, adenoviral based systems are typically used. Adenoviral based vectors are capable of very high transduction efficiency in many cell types and do not require cell division. With such vectors, high titer and levels of expression have been obtained. This vector can be produced in large quantities in a relatively simple system. Adeno-associated virus ("AAV") vectors are also used to transduce cells with target nucleic acids, e.g., in the in vitro production of nucleic acids and peptides, and for in vivo and ex vivo gene therapy procedures (see, e.g., West et al., *Virology* 160:38-47 (1987); U.S. Patent No. 4,797,368; WO 93/24641; Kotin, *Human Gene Therapy* 5:793-801 (1994); Muzyczka, *J. Clin. Invest.* 94:1351 (1994). Construction of recombinant AAV vectors are described in a number of publications, including U.S. Pat. No. 5,173,414; Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, *PNAS* 81:6466-6470 (1984); and Samulski et al., *J. Virol.* 63:03822-3828 (1989).

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[241] In particular, at least six viral vector approaches are currently available for gene transfer in clinical trials, with retroviral vectors by far the most frequently used system. All of these viral vectors utilize approaches that involve complementation of defective vectors by genes inserted into helper cell lines to generate the transducing agent.

- 5 [242] pLASN and MFG-S are examples are retroviral vectors that have been used in clinical trials (Dunbar et al., Blood 85:3048-305 (1995); Kohn et al., Nat. Med. 1:1017-102 (1995); Malech et al., PNAS 94:22 12133-12138 (1997)). PA317/pLASN was the first therapeutic vector used in a gene therapy trial. (Blaese et al., Science 270:475-480 (1995)). Transduction efficiencies of 50% or greater have been observed for MFG-S packaged vectors. (Ellem et al., Immunol Immunother. 44(1):10-20 (1997); Dranoff et al., Hum. Gene Ther. 1:111-2 (1997).

- 10 [243] Recombinant adeno-associated virus vectors (rAAV) is another alternative gene delivery systems based on the defective and nonpathogenic parvovirus adeno-associated type 2 virus. All vectors are derived from a plasmid that retains only the AAV 145 bp inverted terminal repeats flanking the transgene expression cassette. Efficient gene transfer and stable transgene delivery due to integration into the genomes of the transduced cell are key features
15 for this vector system. (Wagner et al., Lancet 351:9117 1702-3 (1998); Kearns et al., Gene Ther. 9:748-55 (1996)).

- [244] Replication-deficient recombinant adenoviral vectors (Ad) are predominantly used for colon cancer gene therapy, because they can be produced at high titer and they readily infect
20 a number of different cell types. Most adenovirus vectors are engineered such that a transgene replaces the Ad E1a, E1b, and E3 genes; subsequently the replication defector vector is propagated in human 293 cells that supply deleted gene function in trans. Ad vectors can transduce multiply types of tissues in vivo, including nondividing, differentiated cells such as those found in the liver, kidney and muscle system tissues. Conventional Ad vectors
25 have a large carrying capacity. An example of the use of an Ad vector in a clinical trial involved polynucleotide therapy for antitumor immunization with intramuscular injection (Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-9 (1998)). Additional examples of the use of adenovirus vectors for gene transfer in clinical trials include Rosenecker et al., Infection 24:1 5-10 (1996); Sterman et al., Hum. Gene Ther. 9:7 1083-1089 (1998); Welsh et al., Hum. Gene Ther. 2:205-18 (1995); Alvarez et al., Hum. Gene Ther. 5:597-613 (1997); Topf et al., Gene Ther. 5:507-513 (1998); Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-1089 (1998).

[245] Packaging cells are used to form virus particles that are capable of infecting a host cell. Such cells include 293 cells, which package adenovirus, and ψ 2 cells or PA317 cells, which package retrovirus. Viral vectors used in gene therapy are usually generated by

WO 02/46412

PCT/US01/46861

producer cell line that packages a nucleic acid vector into a viral particle. The vectors typically contain the minimal viral sequences required for packaging and subsequent integration into a host, other viral sequences being replaced by an expression cassette for the protein to be expressed. The missing viral functions are supplied in trans by the packaging cell line. For example, AAV vectors used in gene therapy typically only possess ITR sequences from the AAV genome which are required for packaging and integration into the host genome. Viral DNA is packaged in a cell line, which contains a helper plasmid encoding the other AAV genes, namely rep and cap, but lacking ITR sequences. The cell line is also infected with adenovirus as a helper. The helper virus promotes replication of the AAV vector and expression of AAV genes from the helper plasmid. The helper plasmid is not packaged in significant amounts due to a lack of ITR sequences. Contamination with adenovirus can be reduced by, e.g., heat treatment to which adenovirus is more sensitive than AAV.

[246] In many gene therapy applications, it is desirable that the gene therapy vector be delivered with a high degree of specificity to a particular tissue type. A viral vector is typically modified to have specificity for a given cell type by expressing a ligand as a fusion protein with a viral coat protein on the viruses outer surface. The ligand is chosen to have affinity for a receptor known to be present on the cell type of interest. For example, Han et al., PNAS 92:9747-9751 (1995), reported that Moloney murine leukemia virus can be modified to express human heregulin fused to gp70, and the recombinant virus infects certain human breast cancer cells expressing human epidermal growth factor receptor. This principle can be extended to other pairs of virus expressing a ligand fusion protein and target cell expressing a receptor. For example, filamentous phage can be engineered to display antibody fragments (e.g., Fab or Fv) having specific binding affinity for virtually any chosen cellular receptor. Although the above description applies primarily to viral vectors, the same principles can be applied to nonviral vectors. Such vectors can be engineered to contain specific uptake sequences thought to favor uptake by specific target cells.

[247] Gene therapy vectors can be delivered in vivo by administration to an individual patient, typically by systemic administration (e.g., intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subdermal, or intracranial infusion) or topical application, as described below. Alternatively, vectors can be delivered to cells ex vivo, such as cells explanted from an individual patient (e.g., lymphocytes, bone marrow aspirates, tissue biopsy) or universal donor hematopoietic stem cells, followed by reimplantation of the cells into a patient, usually after selection for cells which have incorporated the vector.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[248] Ex vivo cell transfection for diagnostics, research, or for gene therapy (e.g., via re-infusion of the transfected cells into the host organism) is well known to those of skill in the art. In some instances, cells are isolated from the subject organism, transfected with a ZFP nucleic acid (gene or cDNA), and re-infused back into the subject organism (e.g., patient).

5 Various cell types suitable for ex vivo transfection are well known to those of skill in the art (see, e.g., Freshney et al., *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique* (3rd ed. 1994)) and the references cited therein for a discussion of how to isolate and culture cells from patients).

[249] In one embodiment, stem cells are used in ex vivo procedures for cell transfection and gene therapy. The advantage to using stem cells is that they can be differentiated into other cell types in vitro, or can be introduced into a mammal (such as the donor of the cells) where they will engraft in the bone marrow. Methods for differentiating CD34+ cells in vitro into clinically important immune cell types using cytokines such as GM-CSF, IFN- γ and TNF- α are known (see Inaba et al., *J. Exp. Med.* 176:1693-1702 (1992)).

15 [250] Stem cells are isolated for transduction and differentiation using known methods. For example, stem cells are isolated from bone marrow cells by panning the bone marrow cells with antibodies which bind unwanted cells, such as CD4+ and CD8+ (T cells), CD45+ (panB cells), GR-1 (granulocytes), and Iad (differentiated antigen presenting cells) (see Inaba et al., *J. Exp. Med.* 176:1693-1702 (1992)).

20 [251] Vectors (e.g., retroviruses, adenoviruses, liposomes, etc.) containing therapeutic ZFP nucleic acids can be also administered directly to the organism for transduction of cells in vivo. Alternatively, naked DNA can be administered. Administration is by any of the routes normally used for introducing a molecule into ultimate contact with blood or tissue cells. Suitable methods of administering such nucleic acids are available and well known to those of skill in the art, and, although more than one route can be used to administer a particular composition, a particular route can often provide a more immediate and more effective reaction than another route.

25 [252] Pharmaceutically acceptable carriers are determined in part by the particular composition being administered, as well as by the particular method used to administer the composition. Accordingly, there is a wide variety of suitable formulations of pharmaceutical compositions, as described below (see, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., 1989).

WO 02/46412

PCT/US01/46861

B. Protein Compositions

[253] An important factor in the administration of polypeptide compounds, such as the present ZFPs, is ensuring that the polypeptide has the ability to traverse the plasma membrane of a cell, or the membrane of an intra-cellular compartment such as the nucleus.

5 Cellular membranes are composed of lipid-protein bilayers that are freely permeable to small, nonionic lipophilic compounds and are inherently impermeable to polar compounds, macromolecules, and therapeutic or diagnostic agents. However, proteins and other compounds such as liposomes have been described, which have the ability to translocate polypeptides such as ZFPs across a cell membrane.

10 [254] For example, "membrane translocation polypeptides" have amphiphilic or hydrophobic amino acid subsequences that have the ability to act as membrane-translocating carriers. In one embodiment, homeodomain proteins have the ability to translocate across cell membranes. The shortest internalizable peptide of a homeodomain protein, Antennapedia,

15 was found to be the third helix of the protein, from amino acid position 43 to 58 (see, e.g., Prochiantz, *Current Opinion in Neurobiology* 6:629-634 (1996)). Another subsequence, the h (hydrophobic) domain of signal peptides, was found to have similar cell membrane translocation characteristics (see, e.g., Lin et al., *J. Biol. Chem.* 270:14255-14258 (1995)).

[255] Examples of peptide sequences which can be linked to a ZFP, for facilitating uptake of ZFP into cells, include, but are not limited to: an 11 amino acid peptide of the tat protein of
20 HIV; a 20 residue peptide sequence which corresponds to amino acids 84-103 of the p16 protein (see Fahraeus et al., *Current Biology* 6:84 (1996)); the third helix of the 60-amino acid long homeodomain of Antennapedia (Derossi et al., *J. Biol. Chem.* 269:10444 (1994)); the h region of a signal peptide such as the Kaposi fibroblast growth factor (K-FGF) h region (Lin et al., *supra*); or the VP22 translocation domain from HSV (Elliot & O'Hare, *Cell*
25 88:223-233 (1997)). Other suitable chemical moieties that provide enhanced cellular uptake may also be chemically linked to ZFPs.

[256] Toxin molecules also have the ability to transport polypeptides across cell membranes. Often, such molecules are composed of at least two parts (called "binary toxins"): a translocation or binding domain or polypeptide and a separate toxin domain or
30 polypeptide. Typically, the translocation domain or polypeptide binds to a cellular receptor, and then the toxin is transported into the cell. Several bacterial toxins, including *Clostridium perfringens* iota toxin, diphtheria toxin (DT), *Pseudomonas* exotoxin A (PE), pertussis toxin (PT), *Bacillus anthracis* toxin, and pertussis adenylate cyclase (CYA), have been used in attempts to deliver peptides to the cell cytosol as internal or amino-terminal fusions (Arora et

WO 02/46412

PCT/US01/46861

al., J. Biol. Chem., 268:3334-3341 (1993); Perelle et al., Infect. Immun., 61:5147-5156 (1993); Stenmark et al., J. Cell Biol. 113:1025-1032 (1991); Donnelly et al., PNAS 90:3530-3534 (1993); Carbonetti et al., Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 95:295 (1995); Sebo et al., Infect. Immun. 63:3851-3857 (1995); Klimpel et al., PNAS U.S.A. 89:10277-10281 (1992); and Novak et al., J. Biol. Chem. 267:17186-17193 (1992)).

[257] Such subsequences can be used to translocate ZFPs across a cell membrane. ZFPs can be conveniently fused to or derivatized with such sequences. Typically, the translocation sequence is provided as part of a fusion protein. Optionally, a linker can be used to link the ZFP and the translocation sequence. Any suitable linker can be used, e.g., a peptide linker.

[258] The ZFP can also be introduced into an animal cell, preferably a mammalian cell, via a liposomes and liposome derivatives such as immunoliposomes. The term "liposome" refers to vesicles comprised of one or more concentrically ordered lipid bilayers, which encapsulate an aqueous phase. The aqueous phase typically contains the compound to be delivered to the cell, i.e., a ZFP. The liposome fuses with the plasma membrane, thereby releasing the drug into the cytosol. Alternatively, the liposome is phagocytosed or taken up by the cell in a transport vesicle. Once in the endosome or phagosome, the liposome either degrades or fuses with the membrane of the transport vesicle and releases its contents.

[259] In current methods of drug delivery via liposomes, the liposome ultimately becomes permeable and releases the encapsulated compound (in this case, a ZFP) at the target tissue or cell. For systemic or tissue specific delivery, this can be accomplished, for example, in a passive manner wherein the liposome bilayer degrades over time through the action of various agents in the body. Alternatively, active drug release involves using an agent to induce a permeability change in the liposome vesicle. Liposome membranes can be constructed so that they become destabilized when the environment becomes acidic near the liposome membrane (see, e.g., PNAS 84:7851 (1987); Biochemistry 28:908 (1989)). When liposomes are endocytosed by a target cell, for example, they become destabilized and release their contents. This destabilization is termed fusogenesis. Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) is the basis of many "fusogenic" systems.

[260] Such liposomes typically comprise a ZFP and a lipid component, e.g., a neutral and/or cationic lipid, optionally including a receptor-recognition molecule such as an antibody that binds to a predetermined cell surface receptor or ligand (e.g., an antigen). A variety of methods are available for preparing liposomes as described in, e.g., Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980), U.S. Pat. Nos. 4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085, 4,837,028, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728,

WO 02/46412

PCT/US01/46861

- 4,774,085, 4,837,028, 4,946,787, PCT Publication No. WO 91/17424, Deamer & Bangham, Biochim. Biophys. Acta 443:629-634 (1976); Fraley, et al., PNAS 76:3348-3352 (1979); Hope et al., Biochim. Biophys. Acta 812:55-65 (1985); Mayer et al., Biochim. Biophys. Acta 858:161-168 (1986); Williams et al., PNAS 85:242-246 (1988); Liposomes (Ostro (ed.), 1983, Chapter 1); Hope et al., Chem. Phys. Lip. 40:89 (1986); Gregoriadis, Liposome Technology (1984) and Lasic, Liposomes: from Physics to Applications (1993)). Suitable methods include, for example, sonication, extrusion, high pressure/homogenization, microfluidization, detergent dialysis, calcium-induced fusion of small liposome vesicles and ether-fusion methods, all of which are well known in the art.
- 10 [261] In some instances, liposomes are targeted using targeting moieties that are specific to a particular cell type, tissue, and the like. Targeting of liposomes using a variety of targeting moieties (e.g., ligands, receptors, and monoclonal antibodies) has been previously described (see, e.g., U.S. Patent Nos. 4,957,773 and 4,603,044).
- [262] Standard methods for coupling targeting agents to liposomes can be used. These
- 15 methods generally involve incorporation into liposomes lipid components, e.g., phosphatidylethanolamine, which can be activated for attachment of targeting agents, or derivatized lipophilic compounds, such as lipid derivatized bleomycin. Antibody targeted liposomes can be constructed using, for instance, liposomes which incorporate protein A (see Renneisen et al., J. Biol. Chem., 265:16337-16342 (1990) and Leonetti et al., PNAS 87:2448-
- 20 2451 (1990).
- C. Dosage
- [263] For therapeutic applications of ZFPs, the dose administered to a patient should be sufficient to effect a beneficial therapeutic response in the patient over time. The dose will be determined by the efficacy and Kd of the particular ZFP employed, the nuclear volume of the
- 25 target cell, and the condition of the patient, as well as the body weight or surface area of the patient to be treated. The size of the dose also will be determined by the existence, nature, and extent of any adverse side-effects that accompany the administration of a particular compound or vector in a particular patient.
- [264] In determining the effective amount of the ZFP to be administered in the treatment or
- 30 prophylaxis of disease, the physician evaluates circulating plasma levels of the ZFP or nucleic acid encoding the ZFP, potential ZFP toxicities, progression of the disease, and the production of anti-ZFP antibodies. Administration can be accomplished via single or divided doses.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

D. Compositions and Modes of Administration

1. General

[265] ZFPs and the nucleic acids encoding the ZFPs can be administered directly to a patient for modulation of gene expression and for therapeutic or prophylactic applications such as those described infra. In general, and in view of the discussion herein, phrases referring to introducing a ZFP into an animal or patient can mean that a ZFP or ZFP fusion protein is introduced and/or that a nucleic acid encoding a ZFP or ZFP fusion protein is introduced in a form that can be expressed in the animal. For example, as described in greater detail in the following section, the ZFPs and/or nucleic acids can be used to modulate angiogenesis and in the treatment of ischemia.

[266] Administration of therapeutically effective amounts is by any of the routes normally used for introducing ZFP into ultimate contact with the tissue to be treated. The ZFPs are administered in any suitable manner, preferably with pharmaceutically acceptable carriers. Suitable methods of administering such modulators are available and well known to those of skill in the art, and, although more than one route can be used to administer a particular composition, a particular route can often provide a more immediate and more effective reaction than another route.

[267] Pharmaceutically acceptable carriers are determined in part by the particular composition being administered, as well as by the particular method used to administer the composition. Accordingly, there is a wide variety of suitable formulations of pharmaceutical compositions (see, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. 1985)).

[268] The ZFPs, alone or in combination with other suitable components, can be made into aerosol formulations (i.e., they can be "nebulized") to be administered via inhalation. Aerosol formulations can be placed into pressurized acceptable propellants, such as

dichlorodifluoromethane, propane, nitrogen, and the like.

[269] Formulations suitable for parenteral administration, such as, for example, by intravenous, intramuscular, intradermal, and subcutaneous routes, include aqueous and non-aqueous, isotonic sterile injection solutions, which can contain antioxidants, buffers, bacteriostats, and solutes that render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient, and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that can include suspending agents, solubilizers, thickening agents, stabilizers, and preservatives. In the practice of the disclosed methods, compositions can be administered, for example, by intravenous infusion, orally, topically, intraperitoneally, intravesically or intrathecally. The formulations of compounds can be presented in unit-dose or multi-dose sealed containers, such as ampules

WO 02/46412

PCT/US01/46861

and vials. Injection solutions and suspensions can be prepared from sterile powders, granules, and tablets of the kind previously described.

2. Exemplary Angiogenesis Delivery Options

- [270] A variety of delivery options are available for the delivery of the pharmaceutical compositions provided herein so as to modulate angiogenesis and thus, for example, the treatment of ischemic conditions. Depending upon the particular application, the compositions can be targeted to specific areas or tissues of a subject. For example, in some methods, one delivers compositions to specific regions of the heart to treat various disorders such as ischemia. Other treatments, in contrast, involve administering the composition in a general manner without seeking to target delivery to specific regions.
- [271] A number of approaches can be utilized to localize the delivery of agents to particular regions. Certain of these methods involve delivery to the body lumen or to a tissue (see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,941,868; 6,067,988; 6,050,986; and 5,997,509; as well as PCT Publications WO 00/25850; WO 00/04928; 99/59666; and 99/38559). Delivery can also be effectuated by intramyocardial injection or administration. Examples of such approaches include those discussed in U.S. Patent Nos. 6,086,582; 6,045,565; 6,056,969; and 5,997,525; and in PCT Publications WO 00/16848; WO 00/18462; WO 00/24452; WO 99/49773 and WO 99/49926. Other options for local delivery include intrapericardial injection (see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,931,810; 5,968,010; and 5,972,013) and perivascular delivery. Various transmyocardial revascular (TMR) channel delivery approaches can be utilized as well. Many of these methods utilize a laser to conduct the revascularization. A discussion of such approaches is set forth in U.S. Patent Nos. 5,925,012; 5,976,164; 5,993,443; and 5,999,678, for example. Other options include intraarterial and/or intracoronary delivery, for example coronary artery injection (see, e.g., WO 99/29251) and endovascular administration (see, e.g., U.S. Patent Nos. 6,001,350; 6,066,123; and 6,048,332; and PCT Publications WO 99/31982; WO 99/33500; and WO 00/15285). Thus, for example, one can inject a composition as described herein directly into the myocardium.
- [272] Additional options for the delivery of compositions to modulate angiogenesis include systemic administration using intravenous or subcutaneous administration, cardiac chamber access (see, e.g., U.S. Patent No. 5,924,424) and tissue engineering (U.S. Patent No. 5,944,754).
- [273] Other delivery methods known by those skilled in the art include the methods disclosed in U.S. Patent Nos. 5,698,531; 5,893,839; 5,797,870; 5,693,622; 5,674,722; 5,328,470; and 5,707,969.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

IX. Applications

A. General

- [274] ZFPs that bind to the target sites disclosed herein, and nucleic acids encoding them, can be utilized in wide variety of applications, particularly applications involving the modulation of endothelial cell growth. Such methods generally involve contacting a target site of a nucleic acid within a cell or population of cells with a ZFP that has binding specificity for one of the target sites disclosed herein. Methods can be performed in vitro with cell cultures, for example, or in vivo.
- [275] Certain methods are performed such that modulation involves activation of one or more VEGF genes. Such methods are useful when generation of additional endothelial cells is desired, such as in promoting angiogenesis to relieve some type of arterial or vascular blockage or in activating lymphogenesis or myelopoiesis. Other methods can be conducted to repress endothelial cell growth when such repression provides a beneficial effect, such as inhibiting further vascular development in the region of a tumor for example.
- [276] The ZFPs can also be used for non-therapeutic applications such as in screening methods to identify agents that activate or repress expression of a VEGF gene or to detect target nucleic acids containing the target sequences.

B. Therapeutic Applications

1. Modulation of Angiogenesis

- [277] The ZFPs provided herein and the nucleic acids encoding them such as in the pharmaceutical compositions described supra can be utilized to activate expression of VEGF genes such that the resulting VEGF proteins can act as growth factors in activating endothelial cell growth, both in cell cultures (i.e., in vitro applications) and in vivo. Such activation can promote useful angiogenesis in which new blood vessels and capillaries are formed; activation can also promote somatic growth and vascular development and differentiation. Hence, certain methods for promoting angiogenesis involve introducing a ZFP into an animal. Binding of the ZFP bearing an activation domain to a gene that modulates angiogenesis can enhance the process of angiogenesis. Certain methods involve the use of ZFPs such as described herein to bind to target sites in the VEGF genes. An activation domain fused to the ZFP activates the expression of one or more VEGF genes.
- [278] The ZFPs and nucleic acids can also be useful in bone repair, promoting wound healing and in speeding the healing of gastric and/or duodenal ulcers. The ZFPs and nucleic acids can also be utilized to promote development of the corpus luteum and endometrium,

WO 02/46412

PCT/US01/46861

such activation useful in initiating and/or maintaining pregnancy. In related methods, administration of the ZFPs and nucleic acids also find utility in supporting embryogenesis.

[279] A variety of assays for assessing endothelial cell proliferation and angiogenesis are known. For example, endothelial cell proliferation assays are discussed by Ferrara and
5 Henzel (1989) *Nature* 380:439-443; Gospodarowicz et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 7311-7315; and Claffey et al. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1246:1-9. The ability of the ZFPs and/or nucleic acids to promote angiogenesis can be evaluated, for example, in chick chorioallantoic membrane, as discussed by Leung et al. (1989) *Science* 246:1306-1309. Another option is to conduct assays with rat corneas, as discussed by Rastinejad et al. (1989)
10 *Cell* 56:345-355. Other assays are disclosed in U.S. Patent No. 5,840,693. In addition, microscopic examination of tissue sections is disclosed in Example 4 and Figure 9 can be used as an assay for angiogenesis. Each of these methods are accepted assays of in vivo angiogenesis and the results can also be extrapolated to other systems.

[280] Administration of the ZFPs and/or nucleic acids encoding them can also be utilized in
15 applications in which initiation or extension of vascularization is desirable. Examples of such applications include therapies following tissue or organ transplantation. Many applications involve relieving ischemic conditions and various types of blood flow blockage such as that resulting from atherosclerosis. For instance, certain applications involve establishing collateral circulation in tissue infarction or arterial stenosis, such as occurs in coronary heart
20 disease. Stimulation of collateral circulation is also useful in treating deep venous thrombosis, myocardial infarcts, ischaemic limbs and/or postpartum vascular problems.

[281] A variety of assays can be utilized to assess the ability of a ZFP to treat ischemia. For example, several models for studying ischemia are known. These include, but are not limited to, experimentally induced rat hindlimb ischemia (see, e.g., Takeshita, S. et al., *Circulation*
25 (1998) 98: 1261-63; and Takeshita, S. et al. (1994) *Circulation* 90(#5; part II):228-234), a partially ischemic hindlimb rabbit model (see, e.g., Hopkins, S. et al., *J. Vasc. Surg.* (1998) 27: 886-894), and a chronic porcine myocardial ischemia model (see, e.g., Harada, K. et al., *Am. J. Physiol.* (1996) 270: 886-94; and Hariawala, M. et al., 1996, *J. Surg. Res.* 63: 77-82). Another assay includes a rabbit model of hindlimb ischemia (see, e.g., Takeshita, S. et al.,
30 1994, *Circulation* 90(#5; part II):228-234).

[282] Neovascularization is also important in fracture repair as the healing process involves formation of new blood vessels at the fracture site. Thus, the ZFP and nucleic acids can also be used in the treatment of bone fractures. Assays for measuring effects of administration are

WO 02/46412

PCT/US01/46861

known. For example, methods for assaying for atherosclerosis are discussed in PCT Publication WO 00/25805.

