(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
C12Q 1/68

(11) 공개번호 특2002-0065473
(43) 공개일자 2002년08월13일

(21) 출원번호 10-2002-7003410
(22) 출원일자 2002년03월14일
번역문 제출일자 2002년03월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2000/24897
(86) 국제출원출원일자 2000년09월12일
(87) 국제공개번호 WO 2001/19981
(87) 국제공개일자 2001년03월22일

(81) 지정국 국내특허 : 아랍에미리트, 안티구아바부다, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 벨리즈, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카연방, 알제리, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그레나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 모잠비크, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 유고슬라비아, 남아프리카, 짐바브웨,
AP ARIPO특허: 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 모잠비크, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀랜드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 기네비쏘, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 09/395,448 1999년09월14일 미국(US)

(71) 출원인 상가모 바이오사이언스 인코포레이티드
미국 캘리포니아 94804 리치몬드 스위트 에이100 커넬 불러바드 501

(72) 발명자 카스카세이씨.
미국캘리포니아94402산마테오바리올헤트애비뉴605
장레이
미국캘리포니아94132샌프란시스코폰트불러바드520

(74) 대리인 정진상
박종혁
이기석

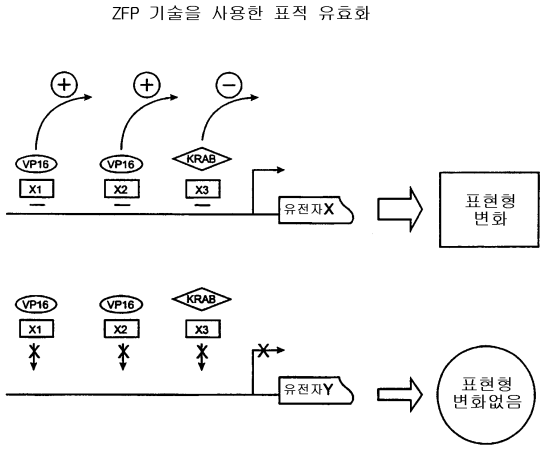
심사청구 : 없음

(54) 징크핑거 단백질을 사용한 기능 유전자학

요약

본 발명은 기능 유전자학 및 표적 유효화 적용을 위한, 재조합 징크핑거 단백질을 사용하여 유전자 발현을 조절하는 방법을 제공한다.

대표도



색인어
기능 유전자학, 징크핑거, 유전자, 발현, 게놈

명세서

기술분야

본 발명은, 기능 유전자학 및 표적 유효화 적용을 위한, 재조합 징크핑거 단백질을 사용하여 유전자 발현을 조절하는 방법을 제공한다.

배경기술

관심의 유전자의 기능을 측정하는 것은 약물 발견을 위한 잠재적 게놈 표적의 확인에 중요하다. 다음에, 특정한 기능 또는 표현형에 관련된 유전자가 치료적 화합물의 발견을 위한 표적으로서 유효화될 수 있다. 역사적으로, 특정한 유전자의 기능은 세포 또는 트랜스제닉 동물과 같은 생물학적 시스템에서의 유전자의 발현과 나열된 표현형의 기능을 관련시킴에 의해 확인되어 왔다.

유전자의 기능을 유효화하는데 사용되는 한가지 공지된 방법은 세포 또는 동물로부터 유전자를 유전적으로 제거하고(즉, " 녹아웃" 을 만든다), 세포 또는 동물의 표현형(즉, 어떤 변화, 예를 들어 분석에 의해 관찰할 수 있는 형태적, 기

능적 변화 등)이 변화되는지의 여부를 측정하는 것이다. 이 측정은 세포 또는 유기체가 유전자 없이 생존하는지의 여부에 의존하며, 유전자가 생존에 필요하다면 가능하지 않다. 다른 유전자들은 유전자의 소실에 적합하게 되어, 다른 방식으로 그것의 기능을 보상할 수 있는 상호작용 메카니즘을 행한다. 이 보상은 실제로, 결실된 유전자의 참기능을 무시할 수 있을 만큼 효과적일 수 있다. " 녹아웃" 을 만드는 기술적인 과정은 어렵고 광범위한 서열 정보가 필요하며, 따라서 게놈 영역 스케일에 대해 착수하려면 막대한 돈과 기술적인 자원을 마음대로 쓸 수 있어야 한다.

다른 예로서, 유전자 조절의 안티센스 방법 및 표적 리보자임에 의존하는 방법은 매우 예측불가능하다. 새로 발견된 유전자의 기능을 실험적으로 측정하는 또 다른 방법은 유전자의 cDNA를 강력한 프로모터에 의해 유도된 발현 벡터로 클론하고, 트랜스펙션 세포에서 유전자의 과발현에 대한 생리학적 결과를 측정하는 것이다. 이 방법 또한 강도 높은 일이며, 표적 유전자의 하향-조절에 대한 생리학적 결과를 다루지는 않는다. 따라서, 특성화되지 않은 유전자의 선택적 과- 및 저-발현을 허용하는 간단한 방법이 과학계에 대단히 유용할 것이다. 세포 모델 시스템, 트랜스제닉 동물 및 트랜스제닉 식물에서 유전자의 조절을 허락하는 방법은 대학 연구실, 제약 회사, 게놈 회사, 및 생물공학 산업에서 광범하게 사용될 것이다.

표적 유효화의 추가적 사용은 약물 발견을 위한 생체내 및 시험관내 분석의 생산에서이다. 일단, 선택된 표현형을 일으키는 유전자가 확인되면, 셀라인, 트랜스제닉 동물 및 트랜스제닉 식물이 유용한 단백질 생성물을 발현하거나 또는 해로운 단백질 생성물을 리프레션하도록 조작될 수 있다. 다음에, 이들 모델 시스템은, 예를 들어 고-처리량 스크리닝법과 함께, 선택된 유전자의 발현을 조절함으로써 바람직한 표현형, 예를 들어 질환의 치료를 제공하는 선도적인 치료적 화합물을 확인하는데 사용된다.

예를 들어, 리보자임, 안티센스 기법, 소분자 조절인자, cDNA 클론의 과발현, 및 유전자-녹아웃을 사용하여 주어진 유전자의 발현을 변경하는 방법이 현재 본 분야에 존재한다. 상술된 바와 같이, 이들 방법은 일반적으로 많은 적용에 불충분하다는 것이 지금까지 입증되었으며, 전형적으로 생체내에서의 높은 표적 효능 또는 높은 특이성이 증명되지 않았다. 유용한 실험 결과 및 치료적 처치를 위해서는 이들 특성이 바람직하다.

유전자 발현은 보통 전사 인자라고 명명된 서열 특이적 DNA 결합 단백질에 의해 제어된다. 이것들은 일반적으로 유전자의 전사 개시 지점에 근접하여 결합하고, 전형적으로 DNA 결합 도메인 및 조절성 도메인을 포함한다. 그것들은 프로모터에서 전사 개시 복합체의 형성 또는 기능의 효능에 영향을 미친다. 전사 인자는 긍정적인 방식(트랜스액티베이션)으로 또는 부정적인 방식(트랜스리프레션)으로 작용할 수 있다. 전사 인자는 전형적으로 조절성 도메인을 함유하지만, 또한 리프레션이 DNA 결합 도메인만에 의한 입체장애에 의해 달성될 수 있다.

전사 인자 기능은 구성적(항상 " 진행중") 또는 조건적일 수 있다. 조건적 기능이 여러 수단에 의해 전사 인자에 부여될 수 있지만, 이들 조절성 메카니즘의 대다수는 세포질에서 전사 인자의 격리 및 유도 방출, 그리고 이어지는 핵 전위, DNA 결합 및 트랜스액티베이션(또는 리프레션)에 의존한다. 이 방식으로 기능하는 전사 인자의 예는 프로게스테론 리셉터, 스테롤 반응 요소 결합 단백질(SREBP) 및 NF-kappa B를 포함한다. 전사 인자의 동족 DNA 인식 서열에 결합하는 전사 인자의 능력을 변경시킴에 의해 인산화 또는 소분자 리간드에 반응하는 전사 인자의 예들이 있다(Hou et al., Science 256:1701 (1994); Gossen & Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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); 및 Rendahl et al., Nat. Biotechnol. 16:757-761 (1998)).