[283] Wound treatment is another general type of application in which administration of the ZFPs, nucleic acids and compositions disclosed herein find utility. The ZFPs and nucleic acids can be used to treat significant wounds such as ulcers, pressure sores and venous ulcers and burns. Examples of such ulcers are those experienced by diabetic patients. An example of the use of ZFP fusions to promote wound healing is provided in Example 4 and Figure 9.

[284] The ZFPs and nucleic acids provided herein can also be utilized in diverse surgical applications. For instance, another use is in preparation of a burn or trauma site to receive a skin graft. Similarly, the compositions can be used to promote the formation of endothelial cells in vascular graft surgery. In such surgeries, compositions can be introduced at the site of the graft before or during surgery. The ZFPs and nucleic acids can be utilized in plastic surgery, especially in reconstruction of areas burned or otherwise traumatized. Another surgical setting in which the compositions can be utilized is in post-operative wound healing following balloon angioplasty as such procedures involve removal and damage to endothelial cells. Treatment in such instances can utilize compositions containing the ZFP or nucleic acids in combination with a parenteral carrier.

[285] The ZFPs and nucleic acids encoding them also find use in general surgery and in treating and repairing cuts and lacerations. In such applications, the ZFPs and nucleic acids are used to prevent wounds from becoming infected. When utilized in topical wound healing, in some instances the ZFPs or nucleic acids can be administered topically as part of a solution, spray, cream, gel, ointment or dry powder directly to the site being treated. Slow release compositions can also be effective in treating certain types of wounds.

[286] Wound healing assays that can be utilized to assess the utility of various compositions are discussed, for example, by Schilling et al. (1959) Surgery 46:702-710; and Hunt et al. (1967) Surgery 114:302-307. Another wound healing assay is disclosed in Example 4.

[287] The ZFPs and nucleic acids provided herein can also be utilized in promoting the growth of lymphatic endothelial cells and lymphatic vessels. Additionally, the compositions can be used to stimulate lymphangiogenesis. Thus, for example, the compositions can be administered to promote regrowth or permeability in lymphatic vessels. This can be useful in treating organ transplant patients and in mitigating the loss of axillary lymphatic vessels that often accompanies surgery and cancer treatments. Other related applications include treatment of lymphatic vessel occlusions (e.g., elephantiasis) and lymphangiomas.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[288] Activation of myelopoiesis can also be achieved with certain of the present ZFPs and nucleic acids. For example, the compositions can be used to promote the growth of neutrophilic granulocytes. Such treatments can be useful in treating patients suffering from diseases such as granulocytopenia, for example. The production of neutrophilic granulocytes can be monitored by established microscopic and macroscopic methods.

[289] Previous experiments showed that the introduction of cDNA encoding a single mouse VEGF164 isoform in mice led to the formation of permeable vessels which were spontaneously hemorrhagic (Pettersson, A. et al., 2000, Lab. Invest. 80:99-115). Briefly, an adenoviral vector encoding murine VEGF164 was injected subcutaneously in the ears of mice. VEGF164 was shown to induce hemorrhage and extravasation of intravascular dye in this mouse ear model. When compared to mouse ears similarly treated with an adenovirus encoding murine VEGF164, the ZFP-induced neovasculature was not spontaneously hemorrhagic and was not permeable to Evans Blue dye infusion (see Example 6).

2. Repression of VEGF Gene Expression

[290] The compositions provided herein can also be utilized to repress expression of VEGF genes in a variety of therapeutic applications. One common application is to reduce or inhibit angiogenesis to particular cells or tissues which for therapeutic reasons one wants to destroy. Often such methods involve administration of compositions to prevent angiogenic events associated with pathological processes such as tumor growth and metastasis. Other pathological processes associated with increased angiogenesis, particularly in the proliferation of the microvascular system, include diabetic retinopathy, psoriasis and various arthropathies. Thus, certain of the present compositions can be utilized to treat these processes.

C. Non-Therapeutic Applications

[291] The ZFPs and the nucleic acids encoding them can also be utilized in various non-therapeutic applications. One such application involves screening to identify new agents capable of modulating angiogenesis. In particular, the ZFPs can be used to identify agents able to modulate gene expression, such as the expression of VEGF genes. Such methods generally involve contacting a cell or population of cells with a ZFP that binds to one of the target sites listed in Tables 2-3 to either activate or repress expression of one or more VEGF genes. The cell(s) are also contacted with a test agent. The level of expression of a VEGF gene is then determined and compared with a baseline level of expression. A statistically significant difference in the expression level of the VEGF gene in the test cell(s) with the baseline level indicates that the test agent is a potential modulator of the expression of the

WO 02/46412

PCT/US01/46861

VEGF gene. For example, if the ZFP activates expression of the VEGF gene, and level of expression in the test cell(s) is lower than the baseline level, then the evidence indicates that the test agent is a repressor of expression of the VEGF gene. On the other hand, if the ZFP represses expression of the VEGF gene, then test agents can be screened for potential
5 activators that are able to relieve the repression caused by the ZFP. The method can be varied to introduce a nucleic acid encoding the ZFP, provided the nucleic acid includes the necessary regulatory sequences for expression in the cells being utilized in the assay. Such methods can be used to identify agents that interact with the ZFP potentially increasing or decreasing its binding and/or agents capable of binding elsewhere on the gene, thereby
10 providing either a synergistic or antagonistic effect.

[292] The baseline level of expression refers generally to a value (or range of values) against which an experimental or determined value is compared. Typically, the baseline value is a value determined for a control cell or individual treated in parallel and under similar conditions with the cell or individual being tested. The baseline value can also be a statistical
15 value (e.g., a mean or average) established for a population of control cells or individuals. In cellular assays such as those just described, often the test cell is contacted with a ZFP or expresses a ZFP, while the control does not.

[293] A difference is typically considered to be statistically significant when the difference is greater than the level of experimental error. Such a difference is also statistically
20 significant if the probability of the observed difference occurring by chance (the p-value) is less than some predetermined level. Thus, a statistically significant difference can refer to a p-value that is <0.005 , preferably <0.01 , and most preferably <0.001 .

[294] In other applications, ZFPs are used in diagnostic methods for sequence specific detection of target nucleic acid in a sample that includes one of the target sites provided
25 herein. As an example, ZFPs can be used to detect the presence of particular mRNA species or cDNA in a complex mixtures of mRNAs or cDNAs that includes the target site. Thus, the ZFPs can be used to quantify copy number of VEGF genes in a sample.

[295] A suitable format for performing diagnostic assays employs ZFPs linked to a domain that allows immobilization of the ZFP on an ELISA plate. The immobilized ZFP is contacted
30 with a sample suspected of containing a target nucleic acid under conditions in which binding can occur. Typically, nucleic acids in the sample are labeled (e.g., in the course of PCR amplification). Alternatively, unlabeled probes can be detected using a second labeled probe. After washing, bound-labeled nucleic acids are detected.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[296] The following examples are provided solely to illustrate in greater detail particular aspects of the disclosed methods and compositions and should not be construed to be limiting in any way.

EXAMPLE 1

5 Regulation of human VEGF genes using a panel of designed zinc finger fusion proteins

I. Introduction

[297] A major question in the study of gene regulation involves the mechanisms by which the cell achieves specific activation of endogenous chromosomal genes. In addressing this
10 issue, rationally designed components of the transcriptional machinery can provide powerful tools for testing our understanding of gene regulation (Chatterjee et al. (1995) Nature 374: 820-822; Kim et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3616-3620; Klages et al. (1995) Nature 374, 822-823). In particular, artificial transcription factors – targeted to novel sequences within a given locus and bearing functional domains of the experimenter's
15 choosing – may prove especially useful since they offer the prospect of complete recapitulation of any given activation process using totally defined components. Artificial transcription factors may also provide practical benefits in areas such as medicine and biotechnology.

[298] The DNA binding motif of choice that has emerged for achieving specific recognition
20 of novel, desired DNA sequences are zinc fingers. These include the initially-described Cys2-His2 zinc finger, as well as additional types of zinc finger molecules such as, for example, Cys4 zinc fingers and others. See, for example, Rhodes et al. (1993) Scientific American 268: 56-65. Over the past decade, selection and design studies have demonstrated the adaptability of this motif and have yielded simple, powerful strategies for designing zinc finger proteins
25 (ZFPs) that can bind specifically to virtually any DNA sequence. See, for example, Choo et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11,163-11,167; Choo et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11,168-11,172; Choo et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 646 (published erratum); Desjarlais et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7345-7349; Desjarlais et al. (1992) Proteins 12: 101-104; Desjarlais et al. (1992) Proteins 13, 272;
30 Desjarlais et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2256-2260; Greisman et al. (1997) Science 275: 657-661; Jamieson et al. (1994) Biochemistry 33: 5689-5695; Jamieson et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 12,834-12,839; Liu et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5525-5530; Rebar et al. (1994) Science 263: 671-673; Rebar et al. (1996) Meth. Enzymol. 267: 129-149; Segal et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2758-2763. More

WO 02/46412

PCT/US01/46861

recently, ZFPs with novel, engineered DNA sequence specificities have begun to be used as artificial transcription factors to regulate endogenous chromosomal genes. See, for example, Bartsevich et al. (2000) *Mol. Pharmacol.* 58: 1-10; Beerli et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1495-1500; Zhang et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 33,850-33,860. See also co-owned PCT WO 00/41566.

[299] The goal of this study was to identify a panel of ZFPs that would activate the endogenous gene for vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). VEGF-A is an endothelial cell specific mitogen that is generally recognized as the key inducer of new blood vessel growth, both during embryogenesis and in adult processes such as wound healing (for recent reviews see Flamme et al. (1997) *Mech. Dev.* 63: 51-60; Ferrara (1999) *J. Mol. Med.* 77: 527-543; Yancopoulos et al. (2000) *Nature* 407: 242-248. Its central roles in both vasculogenesis and angiogenesis apparently necessitate that VEGF-A expression levels be controlled by exquisitely precise regulatory mechanisms. Mouse studies have highlighted VEGF-A as perhaps the sole example of a gene whose haploinsufficiency precipitates embryonic lethality (Ferrara et al. (1996) *Nature* 380: 439-442; Carmeliet et al. (1996) *Nature* 380: 435-439. Furthermore, several other studies have suggested that proper VEGF-A function requires expression of appropriate relative levels of the three major splice variants produced by this gene (Carmeliet et al., 1996 *supra*; Carmeliet et al. (1999) *Nature Med.* 5: 495-502; Grunstein et al. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20: 7282-7291). A diversity of conditions and transcription factors have been implicated as inducing VEGF-A expression (Chua et al. (1998) *Free Radic. Biol. Med.* 25: 891-897; Cohen et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 736-741; Damert et al. (1997) *Biochem. J.* 327: 419-423; Diaz et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 642-650; Ladoux et al. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204: 794-798; Ryuto et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 28,220-28,228; Salimath et al. (2000) *Oncogene* 19: 3470-3746), of which perhaps the best characterized is the hypoxic response, mediated by HIF-1 (Levy et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 13,333-13,340; Liu et al. (1995) *Circ. Res.* 77: 638-643; Forsythe et al. (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16: 4604-4613; Kimura et al. (2000a) *Blood* 95: 189-197). Consistent with its highly regulated nature, VEGF-A dysregulation plays a role in a variety of pathological conditions, including tumor growth, diabetic retinopathy, and ischemic heart and limb diseases. Consequently, VEGF-A would appear to provide an attractive target for both pro- and anti-angiogenic gene therapies using designed artificial transcription factors.

[300] In this example, the inventors have made use of engineered Cys2-His2 ZFPs and a knowledge of chromosomal structure to achieve activation of the endogenous chromosomal

WO 02/46412

PCT/US01/46861

locus containing the gene for Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A). DNase I hypersensitivity mapping analysis was used to identify accessible regions of the VEGF-A locus. This analysis identified four distinct DNase I-accessible regions in VEGF-A, of which three were present in the HEK293 cells used for activation studies. Next, eight novel ZFPs were designed to recognize 9-bp sequences within each of the three HEK293-specific DNase I-accessible regions, and their DNA-binding properties were characterized. Each designed ZFP bound to its intended target with an apparent K_d of <10 nM. These zinc fingers were then linked to the VP16 transcriptional activation domain (Sadowski et al. (1988) Nature 335: 563-564), and tested for their capacity to activate transcription of both the endogenous VEGF-A gene and transiently transfected native reporter constructs containing ~3 kb of the VEGF-A promoter. The results indicate that each of the designed ZFP-VP16 fusions activates both the endogenous VEGF-A locus and the native reporter constructs. The designed ZFPs were also linked to the activation domain from the p65 subunit of NF κ B (Ruben et al. (1991) Science 251: 1490-1493; published erratum appears in Science (1991) 254: 11), and tested for the capacity to activate transcription of endogenous VEGF-A both alone and in certain combinations with VP16-linked ZFPs.

[301] This strategy has yielded eight distinct ZFPs, targeted to seven 9-bp sites, that activate VEGF-A expression. For certain ZFPs, linkage to activation domains from either VP16 or p65 provides differing levels activation, dependent on the chromosomal site that is targeted. Furthermore, when certain combinations of VP16- and p65-linked ZFPs (targeted to distinct chromosomal sites) are cotransfected, the observed VEGF-A activation is more than additive relative to the activation levels of the individual ZFPs. Finally, it is disclosed that the levels of activation achieved by these engineered transcription factors exceed VEGF-A levels attained during the hypoxic response and that the relative proportions of VEGF-A splice variants produced by this activation closely approximates those normally observed in these cells.

II. Experimental Procedures

[302] Cell lines and cell culture. Immortalized cell lines used in these studies (HEK 293, Hep3B, and H9c2(2-1)) were obtained from the American Type Culture Collection, and human primary skeletal muscle cells were obtained from Clonetics. Each line was maintained essentially as recommended by the suppliers. Rat primary cardiac myocytes were recovered from the hearts of day 1 neonatal Wistar-Han rats (Charles River) via dissociation with a solution of 115 U/ml type II collagenase and .08% pancreatin. They were then purified on a discontinuous Percoll gradient, resuspended in a plating medium containing 15% serum, and

WO 02/46412

PCT/US01/46861

plated on gelatin-coated plates for 24 hr. Cells were then maintained in a serum-free medium for 24 to 48 hrs prior to use in DNase I mapping studies.

[303] Mapping of DNase I-accessible chromatin regions in the VEGF-A locus. Nuclei were isolated and treated with DNase I (Worthington) essentially as described by Zhang et al., supra, except that DNase I digestions were for 1.5 min at 22 °C and the concentrations of DNase I used were as indicated in the legend to Figure 1. Genomic DNA isolation, restriction enzyme digestion, and Southern blot analysis were then performed essentially as described by Zhang et al., supra, except that enzymes and probes were as indicated in the legend to Figure 1. See also co-owned U.S. Patent Applications Serial Nos. 60/200,590 and 60/228,556 for additional disclosure regarding identification of accessible regions in cellular chromatin.

[304] Assembly of ZFP-encoding polynucleotides; synthesis, purification and binding analysis of zinc finger proteins. - Genes encoding VEGF-A-targeted ZFPs were assembled, cloned and purified as previously described. See, for example, Zhang et al., supra; WO 00/41566; and WO 00/42219. Briefly, oligonucleotides encoding α -helix and β -sheet regions of each three-finger protein were assembled using PCR (Figures 2A and 2B), and each resultant ZFP gene was cloned into the pMal-c2 plasmid (New England Biolabs, Beverly, MA) as a fusion with DNA encoding the maltose binding protein. Maltose binding protein-ZFP fusions were then expressed and affinity purified using an amylose resin (New England Biolabs, Beverly, MA).

[305] Binding studies were performed essentially as described (Zhang et al., supra; WO 00/41566; and WO 00/42219) except that the binding reactions contained 10 pM of labeled target site and the buffer composition was as follows: 17 mM Tris, 170 mM KCl, 1.7 mM MgCl₂, 3.5 mM DTT, 0.01-0.033 mM ZnCl₂, 15% glycerol, 300 μ g/ml bovine serum albumin, 0.03% IGEPAL. In addition, ZFP concentrations for these studies were determined directly by measuring the DNA-binding activity of each ZFP preparation using conditions under which binding is essentially stoichiometric (ZFP and target site concentrations of >100 nM). Using this modified protocol, the SP1 zinc finger protein exhibits a significantly higher affinity for its target site than was determined in previous studies (Zhang et al., supra) and it is likely that both the use of activity-based estimates of ZFP concentration and the new binding buffer in these studies contributed to the difference in apparent K_ds.

[306] Construction of Zinc Finger Fusion Proteins. VEGF-A-targeted zinc fingers were assembled in an SP1 backbone and cloned into the pcDNA3 mammalian expression vector

WO 02/46412

PCT/US01/46861

(Invitrogen, Carlsbad, CA) as described previously (Zhang et al., supra; WO 00/41566; and WO 00/42219). A CMV promoter was used to drive the expression of all the ZFPs in mammalian cells. All ZFP constructs contained an N-terminal nuclear localization signal (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val, SEQ ID NO:224) from SV40 large T antigen, a Zinc Finger DNA-binding domain, an activation domain, and a FLAG peptide (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, SEQ ID NO:225). ZFP-VP16 fusions contained the herpes simplex virus VP16 activation domain from amino acid 413 to 490 (Sadowski et al., supra; Zhang et al, supra; WO 00/41566; and WO 00/42219). ZFP-p65 fusions contained the human NF- κ B transcription factor p65 subunit (amino acid 288-548) as the activation domain (Ruben et al., supra).

[307] Assay for the activity of ZFP fusions for human VEGF-A reporter activation. The effect of ZFPs on human VEGF-A promoter activity was measured using a luciferase reporter construct containing the human VEGF-A promoter. The human VEGF-A luciferase reporter construct pGLP VFH was made by inserting a genomic DNA fragment containing 3318 base pairs of the human VEGF-A promoter and its flanking sequences (nt -2279 to +1039 with respect to the transcription start site) into the multiple cloning site region of the pGL3 vector (Promega, Madison, WI) between the KpnI and NcoI sites. The translation start codon ATG of the VEGF-A gene was directly fused with the luciferase gene in this construct. Human embryonic kidney cells (HEK 293) were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), supplemented with 10% fetal bovine serum, in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Cells were plated in 24-well plates at a density of 160,000 cells per well a day before transfection. The reporter construct and ZFP-VP16 fusion plasmid were co-transfected into the cells via LipofectAMINE reagent (Gibco Life Technologies, Rockville, MD) according to manufacturer's recommendations, using 1.5 μ l LipofectAMINE reagent, 260 ng of the VEGF-A reporter construct, 30 ng of plasmid DNA encoding ZFP-VP16, and 10 ng of control pRL-CMV plasmid (Promega, Madison, WI). Medium was removed and replaced with fresh medium 16 hours after transfection. Forty hours after transfection, medium was removed, and the cells were harvested and assayed for luciferase reporter activity using the Dual-luciferase Assay System (Promega, Madison, WI) according to manufacture's protocol.

[308] Assays for the activity of ZFP fusions on the endogenous VEGF-A gene in human cells by transient transfection. Human embryonic kidney cells (HEK 293) were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), supplemented with 10% fetal bovine serum, in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Cells were plated in 24-well plates at a density of 160,000

WO 02/46412

PCT/US01/46861

cells per well. A day later, plasmids encoding ZFP-VP16 fusions were transfected into the cells using LipofectAMINE reagent (Gibco Life Technologies, Rockville, MD) according to manufacture's recommendations, using 1.5 µl LipofectAMINE reagent and 0.3 µg ZFP plasmid DNA per well. Cells are transfected at 50% confluence or 90% confluence, or any integral percentage therebetween. Medium was removed and replaced with fresh medium 16 hours after transfection. Forty hours after transfection, the culture medium and the cells were harvested and assayed for VEGF-A expression. VEGF-A protein content in the culture medium was assayed using a human VEGF ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to manufacture's protocol.

[309] For western analysis of ZFP protein expression, cells were lysed with Laemmli Sample Loading Buffer and the lysates were analyzed by a 10% polyacrylamide gel electrophoresis (BioRad, Hercules, CA) followed by western blotting using anti-FLAG antibody (Sigma, St. Louis, MO) which recognizes the FLAG epitope tag of the designed ZFPs. The western blots were visualized by ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) as described previously (Zhang et al., supra).

[310] For quantitative RT-PCR analysis of VEGF mRNA level, the cells were lysed and total RNA was prepared using the RNeasy Total RNA Isolation Kit with in-column DNase treatment, according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Valencia, CA). Twenty five ng RNA were used in real-time quantitative RT-PCR analysis using Taqman chemistry on an ABI 7700 SDS machine (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) as described previously (Zhang et al., supra). Briefly, reverse transcription was performed at 48°C for 30 min using Multiscribe Reverse Transcriptase (PE BioSystems, Foster City, CA). Following a 10 min denaturation at 95°C, PCR amplification using AmpliGold DNA polymerase was conducted for 40 cycles at 95°C for 15 seconds and at 60°C for 1 minute. The results were analyzed using SDS version 1.6.3 software (PE BioSystems, Foster City, CA). The primers and probes used for Taqman analysis are listed in Table 5. These primers and probes recognize all known splice variants of the human VEGF-A gene, but do not distinguish among them.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

Table 5: Nucleotide sequences of primers and probes used for Taqman analysis

	Sequence	SEQ ID NO
VEGF-A forward primer	5'-GTGCATTGGAGCCTTGCCTTG-3'	226
VEGF-A reverse primer	5'-ACTCGATCTCATCAGGGTACTC-3'	227
VEGF-A Taqman Probe	5'-FAM-CAGTAGCTGCGCTGATAGACATCCA-TAMRA-3'	228
GAPDH forward primer	5'-CCATGTTTCGTCATGGGTGTGA-3'	229
GAPDH reverse primer	5'-CATGGACTGTGGTCATGAGT-3'	230
GAPDH Taqman Probe	5'-FAM-TCCTGCACCACCAACTGCTTAGCA-TAMRA-3'	231
VP16-FLAG forward primer	5'-CATGACGATTTCGATCTGGA-3'	232
VP16-FLAG reverse primer	5'-CTACTTGTTCATCGTCGTCCTTG-3'	233
VP16-FLAG Taqman Probe	5'-FAM-ATCGGTAACATCTGCTCAAACTCGA-TAMRA-3'	234

Abbreviations: FAM: aminofluorescein; TAMRA: tetramethylrhodamine

- [311] *RNA blot analysis of VEGF mRNA*. HEK 293 cells were grown in 150 mm dishes and transfected with a pcDNA3 vector control or a ZFP-encoding plasmid, using LipofectAMINE reagent (Gibco Life Technologies, Rockville, MD) according to the manufacture's recommendations. Cells and conditioned media were harvested forty hours after transfection. Total RNA was extracted from the cells using Trizol reagent (Gibco Life Technologies, Rockville, MD) followed by RNeasy total RNA isolation midi-prep system (Qiagen, Valencia, CA). For RNA blots, total RNA samples (30 µg) were resolved on a 1.2% formaldehyde agarose gel and blotted onto a Nytran SuperCharge membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH). The membrane was hybridized to ³²P-labeled human VEGF-A165 antisense riboprobe at 68°C in Ultrahyb™ hybridization buffer (Ambion, Austin, TX). After washing with 0.1x SSC, 0.1% SDS at 68°C, the membrane was exposed to film. The same membrane was stripped by boiling in 0.1% SDS and re-hybridized with a human β-actin antisense riboprobe.
- [312] *Analysis of splice variants of VEGF-A mRNA* - To detect the multiple splice variants of VEGF-A mRNA, total RNA samples (0.5 µg) were subjected to a 20-cycle RT-PCR

WO 02/46412

PCT/US01/46861

reaction using Titan™ one-tube RT-PCR system (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). The primers used were 5'-ATGAACCTTTCTGCTGTCTTGGGTGCATT-3' (SEQ ID NO:235), and 5'-TCACCGCCTCGGCTTGTACAT-3' (SEQ ID NO:236). The PCR products were resolved on a 3% Nusieve 3:1 agarose gel (FMC, Rockland, ME), blotted onto a Nytran SuperCharge membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH), and analyzed by Southern hybridization using a ³²P-labeled human VEGF-A165 antisense riboprobe. The expected PCR product sizes for VEGF-189, VEGF-165 and VEGF-120 were 630, 576, and 444 bp, respectively.

10 III. Results

[313] Constitutive and cell-specific regions of accessible chromatin associated with VEGF-

A - Chromatin mapping studies encompassed a variety of cell types from human and rat, including both tumor lines and primary cells. The scope of this survey, as well as choice of cell types, was motivated by the goal of developing candidate ZFPs for a variety of pro- and anti-angiogenic gene therapies. An initial goal was to identify any constitutive accessible chromatin regions in the VEGF-A promoter, as well as those specific to medically relevant target tissues and model organisms. Accordingly, DNase hypersensitivity analysis was conducted on chromatin from a number of different primary cells and cell lines. The results of this analysis indicate the existence of four distinct hypersensitive regions in or near the VEGF-A gene. Two of these, centered on approximately bp -550 and +1 of the VEGF-A promoter, were invariably observed in every cell type tested. Figure 1 shows typical experimental results identifying these regions in both human (Figure 1A) and rat (Figure 1B). Both regions appear as doublets when viewed at higher resolution (Figures 1A and 1C). The discovery of an open region at '+1' was somewhat expected, as hypersensitive regions are often observed in the vicinity of sites for transcription initiation (see, e.g., Gross *et al.* (1988) Ann. Rev. Biochem. 57: 159-197), and this region further contains several conserved regulatory elements which have been shown to be important for VEGF-A activation, including targets for SP1 and AP-2. Milanini *et al.* (1998) J. Biol. Chem. 273: 18,165-18,172. The observation of accessible chromatin in the '-550' region (in both human and rat chromatin) was somewhat more surprising, as no regulatory elements have thus far been mapped to this area of the VEGF-A promoter. However, it is noted that this region of the VEGFA promoter exhibits a high degree of sequence conservation among humans, mouse and rat (Figure 1F, gray trace), which becomes more pronounced when conservation is

WO 02/46412

PCT/US01/46861

assessed in terms of regulatory element-sized sequence blocks, (Figure 1F, black trace), and that the DNase I hypersensitivity of this region (as well as that of the '+1' region) is also conserved between rat and human. Indeed, analysis of a construct comprising a DNA fragment containing this region, fused to a SV40 basal promoter driving a luciferase reporter gene, indicates that this region mediates *cis*-acting regulatory functions. The possibility that the -550 region was inherently more susceptible to DNase I digestion was excluded by performing a control mapping study using purified naked genomic DNA, that indicated no enhanced cutting of this region by DNase I.

[314] In addition to the constitutive hypersensitive regions found at -550 and +1, two other stretches of accessible chromatin, apparent in only a subset of cell types tested, were identified. One of these regions encompassed approximately 300 bp centered on the hypoxia response element (HRE) of VEGF-A, and was observed in human primary skeletal muscle cells (Figure 1C) and in the Hep3B cell line. In contrast, this site was clearly not observed in HEK293 cells (Figure 1C). The hypoxia response element encompasses a region of enhanced sequence conservation in the VEGF-A promoter (Figure 1F), and has been shown to contain several conserved regulatory elements that are required for induction of VEGF-A by hypoxia, including a binding site for HIF-1. Ikeda *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 19,761-19,766; Liu *et al.* (1995) *supra*; Grant *et al.* (2000) *Biochemistry* 39: 8187-8192. Finally, a hypersensitive region was observed, approximately 500 bp downstream of the transcription start site, in HEK293 cells (Figure 1D), primary skeletal muscle cells, and rat primary cardiac myocytes (Figure 1B). Interestingly, this region contains a putative SP1 regulatory element and is adjacent to an alternative transcription start site (Figure 1F). Akiri *et al.* (1998) *Oncogene* 17: 227-236. This region also displayed the capacity to activate the expression of a reporter gene *in cis*. In summary, the inventors have identified three regions accessible to DNase I in HEK293 cells, centered at approximately bp -550, +1, and +500 relative to the transcriptional start site of VEGF-A.

[315] Design and biochemical characterization of ZFPs targeted to open chromatin regions of VEGF-A. ZFPs that bind to sequences contained within each of the hypersensitive regions described above were designed. Design and selection studies of zinc finger-DNA recognition have yielded a diverse collection of fingers with characterized triplet specificities. *See*, for example, Elrod-Erickson *et al.* (1998) *Structure* 6: 451-464 and references cited *supra*. Collectively, these fingers provide a directory of triplet-binding modules that can, under certain conditions, be mixed and matched to obtain multifinger proteins with desired binding properties. Using this approach, a series of ZFPs targeted to sites within the '-550', '+1' and

WO 02/46412

PCT/US01/46861

- '+500' open chromatin regions observed in 293 cells (Figure 2D) were designed, and genes encoding these ZFPs were assembled. Genes encoding two control ZFPs, targeted to sites outside of the hypersensitive regions, were also assembled. Designs for these ZFPs are shown in Tables 3, 4 and 6. The ZFPs were named according to their target location relative to the transcription start site of VEGF-A. Thus the first base in the target sequences of VZ-475 and VZ+590 lie 475 base pairs upstream and 590 nucleotides downstream, respectively, of the principal transcription initiation site of the VEGF-A gene. One of these ZFPs has two target sites in this region and so has been given a complex name to reflect this fact (VZ+42 / +530). Where multiple ZFPs are targeted to a given sequence, this is indicated by the use of a small letter suffix at the end of each name to distinguish between alternate ZFP designs.
- [316] Using previously described methods (see, for example, co-owned WO 00/41566 and WO 00/42219, and Zhang *et al.*, *supra*), genes encoding the ZFP designs were assembled and each of the encoded proteins was expressed in recombinant form (Figures 2A-2C). The DNA-binding affinity of each of the ZFPs was then characterized using a gel shift assay. All of the designed ZFPs exhibited apparent K_{ds} for their intended DNA targets that were in the nanomolar range. For comparison, under these conditions SP1 exhibited an apparent K_d of 0.25 nM for its DNA target. These studies demonstrated that each designed ZFP recognizes its target site with high affinity.
- [317] *Activation of the human VEGF-A gene promoter by ZFPs.* Each of the designed ZFPs was fused to the minimal activation domain of the VP16 transcription factor and tested for its ability to activate a reporter gene under the control of a VEGF-A promoter. Fusion constructs also contained a N-terminal nuclear localization sequence and a C-terminal FLAG epitope tag. The reporter plasmid was constructed to contain a firefly luciferase gene under the control of human VEGF-A promoter. When transiently cotransfected into cells with the reporter plasmid, all of the designed ZFP-VP16 fusions were able to activate the reporter (Figure 3A). The range of activation varied between 3- to 15-fold. The activation was ZFP-dependent; since a Green Fluorescent Protein-VP16 fusion was unable to activate the reporter. See also Figure 12. These results showed that all of the designed ZFPs were active on an extrachromosomal DNA template.
- [318] *Transcriptional activation of an endogenous human VEGF-A gene using ZFPs.* To test whether these ZFP-VP16 fusions were also active in regulating VEGF-A gene transcription from the endogenous chromosomal locus, the designed ZFP-VP16 fusions were transiently transfected into HEK293 cells, and their effect on endogenous VEGF-A gene expression was analyzed. Human embryonic kidney cells (HEK 293) produced relatively low

WO 02/46412

PCT/US01/46861

levels of VEGF-A in the absence of any ZFP constructs. As shown in Figure 3C, expression of the ZFP-VP16 fusions designed as described above resulted in the secretion of elevated levels VEGF-A into the culture medium, as determined by ELISA. The range of activation varied between 2- to 15-fold, with ZFP VZ+434b the most active. The increased VEGF-A protein production induced by ZFP was correlated with a 2- to 10-fold increase in the level of VEGF-A mRNA as determined by quantitative PCR (Figure 3D). The various ZFP-VP16 fusions activated human VEGF-A mRNA transcription with varying abilities, with ZFP VZ+434b being the most active. The different ZFP fusions were found to be expressed to similar levels, as determined by western blotting for protein levels (Figure 3E) and by Taqman for mRNA expression (Figure 3F). See also Figures 10 and 13 (for VEGF protein levels induced by additional ZFP constructs) and Figure 11 (for a corresponding analysis of VEGF mRNA levels).

[319] The behavior of ZFPs targeted to the accessible regions of the VEGF A gene was compared with that of ZFPs targeted to non-accessible regions. Representative data from these studies are shown in Figure 4. Whereas all four ZFPs tested activated the extrachromosomal reporter construct to approximately equal levels, a clear discrepancy was seen regarding activity against the endogenous VEGF-A gene. The accessible-region targeted ZFPs activated VEGF-A by factors of 4 to 5 while the ZFPs targeted to sites outside of the accessible regions showed no appreciable increase in VEGF-A expression level. Thus, in certain cases, it can be advantageous to target a designed ZFP to a binding site present in an accessible region of cellular chromatin.

[320] *Activation of a human VEGF-A gene by ZFPs fused with different activation domains.*

To achieve a higher level of VEGF-A activation by ZFPs in human cells, the performance of other activation domains was tested and compared to that achieved by VP16. It was found that use of the activation domain from the p65 subunit of NF- κ B provided higher levels of activation, when tested using several of the designed ZFPs (Figure 5). In this experiment, some ZFP-p65 fusions, for example the ZFP VZ+434b, induced levels of VEGF-A protein that were 3- to 4-fold higher than those induced by ZFP-VP16 fusions (Figure 5C), even though the ZFP-p65 fusion proteins and the ZFP-VP16 fusion proteins were expressed and accumulated in cells to similar levels (Figure 5B). The higher level of VEGF-A protein production induced by the ZFP-p65 fusion was consistent with a higher level of VEGF-A mRNA transcription, as determined by Taqman analysis (Figure 5D). Interestingly, for some ZFPs, such as VZ-8, the p65 fusions displayed activities similar to those of the VP16 fusions.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

Therefore, it seems that VP16 and p65 have different target site-dependent activation mechanisms.

[321] *Synergy between ZFPs in the activation of a human VEGF-A gene.* The availability of a set of activating ZFPs targeted to diverse regions of the VEGF gene promoter, and fused to different activation domains, provided an opportunity to investigate whether combinations of ZFPs with different activation domains could achieve synergistic control of VEGF gene transcription. To test the possibility, various ZFP-VP16 and ZFP-p65 fusions were cotransfected into human HEK293 cells, and VEGF levels were determined by ELISA and Taqman. As shown in Figure 6, the ZFPs VZ+434b-VP16 and VZ-573a-p65 activated VEGF production in 293 cells by 8- and 6-fold respectively. However, when these two fusions were co-transfected at a 1:1 ratio into the cells, the level of VEGF gene activation (30-fold) was more than additive, compared to the levels induced by each individual ZFP. A similar synergy between the ZFPs VZ+434b-p65 and VZ-573a-VP16 was also observed.

[322] *Comparison of VEGF induction by ZFPs with levels of VEGF-A induced by hypoxia.* -

In order to assess the magnitude of activation of VEGF-A expression by ZFP fusions, with respect to activation of VEGF by a physiologically relevant processes, VEGF levels induced by ZFP fusions were compared with those induced by hypoxia. For many of the ZFP fusions tested, for example ZFP VZ+434b, the ZFPs were capable of activating VEGF-A expression to a level higher than that induced by hypoxia. As shown in Figure 7, HEK293 cells grown under hypoxic conditions had a steady-state VEGF-A mRNA level that was 5-fold higher than that in cells grown in normoxic conditions (Figure 7B), and accumulated VEGF-A protein to nearly 400 pg/ml in the culture medium (a 10-fold increase, Figure 7A). ZFP VZ+434b fused to a p65 activation domain induced expression of the VEGF gene to levels 5- to 10-fold greater than that induced by hypoxia, as evidenced by an accumulation of VEGF protein in culture medium to nearly 4000 pg/ml (Figure 7A) and a 20-fold increase in VEGF mRNA level (Figure 7B). This observation was also confirmed by RNA blot analysis (Figure 7C).

[323] *Activation of multiple VEGF splice variants using a single ZFP.* Several splice variants of human VEGF-A mRNA have been reported, each one comprising a specific exon addition. Ferrara (1999) *supra*. The major VEGF mRNA splice variants produce polypeptides with 121, 165, and 189 and 206 amino acids, although VEGF206 is rarely expressed and has been detected only in fetal liver. Because the designed ZFPs activated gene transcription from the natural chromosomal promoter (see *supra*), they would be expected to activate all of the different VEGF-A transcripts equally, preserving their relative proportions. To confirm this

WO 02/46412

PCT/US01/46861

notion, the ability of the ZFP VZ+434b to activate multiple transcripts from the same promoter was analyzed. To distinguish the splice variants, RT-PCR was performed using primers flanking the regions of differential splicing, such that a distinct PCR product is produced for each splice variant. The PCR products were then analyzed by Southern hybridization using a VEGF165 probe. Three splice variants, VEGF-A-189, VEGF-A-165, and VEGF-A-121 were detected in 293 cells, with VEGF-A-165 being the predominant form. As demonstrated in Figure 7D, the introduction of a single ZFP, VZ+434b, as either a VP16 or a p65 fusion, resulted in a proportional increase in levels of all of the splice variants.

IV. Discussion

- [324] This example demonstrates the successful design of a panel of ZFPs capable of activating the endogenous human VEGF-A gene from diverse target sites within its promoter. The experimental approach incorporated information regarding the chromatin structure of the VEGF-A locus, since, in certain circumstances, information regarding chromatin structure may be used in combination with ZFP design principles to provide efficient means for identifying artificial transcription factors capable of specifically regulating endogenous genes. Several of the designed ZFPs disclosed herein are potent activators, yielding VEGF-A levels exceeding those observed during induction by hypoxia. While an understanding of mechanism is not required for the practice of the disclosed methods and/or use of the disclosed compositions, it is possible that designed ZFP fusions targeted to DNase I accessible regions may act synergistically with the natural transcription factors which presumably bind to these regions.
- [325] The panel of artificial transcription factors disclosed herein, which are targeted to diverse sites in the VEGF-A gene, provides a unique tool for assessing the structural determinants of transcriptional activation at an endogenous locus, and several of the results reflect possible transcriptional effects of chromatin structure. For example, different members of the panel of ZFPs exhibit different patterns of activation of the endogenous VEGF-A locus, compared to an extrachromosomal promoter reporter construct (compare Figures 3B and 3C). Furthermore, the ability of the p65 activation domain to outperform VP16 varies in a position-dependent manner, with relative activation levels varying over a factor of three, depending on the location of the ZFP target within the VEGF-A locus (Figure 5C). These effects could reflect limitations on the capacity of designed transcription factors to activate an endogenous locus resulting from the structural context imposed by chromatin, possibly coupled with the binding of other regulatory proteins. They also reemphasize the idea that

WO 02/46412

PCT/US01/46861

different activation domains have distinct regulatory and steric requirements for optimal performance.

- [326] The ability to generate a panel of factors targeted to an endogenous locus also provides practical advantages in a variety of applications. In studying the effects of up- or down-regulation of a target locus, for example, conclusions regarding gene function will be strongest if a given effect is observed repeatedly using a number of different regulators. In addition, for potential medical uses, the availability of multiple ZFP candidates provides a greater likelihood of obtaining a lead which yields optimal benefits with minimal side effects. Additional possibilities for use of these proteins are in the study of transcriptional regulation.
- 10 For example, the ability to target multiple activation domains to arbitrary sites in the same locus has clear applications in the study of synergy. In this respect, greater than additive effects on VEGF expression, mediated by cotransfected VP16- and p65 activation domain-bearing ZFPs, has been disclosed herein. It is likely that, by using larger combinations of appropriately targeted functional domains, designed ZFPs may offer the prospect for total reconstitution of activation processes using completely defined components.
- 15 [327] An additional observation of the studies disclosed herein is that ZFPs fused with the NF- κ B p65 subunit (Ruben *et al.*, *supra*) activate the endogenous VEGF gene as well as or better than the 78 amino acid activation subdomain of the Herpes Simplex Virus VP16 protein (Sadowski *et al.*, *supra*). Although both VP16 and NF- κ B p65 are strong acidic activation domains and share certain functional features; for example, recruitment of the ARC/DRIP complex and facilitated assembly of a preinitiation complex on promoter DNA (Naar *et al.* (1999) *Nature* 398: 828-832; Rachez *et al.* (1999) *Nature* 398: 824-828); differences in their transactivation mechanism have been reported. For example, the histone acetyltransferase activity of p300 has been demonstrated to be necessary for activation by
- 20 NF- κ B, but less essential for activation by VP16. Kraus *et al.* (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19: 8123-8135; Li *et al.* (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20: 2031-2042. It is possible that the local availability of p300 or other coactivators in the endogenous VEGF locus may account for the observed differences.
- [328] Finally, the designed ZFPs disclosed herein upregulate each major splice variant of VEGF-A, in proportions similar to those observed under physiological conditions (*e.g.*, hypoxia). This is important because recent studies suggest that proper isoform balance is crucial for VEGF-A function. Carmeliet *et al.* (1996) *supra*; Carmeliet *et al.* (1999) *supra*; Grunstein *et al.* (2000) *supra*. In particular, the 165, 189 and 206 amino acid isoforms of
- 30

WO 02/46412

PCT/US01/46861

VEGF-A have increasingly stronger heparin-binding domains, which are involved in presentation to VEGF receptors and in binding to the extracellular matrix. Heparin-binding ability is a critical determinant of VEGF-A potency, resulting in different biological activities for different isoforms. Currently, most VEGF-A gene therapy trials involve the application of just a single VEGF-A splice variant cDNA or protein isoform. Isner *et al.* (1996) *Lancet* 348: 370-374; Esakof *et al.* (1999) *Hum. Gene Ther.* 10: 2307-2314; Rosengart *et al.* (1999a) *Ann. Surg.* 230: 466-470, discussion 470-472; Rosengart *et al.* (1999b) *Circulation* 100: 468-474; Hendel *et al.* (2000) *Circulation* 101: 118-121. It has been suggested that an ideal gene therapy agent should be able to recapitulate natural ratios of various different VEGF-A isoforms. Activation of VEGF-A using the designed ZFPs disclosed herein therefore offers advantages in this regard, providing key components of pro-angiogenic gene therapy agents.

EXAMPLE 2

Activation of an endogenous mouse VEGF gene

[329] The sequence of the murine VEGF gene (GenBank Accession Number U41383) was searched for ZFP target sites and a ZFP, denoted VG10A/8A, was designed to bind to a site between 56 and 73 nucleotides downstream of the transcriptional startsite. The sequence of this target site is 5'-TGAGCGGCGGCAGCGGAG (SEQ ID NO:237). The six-finger ZFP designed to bind this target site has the following amino acid sequences in the recognition helices (proceeding in an N-terminal to C-terminal direction): RSDNLAR (SEQ ID NO:35); RSDELQR (SEQ ID NO:159); QSGSLTR (SEQ ID NO:57); RSDELTR (SEQ ID NO:122); RSDELSR (SEQ ID NO:238) and QSGHLTK (SEQ ID NO:239). This six-finger binding domain was fused to a VP16 activation domain, according to methods described in Example 1. A plasmid encoding this ZFP fusion was co-transfected into mouse cells with a reporter gene under the control of the murine VEGF promoter, and a 29-fold activation of reporter gene activity was observed.

[330] This ZFP fusion construct was also injected into mouse skeletal muscle to test for activation of the endogenous VEGF gene. One hundred microliters of a 1 mg/ml solution of plasmid DNA was injected into two separate sites in the quadriceps muscle of a live mouse. The contralateral quadriceps muscle was subjected to two control injections, of a plasmid lacking ZFP-encoding sequences, at sites in the muscle similar to those receiving the experimental injections. Injection needles were marked to assure similar depths of injection, and sites of injection were marked with India Ink.

[331] Three days after injection, identically-sized tissue samples were harvested from the marked injection sites by punch biopsy. Proteins were extracted from the tissue samples and

WO 02/46412

PCT/US01/46861

separated by gel electrophoresis. The gel was blotted and the blot was probed with an anti-mouse VEGF antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN). Results are shown in Figure 8. The results indicate that production of VEGF is enhanced in mouse muscle that has been injected with a plasmid encoding a ZFP-VP16 fusion, and that the enhancement of VEGF expression is not simply due to injection *per se*.

EXAMPLE 3

Activation of an endogenous rat VEGF gene

[332] Experiments similar to those described in Example 2 were performed on rats, using ZFPs targeted to sites in the rat VEGF gene, certain of which are homologous to ZFP target sites in the human VEGF-A gene and were shown to activate the human VEGF-A gene (see Example 1, *supra*). Sequences of the target sites and recognition helices of these ZFPs are provided in Table 7. ZFP-VP16 fusions were injected into rat skeletal muscle, similar to the mouse injections described in Example 2. Analysis by immunoblotting, using an anti-rat VEGF antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN), showed that all of the ZFP fusions activated rat VEGF production, and that BVO12A-11A, BVO14A-13B, and VOP 32B induced a marked increase in VEGF expression, between 5- and 10-fold.

EXAMPLE 4

Stimulation of wound healing and angiogenesis in mice using VEGF-targeted ZFP fusions

[333] In this example, punch biopsy wounds were made in both quadriceps muscles of a mouse. A plasmid encoding the VG10A/8A ZFP-VP16 fusion under the transcriptional control of a CMV promoter (as used in Example 2, *supra*) was injected into the periphery of one of the wounds, and a control plasmid, lacking sequences encoding a ZFP binding domain, was injected into the contralateral wound. After three days, tissue was excised, and hematoxylin & eosin-stained thin sections were examined microscopically. Results are shown in Figure 9. Figure 9B shows a low-magnification image in which margins of ingrowing tissue are apparent beneath the blood clot covering the wound (clot at top left, margins of ingrowing tissue indicated by arrowheads). In comparison, no ingrowing tissue is seen beneath the clot in the control-injected tissue shown in Figure 9A. Figures 9D and 9F show high-magnification images which reveal increased vascularization in the ZFP-injected tissue, evidenced by a larger number of capillary sections and red blood cells, compared to the control-injected tissue shown in Figures 9C and 9E.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[334] The results of this experiment indicate that activation of the VEGF gene by targeted ZFP fusions leads to faster wound healing and increased vascularization.

EXAMPLE 5

Regulation of multiple human VEGF genes

using a single ZFP fusion protein

[335] In this example, the ability of a single ZFP fusion to regulate a plurality of human VEGF genes was tested. As shown in Table 2, the VOP 28A and VOP 30A ZFPs have target sites in both the VEGF-A and VEGF-C genes. VOP 28A has target sites at -573 in the VEGF-A gene and +61 in the VEGF-C gene; while VOP 30A has a target sites at +42 and +530 in VEGF-A and one at -481 in VEGF-C.

[336] HEK 293 cells were transfected with a plasmid encoding either a VOP 28A-VP16 fusion or a VOP 30A-VP16 fusion, according to the methods described in Example 1, *supra*. Forty hours after co-transfection, VEGF-A mRNA was quantitated by TaqMan[®] as described in Example 1, using the primers and probes shown in Table 5. VEGF-C mRNA was

quantitated in the same RNA samples, according to the methods disclosed in Example 1, using the primers and probe disclosed in Table 8. The results, shown in Figure 14, indicate that each of the VOP 28A and VOP 30A fusion proteins activate production of both VEGF-A and VEGF-C mRNA.

[337] As a control, HEK 293 cells were transfected with a plasmid encoding a VOP 32B-VP16 fusion. VOP 32B has a target site in the VEGF-A gene, at +434, but has no target site in the VEGF-C gene. Strong activation of VEGF-A transcription, but no change in VEGF-C mRNA levels, was observed in these cells (Figure 14).

[338] These results show that multiple VEGF genes can be regulated by a single ZFP, leading to more efficient regulation of angiogenesis.

EXAMPLE 6

In Vivo Induction of VEGF in Mice using VEGF-Targeted

ZFP Fusions and Stimulation of Angiogenesis and Wound Healing

I. Introduction

[339] This series of experiments was designed to demonstrate further the ability of appropriately designed ZFP fusion proteins to activate expression of VEGF *in vivo*, and to show the ability of such proteins to stimulate angiogenesis and wound healing in mouse model systems that are used as models of the corresponding processes in humans.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

[340] Engineered ZFPs and knowledge of chromosomal structure were utilized in a variety of different types of investigations to achieve selective activation of VEGF A. As in Example 1, certain VEGF stimulating ZFPs were designed following identification of targets by DNase I hypersensitive mapping analysis. These initial experiments led to the identification of three different DNase-I accessible regions in both NIH3T3 cells and C127I cells. ZFPs were designed to bind to either a 9-bp or 18-bp target site within the accessible regions identified in each cell type. Each of these designed ZFPs was shown to bind tightly to its intended target with an apparent K_d of < 0.6 nM and more tightly than a naturally occurring transcription factor (SP1).

[341] Fusion proteins containing one of the designed ZFPs and the VP16 transcriptional activation domain (Sadowski et al. (1988) Nature 335: 563-564) were then tested for their ability to activate expression of the endogenous VEGF-A gene in C 127I cells at both the transcript and protein levels. As described more fully *infra*, the results demonstrate that the designed ZFPs were able to activate the endogenous VEGF-A locus and, in so doing,

accelerate processes of angiogenesis, reepithelialization and wound healing.

II. Experimental Procedures

A. Design of VEGF regulating Zinc Finger Proteins

[342] Mapping of DNase I - accessible chromatin regions in the mouse VEGF-A locus.

C127I and NIH3T3 cells were obtained from the American Type Culture Collection and maintained essentially as recommended by the supplier. Nuclei were isolated and treated with DNase I (Worthington) essentially as described (Zhang *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 33,850-33,860; and Liu, *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 11,323-11,334), except that DNase I digests were for 1.5 min at 22 °C and the concentrations of DNase I used were as indicated in the legend to Figure 15A. Genomic DNA isolation, restriction enzyme digestion and Southern blot analysis were then performed essentially as described (Zhang *et al.*, *supra*; and Liu, *et al.*, 2001, *supra*), except that enzymes and probes were as indicated in Figure 15A.

[343] Synthesis of genes encoding zinc finger proteins. The assembly of genes encoding the three-finger ZFPs mVZ+426 and mVZ+509 has been described (Liu *et al.*, 2001, *supra*).

[These designs were referred to, respectively, as VZ+434 and VZ+42/+530 in that study.]

Briefly, oligos encoding α -helix and β -sheet regions of each three-finger protein were assembled using PCR and each resultant ZFP gene was cloned into the pMal-c2 plasmid (New England Biolabs) as a fusion with DNA encoding maltose binding protein.