징크핑거 단백질(" ZFP")은 서열-특이적 방식으로 DNA에 결합할 수 있는 단백질이다. 징크핑거는 아프리카 발톱 두꺼비 Xenopus laevis의 난모세포로부터의 전사 인자 TFIIIA에서 최초로 확인되었다. 징크핑거 단백질은 진핵 세포에 광범하게 퍼져 있다. 이들 단백질의 한 부류(Cys_2His_2 부류)를 특성화하는 모티프의 예는 -Cys-$(X)_{2-4}$-Cys-$(X)_{12}$-His-$(X)_{3-5}$-His(여기에서, X는 어떤 아미노산이다)이다. 단일 핑거 도메인은 약 30 아미노산 길이이며, 몇몇 구조 연구는, 그것이 단일 베타 턴의 시스테인 2개를 갖는 아연을 관통하는 공통-세로좌표에 있는 2개의 불변 히스티딘 잔기를 함유하는 알파 헬릭스를 함유한다는 것을 증명했다. 지금까지, 10,000 이상의 징크핑거 서열이 수천의 공지 또는 추정 전사 인자에서 확인되었다. 징크핑거 단백질은 DNA-인식에 연루될 뿐만 아니라, RNA 결합 및 단백질-단백질 결합에도 연루된다. 현재의 대략적인 계산은 이 부류의 분자가 모든 사람 유전자 중 약 2%의 생성물을 구성할 것이라는 것이다.

뮤린 전사 인자로부터의 3-핑거 도메인인 Zif268의 X-선 결정 구조는, 그것의 동족 DNA-서열과의 복합체로서 해석되었으며, 각 핑거는 주기적 회전 및 주 DNA 축을 따르는 핑거의 번역에 의해 다음 핑거위에 포개질 수 있는 것으로 나타난다. 이 구조는, 각 인식 헬릭스상의 -1, 2, 3 및 6 위치에 있는 측쇄가 각각의 DNA 트리플렛 하위-부위와 접촉하면서, 각 핑거가 독립적으로 3 염기쌍 간격에 걸쳐 DNA와 상호작용한다는 것을 지지한다. Zif268의 아미노 말단은 그것의 DNA 인식 하위-부위의 3' 말단에 놓여진다. 최근 결과는 일부 징크핑거가 표적 세그먼트에 있는 4번째 염기에 결합할 수 있다는 것을 지적하고 있다(Isalan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5617-5621 (1997)). 4번째 염기는 징크핑거에 의해 인식된 다른 3개 염기에 마주한 가닥상에 있으며, 3개 염기 하위-부위 중 3'에 인접한 염기에 상보한다.

또한, Zif286-DNA 복합체의 구조는, 징크핑거 단백질의 DNA 서열 특이성이 징크핑거 인식 헬릭스상의 4개 헬릭스 위치(-1, 2, 3 및 6)에서 아미노산을 치환함으로써 변경될 수 있다는 것을 지지했다. 이런 관찰 결과를 시험하기 위한 징크핑거 조합 라이브러리를 사용한 파지 디스플레이 실험이 1994년 일련의 논문에 공개되었다(Rebar et al., Science 263:671-673(1994); Jamieson et al., Biochemistry 33:5689-5695 (1994); Choo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11163-11167 (1994)). 조합 라이브러리는 Zif268의 첫째 또는 중간 핑거에 있는 무작위화된 측쇄로 구성되었고, 다음에 적합한 DNA 하위-부위가 변경된 DNA 트리플렛으로 대체된, 변경된 Zif268 결합 부위와 함께 분리되었다. 도입된 돌연변이의 성질과 결합 특이성에 있어 결과적 변경 사이의 상호 관계는, 변경된 결합 특이성을 갖는 징크핑거 단백질의 합리적인 디자인을 위한 치환 규칙의 부분적 세트를 발생시켰다. Greisman & Pabo, Science 275:657-661 (1997)은 징크핑거 단백질의 각 핑거가 연속적으로 무작위화되어 선택되는 정교한 파지 디스플레이 법을 논의한다. 이 논문은 핵 호르몬 반응 요소, p53 표적 부위 및 TATA 박스 서열에 대해 선택된 징크핑거 단백질 보고했다.