[344] To assemble the gene encoding the six-finger protein mVZ+57, the following two-step strategy was utilized. First, genes encoding three finger proteins corresponding to fingers

WO 02/46412

PCT/US01/46861

1-3 and 4-6 of VZ+57 were constructed and cloned as above, yielding constructs pMal-c2 '1-3' and pMal-c2 '4-6'. Next, these two genes were joined via a short DNA spacer encoding a flexible peptide linker. This was accomplished as follows: (i) PCR of the '4-6' ZFP gene using the primers 5'

- 5 CCCAGATCTGGTGATGGCAAGAAGAAGCAGCACCATCTGCCACATCCAG (SEQ ID NO:241) and 5' CCCAAGCTTAGGATCCACCCTTCTTGTCTGGTGGGT (SEQ ID NO:242); (ii) digestion of the resultant fragment with Bgl II and Hind III (sites underlined in primers); and (iii) ligation into the BamHI and Hind III sites of the pMal-c2 '1-3'. The resultant protein, VZ+57, consists of the '1-3' and '4-6' three-finger modules connected by a flexible peptide linker, with the amino acid sequence between the second zinc-coordinating histidine of finger 3 and the first zinc-coordinating cysteine of finger 4 (both underlined) as follows: HQNKKGSGDGKKKQHIC (SEQ ID NO:243).

- [345] Binding studies. Binding studies were performed essentially as described (Liu, *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 11,323-11,334), except that the buffer was modified to the following final composition: 10 mM Tris, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.01 mM ZnCl₂, 10% glycerol, 200 µg/ml bovine serum albumin, 0.02% IGEPAL. Under these conditions SP1 (a naturally occurring zinc finger containing transcription factor used as a control) exhibits a significantly higher affinity than was determined in previous studies (Liu *et al.*, 2001, *supra*) and it is likely that the use of our refined binding buffer contributed to the difference in apparent K_d. ZFP concentrations for these studies were determined directly by measuring the DNA-binding activity of each ZFP preparation using conditions under which binding is essentially stoichiometric (*i.e.*, concentrations of ZFP and target site >50x K_d).

- [346] Construction of retroviral vectors. The retroviral vectors described here are derived from a pLXSN, a Moloney murine leukemia virus-based vector containing a neomycin resistance gene under the control of an internal simian virus (SV40) promoter. Using EcoRI and XhoI restriction sites, the zinc finger expression cassette was placed immediately downstream of the LTR in pLXSN. Briefly, all ZFP constructs contained an N-terminal nuclear localization signal (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val)(SEQ ID NO:224) from SV40 largeT antigen, a Zinc Finger DNA-binding domain, the herpes simplex virus VP16 activation domain from amino acid 413 to 490, and a FLAG peptide (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys)(SEQ ID NO:225). The LXSN vectors were produced in the 293 AMPHO-PAK™ cell line and had titers ranging from 0.5-1.0 × 10⁶ G418-resistant colony-forming units. Virus-containing supernatant was collected 48 hr after transfection, filtered through

WO 02/46412

PCT/US01/46861

0.45-mm-pore-size filter and used fresh for transduction of target cells or aliquoted and stored at -80°C .

- [347] Retroviral transduction. The AMPHO-PAK™ 293 cell line was obtained from Clontech and grown according to the manufacturer's recommendation. C127I cells were
 5 obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum. The cells were plated in 6-well plates at a density of 2×10^4 cells per well and then exposed 24 hour later to 2.0 ml of virus-containing supernatant in the presence of 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene, and incubated in a 37°C incubator. The virus was removed 24 hour later and fresh medium was
 10 added. The cells were split 2 days later and G418 containing medium was added. A G418-resistant population of cells was established 14 days later and tested for VEGF expression by ELISA. The cells were plated at a density of 5×10^5 cells per well, refed at 24 hours and media was collected for ELISA after 24 hours.

B. Adenovirus Construction and Experiments

- [348] Construction. Recombinant E1A/E1B deleted adenovirus vectors encoding zinc finger protein (ZFP) cDNA's were produced using the Ad-Easy system (T.-C. He, *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 2509-2514). Briefly, cDNA's encoding VEGF regulating ZFP's were subcloned into the pAd-Track-CMV shuttle vector. This vector contains two
 15 separate CMV promoters, one to direct expression of inserted cDNA's and the other to direct expression of the transduction marker green fluorescent protein (GFP). In this shuttle vector, both the green fluorescent protein and the cDNA expression cassettes are flanked by genomic adenovirus-5 sequences, allowing recombination with genomic adenovirus-5 DNA (T.-C. He, *et al.* (1998) *supra*). More specifically, ZFP-encoding inserts from pcDNA MVG (a plasmid
 20 encoding the zinc finger binding domain VG10A/8A as described in Example 2 *supra*) and three-finger constructs pCV VOP 30A and pCV VOP 32B were cut by restriction digestion with EcoRI / HindIII and sub-cloned into shuttle plasmid pAdTrack-CMV, linearized with PmeI.

- [349] Each construct was co-electroporated along with the adenovirus-5 genomic vector pAd-Easy-1 into electrocompetent BJ5183 *E.coli* bacteria. Adenovirus-5 genomic DNA
 30 clones encoding the VEGF regulating ZFP's and deficient for the essential adenovirus E1A/E1B gene region were obtained by recombination between the ZFP encoding pAd-Track-CMV shuttle vectors and pAd-Easy-1 in *E.coli*. Kanamycin resistant colonies were screened for recombinants by restriction mapping, and clones with the appropriate restriction pattern were transfected into human embryonic kidney 293 cells (HEK 293's) using the

WO 02/46412

PCT/US01/46861

Lipofectamine reagent. HEK 293's contain the E1A/E1B genes and provide these essential proteins in trans to allow production and propagation of the replication defective E1A/E1B deficient adenovirus recombinants. These recombinants do not propagate in normal mammalian cells due to the lack of E1A/E1B gene functions. Adenovirus stocks were expanded in 293 cells, purified by CsCl ultracentrifugation, desalted by column purification or dialysis against phosphate buffered saline, and titered on HEK 293 monolayers as described (see, *e.g.*, Giordano, *et al.* (1996) *Nat. Med.* 2:534-9; and Giordano *et al.* (1997) *Circulation* 96:400-3). Adenovirus stocks were stored in 20% glycerol at -80 °C.

[350] In vitro testing. To document that the above adenovirus vectors were capable of directing expression of the VEGF-A regulating ZFP's after transduction, studies were performed in cultured rat aortic smooth muscle cells (SMC). As indicated above, the ZFP constructs used in these studies contain both a FLAG epitope and a VP-16 activation domain. Adenovirus-mediated expression of the ZFP constructs was thus evaluated by Western blot analysis of proteins expressed in the SMC using antibodies directed to the FLAG epitope and the VP-16 activation domain. Briefly, SMC were grown in culture to subconfluence and were transduced with adenovirus vectors encoding either a ZFP or green fluorescent protein (GFP) (control). Transduction was carried out at a multiplicity of infection of approximately 5. 48 hours after transduction the cells were scraped and protein lysates obtained for Western blot analysis using specific antibodies against either the FLAG epitope (Fisher Scientific) or VP-16.

C. Induction of the VEGF-A gene in Skeletal and Cardiac Muscle by VEGF-ZFP's

[351] Plasmid Injection Studies The ability of a number of different VEGF-A regulating ZFPs to induce expression of the endogenous VEGF-A gene was tested *in vivo* in rat skeletal muscle. Initial studies were carried out using plasmid DNA expression vectors encoding either a VEGF-A regulating ZFP fusion protein or a control protein containing the same peptide sequences absent the DNA binding domain. A commercially available plasmid in which gene expression is directed by the CMV promoter (pCDNA-3; Clontech) was used as the backbone for construction of the ZFP encoding plasmids.

[352] Fifty µg of purified plasmid DNA encoding a VEGF-A regulating ZFP was diluted into 50 µl of phosphate buffered saline (PBS) and aspirated into a 1 cc syringe. A small incision was made in the skin overlying the adductor muscle of the hindlimb of a Sprague-Dawley rat, and the plasmid DNA was injected directly into the muscle through a 30 gauge needle. The site was marked by injecting a small amount of India ink at the point of plasmid

WO 02/46412

PCT/US01/46861

DNA delivery. Fifty µg of the control plasmid was injected into the contralateral hindlimb adductor muscle using the same methods. At day 3 or 6 after plasmid delivery, the rats were sacrificed and skeletal muscle from the plasmid injection sites was harvested using a 1 cm diameter punch biotome. The muscle tissue was rinsed in ice-cold PBS and rapidly frozen in liquid nitrogen and used for subsequent VEGF-A protein expression analysis by Western blotting.

[353] ZFP-directed VEGF-A protein expression was also evaluated in heart muscle using a similar approach. Briefly, in anesthetized and ventilated CD-1 mice, the heart was exposed by left lateral thoracotomy. Fifty µg of plasmid DNA encoding either a VEGF-ZFP or the control peptide was injected in a 50 µl volume into the apex of the heart. Injection was documented by blanching of the injection site. The chest was closed and the animal allowed to recover. Three days after injection the animals were sacrificed and the heart removed. The apex was clipped, rinsed in ice cold PBS, rapidly frozen in liquid nitrogen and used for subsequent VEGF-A protein expression analysis by Western blotting (data for these experiments is not shown). Similar techniques can be used with rats.

[354] Adenovirus Injection Studies. Using methodology similar to that used for the plasmid DNA injection studies, VEGF-ZFP encoding or control (green fluorescent protein encoding) adenovirus vectors were injected into the hindlimb adductor muscle of CD-1 mice. Approximately 5×10^8 pfu of VEGF-ZFP encoding adenovirus was injected in a 50 µl volume of PBS into the adductor muscle using a 1cc syringe and a 30 gauge needle, as above. The contralateral adductor muscle was injected with a green fluorescent protein encoding control adenovirus. Three or six days after adenovirus injection the skeletal muscle injection site was harvested as above for Western blot analysis of VEGF-A protein expression. For those VEGF-ZFP's that were designed to bind to DNA sequences in both the murine and rat VEGF-A regulatory domains (VOP 30A, VOP 32B, BVO12), *in vivo* testing was also carried out in the rat hindlimb adductor muscle. These studies were carried out essentially as above, although the volume of the injectate was increased to 100 µl. Related experiments were also conducted with plasmids in the same volume.

D. Murine Ear Angiogenesis Assay

[355] To test the ability of the designed VEGF-ZFP's to induce angiogenesis *in vivo*, angiogenesis in the murine ear after injection of adenovirus vectors encoding either VEGF regulating ZFP's or the control peptide green fluorescent protein was evaluated (see, e.g., Pettersson, A., *et al.* (2000) *Laboratory Investigation* 80:99-115). Briefly, using a 1cc syringe and a 30 gauge needle $\sim 3 \times 10^8$ pfu of VEGF-ZFP encoding adenovirus was injected

WO 02/46412

PCT/US01/46861

subcutaneously into the mouse ear in a volume of ~25 μ l PBS. The contralateral ear was similarly injected with an equal amount of control (green fluorescent protein) adenovirus. Three and six days after injection, the ears were visually inspected and digital photographs obtained using the same settings at the same distances. The animals were sacrificed, the ears

- 5 harvested and fresh frozen in OTC for immunohistochemical analysis of angiogenesis.
- [356] Vessel Counts. Angiogenesis/vascularization in the mouse ear was evaluated on fresh frozen tissue sections using an anti-lectin antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA) that is specific for endothelial cells (see, *e.g.*, Christie, K.N. and Thomson, C. (1989) *J.Histochem. Cytochem.* 37:1303-1304). Briefly, frozen sections were fixed with acetone,
- 10 rinsed with PBS, and incubated for 2 hours with the anti-lectin antibody. Following three sequential wash steps, the sections were incubated for 2 hours with a secondary antibody linked to alkaline phosphatase and the slides were developed using a commercial alkaline phosphatase staining kit (Vecta Inc.). Vessel counts were determined on the basis of microscopic analysis of anti-lectin immunostaining by an observer blinded to the identity of
- 15 the sections. Five separate 40x microscopic fields were evaluated per section, and the number of lectin stained vessels per field was averaged.

E. Wound Healing

- [357] To evaluate the ability of the VEGF-A regulating ZFP's to augment angiogenesis in a functional *in vivo* biologic assay we used a well established model of cutaneous wound
- 20 healing (see, *e.g.*, Swift, M.E., *et al.*, (1999) *Lab Invest.* 79:1479-87). Highly reproducible bilateral dorsal cutaneous wounds were created in CD-1 mice by excision of a 5 mm circle of skin using a 5 mm punch biotome. Healing of these wounds involves production of granulation tissue, reepithelialization by ingrowth of keratinocytes and an angiogenic response. At the time of wound creation $\sim 5 \times 10^6$ pfu of VEGF-ZFP encoding adenovirus was
- 25 delivered to the wound site by topical application in a volume of 20 μ l PBS. The contralateral wound site was treated with a control adenovirus encoding green fluorescent protein.
- [358] On day 5, the wound sites were excised whole, carefully bisected, formalin fixed and embedded in paraffin blocks. Multiple serial sections were obtained and used for histologic and immunohistologic analysis. Wound reepithelialization was analyzed on hematoxylin and
- 30 eosin stained sections evaluated under light microscopy with 4X and 40X objectives. Micrographic images were captured with a SPOT CCD camera and imported into Adobe Photoshop for analysis. Two parameters of reepithelialization were evaluated: a) the distance from the wound edge to the leading edge of keratinocyte ingrowth, and b) the distance between the leading edges of keratinocytes growing in from opposite sides of the wound. All

WO 02/46412

PCT/US01/46861

measurements were made quantitatively using computer calipers, and all sections were evaluated by an observer blinded to the treatment.

[359] Wound vessel counts were determined by immunostaining of wound sections using the endothelial cell specific anti-lectin antibody described above. Vessel counts from 5 separate microscopic fields were made per section (100x magnification) and the results per section averaged.

F. Western Blot Analysis

[360] For Western Blot analysis of ZFP induced VEGF expression, animals were killed by euthanasia at the 3rd day after adenoviral-ZFP or control adenoviral- green fluorescent protein (GFP) injections. Skeletal muscles around the injection sites were carefully removed and homogenized at 4 °C in lysis buffer containing Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), NaCl 150 mM, SDS 0.1%, NP-40 1%, Na Desoxycholate (0.5%) and proteinase inhibitors. After a ten-minute centrifugation (10,000g at 4 °C), the protein-containing supernatant fraction was collected, a small part of each sample was used to determine protein concentration (BioRad) and samples were diluted (1:1) with 2xloading buffer containing 50 mM DTT and denatured by boiling 5 min. Samples containing equal amounts of total protein were loaded on and separated by electrophoresis through 12% SDS-PAGE gels (Tris-Glycine, Novex). Proteins in the gel were transferred to nitrocellulose membranes and the membranes were exposed to mouse monoclonal anti-VEGF antibody (RDI) to check the level of VEGF expression, rabbit polyclonal anti-VP16 antibody (Clontech) to check expression of ZFP-VP16 fusion protein, and mouse monoclonal anti-muscle specific actin antibody (NCL) as an internal standard. After several washes in TBST, the blots were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody for 1h at room temperature, followed by TBST washes, and developed with an enhanced chemiluminescent substrate for detection of HRP (Pierce).

III. Results

A. Mapping of DNase I accessible regions in the mouse VEGF-A locus

[361] The strategy for designing ZFP transcriptional regulators involved the preferential targeting of accessible regions within the locus of interest. Such regions, which are readily identified via mapping of DNase I hypersensitive sites (Gross *et al.* (1988) Ann. Rev. Biochem. 57: 159-197), are generally more accessible to macromolecules than surrounding stretches of DNA, and these regions often comprise binding sites for natural transcriptional regulators of the associated genes. Preferential targeting of such regions with designed ZFPs tends to yield both more effective regulation and greater potency of response (Liu *et al.*

WO 02/46412

PCT/US01/46861

(2001) *J. Biol. Chem.* 276:11,323 – 11,334). Accordingly, we have mapped DNase I accessible regions in mouse VEGF-A locus. In both NIH 3T3 cells and the C127 I cell line, we observe three regions of enhanced DNase I accessibility centered approximately on bases –550, +1, and +400 (numbers relative to the start site of transcription) (Figure 15A and 15B). The –550 and +1 regions each appear to span approximately 200 base pairs, while the +400 region is somewhat more diffuse and encompasses approximately 300 base pairs (Figures 15A and 15B). We have also observed similar patterns of DNase I accessibility in mouse TM3 cell line (data not shown) and in a variety of cell types from man and rat (Liu *et. al.*, 2001, *supra*).

10 B. Design and biochemical characterization of ZFPs targeted to open chromatin regions of mouse VEGF-A

[362] We next chose target sites within the ‘+1’ and ‘+400’ accessible regions and designed zinc finger proteins that recognized these sequences with high affinity (Figure 15C). This was accomplished by linking together fingers of known triplet preference to yield either three- or six- finger ZFPs with the desired sequence specificities. Designs for our ZFPs are shown in Figure 15C, with the ZFPs named according to their target location relative to the transcription start site of mouse VEGF-A. Two of these designs, mVZ+426 and mVZ+509, contain three fingers and target nine base pair sequences conserved in man and mouse. Our third ZFP, mVZ+57, contains six fingers and targets an 18 base pair sequence present in mouse (but not man).

[363] Genes for our ZFPs were assembled (see experimental procedures) and each protein was expressed and purified essentially as described (Liu *et. al.*, 2001, *supra*; and Zhang *et. al.*, *supra*). We then characterized the DNA-binding affinity of each ZFP using a gel shift assay. Procedures for these studies were essentially identical to those described previously (Liu *et. al.*, 2001, *supra*; and Zhang *et. al.*, *supra*) except for the use of a modified binding buffer. We found that our designed ZFPs bound to their targets with high affinity, with K_d 's of 0.031 nM (Figure 15D). For comparison, SP1, the parent ZFP for our designs, exhibited an apparent K_d of 0.053 nM for its DNA target under these conditions.

25 C. Activation of the mouse VEGF-A locus by ZFPs

[364] We chose to use C127 I cells for our initial studies of VEGF-A activation, since this cell line exhibited a relatively low background of endogenous VEGF-A expression against which to measure activation mediated by our designed ZFPs. For these studies, each ZFP was cloned into pLXSN, a Moloney murine leukemia virus-based vector, as a fusion with a VP16 activation domain, nuclear localization sequence, and FLAG tag. C127 I cells were then

WO 02/46412

PCT/US01/46861

exposed to this vector, and transduced cell populations were selected using G418. As shown in Figure 16B, expression of our ZFP-VP16 fusions resulted in activation of the VEGF-A locus as determined by analysis of VEGF-A mRNA, with relative levels of VEGF-A message increasing by up to 4.6-fold for VZ+426-VP16 relative to a control construct expressing a

- 5 VP16 activation domain fused to green fluorescent protein. We also observed similar increases in the levels of VEGF-A protein secreted into the medium as measured by ELISA (Figure 16C).

D. Induction of the VEGF-A gene in skeletal and Cardiac Muscle by VEGF-binding ZFPs

- 10 [365] In vitro characterization of adenovirus-mediated expression of VEGF-A regulating ZFP's. Prior to in vivo testing of the recombinant adenovirus constructs encoding the VEGF-A regulatory ZFP's, expression of the ZFP's was documented by Western blot analysis. Aortic smooth muscle cells (SMC) were transduced with an adenovirus encoding either a VEGF-A regulating ZFP or a green fluorescent protein (GFP). 48 hours after transduction the
- 15 cells were washed with phosphate buffered saline and protein lysates prepared. Western blot analysis using either an anti-VP16 antibody or an anti-FLAG epitope antibody revealed expression of the ZFP constructs in adeno-VEGF-ZFP transduced cells, but not in adeno-green fluorescent protein (GFP) transduced cells (Figure 17A).

- [366] VEGF-A protein expression after injection of recombinant adenovirus encoding
- 20 VEGF-A regulating zinc finger protein VOP30A. Approximately 5×10^8 pfu of an adenovirus encoding a fusion protein comprising the VOP 30A ZFP binding domain fused to a VP16 activation domain (Adeno-VOP 30A) was injected in a volume of 50 μ l phosphate buffered saline into the hindlimb adductor muscle of CD-1 mice. The contralateral hindlimb adductor muscle was injected with adenovirus encoding green fluorescent protein (adeno-
- 25 GFP) as a control. Three days after the injection, the muscle encompassing the injection sites was harvested and used to prepare protein lysates for Western blot analysis of VEGF protein expression. As illustrated in Figure 17B, adenovirus-mediated VOP30A gene expression resulted in a marked induction of the VEGF-A gene in vivo as demonstrated by the marked increase in VEGF-A protein expression. Western blotting with anti-VP16 antibody
- 30 documents expression of the VOP30A construct in the injected muscle.

[367] Induction of VEGF-A protein expression in mice after injection of Adeno-MVG. Skeletal muscle injection of adeno-MVG or adeno-GFP (green fluorescent protein) as a control was accomplished as just described supra. Three days after injection, VEGF-A protein expression was evaluated by Western blot. Induction of VEGF-A protein expression

WO 02/46412

PCT/US01/46861

was observed as shown in Figure 17C. Equal loading of skeletal muscle protein lysates is documented by immunostaining for actin.

[368] VEGF-A protein expression in rats after skeletal muscle injection of plasmids encoding VEGF-A regulating zinc finger proteins. Tests were conducted in which plasmids encoding the ZFPs VOP 30A, VOP 32B, BVO12A, BVO14A or a control plasmid (lacking the ZFP binding domain) were injected into the hindlimb adductor muscle of Sprague-Dawley rats. In all plasmids, protein expression was directed by the CMV promoter. Three days after gene injection, the injection sites were excised. The results from Western blot analysis of the resulting protein lysates as shown in Figure 17D show induction of VEGF-A protein by all four constructs.

E. Induction of Angiogenesis

[369] Subcutaneous injection of recombinant adenovirus encoding VEGF regulating zinc finger proteins induces angiogenesis in the mouse ear. To assess the ability of VEGF-A regulating zinc finger proteins to induce angiogenesis *in vivo* we injected recombinant adenovirus encoding VEGF-A regulating ZFP's subcutaneously into the mouse ear. Approximately 5×10^8 pfu were injected in a volume of 25 μ l subcutaneously into the ear of CD-1 mice. The contralateral ear was injected in the same manner with a control adenovirus encoding green fluorescent protein (GFP). Three days and six days later the animals were visualized and digital photographs of the ears were taken. As shown in Figures 18A-D, adenovirus-mediated delivery of genes encoding VEGF-A regulating ZFP's (VOP30A or VOP 32B) resulted in augmented ear vascularization. These results were correlated with data from formal vessel counts, as shown in Figure 18E.

[370] Increased vascularity is documented by vessel counts after adenovirus-mediated delivery of genes encoding VEGF-A regulating zinc finger proteins. To further characterize the effects of adenovirus-mediated delivery of genes encoding VEGF-A regulating ZFP's in the ear angiogenesis assay just described, immunohistochemistry facilitated vessel counts were performed on sections from control and VEGF-ZFP (VOP30A or VOP 32B) treated mouse ears. Vessel counts were performed by an observer blinded to the treatment group, and were determined by counting 5 separate fields per section at a magnification of 40x and averaging the values (n=5 per group at day 3; n=4 per group at day 6). As shown in Figure 18E, assays conducted utilizing this approach also found a significant increase in vascularity for ears injected with adenovirus encoding a ZFP (black box) as compared to adenovirus encoding green fluorescent protein (gray box).

WO 02/46412

PCT/US01/46861

Neovasculture resulting from activation of the endogenous VEGF-A gene by the ZFP constructs is not hyperpermeable. Additional ear angiogenesis studies used a modification of a previously described approach (Thurston, G., et al., 2000, Nature Medicine 6:460-463). Briefly, adenovirus vectors encoding either a VEGF-A activating ZFP or murine VEGF164 were injected subcutaneously in the ears of CD-1 mice (10^6 pfu in 15 μ l volume). Contralateral ears were injected with adenovirus encoding GFP. Digital photographs were obtained after three or six days. Evans Blue dye (200 μ l of 4% solution) was injected by tail vein and the distribution in the ears was assessed and photographed three hours later. The mice were then sacrificed, ears embedded in OCT and frozen in liquid nitrogen cooled isopentane. 5 μ m sections were fixed with cold acetone:methanol, immunostained with a monoclonal anti-PECAM antibody and vessel counts obtained as previously described (Giordano, F. J. et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:5780-5785)

[371] VEGF is a potent vascular permeability factor and has been shown to induce hemorrhage and extravasation of intravascular dye in the mouse ear model (Pettersson, A. et al., 2000, Lab. Invest. 80:99-115). Interestingly, when compared to ears similarly treated with an adenovirus encoding murine VEGF164, the ZFP-induced neovasculture was not spontaneously hemorrhagic and was not permeable to Evans Blue dye infusion (see Figure 22). In other experiments, expression of angiopoietin 1, a growth factor previously shown capable of promoting the growth of a more 'mature' non-leaky neovasculture, was not induced in the VEGF-ZFP treated cells.

[372] As shown in Figure 22, the neovasculture resulting from ZFP-induced expression of VEGF-A expression was not hyperpermeable as was that produced by murine VEGF164 cDNA expression.

F. Accelerated Wound Healing

[373] Cutaneous wound healing is accelerated by VEGF-A regulating ZFP's. Bilateral cutaneous wounds were created in the backs of CD-1 mice by excision of a 5 mm circle of skin using a punch biotome. At the time of wounding, adenovirus encoding a VEGF-A regulating zinc finger protein (MVG) was applied topically to the wound. The contralateral wound was treated by topical application of a control adenovirus encoding green fluorescent protein.