재조합 징크핑거 단백질이 배양 세포에서 일시적으로 발현된 리포터 유전자의 유전자 발현을 조절하는 능력을 가진다는 것이 보고되었다(예를 들어, Pomerantz et al., Science 267:93-96 (1995); Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5525-5530 (1997); 및 Beerli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14628-14633 (1998)). 예를 들어, Pomerantz et al., Science 267:93-96 (1995)은 Oct-1으로부터의 홈도메인을 갖는 Zif268의 2개 핑거를 융합함으로써 신규 DNA 결합 단백질을 디자인하려는 시도를 보고한다. 다음에, 이 혼성체 단백질이 키메라 단백질로서 발현에 대한 전사 활성인자 또는 리프레서 도메인과 융합된다. 키메라 단백질은 그것의 2개 성분의 하위-부위들의 혼성체를 나타내는 표적 부위를 결합시키는 것으로 보고되었다. 다음에, 저자는 프로모터에 작동가능하게 연결된 루시페라제 유전자 및 프로모터에 근접하여 키메라 DNA 결합 단백질을 위한 혼성체 부위를 함유하는 리포터 벡터를 구성했다. 저자는 키메라 DNA 결합 단백질이 루시페라제 유전자의 발현을 활성화 또는 리프레션할 수 있다고 보고했다.

Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5525-5530 (1997)은 펩티드 스페이서를 사용하여 각각 3개의 핑거를 갖는 2개의 징크핑거 단백질을 연결시킴으로써 복합 징크핑거 단백질을 형성하는 것을 보고한다. 다음에, 복합 단백질

은 더 이상으로 전사 활성화 또는 리프레션 도메인에 연결되었다. 결과의 키메라 단백질이 2개의 징크핑거 단백질에 의해 결합된 표적 세그먼트로부터 형성된 표적 부위에 결합된다는 것이 보고되었다. 더 이상으로, 키메라 징크핑거 단백질이, 표적 부위가 리포터에 작동가능하게 연결된 프로모터에 근접하여 리포터 플라스미드에 삽입되었을 때, 리포터 유전자의 전사를 활성화 또는 리프레션할 수 있다는 것이 보고되었다.

Beerli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14628-14633 (1998)은 KRAB, ERD 또는 SID 전사 리프레서 도메인, 또는 VP16 또는 VP64 전사 활성화 도메인에 융합된 키메라 6-핑거 징크핑거 단백질을 보고한다. 이 키메라 징크핑거 단백질은 사람 erbB-2 유전자의 5' 미번역 영역에 있는 18bp 표적 부위를 인식하도록 디자인되었다. 이 구성물을 사용하여, 이 연구의 저자는 erbB-2 프로모터에 연결된 일시적으로 발현된 리포터 루시페라제 구성물의 활성화 및 리프레션을 모두 보고한다.

여기에 더하여, 재조합 징크핑거 단백질이 bcr-abl 종양유전자를 코드화하는 통합 플라스미드 구성물의 발현을 리프레션한다는 것이 보고되었다(Choo. et al., Nature 372:642-645 (1994)). 징크핑거 단백질이 결합된 표적 세그먼트는 bcr 및 abl을 코드화하는 유전자를 융합하는 특이적 종양유전자 전위에 의해 만들어진 정션을 오버랩하도록 선택된 9 염기 서열 GCA GAA GCC였다. 이 표적 부위에 특이적인 징크핑거 단백질이 abl 또는 bcr 유전자에 결합하지 않고 종양 유전자에 결합하게 할 목적이었다. 저자는 파지 디스플레이를 사용하여 이 표적 세그먼트에 결합된 징크핑거 단백질 변이체를 선택했다. 다음에, 이와 같이 분리된 징크핑거 단백질 변이체가 셀라인에서 안정하게 트랜스펙션된 bcr-abl 구성물의 발현을 리프레션한다는 것이 보고되었다.

지금까지, 이들 방법은 일시적으로 발현된 공지된 유전의 조절, 또는 게놈에 통합된 공지된 외인성 유전자의 조절에 중점을 두었다. 반면에, 후보 유전자의 특이적 조절, 또는 선택된 표현형의 원인을 확인하기 위한 유전자의 리스트는 본 분야에서 증명되지 않고 있다. 따라서, 선택된 유전자 또는 유전자들의 생물학적 기능을 확인하고, 및/또는 약물 발견을 위한 적합한 표적으로서 유전자 또는 유전자들을 유효화하는데 유용한 방법이 요구된다.

발명의 상세한 설명

(발명의 개요)

따라서, 본 발명은, 예를 들어 약물 발견, 표적 유효화, 또는 기능 유전자학을 위한, 선택된 표현형에 관련된 유전자 또는 유전자들을 확인하는 방법을 최초로 제공한다.

한 양태로서, 본 발명은 후보 유전자의 생물학적 기능을 확인하는 방법을 제공하며, 이 방법은 (i) 제 1 후보 유전자를 선택하는 단계; (ii) 제 1 후보 유전자의 제 1 표적 부위에 결합하는 제 1 징크핑거 단백질, 및 제 2 유전자의 표적 부위에 결합하는 제 2 징크핑거 단백질을 제공하는 단계; (iii) 제 1 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자와 접촉하는 조건하에서 제 1 세포를 배양하고, 제 2 징크핑거 단백질이 제 2 후보 유전자와 접촉하는 조건하에서 제 2 세포를 배양하는 단계로서, 여기에서 제 1 및 제 2 징크핑거 단백질이 제 1 및 제 2 후보 유전자의 발현을 조정하는 단계; 및 (iv) 선택된 표현형을 분석함으로써, 제 1 후보 유전자가 선택된 표현형에 관련되는지의 여부를 확인하는 단계를 포함한다.

다른 양태로서, 본 발명은 후보 유전자의 생물학적 기능을 확인하는 방법을 제공하며, 이 방법은 (i) 복수의 후보 유전자를 확인하는 단계; (ii) 제 1 후보 유전자의 제 1 표적 부위에 결합하는 제 1 징크핑거 단백질을 제공하는 단계; (iii) 제 1 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자와 접촉하는 조건하에서 제 1 세포를 배양하는 단계로서, 여기에서 제 1 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자의 발현을 조정하는 단계; (iv) 후보 유전자의 발현 패턴을 측정하고, 제 1 후보 유전자

가 선택된 표현형에 관련되는지의 여부를 측정하는 단계; 및 (v) 각 후보 유전자에 대해 단계 (ii)에서 (iv)를 반복하는 단계를 포함한다.

다른 양태로서, 본 발명은 후보 유전자의 생물학적 기능을 확인하는 방법을 제공하며, 이 방법은 (i) 제 1 후보 유전자를 선택하는 단계; (ii) 제 1 후보 유전자의 제 1 표적 부위에 결합하는 제 1 징크핑거, 및 제 1 후보 유전자의 제 2 표적 부위에 결합하는 제 2 징크핑거를 제공하는 단계; (iii) 제 1 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자와 접촉하는 조건하에서 제 1 세포를 배양하고, 제 2 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자와 접촉하는 조건하에서 제 2 세포를 배양하는 단계로서, 여기에서 제 1 및 제 2 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자의 발현을 조정하는 단계; 및 (iv) 선택된 표현형을 분석함으로써, 제 1 후보 유전자에 선택된 표현형에 관련되는지의 여부를 확인하는 단계를 포함한다.

다른 양태로서, 본 발명은 후보 유전자의 생물학적 기능을 확인하는 방법을 제공하며, 이 방법은 (i) 제 1 후보 유전자를 선택하는 단계; (ii) 제 1 후보 유전자의 제 1 표적 부위에 결합하는 제 1 징크핑거 단백질을 제공하는 단계; (iii) 제 1 후보 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자와 접촉하는 조건하에서 제 1 세포를 배양하는 단계로서, 여기에서 제 1 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자의 발현을 조정하는 단계; 및 (iv) 선택된 표현형을 분석함으로써, 제 1 후보 유전자가 선택된 표현형에 관련되는지의 여부를 확인하는 단계를 포함한다.