[374] Shown in Figures 19A and 19B is an example of how treatment with the VEGF-A regulating ZFP augments the degree of reepithelialization noted at day 5 post-wounding. The arrows denote the leading edge of keratinocyte ingrowth into the wound. As is apparent, and as is shown in the graph of Figure 19C, the distance between the edges of keratinocyte

WO 02/46412

PCT/US01/46861

ingrowth is decreased by VEGF-ZFP treatment; thus reepithelialization is augmented. All measurements were performed using captured digital images and a computer caliper program. The values shown in the graph are relative units.

[375] Wound reepithelialization is augmented by treatment with VEGF-A regulating ZFP's.

5 As depicted in Figure 20A and 20B, ingrowth of the leading edge of keratinocytes into the wound is augmented by the topical application of recombinant adenovirus encoding a VEGF-A regulating ZFP (MVG). The arrowheads in the lower left of Figures 20A and 20B mark the wound edge and the upper arrow in each figure marks the extent of keratinocyte ingrowth at day 5 post-wounding. This analysis is complementary to the quantitation of the distance
10 between the keratinocyte ingrowth cones noted in Figures 19A and 19B.

[376] Treatment of cutaneous wounds by topical application of recombinant adenovirus encoding VEGF-A regulating zinc finger proteins results in angiogenesis and increased vascularity. Cutaneous wounds were treated as just described with either adenovirus encoding a VEGF-A regulating ZFP (MVG) or a control adenovirus encoding green fluorescent protein
15 (GFP). Wounds were fixed, sectioned and immunostained with an antibody against an endothelial cell specific lectin. As shown in Figures 21A and 21B, there is increased vascularity in the VEGF-ZFP treated wounds (Figure 21A) as compared to the control wounds (Figure 21B). Vessel counts were performed on digitally captured images and represent the average of 5 high power fields per section (n=6 per group). The results with this
20 approach (see Figure 21C) are consistent with the immunostaining results.

IV. Discussion

[377] The results of the experiments described in this example illustrate the ability to design ZFPs capable of tightly binding to target sites within the promoter region of the VEGF-A gene utilizing the approaches described herein. Certain of the ZFPs were found to bind more
25 tightly to their intended target site than the naturally occurring transcription factor SP1. The ability of these ZFPs to function in vitro was shown by transfecting C 127I cells with constructs encoding the ZFPs and demonstrating increased expression of VEGF-A at both the transcript and expressed protein level.

[378] Using several different accepted model systems for angiogenesis and wound healing,
30 the results from these investigations also show that ZFPs can be utilized to modulate angiogenesis and thus affect a wide variety of conditions that are correlated with blood flow and blood delivery. More specifically, the foregoing results demonstrate that one can regulate angiogenesis by introducing plasmid or viral constructs encoding a ZFP having appropriate binding capability to modulate expression of one or more VEGF genes *in vivo* and to thereby

WO 02/46412

PCT/US01/46861

modulate vessel formation. As an example of the utility of this general approach, the results of certain of the model studies conducted in this example show that introduced ZFPs can significantly accelerate wound reepithelialization and wound healing. Such utility was demonstrated using accepted model systems and by established histological and immunohistological methods. In view of these results, it is expected that the approaches illustrated in this example can be utilized in other treatment applications that are based upon regulation of angiogenesis. By judicious selection of either an appropriate activation domain or repressor domain with the ZFP, one can selectively increase or reduce angiogenesis depending upon the nature of the condition being treated. While this particular set of investigations was conducted using viral or plasmid constructs to introduce ZFPs into a cell, other delivery methods such as described supra can also be utilized. It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims. All publications, patents and patent applications cited herein are hereby incorporated by reference in their entireties for all purposes to the same extent as if each individual publication, patent or patent application were specifically and individually indicated to be so incorporated by reference.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

TABLE 1 Regions of VEGF Genes Examined for Potential Target Sites¹

A	B ²	C	D	PlGF ²	Viral VEGF-E
-2.3	-1.0	-0.60	-1.0	-1.0	-2.3
+1.1	+0.32	+0.51	+1.0	+1.0	+6.2

¹Numbers indicate the number of kilobase pairs upstream (negative number) or downstream (positive number) from the transcriptional start site which were examined.

²The PlGF sequence, and the portion of the VEGF-B sequence between -1.0 and -0.4, are based on high-throughput genome sequence data that may be subject to change.

TABLE 2 Locations of Target Site in VEGF Sequences

ZFP NAME	VEGF A	VEGF B	VEGF C	VEGF D	VEGF E (PlDGF)	Viral VEGF
BVO 13A	+851					
EP10A	-1083	-31	-252			
	+534					
GATAB227678	-485	-170			+183	
HBV 3	+779		-245			
HP38 4A	-2248	-119	+479	+805	-29	
	-1413		+510		+210	
	-1055					
	-633					
HUM 17A	-1002				-33	
	+472					
HUM 19A	-1016					
MTS 5A	-2251				+213	
MX1E	+851					
PDF 5A	+590				-748	
RAT 24A	+711					
SAN 16A	-1954					
USX 3A	+554		-230			
	+928					
VEGF 1	-8				-454	
					-348	
					-36	
VEGF 1*3	-8				-454	
					-348	
					-36	
VEGF 1A	-8				-454	
					-348	
					-36	
VEGF 1B	-8					
VEGF 1C	-8					
VEGF 1D	-8					
VG 10A	-1412	-774				
	-354					
VG 1B	-2252	-943				
VG 4A	-1083	-31	-252			
ZFP NAME	VEGF A	VEGF B	VEGF C	VEGF D	VEGF E (PlDGF)	Viral VEGF

WO 02/46412

PCT/US01/46861

VG 8A	-2248 -633 -475 -391	-119 -784	+479 +510	+313 +805	-903 -29 -22 +179 +210	+575
VOP 28A-2	-573		+61			
VOP 30A-4	+42 +530		-481			
VOP 32A-6	+434					
VOP 32B-7	+434					
VOP 35A-10	+892					
ZEN-7A 1	-1273 -573	-945	+61		-675	
BVO 10A-9A	+621					
BVO 12A-11B	+806					
BVO 14B-13A	+851					
VOP 29A-3	+5					
VOP 32C	+434					
VOP 32D	+434					
VOP 32E	+434					
VOP 32F	+434					
VOP 32G	+434					
VOP 32H	+434					
VOP 32I	+434					
VOP 32J	+434					

WO 02/46412

PCT/US01/46861

TABLE 3 Target sites and recognition helix sequences of human VEGF-targeted ZFPs

ZFP NAME	TARGET	SEQ. ID NO	F 1	SEQ ID NO	F 2	SEQ ID NO	F 3	SEQ ID NO	K _d (nM)
BVO 13A	ATGACCGG	1	RSDHLR	30	DRSHLR	59	RSDALTR	88	<.02
BP10A	KGAGCTGG	2	RSDHLTT	31	DRSHLR	60	RSDHLK	89	0.35
GATA22678	GAGGCTGG	3	RLDSLR	32	DRSHLR	61	RSDHLR	90	1.8
HEV 3	GAGGAGGG	4	QTGHLR	33	QSGHLR	62	RSDHLR	91	30
HP38 4A	GDTGGGGG	5	RSDHLR	34	RSDHLTT	63	QRAHLR	92	0.75
HUM 17A	ARGGGGAG	6	RSDHLR	35	RSDHLR	64	RSDHLTR	93	<.02
HUM 19A	TGGGAGAC	7	DRSHLR	36	QSGHLR	65	RSDHLTT	94	0.02
MTS 5A	TGGGGGTGG	8	RSDHLTT	37	RSDHLR	66	RSDHLTT	95	0.07
MXLE	ATGACCGG	9	RSDHLR	38	DRSHLR	67	RSDALR	96	3.4
PDF 5A	GTAAGGCC	10	DRSHLR	39	RSDHLR	68	QSGHLR	97	23
PAT 24A	GAGGAGGC	11	RSDHLR	40	QSGHLR	69	RSDHLR	98	<.02
SAN 16A	AGGAGGGG	12	RSDHLR	41	QSGHLR	70	RSDALR	99	1.03
USX 3A	GCGGGGGG	13	RSDHLR	42	RSDHLR	71	DRSDHLR	100	0.06
VEGF 1	GCGGAGGVK	14	TYSNLR	43	RSDHLR	72	RSDHLR	101	2.63
VEGF 1*	GCGGAGGVK	15	TYSNLR	44	RSDHLR	73	RSDHLR	102	3
VEGF 1A	GCGGAGGVK	16	TYSNLR	45	RSDHLR	74	RSDHLR	103	0.2
VEGF 1B	GCGGAGGVK	17	TYSNLR	46	RSDHLR	75	RSDHLR	104	2
VEGF 1C	GCGGAGGVK	18	TYSNLR	47	RSDHLR	76	RSDHLR	105	1
VEGF 1D	GCGGAGGVK	19	TYSNLR	48	RSDHLR	77	RSDHLR	106	2
VG 10A	GAGGGGGG	20	QSGHLR	49	RSDHLR	78	QSGHLR	107	ND
VG 1B	GAGGGGGG	21	RSDHLR	50	RSDHLR	79	RSDHLR	108	ND
VG 4A	GCGGGGCTGG	22	RSDHLTT	51	DRSHLR	80	RSDHLR	109	ND
YOP 28A-2	GCGGGGCT	23	QSGHLR	52	RSDHLR	81	RSDHLR	110	.35
		24	QSGHLR	53	DRSHLR	82	RSDHLR	111	<.02
YOP 30A-4	GCTGGGGG	25	DRSHLR	54	RSDHLR	83	QSGHLR	112	<.02

WO 02/46412

PCT/US01/46861

ZFP NAME	TARGET	SEQ. ID NO.	F 1	SEQ. ID NO.	F 2	SEQ. ID NO.	F 3	SEQ. ID NO.	K _a (nM)
VOP 32A-6	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	MSHLR	84	RSDHLSR	113	<.02
VOP 32B-7	GGGGGTGAC	27	DRSNLTR	56	TSGLR	85	RSDHLSR	114	<.02
VOP 32A-10	CTGGAGACA	28	QSSDLTR	57	QSSHLR	86	QSSDLTR	115	<.02
ZEN-7A.1	GGGGGGCT	29	QSSDLTR	58	QSSHLR	87	RSDHLSR	116	.43
VOP 29A-3	GAGGCTTGG	244	RSDLT	51	QSSDLTR	112	RSDHLSR	42	<.02
VOP 32-C	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TSGLR	245	RSDHLSR	68	ND
VOP 32-D	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TSGLR	246	RSDHLSR	68	ND
VOP 32-E	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TSGLR	247	RSDHLSR	68	ND
VOP 32-F	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TSGLR	248	RSDHLSR	68	ND
VOP 32-G	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TSGLR	249	RSDHLSR	68	ND
VOP 32-H	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TSGLR	250	RSDHLSR	68	ND
VOP 32-I	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TSGLR	251	RSDHLSR	68	ND
VOP 32-J	GGGGGTGAC	26	DRSNLTR	55	TSGLR	252	RSDHLSR	68	ND

TABLE 4 Target sites and recognition helix sequences of human VEGF-targeted ZFPs

ZFP NAME	TARGET	SEQ ID NO	F 1	SEQ ID NO	F 2	SEQ ID NO	F 3	SEQ ID NO	F 4	SEQ ID NO	F 5	SEQ ID NO	F 6	SEQ ID NO
EVO 10A-9A	GTGGAGGGGTCGGGGCT	117	QSSDLTR	120	RSDHLTR	123	DRSALR	126	RSDHLTR	129	RSDHLTR	132	RSDALTR	135
EVO 12A-11B	GGAGAGGGGGCGCAGTG	118	RSDALTR	121	QSGDLTR	124	ERGDLTR	127	RSDHLTR	130	RSDHLTR	133	QSGHLR	136
EVO 14B-13A	ATGACGGGCGAGYGGYG	119	RSDLTR	122	RSDLTR	125	RSDLTR	128	RSDLTR	131	DRSNLTR	134	RSDALTR	137

WO 02/46412

PCT/US01/46861

TABLE 6 Vegf-targeted ZFPs

ZFP Name	Sequence 5'-3'	Target		Finger Designs	SEQ ID NO:	Apparent Kd (nM)
		SEQ. ID	Subsites 5'-3'			
		No:				
VZ-950	GAAGAGGACc	138	GACc GAGg GAAg	EKANLTR RSDNLTR QRSNLVR	149 150 151	0.18
VZ-573	GGGGCGCTc	139	GCTc GGCg GGGg	QSSDLRR QSSHLAR RSDHLR	152 153 154	0.63
VZ-475	GTGTGGGGTt	140	GGTt TGGg GTGt	QSSHLAR RSDHLTT RSDALAR	155 156 157	0.35
SP1 (-76/+527)	GGGGCGGGGg	141	GGGg GCCg GGGg	KTSHLRA RSDBLQR RSDHLR	158 159 160	0.25
VZ-8	GGGAGGATc	142	GATc GAGg GGGg	TTSNLRR RSSNLQR RSDHLR	161 162 163	2.83
VZ+42/+530	GCTGGGGGCT/g	143	GGCT/g GGGg GCTg	DRSHLTR RSDHLTR QSSDLTR	164 165 166	<0.02
VZ+434b	GGGGGTGACc	144	GACc GGTg GGGg	DRSNLTR TSGHLVR RSDHLR	167 168 169	<0.02
VZ+434a	GGGGGTGACc	145	GACc GGTg GGGg	DRSNLTR MSHHLR RSDHLR	170 171 172	<0.02
VZ+472	AAGGGGAGg	146	GAGg GGGg AAGg	RSDNLAR RSDHLR RSDNLQ	173 174 175	0.006
VZ+590	GCAGGGGCCg	147	GCCg GGGg GCAg	DRSSLTR RSDHLR QSGSLTR	176 177 178	0.23
VZ+892	GCTGGAGCAc	148	GCAC GGAG GCTg	QSGSLTR QSGHLQR QSSDLTR	179 180 181	0.24

WO 02/46412

PCT/US01/46861

TABLE 7 Target sites and recognition helix sequences of rat VEGF-targeted ZFPs

ZFP NAME	TARGET	LOCATION	RECOGNITION HELICES
BVO 12A- 11A	GGAGAGGGGGCCGCGAGTG (SEQ ID NO: 182)	+785	F1: RSDALTR (SEQ ID NO: 186) F2: QSGDLTR (SEQ ID NO: 187) F3: ERGDLTR (SEQ ID NO: 188) F4: RSDHLAR (SEQ ID NO: 189) F5: RSDNLAR (SEQ ID NO: 190) F6: QSSHLAR (SEQ ID NO: 191)
BVO 14A- 13B	ATGGACGGGtGAGGCGGCG (SEQ ID NO: 183)	+830	F1: RSEDLTR (SEQ ID NO: 192) F2: RSEDLQR (SEQ ID NO: 193) F3: RSDNLAR (SEQ ID NO: 194) F4: RSDHLAR (SEQ ID NO: 195) F5: DRSNLTR (SEQ ID NO: 196) F6: RSDALTQ (SEQ ID NO: 197)
VOP 32A	GGGGGTGAC (SEQ ID NO: 184)	+420	F1: DRSNLTR (SEQ ID NO: 198) F2: MSHLSR (SEQ ID NO: 199) F3: RSDHLR (SEQ ID NO: 200)
VOP 30A	GCTGGGGGC (SEQ ID NO: 185)	+40 +514	F1: DRSHLTR (SEQ ID NO: 201) F2: RSDHLTR (SEQ ID NO: 202) F3: QSSDLTR (SEQ ID NO: 203)
VOP 32B	GGGGGTGAC (SEQ ID NO: 184)	+420	F1: DRSNLTR (SEQ ID NO: 198) F2: TSGHLVR (SEQ ID NO: 85) F3: RSDHLR (SEQ ID NO: 200)

5

Table 8: Nucleotide sequences of probe and primers used for analysis of VEGF-C mRNA

	SEQUENCE	SEQ ID NO
VEGF-C-Forward primer	5'-TGCCGATGCATGICTAAACT-3'	204
VEGF-C-Reverse primer	5'-TGAACAGGTCTCTTCATCCAGC-3'	205
VEGF-C-Probe	5'-FAM-CAGCAACTACCACAGTGTCAAGCA-TAMRA-3'	206

WO 02/46412

PCT/US01/46861

WHAT IS CLAIMED IS:

- 1 1. A zinc finger protein that binds to a target site, wherein the target site
2 has a nucleotide sequence as specified in Table 3 or 4.
- 1 2. The zinc finger protein of claim 1, comprising at least one finger of the
2 C2H2 class of zinc fingers.
- 1 3. The zinc finger protein according to claim 2, wherein the target site is
2 one of the nucleotide sequences in a row of Table 3 or 4 and positions -1 to +6 in at least one
3 of the zinc fingers are occupied by a segment of seven contiguous amino acids as specified in
4 the row.
- 1 4. The zinc finger protein according to claim 3, wherein positions -1 to
2 +6 in each of the three zinc fingers are occupied by first, second and third segments of seven
3 contiguous amino acids as specified in a row of Table 3.
- 1 5. The zinc finger protein according to claim 4, wherein the segments
2 have the amino acid sequences specified for one of the zinc finger proteins listed in Table 3,
3 wherein the zinc finger protein is selected from the group consisting of BVO 13A, EP10A,
4 GATA82Z7678, HBV 3, HP38 4A, HUM 17A, HUM 19A, MTS 5A, MX1E, PDF 5A, RAT
5 24A, SAN 16A, USX 3A, VEGF 1, VEGF 1*3, VEGF 1A, VEGF 1B, VEGF 1C, VEGF 1D,
6 VG 10A, VG 1B, VG 4A, VG 8A, VOP 28A-2, VOP 30A-4, VOP 32A-6, VOP 32B-7, VOP
7 35A-10, ZEN-7A 1, VOP 29A-3, VOP 32C, VOP 32D, VOP 32E, VOP 32F, VOP 32G,
8 VOP 32H, VOP 32I and VOP 32J.
- 1 6. The zinc finger protein according to claim 2, wherein the zinc finger
2 protein comprises six zinc fingers, and positions -1 to +6 in at least one of the six zinc fingers
3 is occupied by a segment of seven contiguous amino acids as specified in Table 4.
- 1 7. The zinc finger protein according to claim 2, wherein the zinc finger
2 protein comprises six zinc fingers, and positions -1 to +6 in each of the six zinc fingers are
3 occupied by a segment of seven contiguous amino acids as specified in a row of Table 4.
- 1 8. The zinc finger protein according to claim 7, wherein the segments
2 have the amino acid sequences specified for a zinc finger protein selected from the group
3 consisting of BVO 10A-9A, BVO 12A-11B and BVO 14B-13A as listed in Table 4.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

- 1 9. The zinc finger protein according to claim 1, wherein the zinc finger
2 protein is a fusion protein comprising a regulatory domain.
- 1 10. The zinc finger protein according to claim 9, wherein the fusion
2 protein comprises a plurality of regulatory domains.
- 1 11. The zinc finger protein according to claim 9, wherein the regulatory
2 domain is an activation domain.
- 1 12. The zinc finger protein according to claim 11, wherein the activation
2 domain is selected from the group consisting of (a) VP16, (b) p65, and (c) functional
3 fragments of (a) and (b).
- 1 13. The zinc finger protein according to claim 9, wherein the regulatory
2 domain is a repressor domain.
- 1 14. The zinc finger protein according to claim 13, wherein the repressor
2 domain is selected from the group consisting of (a) KRAB, (b) methyl binding domain
3 protein 2B, (c) v-ErbA repressor domain, and (d) functional fragments of (a), (b) and (c).
- 1 15. A zinc finger protein that binds to a target site having a nucleotide
2 sequence as specified in Table 3 or 4 whereby the zinc finger protein can modulate
3 angiogenesis when introduced into an animal having a genome comprising a VEGF gene
4 comprising the target site.
- 1 16. The zinc finger protein of claim 15, comprising at least three fingers of
2 the C₂H₂ class of zinc fingers.
- 1 17. The zinc finger protein according to claim 16, wherein the target site is
2 one of the nucleotide sequences in a row of Table 3 or 4 and positions -1 to +6 in at least one
3 of the zinc fingers are occupied by a segment of seven contiguous amino acids as specified in
4 the row.
- 1 18. The zinc finger protein according to claim 17, wherein positions -1 to
2 +6 in each of the three zinc fingers are occupied by first, second and third segments of seven
3 contiguous amino acids as specified in a row of Table 3.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

1 219. The zinc finger protein according to claim 16, wherein the zinc finger
2 protein comprises six zinc fingers, and positions -1 to +6 in at least one of the six zinc fingers
3 is occupied by a segment of seven contiguous amino acids as specified in Table 4.

1 220. The zinc finger protein according to claim 19, wherein the zinc finger
2 protein comprises six zinc fingers, and positions -1 to +6 in each of the six zinc fingers are
3 occupied by a segment of seven contiguous amino acids as specified in a row of Table 4.

1 221. A nucleic acid encoding a polypeptide, wherein the polypeptide
2 comprises a zinc finger according to claim 1.

1 222. A nucleic acid encoding a polypeptide, wherein the polypeptide
2 comprises a zinc finger protein according to claim 4.

1 223. A nucleic acid encoding a polypeptide, wherein the polypeptide
2 comprises a zinc finger protein according to claim 7.

1 224. A nucleic acid encoding a polypeptide, wherein the polypeptide
2 comprises a zinc finger protein according to claim 9.

1 225. A method for modulating expression of a VEGF gene, the method
2 comprising contacting a target site of a nucleic acid within a cell with a zinc finger protein,
3 wherein the target site has a nucleotide sequence as specified in Table 3 or 4 and binding of
4 the zinc finger protein to the target site modulates expression of the VEGF gene in the cell.

1 226. The method according claim 25, wherein the expression of a plurality
2 of splice variants of the VEGF gene is modulated.

1 227. The method according to claim 25, wherein a plurality of target sites
2 are contacted with a plurality of zinc finger proteins and each zinc finger protein binds to a
3 distinct target site.

1 228. The method according to claim 27, wherein each of the plurality of
2 zinc finger proteins is a fusion protein.

1 229. The method according to claim 28, wherein each of the zinc finger
2 proteins is a fusion protein comprising a regulatory domain.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

1 30. The method according to claim 29, wherein each zinc finger protein is
2 fused to a different regulatory domain.

1 31. The method according to claim 25, wherein the zinc finger protein
2 comprises at least three fingers of the C₂H₂ class of zinc fingers.

1 32. The method according to claim 31, wherein positions -1 to +6 in each
2 of the three zinc fingers are occupied by first, second and third segments of seven contiguous
3 amino acids as specified in a row of Table 3.

1 33. The method according to claim 31, wherein the zinc finger protein
2 comprises six zinc fingers, and positions -1 to +6 in each of the six zinc fingers are occupied
3 by a segment of seven contiguous amino acids as specified in a row of Table 4.

1 34. The method according to claim 25, wherein the zinc finger protein is a
2 fusion protein comprising a regulatory domain.

1 35. The method according to claim 34, wherein the method further
2 comprises administering the zinc finger protein in combination with a delivery vehicle.

1 36. The method according to claim 34, wherein the method further
2 comprises administering a nucleic acid encoding the zinc finger protein into the cell.

1 37. The method according to claim 36, wherein administering comprises
2 delivering the nucleic acid into the cell in a naked form.

1 38. The method according to claim 36, wherein the nucleic acid is
2 contained within an expression vector and is operably linked to a promoter, and administering
3 comprises delivering the vector into the cell.

1 39. The method according to claim 38, wherein the expression vector is a
2 viral expression vector.

1 40. The method according to claim 39, wherein the expression vector is
2 selected from the group consisting of a retroviral expression vector, an adenoviral expression
3 vector, and an AAV expression vector.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

- 1 41. The method according to claim 38, wherein the promoter is an
2 inducible promoter.
- 1 42. The method according to claim 34, wherein regulatory domain
2 comprises an activation domain and binding of the zinc finger protein to the target site
3 activates transcription of the VEGF gene in the cell.
- 1 43. The method according to claim 42, wherein the cell is a population of
2 cells.
- 1 44. The method according to claim 43, wherein activation of VEGF
2 transcription activates angiogenesis in the population of cells.
- 1 45. The method according to claim 44, wherein the population of cells is a
2 cell culture.
- 1 46. The method according to claim 44, wherein the population of cells are
2 in a mammalian subject.
- 1 47. The method according to claim 36, wherein the zinc finger protein or
2 zinc finger protein nucleic acid are administered in an amount effective to treat a disease or
3 injury.
- 1 48. The method according to claim 47, wherein the disease or injury is
2 selected from the group consisting of atherosclerosis, ischemia and arthritis.
- 1 49. The method according to claim 47, wherein the subject has a wound
2 and the amount administered is effective to treat the wound.
- 1 50. The method according to claim 47, wherein the subject has an ulcer
2 and the amount administered is effective to treat the ulcer.
- 1 51. The method according to claim 42, wherein activation of VEGF
2 transcription activates lymphogenesis in the population of cells.
- 1 52. The method according to claim 42, wherein activation of VEGF
2 transcription activates myelopoiesis in the population of cells.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

- 1 53. The method according to claim 42, wherein the activation domain is
2 selected from the group consisting of (a) VP16, (b) p65, (c) functional fragments of (a) and
3 (b).
- 1 54. The method according to claim 34, wherein the regulatory domain is a
2 repressor domain and binding of the zinc finger protein to the target site represses
3 transcription of the VEGF gene in the cell.
- 1 55. The method according to claim 54, wherein the cell is a population of
2 cells.
- 1 56. The method according to claim 55, wherein repression of VEGF
2 transcription represses angiogenesis in the population of cells.
- 1 57. The method according to claim 55, wherein the population of cells is a
2 cell culture.
- 1 58. The method according to claim 55, wherein the population of cells are
2 in a mammalian subject.
- 1 59. The method according to claim 58, wherein the zinc finger protein or
2 zinc finger protein nucleic acid are administered in an amount effective to treat a disease or
3 injury.
- 1 60. The method according to claim 59, wherein the disease is a tumor.
- 1 61. The method according to claim 54, wherein the repressor domain is
2 selected from the group consisting (a) KRAB, (b) methyl binding domain protein 2B, (c) v-
3 ErbA repressor domain, and (d) functional fragments of (a), (b) and (c).
- 1 62. The method according to claim 25, wherein the target site is located in
2 a single type of VEGF gene, and binding of the zinc finger protein to the target site modulates
3 expression of the single VEGF gene in the cell.
- 1 63. The method according to claim 25, wherein the target site is located in
2 a plurality of different types of VEGF genes, and binding of the zinc finger protein to the
3 target site modulates expression of the plurality of VEGF genes.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

1 64. The method according to claim 63, wherein the target site comprises a
2 nucleotide sequence bound by a protein selected from the group consisting of EP10A,
3 GATA82Z678, HBV 3, HP38 4A, HUM 17A, MTS 5A, PDF 5A, USX 3A, VEGF 1,
4 VEGF1*3, VEGF 1A, VG 10A, VG 1B, VG 4A, VG8A, VOP28A-2, VOP 30A-4, and ZEN-
5 7A 1.

1 65. The method according to claim 64, wherein the target site is the
2 nucleotide sequence recognized by VOP 28A-2.

1 66. The method of according to claim 64, wherein the target site is the
2 nucleotide sequence recognized by VOP 30A-4.

1 67. A method for modulating angiogenesis comprising introducing a zinc
2 finger protein into an animal having a genome comprising a target site within a VEGF gene,
3 whereby the zinc finger protein binds to the target site and thereby modulates angiogenesis in
4 the animal.

1 68. The method according to claim 67, wherein the modulation of
2 angiogenesis comprises inhibition of new blood vessel formation.

1 69. The method according to claim 67, wherein modulation of
2 angiogenesis comprises stimulation of new blood vessel formation.

1 70. The method according to claim 69, wherein the blood vessels are
2 nonhyperpermeable.

1 71. The method according to claim 67, wherein the zinc finger protein
2 binds to a target site specified in Table 3 or 4.

1 72. The method according to claim 71, wherein positions -1 to +6 in each
2 of three zinc fingers are occupied by first, second and third segments of seven contiguous
3 amino acids as specified in a row of Table 3.

1 73. The method according to claim 71, wherein the zinc finger protein
2 comprises six zinc fingers, and positions -1 to +6 in each of the six zinc fingers are occupied
3 by a segment of seven contiguous amino acids as specified in a row of Table 4.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

1 74. The method according to claim 67, wherein the target site is present in
2 a plurality of VEGF genes, whereby the zinc finger protein binds to the target site in the
3 plurality of genes, thereby modulating expression of the plurality of VEGF genes.

1 75. The method according to claim 67, wherein introducing comprises
2 introducing a plurality of zinc finger proteins into the animal, each zinc finger protein binding
3 to a different target site in the same gene.

1 76. The method according to claim 75, wherein each of the zinc finger
2 proteins is a fusion protein comprising a regulatory domain.

1 77. The method according to claim 76, wherein each zinc finger protein is
2 fused to a different regulatory domain.

1 78. A method of treating ischemia, comprising administering a zinc finger
2 protein that binds to a target site specified in Table 3 or 4 into an animal having ischemia,
3 wherein the zinc finger protein is administered in an amount effective to treat ischemia.

1 79. The method of claim 78, wherein the animal has a genome comprising
2 a VEGF gene comprising the target site and the zinc finger protein binds to the target site.

1 80. The method according to claim 79, wherein the zinc finger protein
2 comprises at least three fingers of the C₂H₂ class of zinc fingers.

1 81. The method according to claim 80, wherein positions -1 to +6 in each
2 of the three zinc fingers are occupied by first, second and third segments of seven contiguous
3 amino acids as specified in a row of Table 3.

1 82. The method according to claim 80, wherein the zinc finger protein
2 comprises six zinc fingers, and positions -1 to +6 in each of the six zinc fingers are occupied
3 by a segment of seven contiguous amino acids as specified in a row of Table 4.

1 83. A method for screening for a modulator of expression of a VEGF gene,
2 the method comprising:

3 (a) contacting a test cell with a zinc finger protein and a test agent,
4 wherein the zinc finger protein comprises at least one zinc finger that binds to a target site,
5 the target site having a nucleotide sequence as specified in Table 3 or 4;

WO 02/46412

PCT/US01/46861

6 (b) comparing the level of expression of the VEGF gene in the test cell
7 with a baseline level, a statistically significant difference in the level of expression in the test
8 cell relative to the baseline level indicating that the test agent is a potential modulator of
9 VEGF gene expression.

1 84. The method of claim 83, wherein the zinc finger is a fusion protein
2 comprising an activation domain, and a lower level of expression in the test cell relative to
3 the baseline level indicates that the test agent is a repressor of the VEGF gene.

1 85. The method of claim 83, wherein the zinc finger protein is a fusion
2 protein comprising a repressor domain, and an increased level of expression in the test cell
3 relative to the baseline level indicates that the test agent is an activator of the VEGF gene.

1 86. A pharmaceutical composition comprising a nucleic acid according to
2 claim 14 operably linked to a regulatory sequence and a pharmaceutically acceptable carrier
3 or diluent, wherein the regulatory sequence allows for expression of the nucleic acid in a cell.

1 87. The pharmaceutical composition according to claim 86, wherein the
2 nucleic acid is contained in an expression vector.

1 88. The pharmaceutical composition according to claim 87, wherein the
2 expression vector is a viral expression vector.

1 89. The pharmaceutical composition according to claim 88, wherein the
2 expression vector is selected from the group consisting of a retroviral expression vector, an
3 adenoviral expression vector, and an AAV expression vector.

1 90. A pharmaceutical composition comprising a zinc finger protein
2 according to claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

1 91. A zinc finger protein comprising a plurality of zinc fingers, wherein at
2 least one of the plurality of zinc fingers is occupied by a segment of seven contiguous amino
3 acids as specified in a row of Table 3 or 4.

1 92. The zinc finger protein of claim 91, wherein the zinc finger protein is a
2 three finger zinc finger protein and the at least one zinc finger is occupied by a segment of
3 seven contiguous amino acids as specified in a row of Table 3.

WO 02/46412

PCT/US01/46861

1 93. The zinc finger protein of claim 92, wherein at least two of the zinc
2 fingers are occupied by a segment of seven contiguous amino acids as specified in a row of
3 Table 3.

1 94. The zinc finger protein of claim 93, wherein all three of the zinc
2 fingers are occupied by a segment of seven contiguous amino acids as specified in a row of
3 Table 3.

1 95. The zinc finger protein of claim 91, wherein the zinc finger protein is a
2 six finger zinc finger protein and the at least one zinc finger is occupied by a segment of
3 seven contiguous amino acids as specified in a row of Table 4.

1 96. The zinc finger protein of claim 95, wherein at least three of the zinc
2 fingers are occupied by a segment of seven contiguous amino acids as specified in a row of
3 Table 4.

1 97. The zinc finger protein of claim 96, wherein all six of the zinc fingers
2 are occupied by a segment of seven contiguous amino acids as specified in a row of Table 4.

1 98. A method for treating a wound comprising introducing a zinc finger
2 protein into an animal having a genome comprising a target site within a VEGF gene,
3 whereby the zinc finger protein binds to the target site, such binding accelerating healing of
4 the wound.

Figure 1

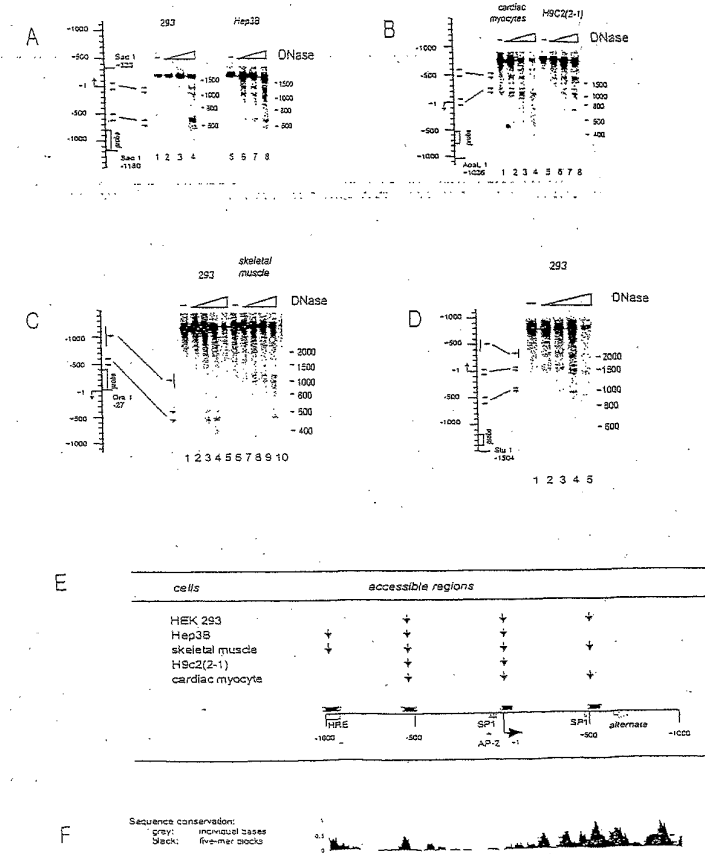
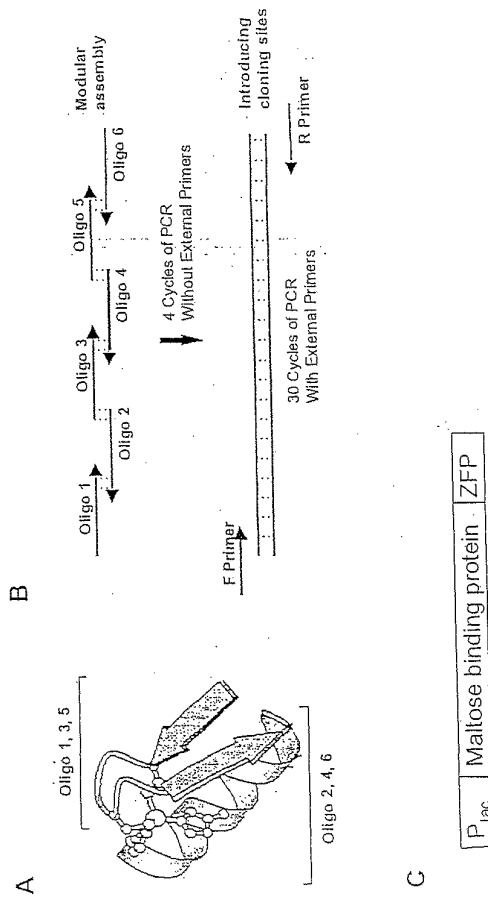


Figure 2

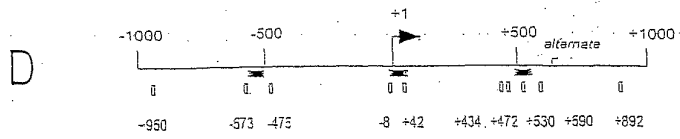


WO 02/46412

3/27

PCT/US01/46861

Figure 2

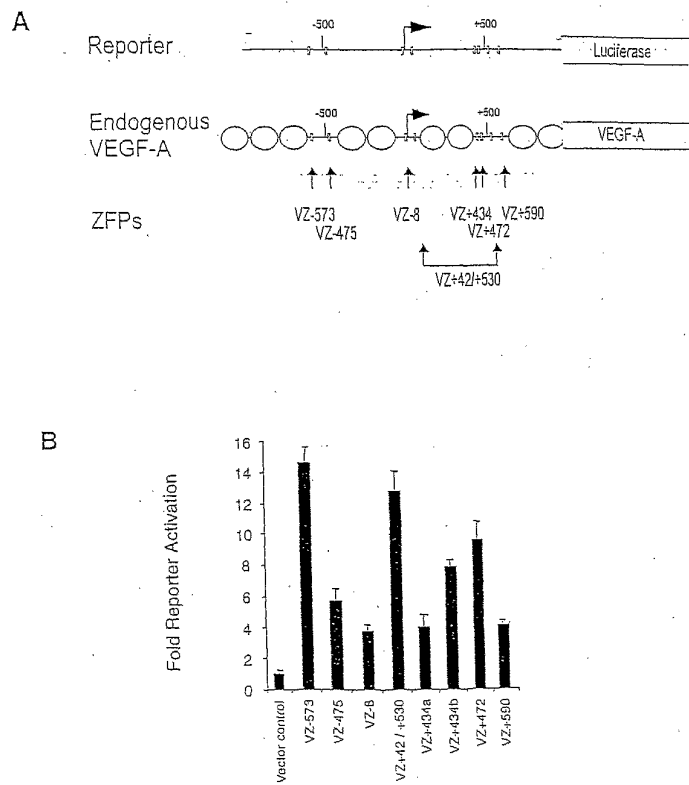


WO 02/46412

4/27

PCT/US01/46861

Figure 3

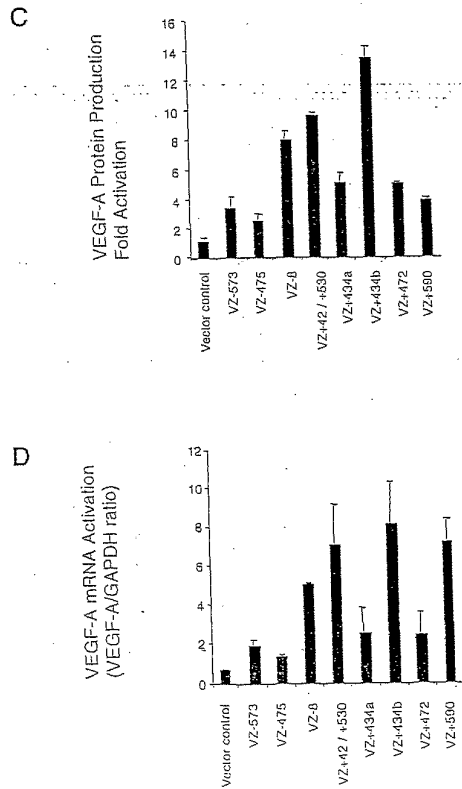


WO 02/46412

5/27

PCT/US01/46861

Figure 3



WO 02/46412

6/27

PCT/US01/46861

Figure 3

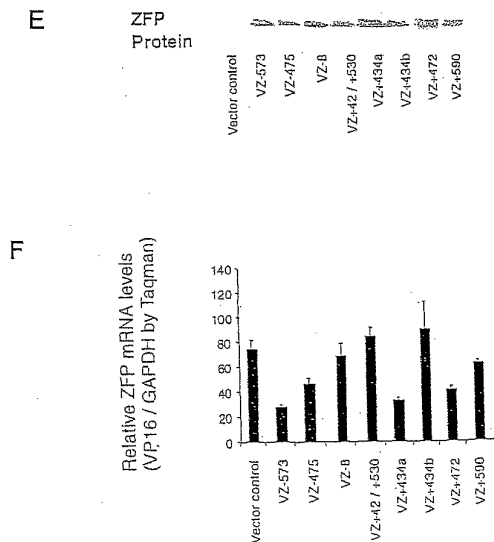


Figure 4

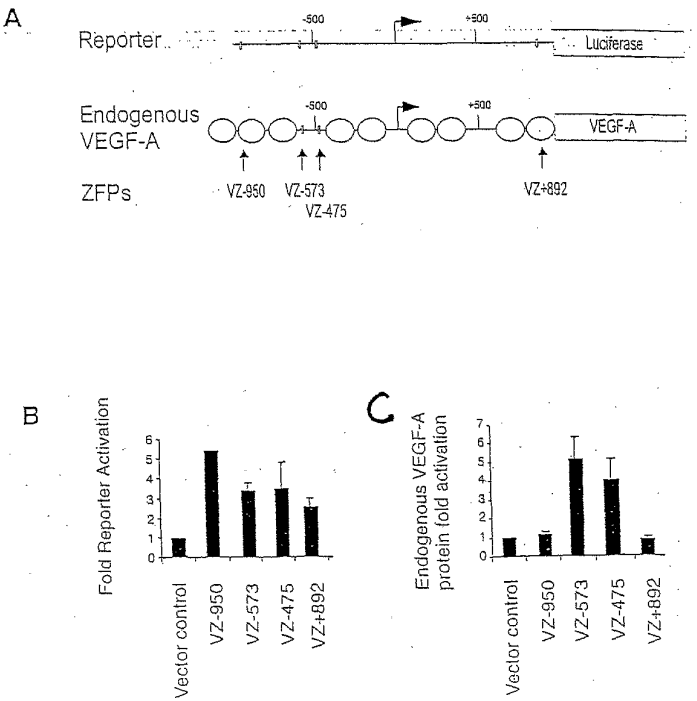
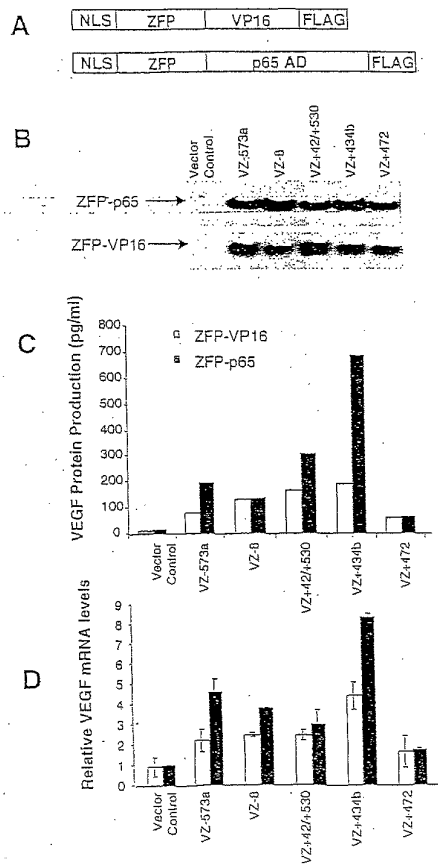


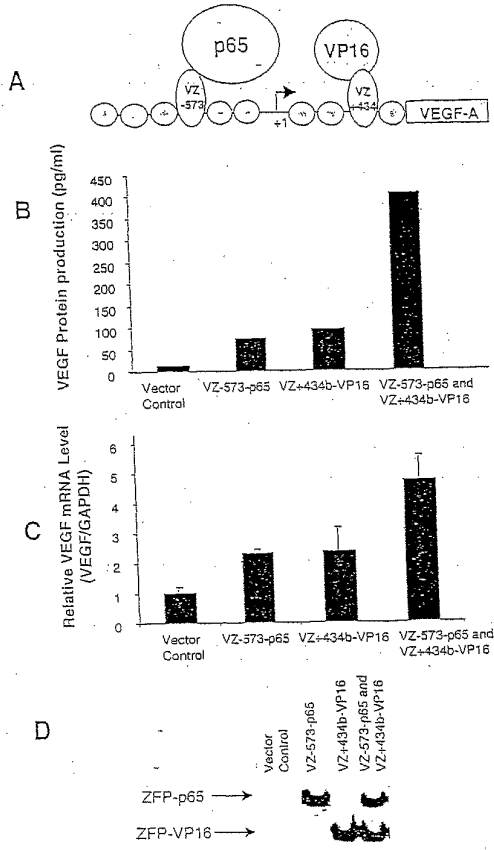
Figure 5



WO 02/46412

PCT/US01/46861

Figure 2



WO 02/46412

10/27

PCT/US01/46861

Figure 7

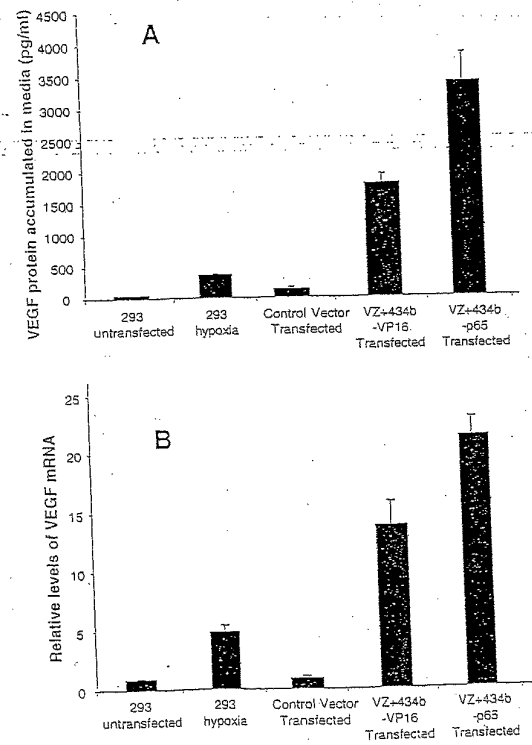
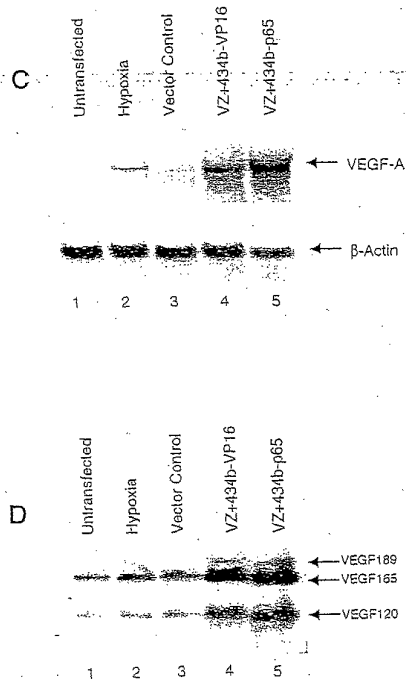


Figure 7



WO 02/46412

12/27

PCT/US01/46861

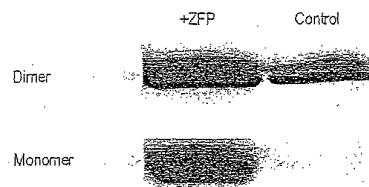


FIG. 8

WO 02/46412

13/27

PCT/US01/46861

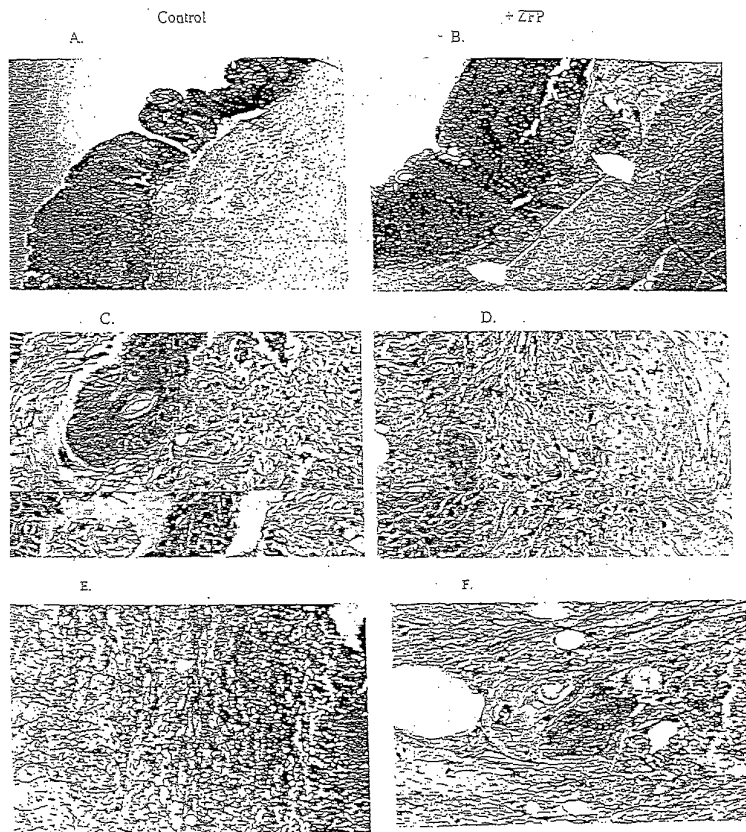
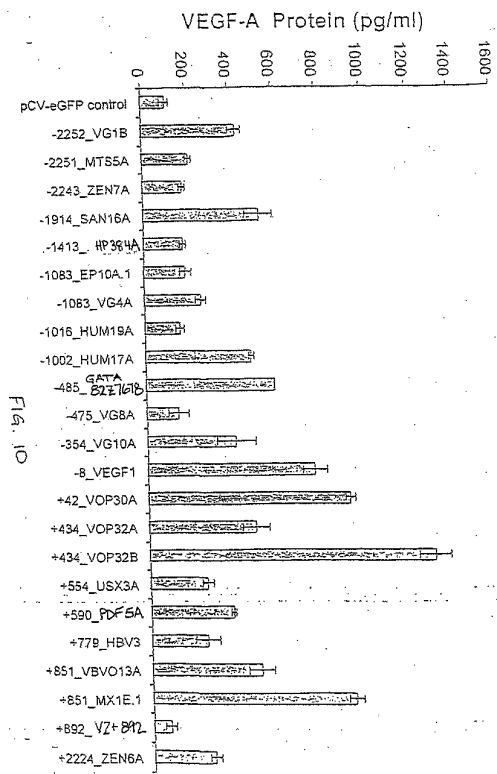