한 구체예에서, 방법은 제 1 후보 화합물의 제 2 표적 부위에 결합하는 제 3 징크핑거 단백질을 제공하는 단계를 더 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 제 2 후보 유전자의 표적 부위에 결합하는 제 3 징크핑거 단백질을 제공하는 단계를 더 포함한다. 다른 구체예에서, 방법은 복수의 후보 유전자를 선택하고, 각 후보 유전자의 표적 부위에 결합하는 복수의 징크핑거 단백질을 제공하는 단계를 더 포함한다.

한 구체예에서, 제 1 후보 유전자는 적어도 약 200 뉴클레오티드 길이의 ETS에 의해 부분적으로 코드화된다. 한 구체예에서, 제 1 후보 유전자 및 제 2 유전자는 모두 선택된 표현형에 관련된다. 한 구체예에서, 제 2 유전자는 대조표준 유전자이다. 한 구체예에서, 제 1 및 제 2 세포는 동일한 세포이며, 여기에서 세포는 제 1 및 제 2 후보 유전자를 포함한다. 한 구체예에서, 제 1 및 제 2 후보 유전자는 내인성 유전자이다.

한 구체예에서, 후보 유전자의 발현은 적어도 약 50%까지 억제된다. 한 구체예에서, 후보 유전자의 발현은 적어도 약 150%까지 활성화된다. 한 구체예에서, 발현의 조정은 유전자 발현의 리프레션을 방지하는 유전자 발현의 활성화이다. 한 구체예에서, 발현의 조정은 유전자 활성화를 방지하는 유전자 발현의 억제이다.

한 구체예에서, 징크핑거 단백질은 1개 이상의 조절성 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 한 구체예에서, 조절성 도메인은 전사 리프레서, 메틸 트랜스페라제, 전사 활성인자, 히스톤 아세틸트랜스페라제, 및 히스톤 디아세틸라제로 구성된 군으로부터 선택된다.

한 구체예에서, 세포는 동물 세포, 식물 세포, 박테리아 세포, 원생동물 세포, 진균 세포, 포유류 세포, 또는 사람 세포로 구성된 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 세포는 각 징크핑거 단백질을 약 $1.5x10^{6}$ 카피 미만으로 포함한다.

한 구체예에서, 제 1 및 제 2 징크 핑거 단백질은 프로모터에 작동가능하게 연결된 징크핑거 단백질 핵산을 포함하는 발현 벡터에 의해 코드화되며, 여기에서 본 방법은 세포에 발현 벡터를 최초로 투여하는 단계를 더 포함한다. 한 구체예에서, 징크핑거 단백질의 발현은 소분자 제어하에 있다. 한 구체예에서, 제 1 징크핑거 단백질의 발현 및 제 2 징크핑거 단백질의 발현은 상이한 소분자 제어하에 있으며, 여기에서 제 1 및 제 2 징크핑거 단백질은 모두 조절성 도메인을 포함하는 융합 단백질이고, 제 1 및 제 2 징크핑거 단백질은 동일한 세포에서 발현된다. 한 구체예에서, 제 1 및 제 2 징크핑거 단백질은 모두 리프레서인 조절성 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 제 1 징크핑거 단백질은 활성인자인 조절성 도메인을 포함하고, 제 2 징크핑거 단백질은 리프레서인 조절성 도메인을 포함한다.

한 구체예에서, 발현 벡터는 바이러스 벡터이다. 다른 구체예에서, 발현 벡터는 레트로바이러스 발현 벡터, 아데노바이러스 발현 벡터, 또는 AAV 발현 벡터이다. 한 구체예에서, 징크핑거 단백질은 유도 프로모터에 작동가능하게 연결된 핵산에 의해 코드화된다.

한 구체예에서, 표적 부위는 후보 유전자의 전사 개시 부위의 상류이다. 한 구체예에서, 표적 부위는 후보 유전자의 전사 개시 부위의 하류이다. 한 구체예에서, 표적 부위는 후보 유전자의 전사 개시 부위에 인접해 있다. 다른 구체예에서, 표적 부위는 후보 유전자의 전사 개시 부위의 RNA 중합효소 중단 부위 하류에 인접해 있다.