FIG. 9

WO 02/46412

14/27

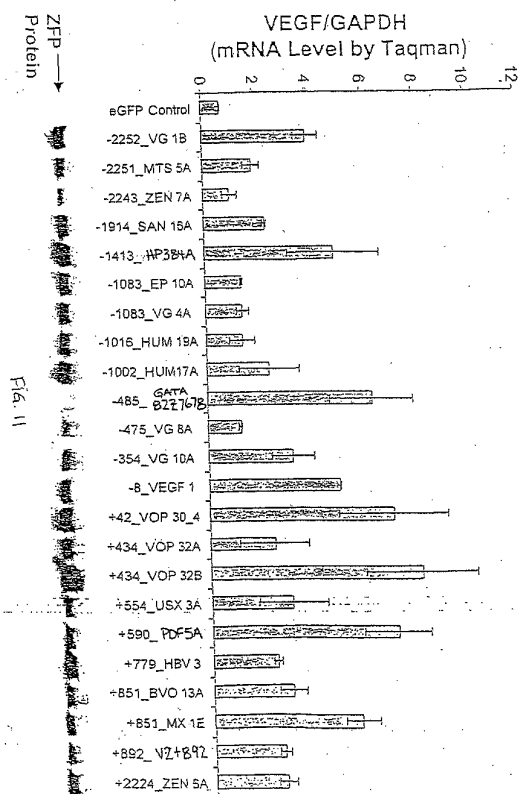
PCT/US01/46861



WO 02/46412

15/27

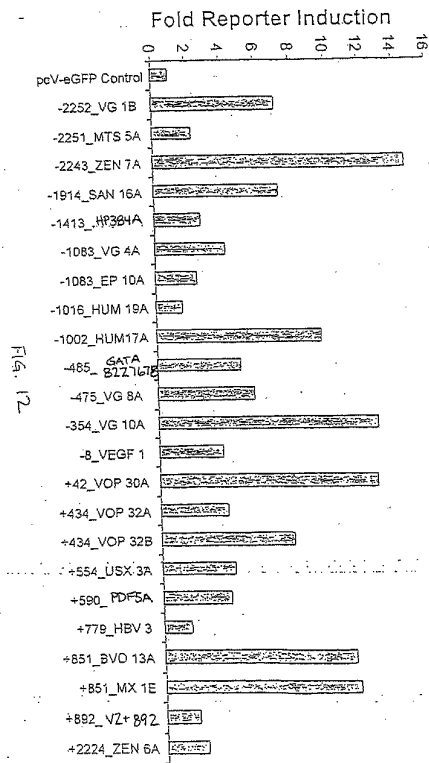
PCT/US01/46861



WO 02/46412

16/27

PCT/US01/46861



WO 02/46412

17/27

PCT/US01/46861

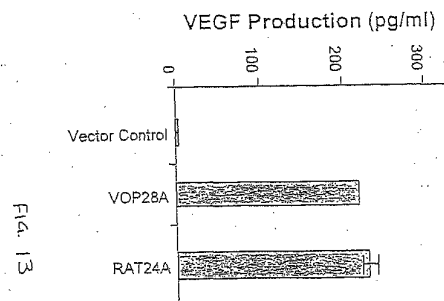
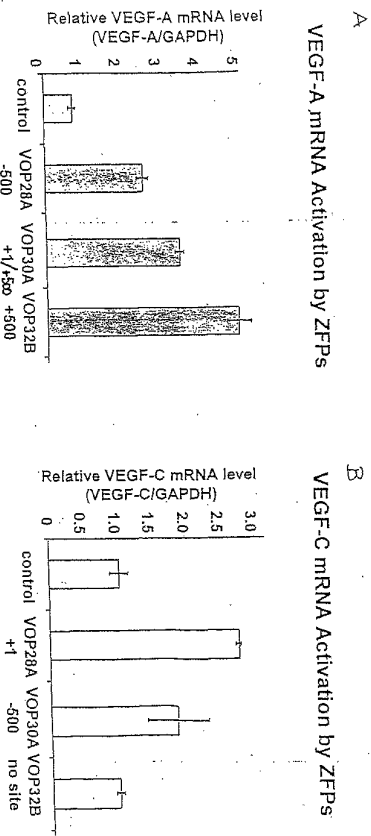


Figure 14

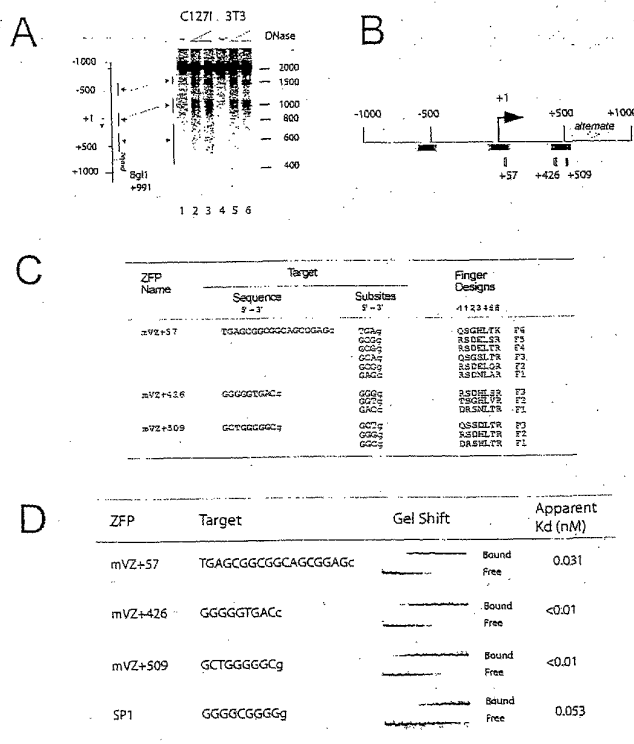


WO 02/46412

19/27

PCT/US01/46861

Figure 15

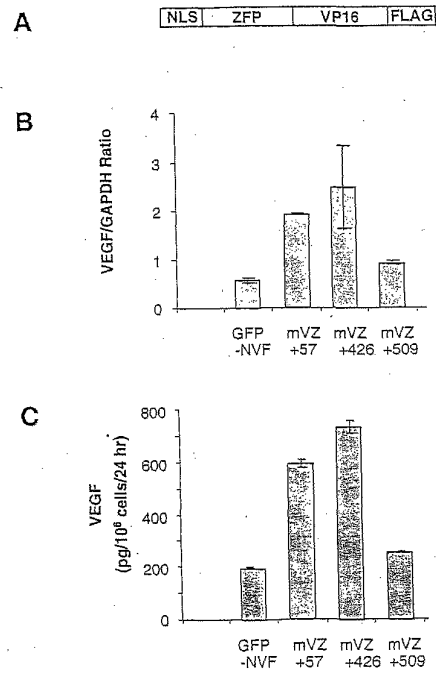


WO 02/46412

20/27

PCT/US01/46861

Figure 16



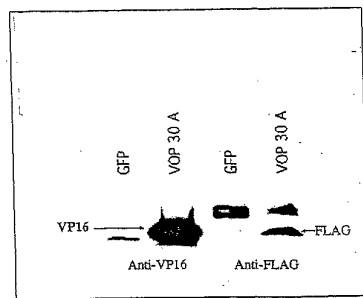


FIG. 17A

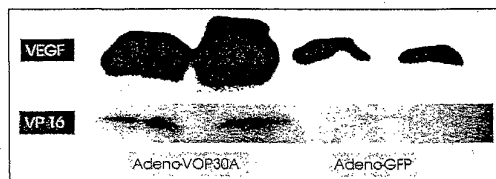


FIG. 17B

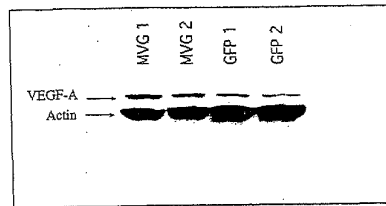


FIG. 17C

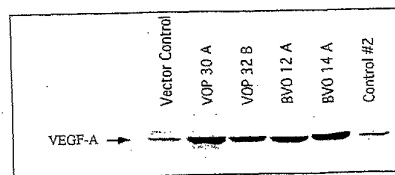


FIG. 17D

WO 02/46412

23/27

PCT/US01/46861

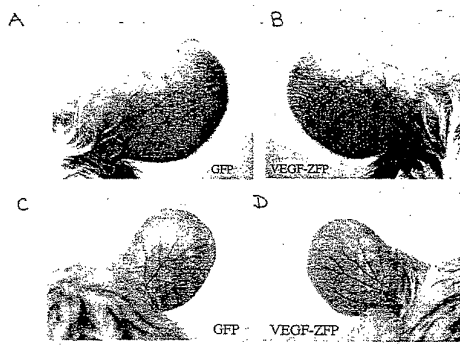


FIG. 18

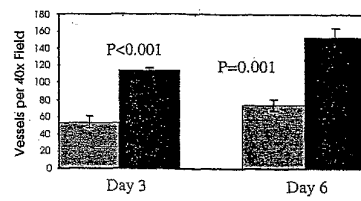


FIG. 18 E

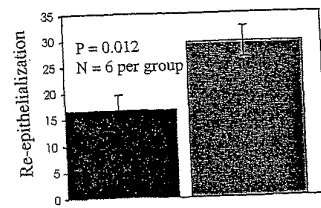
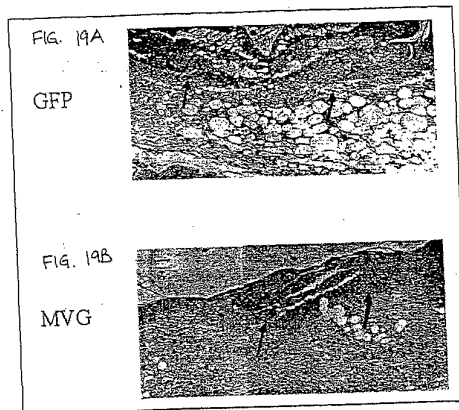
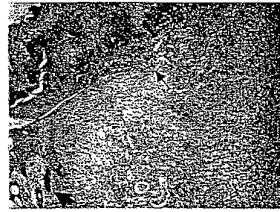
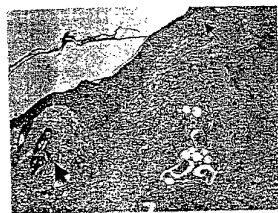


FIG. 19C



VEGF-ZFP (MVG)
(MVG)

FIG. 20A



GFP Control

FIG. 20B

WO 02/46412

26/27

PCT/US01/46861

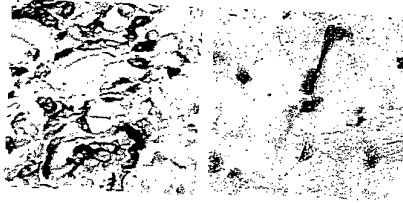


FIG. 21 A

FIG. 21 B

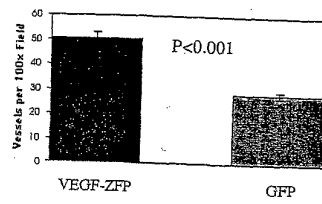
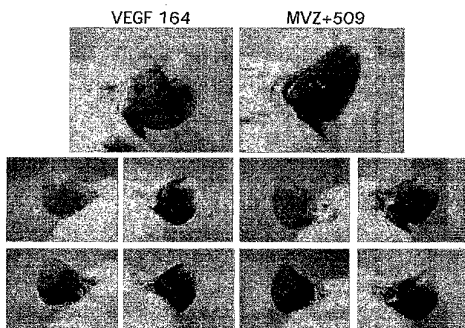


FIG. 21 C

Figure 22



WO 02/46412

1

PCT/US01/46861

SEQUENCE LISTING

<110> Rebar, Edward
Jamieson, Andrew
Liu, Qiang
Liu, Pei-Qi
Wolffe, Alan
Eisenberg, Stephen P.
Jarvis, Eric
Sangamo BioSciences, Inc.

<120> Regulation of Angiogenesis With Zinc
Finger Proteins

<130> 019496-005830US

<140> To Be Assigned
<141> To Be Assigned

<150> US 09/733,604
<151> 2000-12-07

<150> US 09/736,083
<151> 2000-12-12

<150> US 09/846,033
<151> 2001-04-30

<160> 252

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 1
atggacggg 9

<210> 2
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 2
kggggctgg 9

<210> 3
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

WO 02/46412

2

PCT/US01/46861

<220>
<223> target

<400> 3
gagkkgkgyg 9

<210> 4
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 4
gggggaggn 9

<210> 5
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 5
ggdtggggg 9

<210> 6
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 6
argggggag 9

<210> 7
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 7
tgggcagac 9

<210> 8
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 8
tgggggtgg 9

WO 02/46412

3

PCT/US01/46861

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

<220>
<223> target

<400> 9
atggacggg 9

<210> 10
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 10
gyaggggcc 9

<210> 11
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 11
gdggaagcc 9

<210> 12
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 12
akggaagg 9

<210> 13
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 13
gccggggag 9

<210> 14
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```

WO 02/46412 4 PCT/US01/46861

<220>
<223> target

<400> 14
ggggaggvkk 9

<210> 15
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 15
ggggaggvkk 9

<210> 16
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 16
ggggaggvkk 9

<210> 17
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 17
ggggagggat 9

<210> 18
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 18
ggggvvggat 9

<210> 19
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 19
ggggagggmt 9

WO 02/46412

5

PCT/US01/46861

```
<210> 20
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 20
gawgggggc 9

<210> 21
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 21
atgggggtg 9

<210> 22
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 22
gggggctgg 9

<210> 23
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 23
gdgtggggn 9

<210> 24
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 24
gggggcgct 9

<210> 25
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```


WO 02/46412

6

PCT/US01/46861

```
<220>
<223> target

<400> 25
gctgggggc 9

<210> 26
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 26
gggggtgac 9

<210> 27
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 27
gggggtgac 9

<210> 28
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 28
gctggagca 9

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

<220>
<223> target

<400> 29
ggggghgct 9

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 30
Arg Ser Asp His Leu Ala Arg
1 5
```

WO 02/46412

7

PCT/US01/46861

```
<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 31
Arg Ser Asp His Leu Thr Thr
1          5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 32
Arg Leu Asp Ser Leu Leu Arg
1          5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 33
Gln Thr Gly His Leu Arg Arg
1          5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 34
Arg Ser Asp His Leu Ala Arg
1          5

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 35
Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg
1          5
```

WO 02/46412

8

PCT/US01/46861

```
<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 36
Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg
1          5

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

<220>
<223> finger

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

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

<220>
<223> finger

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

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

<220>
<223> finger

<400> 39
Asp Arg Ser Ser Leu Thr Arg
1          5

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

<220>
<223> finger

<400> 40
Glu Arg Gly Thr Leu Ala Arg
1          5
```

WO 02/46412

9

PCT/US01/46861

```
<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 41
Arg Ser Asp His Leu Ala Arg
1          5

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 42
Arg Ser Asp Asn Leu Thr Arg
1          5

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 43
Thr Thr Ser Asn Leu Arg Arg
1          5

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 44
Thr Thr Ser Asn Leu Arg Arg
1          5

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 45
Thr Thr Ser Asn Leu Arg Arg
1          5
```

WO 02/46412

10

PCT/US01/46861

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 46
Gln Ser Ser Asn Leu Ala Arg
1 5

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 47
Thr Thr Ser Asn Leu Ala Arg
1 5

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 48
Gln Ser Ser Asn Leu Arg Arg
1 5

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 49
Asp Ser Gly His Leu Thr Arg
1 5

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 50
Arg Ser Asp Ala Leu Thr Arg
1 5

WO 02/46412

11

PCT/US01/46861

```
<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 51
Arg Ser Asp His Leu Thr Thr
1          5

<210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 52
Gln Ser Ser His Leu Ala Arg
1          5

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 53
Gln Ser Ser Asp Leu Arg Arg
1          5

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 54
Asp Arg Ser His Leu Thr Arg
1          5

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 55
Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg
1          5
```

WO 02/46412

12

PCT/US01/46861

```
<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 56
Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg
1          5

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 57
Gln Ser Gly Ser Leu Thr Arg
1          5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 58
Gln Ser Ser Asp Leu Arg Arg
1          5

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 59
Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg
1          5

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 60
Asp Arg Ser His Leu Ala Arg
1          5
```

WO 02/46412

13

PCT/US01/46861

```
<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 61
Asp Arg Asp His Leu Thr Arg
1           5

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 62
Gln Ser Gly His Leu Gln Arg
1           5

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 63
Arg Ser Asp His Leu Thr Thr
1           5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 64
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1           5

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 65
Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg
1           5
```


WO 02/46412

14

PCT/US01/46861

```
<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 66
Arg Ser Asp His Leu Thr Arg
1          5

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 67
Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg
1          5

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 68
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1          5

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 69
Gln Ser Gly Asn Leu Ala Arg
1          5

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 70
Gln Ser Gly Asn Leu Ala Arg
1          5
```

WO 02/46412

15

PCT/US01/46861

```
<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 71
Arg Ser Asp His Leu Thr Arg
1          5

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 72
Arg Ser Ser Asn Leu Gln Arg
1          5

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 73
Arg Ser Ser Asn Leu Gln Arg
1          5

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 74
Arg Ser Asp Asn Leu Gln Arg
1          5

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 75
Arg Ser Asp Asn Leu Gln Arg
1          5
```

WO 02/46412

16

PCT/US01/46861

```
<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 76
Arg Ser Asp Asn Leu Gln Arg
1          5

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 77
Arg Ser Asp Asn Leu Gln Arg
1          5

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 78
Arg Ser Asp His Leu Thr Arg
1          5

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 79
Arg Ser Asp His Leu Thr Arg
1          5

<210> 80
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 80
Asp Arg Ser His Leu Ala Arg
1          5
```

WO 02/46412

17

PCT/US01/46861

```
<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 81
Arg Ser Asp His Leu Thr Thr
1          5

<210> 82
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 82
Asp Arg Ser His Leu Ala Arg
1          5

<210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 83
Arg Ser Asp His Leu Thr Arg
1          5

<210> 84
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 84
Met Ser His His Leu Ser Arg
1          5

<210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 85
Thr Ser Gly His Leu Val Arg
1          5
```

WO 02/46412

18

PCT/US01/46861

```
<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 86
Gln Ser Gly His Leu Gln Arg
1           5

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 87
Gln Ser Ser His Leu Ala Arg
1           5

<210> 88
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 88
Arg Ser Asp Ala Leu Thr Gln
1           5

<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 89
Arg Ser Asp His Leu Ser Lys
1           5

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 90
Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg
1           5
```

WO 02/46412

19

PCT/US01/46861

```
<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 91
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1          5

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 92
Gln Arg Ala His Leu Ala Arg
1          5

<210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 93
Arg Ser Asp Asn Leu Thr Gln
1          5

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 94
Arg Ser Asp His Leu Thr Thr
1          5

<210> 95
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 95
Arg Ser Asp His Leu Thr Thr
1          5
```

WO 02/46412

20

PCT/US01/46861

```
<210> 96
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 96
Arg Ser Asp Ala Leu Ser Ala
1          5

<210> 97
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 97
Gln Ser Gly Ser Leu Thr Arg
1          5

<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 98
Arg Ser Asp Ala Leu Ala Arg
1          5

<210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 99
Arg Ser Asp Ala Leu Arg Gln
1          5

<210> 100
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 100
Asp Arg Ser Asp Leu Thr Arg
1          5
```

WO 02/46412

21

PCT/US01/46861

```
<210> 101
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 101
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1          5

<210> 102
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 102
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1          5

<210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 103
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1          5

<210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 104
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1          5

<210> 105
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 105
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1          5
```


WO 02/46412

22

PCT/US01/46861

```
<210> 106
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 106
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1          5

<210> 107
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 107
Gln Ser Gly Asn Leu Thr Arg
1          5

<210> 108
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 108
Arg Ser Asp Ala Leu Thr Gln
1          5

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 109
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1          5

<210> 110
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 110
Arg Ser Asp Ala Leu Ala Arg
1          5
```

WO 02/46412

23

PCT/US01/46861

```
<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 111
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1 5

<210> 112
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 112
Gln Ser Ser Asp Leu Thr Arg
1 5

<210> 113
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 113
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1 5

<210> 114
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 114
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1 5

<210> 115
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 115
Gln Ser Ser Asp Leu Thr Arg
1 5
```

WO 02/46412

24

PCT/US01/46861

<210> 116
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 116
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1 5

<210> 117
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 117
gtggaggggg tcggggct

18

<210> 118
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 118
ggagaggggg cygcagtg

18

<210> 119
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 119
atggacgggt gaggyggYG

19

<210> 120
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 120
Gln Ser Ser Asp Leu Arg Arg
1 5

<210> 121
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

WO 02/46412

25

PCT/US01/46861

```
<220>
<223> finger

<400> 121
Arg Ser Asp Ala Leu Thr Arg
1          5

<210> 122
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 122
Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg
1          5

<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 123
Arg Ser Asp His Leu Thr Arg
1          5

<210> 124
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 124
Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg
1          5

<210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 125
Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg
1          5

<210> 126
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
```

WO 02/46412

26

PCT/US01/46861

```
<220>
<223> finger

<400> 126
Asp Arg Ser Ala Leu Ala Arg
1           5

<210> 127
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 127
Glu Arg Gly Asp Leu Thr Arg
1           5

<210> 128
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 128
Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg
1           5

<210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 129
Arg Ser Asp His Leu Ala Arg
1           5

<210> 130
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 130
Arg Ser Asp His Leu Ala Arg
1           5

<210> 131
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
```

WO 02/46412

27

PCT/US01/46861

<223> finger

<400> 131
Arg Ser Asp His Leu Ala Arg
1 5

<210> 132
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 132
Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg
1 5

<210> 133
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 133
Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg
1 5

<210> 134
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 134
Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg
1 5

<210> 135
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 135
Arg Ser Asp Ala Leu Thr Arg
1 5

<210> 136
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

WO 02/46412

28

PCT/US01/46861

<400> 136
Gln Ser Gly His Leu Gln Arg
1 5
<210> 137
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> finger
<400> 137
Arg Ser Asp Ala Leu Thr Gln
1 5
<210> 138
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> target
<400> 138
gaagaggacc 10
<210> 139
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> target
<400> 139
gggggcgctc 10
<210> 140
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> target
<400> 140
gtgtggggtt 10
<210> 141
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> target
<400> 141
ggggcggggg 10

WO 02/46412

29

PCT/US01/46861

```
<210> 142
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 142
ggggaggatc 10

<210> 143
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 143
gctgggggck 10

<210> 144
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 144
gggggtgacc 10

<210> 145
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 145
gggggtgacc 10

<210> 146
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 146
aagggggagg 10

<210> 147
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```


WO 02/46412

30

PCT/US01/46861

```
<220>
<223> target

<400> 147
gcaggggcccg 10

<210> 148
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 148
gctggagcac 10

<210> 149
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 149
Glu Lys Ala Asn Leu Thr Arg
1 5

<210> 150
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 150
Arg Ser Asp Asn Leu Thr Arg
1 5

<210> 151
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 151
Gln Arg Ser Asn Leu Val Arg
1 5

<210> 152
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger
```

WO 02/46412

31

PCT/US01/46861

```
<400> 152
Gln Ser Ser Asp Leu Arg Arg
1           5

<210> 153
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 153
Gln Ser Ser His Leu Ala Arg
1           5

<210> 154
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 154
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1           5

<210> 155
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 155
Gln Ser Ser His Leu Ala Arg
1           5

<210> 156
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 156
Arg Ser Asp His Leu Thr Thr
1           5

<210> 157
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger
```

WO 02/46412

32

PCT/US01/46861

```
<400> 157
Arg Ser Asp Ala Leu Ala Arg
1           5

<210> 158
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 158
Lys Thr Ser His Leu Arg Ala
1           5

<210> 159
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 159
Arg Ser Asp Glu Leu Gln Arg
1           5

<210> 160
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 160
Arg Ser Asp His Leu Ser Lys
1           5

<210> 161
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 161
Thr Thr Ser Asn Leu Arg Arg
1           5

<210> 162
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger
```

WO 02/46412

33

PCT/US01/46861

```
<400> 162
Arg Ser Ser Asn Leu Gln Arg
1          5

<210> 163
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 163
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1          5

<210> 164
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 164
Asp Arg Ser His Leu Thr Arg
1          5

<210> 165
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 165
Arg Ser Asp His Leu Thr Arg
1          5

<210> 166
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 166
Gln Ser Ser Asp Leu Thr Arg
1          5

<210> 167
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger
```

WO 02/46412

34

PCT/US01/46861

<400> 167
Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg
1 5

<210> 168
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 168
Thr Ser Gly His Leu Val Arg
1 5

<210> 169
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 169
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1 5

<210> 170
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 170
Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg
1 5

<210> 171
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 171
Met Ser His His Leu Ser Arg
1 5

<210> 172
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

WO 02/46412

35

PCT/US01/46861

```
<400> 172
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1          5

<210> 173
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 173
Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg
1          5

<210> 174
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 174
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1          5

<210> 175
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 175
Arg Ser Asp Asn Leu Thr Gln
1          5

<210> 176
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 176
Asp Arg Ser Ser Leu Thr Arg
1          5

<210> 177
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger
```

WO 02/46412

36

PCT/US01/46861

```
<400> 177
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1          5

<210> 178
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 178
Gln Ser Gly Ser Leu Thr Arg
1          5

<210> 179
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 179
Gln Ser Gly Ser Leu Thr Arg
1          5

<210> 180
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 180
Gln Ser Gly His Leu Gln Arg
1          5

<210> 181
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> finger

<400> 181
Gln Ser Ser Asp Leu Thr Arg
1          5

<210> 182
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target
```