(발명의 상세한 설명)

서론

본원에 설명된 바와 같이, 본 발명은 유전자 발현의 표현형적 결과 및 기능을 측정하기 위한 분석에 사용되는 징크핑거 단백질을 제공한다. 분석 기술에 있어서 최근의 진전은, 대량 서열화를 위한 집중적인 노력과 결부되어, 이전에 할 수 있었던 것보다 더욱 많은 분자 표적을 확인 및 특성화할 수 있는 기회를 만들고 있다. 유전자 및 그것들의 기능에 대한 이 새로운 정보는 기본적인 생물학적 이해를 서두르고, 치료적 중재를 위한 많은 새로운 표적을 제시할 것이다. 어떤 경우에, 분석적 도구는 새로운 데이타의 생성에 보조를 맞추지 못한다. 전세계에 걸친 상이한 유전자 발현의 측정에 있어서 최근의 진전을 예로 들 수 있다. 유전자 발현 마이크로어레이, 차등 cDNA 클로닝 빈도, 마이너스적 혼성화 및 차등 디스플레이법에 의해 대표되는 이들 방법은 상이한 조직에서 또는 특이적 자극에 대한 반응에서 상향- 또는 하향-조절된 유전자를 매우 신속히 확인할 수 있다. 그러한 방법은 점점, 형질전환, 종양 진행, 염증성 반응, 신경학적 장애 등의 생물학적 과정을 탐구하는데 사용되는 중이다. 어떤 방법은 현재, 주어진 생리학적 현상과 서로 관련이 있는 상이하게 발현된 유전자의 긴 리스트를 매우 쉽게 생성할 수 있지만, 상이하게 발현된 유전자와 현상간의 인과 관계를 증명하기는 어렵다. 지금까지, 상이하게 발현된 유전자에 기능을 지정하는 단순한 방법은 상이한 유전자 발현을 모니터하는 능력과 보조를 맞추지 못했다.

그러나, 징크핑거 단백질 기술은 상이한 유전자 발현 연구를 신속하게 분석하는데 사용될 수 있다. 조작된 징크핑거 단백질은 어떤 후보 표적 유전자를 상향 - 또는 하향-조절하는데 쉽게 사용될 수 있다. 매우 적은 서열 정보가 유전자-특이적 DNA 결합 도메인을 만드는데 필요하다. 이것은 징크핑거 단백질 기술을 빈약하게 특성화된 상이하게 발현된 유전자의 긴 리스트를 분석하는데 이상적으로 만든다. 어떤 것은 각 후보 유전자에 대한 징크핑거-기제 DNA 결합 도메인을 간단하게 조립하고, 키메라 상향- 및 하향-조절 인공 전사 인자를 만들고, 모델 시스템에서 동시에 한번 후보 유전자를 스위치 온하거나 또는 스위치 오프함으로써 연구중인 표현형(형질전환, 사이토카인에 대한 반응 등)에 대한 상향- 또는 하향-조절의 결과를 시험할 수 있다.

추가적으로, 많은 종래의 방법에 의해 달성될 수 있는 것보다, 더 많은 실험적 제어가 징크핑거 단백질에 의해 부여될 수 있다. 이것은 조작된 징크핑거 단백질의 생산 및/또는 기능을 소분자 제어하에 둘 수 있기 때문이다. 이런 접근법의 예는 Tet-On 시스템, 탈피호르몬-조절 시스템, 및 돌연변이 프로게스테론 리셉터를 포함하는 키메라 인자를 결합한 시스템이다. 이들 시스템은 모두, 징크핑거 단백질 조절인자의 기능 및/또는 발현을 소분자 제어하에 둠으로써, 어떤 관심의 후보 화합물 또는 트랜스젠에 대해 소분자 제어를 간접적으로 부여할 수 있다. 한 구체예에서, 세포는 2개의 징크핑거 단백질을 포함한다. 징크핑거 단백질은 2개의 상이한 후보 유전자(즉, 동일한 표현형에 관련된 2개 유전자), 또는 동일한 후보 유전자상의 2개의 상이한 표적 부위를 표적으로 한다. 또한, 각 징크핑거 단백질은 조절성 도메인을 포함한다. 각 징크핑거 단백질의 발현은 상이한 소분자 제어하에 있으며, 이로써 유전자 발현의 활성화 또는 리프레션 정도에 변이를 허용한다.