WO 02/46412

37

PCT/US01/46861

<400> 182
ggagaggggg ccgcagtg 18
<210> 183
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> target
<400> 183
atggacgggt gagggggcg 19
<210> 184
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> target
<400> 184
gggggtgac 9
<210> 185
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> target
<400> 185
gctgggggc 9
<210> 186
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> recognition helix
<400> 186
Arg Ser Asp Ala Leu Thr Arg
1 5
<210> 187
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> recognition helix
<400> 187
Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg
1 5

WO 02/46412

38

PCT/US01/46861

```
<210> 188
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 188
Glu Arg Gly Asp Leu Thr Arg
1          5

<210> 189
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 189
Arg Ser Asp His Leu Ala Arg
1          5

<210> 190
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 190
Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg
1          5

<210> 191
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 191
Gln Ser Ser His Leu Ala Arg
1          5

<210> 192
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 192
Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg
1          5
```

WO 02/46412

39

PCT/US01/46861

```
<210> 193
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 193
Arg Ser Asp Glu Leu Gln Arg
1          5

<210> 194
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 194
Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg
1          5

<210> 195
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 195
Arg Ser Asp His Leu Ala Arg
1          5

<210> 196
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 196
Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg
1          5

<210> 197
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 197
Arg Ser Asp Ala Leu Thr Gln
1          5
```

WO 02/46412

40

PCT/US01/46861

```
<210> 198
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 198
Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg
1           5

<210> 199
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 199
Met Ser His His Leu Ser Arg
1           5

<210> 200
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 200
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1           5

<210> 201
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 201
Asp Arg Ser His Leu Thr Arg
1           5

<210> 202
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 202
Arg Ser Asp His Leu Thr Arg
1           5
```

WO 02/46412

41

PCT/US01/46861

```
<210> 203
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 203
Gln Ser Ser Asp Leu Thr Arg
1           5

<210> 204
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VEGF-C forward primer

<400> 204
tgccgatgca tgtctaaact                20

<210> 205
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VEGF-C reverse primer

<400> 205
tgaacagggtc tttcatcca gc            22

<210> 206
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VEGF-C probe

<221> modified_base
<222> (1)...(1)
<223> n = c modified by aminofluorescein (FAM)

<221> modified_base
<222> (26)...(26)
<223> n = a modified by tetramethylrhodamine (TAMRA)

<400> 206
nagcaacact accacagtgt caggcn        26

<210> 207
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target
```

WO 02/46412

42

PCT/US01/46861

```

<400> 207
tgagcggcgg cagcggagc
10

<210> 208
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> exemplary DNA-binding subdomain motif of C-2H-2
      class of zinc finger proteins (ZFP)

<221> MOD_RES
<222> (2)...(5)
<223> Xaa = any amino acid, Xaa in positions 4 and 5 may
      be present or absent

<221> MOD_RES
<222> (7)...(18)
<223> Xaa = any amino acid

<221> MOD_RES
<222> (20)...(24)
<223> Xaa = any amino acid, Xaa in positions 23 and 24
      may be present or absent

<400> 208
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1      5      10      15
Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His
20      25

<210> 209
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 209
ggcgtagac
9

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

<220>
<223> target

<400> 210
ggcgacgta
9

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

```

WO 02/46412

43

PCT/US01/46861

```
<220>
<223> peptide linker

<400> 211
Thr Gly Glu Lys Pro
1           5

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

<220>
<223> peptide linker

<400> 212
Gly Gly Gly Gly Ser
1           5

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

<220>
<223> peptide linker

<400> 213
Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser
1           5

<210> 214
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> peptide linker

<400> 214
Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro
1           5

<210> 215
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> peptide linker

<400> 215
Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
1           5           10

<210> 216
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
```

WO 02/46412

44

PCT/US01/46861

<220>
 <223> peptide linker

<400> 216
 Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
 1 5 10 15

<210> 217
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> F1 DNA binding domain of mouse transcription
 factor Zif268

<400> 217
 Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 1 5 10 15
 Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro
 20 25 30

<210> 218
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> F2 DNA binding domain of mouse transcription
 factor Zif268

<400> 218
 Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu
 1 5 10 15
 Thr Thr His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro
 20 25

<210> 219
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> F3 DNA binding domain of mouse transcription
 factor Zif268

<400> 219
 Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Arg
 1 5 10 15
 Lys Arg His Thr Lys Ile His Leu Arg Gln Lys
 20 25

<210> 220
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mouse transcription factor Zif268 target

WO 02/46412

45

PCT/US01/46861

<400> 220
 gcgtgggcg 9

 <210> 221
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Sp-1 transcription factor

 <400> 221
 Pro Gly Lys Lys Lys Gln His Ile Cys His Ile Gln Gly Cys Gly Lys
 1 5 10 15
 Val Tyr Gly Lys Thr Ser His Leu Arg Ala His Leu Arg Trp His Thr
 20 25 30
 Gly Glu Arg Pro Phe Met Cys Thr Trp Ser Tyr Cys Gly Lys Arg Phe
 35 40 45
 Thr Arg Ser Asp Glu Leu Gln Arg His Lys Arg Thr His Thr Gly Glu
 50 55 60
 Lys Lys Phe Ala Cys Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe Met Arg Ser Asp
 65 70 75 80
 His Leu Ser Lys His Ile Lys Thr His Gln Asn Lys Lys Gly
 85 90

 <210> 222
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Sp-1 optimal target consensus sequence

 <400> 222
 ggggcgggg 9

 <210> 223
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Sp-1 consensus sequence with leader sequence

 <400> 223
 Met Glu Lys Leu Arg Asn Gly Ser Gly Asp Pro Gly Lys Lys Lys Gln
 1 5 10 15
 His Ala Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Lys Ser Ser His Leu
 20 25 30
 Arg Ala His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Arg Pro Tyr Lys Cys Pro
 35 40 45
 Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Arg Ser Asp Glu Leu Gln Arg His Gln
 50 55 60
 Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys
 65 70 75 80
 Ser Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Ser Lys His Gln Arg Thr His Gln
 85 90 95
 Asn Lys Lys Gly
 100

WO 02/46412

46

PCT/US01/46861

```
<210> 224
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> N-terminal nuclear localization signal from SV40
        large T antigen

<400> 224
Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1                               5

<210> 225
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> FLAG peptide

<400> 225
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1                               5

<210> 226
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VEGF-A forward primer

<400> 226
gtgcattgga gccttgctt g
1                               21

<210> 227
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VEGF-A reverse primer

<400> 227
actcgatctc atcagggtac tc
1                               22

<210> 228
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VEGF-A Taqman probe

<221> modified_base
<222> (1)...(1)
<223> n = c modified by aminofluorescein (FAM)
```

PCT/US01/46861

[illegible]

WO 02/46412

48

PCT/US01/46861

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VP16-FLAG reverse primer

<400> 233
ctacttggtca tgggtgtcct tg 22

<210> 234
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VP16-FLAG Tagman probe

<221> modified base
<222> (1)...(1)
<223> n = a modified by aminofluorescein (FAM)

<221> modified base
<222> (26)...(26)
<223> n = a modified by tetramethylrhodamine (TAMRA)

<400> 234
ntcggtaaac atctggtcaa actcgn 26

<210> 235
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RT-PCR primer

<400> 235
atgaactttc tgctgtcttg ggtgcatt 28

<210> 236
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RT-PCR primer

<400> 236
tcaccgctc ggcttgtcac at 22

<210> 237
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> murine VEGF target

<400> 237
tgagcggcgg cagcggag 18

WO 02/46412

49

PCT/US01/46861

<210> 238
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 238
Arg Ser Asp Glu Leu Ser Arg
1 5

<210> 239
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recognition helix

<400> 239
Gln Ser Gly His Leu Thr Lys
1 5

<210> 240
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> target

<400> 240
gctgggggagc

9

<210> 241
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 241
cccagatctg gtgatggcaa gaagaagcag caccatctgc cacatccag

49

<210> 242
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 242
cccaagctta ggatccaccc ttcttgttct ggtgggt

37

<210> 243
<211> 18
<212> PRT

WO 02/46412

50

PCT/US01/46861

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> VZ+57
<400> 243
His Gln Asn Lys Lys Gly Gly Ser Gly Asp Gly Lys Lys Lys Gln His
1 5 10 15
Ile Cys

<210> 244
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> target

<400> 244
gaggcttgg 9

<210> 245
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> finger

<400> 245
Thr Ser Gly His Leu Thr Arg
1 5

<210> 246
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> finger

<400> 246
Thr Ser Gly His Leu Ile Arg
1 5

<210> 247
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> finger

<400> 247
Thr Ser Gly His Leu Ser Arg
1 5

<210> 248
<211> 7
<212> PRT

WO 02/46412

51

PCT/US01/46861

```
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> finger
<400> 248
Thr Ser Gly His Leu Ala Arg
1           5
<210> 249
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> finger
<400> 249
Thr Ser Gly His Leu Arg Arg
1           5
<210> 250
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> finger
<400> 250
Thr Ala Gly His Leu Val Arg
1           5
<210> 251
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> finger
<400> 251
Thr Thr Gly His Leu Val Arg
1           5
<210> 252
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> finger
<400> 252
Thr Lys Asp His Leu Val Arg
1           5
```

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 June 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/046412 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/47, A61K 48/00, 38/17
- (21) International Application Number: PCT/US01/46861
- (22) International Filing Date: 6 December 2001 (06.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09/733,604 7 December 2000 (07.12.2000) US
09/736,083 12 December 2000 (12.12.2000) US
09/846,033 30 April 2001 (30.04.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): SANG-AMO BIOSCIENCES, INC. [US/US]; Point Richmond Tech Center, 501 Canal Blvd., Suite A100, Richmond, CA 94804 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): REBAR, Edward [US/US]; 1609 Roger Court, El Cerrito, CA 94530 (US); JAMIESON, Andrew [GB/US]; 2528 Sutter Street, San Francisco, CA 94115 (US); LIU, Qiang [US/US]; 55 Williams Lane, Foster City, CA 94404 (US); LIU, Pei-Qi [CN/US]; 2266 Bridlecone Drive, Richmond, CA 94803 (US); WOLFFE, Alan [GB/US]; 155 Alice Lane, Orinda, CA 94563 (US); EISENBERG, Stephen, P. [US/US]; 5664 Pennsylvania Place, Boulder, CO 80303 (US); JARVIS, Eric [US/US]; 2265 Dartmouth Avenue, Boulder, CO 80505 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EL, ES, FI (utility model), FR, GB, GD, GL, GH, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SL, ST, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:
— of inventorship (Rule 4.17(ii)) for US only
- Published:
— with international search report
— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau
- (88) Date of publication of the international search report: 13 March 2003
- (74) Agents: SERAFINI, Andrew, T. et al.; TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW LLP, Two Embarcadero Center, 8th Floor, San Francisco, CA 94111 (US).
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/046412 A3

(54) Title: REGULATION OF ANGIOGENESIS WITH ZINC FINGER PROTEINS

(57) Abstract: Provided herein are a variety of methods and compositions for regulating angiogenesis, such methods and compositions being useful in a variety of applications where modulation of vascular formation is useful, including, but not limited to, treatments for ischemia and wound healing. Certain of the methods and compositions accomplish this by using various zinc finger proteins that bind to particular target sites in one or more VEGF genes. Nucleic acids encoding the zinc finger proteins are also disclosed. Methods for modulating the expression of one or more VEGF genes with the zinc finger proteins and nucleic acids are also disclosed. Such methods can also be utilized in a variety of therapeutic applications that involve the regulation of endothelial cell growth. Pharmaceutical compositions including the zinc finger proteins or nucleic acids encoding them are also provided.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/46861
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 A61K48/00 A61K38/17		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 41566 A (EISENBERG STEPHEN P ;CASE CASEY CHRISTOPHER (US); COX GEORGE NORBE) 20 July 2000 (2000-07-20) cited in the application the whole document	1-98
Y	KANG JONG SEOK ET AL: "Zinc finger proteins as designer transcription factors" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 275, no. 12, 24 March 2000 (2000-03-24), pages 8742-8748, XP002188513 ISSN: 0021-9258 the whole document --- -/--	1-98
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 November 2002		Date of mailing of the international search report 20/12/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-3440, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Valcarcel, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/46861
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHANG LEI ET AL: "Synthetic zinc finger transcription factor action at an endogenous chromosomal site. Activation of the human erythropoietin gene" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 275, no. 43, 27 October 2000 (2000-10-27), pages 33850-33860, XP002170053 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-98
Y	WO 00 42219 A (EISENBERG STEPHEN P ;SANGAMO BIOSCIENCES INC (US); CASE CASEY C (U) 20 July 2000 (2000-07-20) cited in the application the whole document	1-98
Y	BEERLI ROGER R ET AL: "Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 97, no. 4, 15 February 2000 (2000-02-15), pages 1495-1500, XP002188512 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document	1-98
Y	CHOO Y ET AL: "IN VIVO REPRESSION BY A SITE-SPECIFIC DNA-BINDING PROTEIN DESIGNED AGAINST AN ONCOGENIC SEQUENCE" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 372, 15 December 1994 (1994-12-15), pages 642-645, XP000986225 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-98

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In International Application No. PCT/US 01/46861
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	LIU P-Q ET AL: "REGULATION OF AN ENDOGENOUS LOCUS USING A PANEL OF DESIGNED ZINC FINGER PRTEINS TARGETED TO ACCESSIBLE CHROMATIN REGIONS ACTIVATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 276, no. 14, 6 April 2001 (2001-04-06), pages 11323-11334, XP000999288 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	1-98
P,X	LIU PEI-QI ET AL: "Regulation of the endogenous VEGF-A chromosomal locus using designed zinc finger proteins." BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, vol. 79, no. 3, 2001, page 377 XP009001281 22nd Annual West Coast Chromatin and Chromosomes Conference; Pacific Grove, California, USA; December 07-10, 2000 ISSN: 0829-8211 the whole document	1-66, 83-97
P,X	WO 01 83793 A (SANGAMO BIOSCIENCES INC) 8 November 2001 (2001-11-08) The whole document, see in particular examples 1, 3, and 13.	1-66, 83-97
P,X	WO 01 83819 A (SANGAMO BIOSCIENCES INC) 8 November 2001 (2001-11-08) The whole document, see in particular figure 27	1-66, 83-97
P,X	WO 01 84148 A (SANGAMO BIOSCIENCES INC) 8 November 2001 (2001-11-08) The whole document, see in particular Table 2.	1-66, 83-97
P,X	WO 01 83732 A (SANGAMO BIOSCIENCES INC) 8 November 2001 (2001-11-08) The whole document, see in particular figure 27.	1-66, 83-97
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor's Application No. PCT/US 01/46861
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LIU QIANG ET AL: "Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 94, no. 11, May 1997 (1997-05), pages 5525-5530, XP002169348 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-66, 83-97
Y	BEERLI R R ET AL: "TOWARD CONTROLLING GENE EXPRESSION AT WILL: SPECIFIC REGULATION OF THE ERBB-2 / HER-2 PROMOTER BY USING POLYDACTYL ZINC FINGER PROTEINS CONSTRUCTED FROM MODULAR BUILDING BLOCKS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 95, no. 25, December 1998 (1998-12), pages 14628-14633, XP002924795 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-66, 83-97
Y	KIM J-S ET AL: "Getting a handhold on DNA: Design of poly-zinc finger proteins with femtomolar dissociation constants" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 95, 1998, pages 2812-2817, XP002167948 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-66, 83-97
Y	GREISMAN H A ET AL: "A general strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target sites" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 275, 1997, pages 657-661, XP002167950 ISSN: 0036-8075 the whole document	1-66, 83-97
Y	WO 99 42474 A (GENOME DYNAMICS INC) 26 August 1999 (1999-08-26) the whole document	1-66, 83-97
Y	WO 96 26736 A (UNIV HELSINKI LICENSING ;LUDWIG INST CANCER RES (US)) 6 September 1996 (1996-09-06) the whole document	67-82,98
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/46861

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BATTEGAY E J: "ANGIOGENESIS: MECHANISTIC INSIGHTS, NEOVASCULAR DISEASES, AND THERAPEUTIC PROSPECTS" JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 73, no. 7, 1995, pages 333-346, XP002913098 ISSN: 0946-2716 the whole document	67-82,98
Y	RICHARD D E ET AL: "ANGIOGENESIS: HOW A TUMOR ADAPTS TO HYPOXIA" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 266, no. 3, 1999, pages 718-722, XP000938559 ISSN: 0006-291X the whole document	67-82,98
Y	YAO FENG ET AL: "Gene therapy in wound repair and regeneration." WOUND REPAIR AND REGENERATION, vol. 8, no. 6, November 2000 (2000-11), pages 443-451, XP001119979 ISSN: 1067-1927 the whole document	67-82,98
Y	CROMBLEHOLME TIMOTHY M: "Adenoviral-mediated gene transfer in wound healing." WOUND REPAIR AND REGENERATION, vol. 8, no. 6, November 2000 (2000-11), pages 460-472, XP001119980 ISSN: 1067-1927 the whole document	67-82,98
A	ZHANG LIANGLIN ET AL: "Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression." CANCER RESEARCH, vol. 60, no. 13, 1 July 2000 (2000-07-01), pages 3655-3661, XP002221831 ISSN: 0008-5472 the whole document --- -/-	67-82,98

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/46861

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	POLLOCK ROY ET AL: "Regulation of the endogenous VEGF gene by small molecule dimerizers." BLOOD, vol. 98, no. 11 Part 1, 16 November 2001 (2001-11-16), page 746a XP009001400 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Part 1; Orlando, Florida, USA; December 07-11, 2001, November 16, 2001 ISSN: 0006-4971 the whole document -----	1-98

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		national application No. PCT/US 01/46861
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 67-82, and 98 are directed to methods of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2.	☒ Claims Nos.: 1-98 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3.	☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
see additional sheet		
1.	☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2.	☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/US 01 /6861

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-98 (all partially)

The zinc finger pretein BV0 13A and compositions and uses involving this protein.

2. Claims: 1-98 (all partially)

Each of the particular zinc finger proteins disclosed in the present application (as for example the ones mentioned in claims 4, 8), together with their uses, and any of the fussions of such proteins to activation or represion domains would correspond to a separate potential invention.

Listing here all these potential inventions is for technical reasons not feasible. Thus, such potential inventions are here listed as the second group of inventions, but each of them would constitute a different potential invention.

3. Claim : 98 (partially)

Method to treat a wound comprising introducing a zinc finger protein into an animal having a genome comprising a target site within a VEGF gene (wherein the target site or zinc fingers are not the ones specified in Tables 3 and 4 of the present application).

International Application No. PCT/US 01 A6861

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-98

Present claims 1-98 relate to a proteins defined by reference to a desirable characteristic or property, namely, which are able to bind to a big number of possible target sites.

The claims cover all proteins having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such proteins. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the products by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Furthermore, on these claims making reference to particular zinc finger proteins, arbitrary designations are given which do not have any meaning for the skill reader. In contrast to a particular SEQ ID NO:, a mere arbitrary designation does not allow the search examiner to carry out a meaningful search of said protein.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed. Search has been done for the concept of using hybrid proteins containing zinc finger domains in order to alter the expression of a given gene, and also in particular of the VEGF gene.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				I onal Application No. PCT/US 01/46861	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0041566	A	20-07-2000	AU 745844 B2		11-04-2002
			AU 2847000 A		01-08-2000
			CA 2323086 A1		20-07-2000
			EP 1061805 A1		27-12-2000
			GB 2348424 A ,B		04-10-2000
			JP 2002534104 T		15-10-2002
			JP 2001231583 A		28-08-2001
			WO 0041566 A1		20-07-2000
			US 2002160940 A1		31-10-2002
WO 0042219	A	20-07-2000	US 6453242 B1		17-09-2002
			AU 744171 B2		14-02-2002
			AU 2722000 A		01-08-2000
			CA 2322700 A1		20-07-2000
			EP 1075540 A1		14-02-2001
			GB 2348425 A ,B		04-10-2000
			GB 2360285 A ,B		19-09-2001
			JP 2002534134 T		15-10-2002
			JP 2002191371 A		09-07-2002
			WO 0042219 A1		20-07-2000
WO 0183793	A	08-11-2001	AU 5391401 A		12-11-2001
			AU 5574801 A		12-11-2001
			AU 5587001 A		12-11-2001
			AU 5733101 A		12-11-2001
			AU 5742101 A		12-11-2001
			GB 2365969 A		27-02-2002
			GB 2365011 A		13-02-2002
			WO 0183819 A2		08-11-2001
			WO 0183751 A2		08-11-2001
			WO 0184148 A2		08-11-2001
			WO 0183793 A2		08-11-2001
			WO 0183732 A2		08-11-2001
			US 2002127559 A1		12-09-2002
			US 2002076711 A1		20-06-2002
			US 2002081603 A1		27-06-2002
			US 2002115215 A1		22-08-2002
			US 2002064802 A1		30-05-2002
WO 0183819	A	08-11-2001	AU 5391401 A		12-11-2001
			AU 5574801 A		12-11-2001
			AU 5587001 A		12-11-2001
			AU 5733101 A		12-11-2001
			AU 5742101 A		12-11-2001
			GB 2365969 A		27-02-2002
			GB 2365011 A		13-02-2002
			WO 0183819 A2		08-11-2001
			WO 0183751 A2		08-11-2001
			WO 0184148 A2		08-11-2001
			WO 0183793 A2		08-11-2001
			WO 0183732 A2		08-11-2001
			US 2002127559 A1		12-09-2002
			US 2002076711 A1		20-06-2002
			US 2002081603 A1		27-06-2002
			US 2002115215 A1		22-08-2002
			US 2002064802 A1		30-05-2002
WO 0184148	A	08-11-2001	AU 5391401 A		12-11-2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
PCT/US 01/46861

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0184148	A	AU 5574801 A	12-11-2001
		AU 5587001 A	12-11-2001
		AU 5733101 A	12-11-2001
		AU 5742101 A	12-11-2001
		GB 2365969 A	27-02-2002
		GB 2365011 A	13-02-2002
		WO 0183819 A2	08-11-2001
		WO 0183751 A2	08-11-2001
		WO 0184148 A2	08-11-2001
		WO 0183793 A2	08-11-2001
		WO 0183732 A2	08-11-2001
		US 2002127559 A1	12-09-2002
		US 2002076711 A1	20-06-2002
		US 2002081603 A1	27-06-2002
		US 2002115215 A1	22-08-2002
		US 2002064802 A1	30-05-2002
WO 0183732	A	08-11-2001	
		AU 5391401 A	12-11-2001
		AU 5574801 A	12-11-2001
		AU 5587001 A	12-11-2001
		AU 5733101 A	12-11-2001
		AU 5742101 A	12-11-2001
		GB 2365969 A	27-02-2002
		GB 2365011 A	13-02-2002
		WO 0183819 A2	08-11-2001
		WO 0183751 A2	08-11-2001
		WO 0184148 A2	08-11-2001
		WO 0183793 A2	08-11-2001
		WO 0183732 A2	08-11-2001
		US 2002127559 A1	12-09-2002
		US 2002076711 A1	20-06-2002
		US 2002081603 A1	27-06-2002
		US 2002115215 A1	22-08-2002
		US 2002064802 A1	30-05-2002
WO 9942474	A	26-08-1999	
		AU 2871199 A	06-09-1999
		CA 2321088 A1	26-08-1999
		EP 1062227 A2	27-12-2000
		WO 9942474 A2	26-08-1999
WO 9626736	A	06-09-1996	
		US 5607918 A	04-03-1997
		US 5928939 A	27-07-1999
		AU 741856 B2	13-12-2001
		AU 5302196 A	18-09-1996
		CA 2211687 A1	06-09-1996
		CN 1176603 A	18-03-1998
		EP 0814827 A1	07-01-1998
		JP 3275024 B2	15-04-2002
		JP 10510718 T	20-10-1998
		JP 3297687 B2	02-07-2002
		JP 2000228982 A	22-08-2000
		NO 973933 A	01-09-1997
		NZ 305091 A	25-11-1998
		WO 9626736 A1	06-09-1996
		US 5840693 A	24-11-1998
		US 6331301 B1	18-12-2001
		ZA 9601686 A	04-09-1996

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 リーバー, エドワード
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 3 0, エル セリート, ロジャー コート 1 6 0
9

(72)発明者 ジャミーソン, アンドリュー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 5, サン フランシスコ, サッター ストリート
2 5 2 8

(72)発明者 リウ, キアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4, フォスター シティ, ウィリアムス レーン
5 5

(72)発明者 リウ, ペイーキ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 8 0 3, リッチモンド, ブリストルコーン ドライブ
2 2 6 6

(72)発明者 ウォルフ, アラン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 6 3, オリンダ, アリス レーン 1 5 5

(72)発明者 エイゼンバーグ, スティーブン ピー.
アメリカ合衆国 コロラド 8 0 3 0 3, ボルダー, ペンシルベニア プレイス 5 6 6 4

(72)発明者 ジャービス, エリック
アメリカ合衆国 コロラド 8 0 3 0 5, ボルダー, ダートマウス アベニュー 2 2 6 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA07 DA02 EA02 FA02 GA11
4B063 QA18 QQ20 QR33 QR60 QR77 QR80 QS24 QS36
4C084 AA07 AA13 BA17 BA18 CA62 DB52 MA24 MA55 MA56 MA66
NA14 ZA361 ZA451 ZA891 ZA961 ZB111 ZB211 ZB261 ZC781
4H045 AA10 AA30 BA41 CA40 EA20 EA23 EA50 FA74