따라서, 본 출원은, 예를 들어 약물 발견 표적 유효화 또는 기능 유전자학을 위한, 선택된 표현형에 관련된 유전자 또는 유전자들을 확인하는데 징크핑거 단백질을 사용하는 방법을 최초로 제공한다. 본 발명은 유전자를 높은 효능으로 특이적으로 인식하도록 조작된 징크핑거 DNA 결합 단백질을 제공한다. 징크핑거 단백질을 사용한 유전자 발현의 조정은 유전자, 또는 EST에 의해 나타난 유전자의 생물학적 기능을 측정하고, 약물 발견을 위한 잠재적 표적 유전자의 기능을 유효화하는데 사용된다.

한 구체예에서, 적어도 2개의 상이한 유전자의 발현이 각 유전자를 조절하기 위한 상이한 징크핑거 단백질을 사용하여 조절된다. 이 유전자 중 1개는 후보 유전자이고, 나머지 1개 유전자는 대조표준 유전자 또는 제 2 후보 유전자일 수 있다. 유전자를 발현하는 세포가 징크핑거 단백질, 또는 징크핑거 단백질을 코드화하는 핵산과 접촉된다. 이 유전자는 모두 동일한 세포에서 발현될 수 있거나, 또는 상이한 세포에서 각각 발현될 수 있다. 제 1 및 제 2 유전자의 발현이 징크핑거 단백질에 의해 조정된 후, 세포가 선택된 표현형의 변화에 대해 분석되어 후보 유전자 또는 유전자들의 기능이 확인된다. 다른 구체예에서, 2개의 징크핑거 단백질은 2개의 상이한 표적 부위에서 동일한 후보 유전자를 표적으로 한다. 본 발명의 방법은, 전형적으로 특정한 표현형에 관련된 유전자를 확인하는 것으로 간주되는 기능 유전자학, 및 전형적으로 약물 발견 분석에 사용하기 적합한 유전자를 확인하는 것으로 간주되는 표적 유효화에 모두 적용될 수 있다.

결과적으로, 본 발명의 징크핑거 단백질은, 유전자 전사의 활성화 및/또는 리프레션 모두를 통해, 선택된 표현형을 일으키는 유전자를 확인하는데 사용될 수 있다. 프로모터 영역에 결합하는 징크핑거 단백질이 본 발명에 사용될 수 있지만, 또한 징크핑거 단백질은 유전자의 다른 영역에 결합함으로써 유전자 발현을 조절할 수도 있다. 따라서, 광범위한 서열 정보는 징크핑거 단백질을 사용하여 후보 유전자의 발현을 시험하는데 필요하지 않다. 따라서, EST가 그것들의 생물학적 기능을 측정하기 위해 본 발명의 분석에 사용될 수 있다.

더욱이 또한, 징크핑거 단백질은 조절성 도메인에 연결될 수 있으며, 이로써 전사를 활성화 또는 리프레션하는 키메라 전사 인자를 만들 수 있다. 한 구체예에서, 조절 방법은, 징크핑거 단백질을 코드화하는 유전자가 소분자에 의해 제어되는 분자 스위치에 연결된 징크핑거 단백질을 사용한다. 따라서, 징크핑거 단백질의 유전자 발현은 조건적이고 소분자를 사용하여 조절될 수 있으며, 이로써 후보 유전자 발현의 조건적 조절을 제공한다.

그러한 기능 유전자학 분석은, 예를 들어 유전 질환, 암, 진균, 원생동물, 박테리아 및 바이러스 감염, 국소빈혈, 혈관 질환, 관절염, 면역 장애 등을 위한 신규 약물의 발견을 포함하여, 신규의 사람 및 포유류 치료적 적용의 발견을 허용한다. 표현형의 변화에 대한 분석 시스템의 예는, 예를 들어 형질전환 분석, 예를 들어 증식, 앵커리지 의존성, 성장 인자 의존성, 병소 형성, 연한천에서의 성장, 누드 마우스에서 종양 증식, 및 누드 마우스에서 종양 혈관생성의 변화; 세포자살 분석, 예를 들어 DNA 사다리화 및 세포 죽음, 세포자살에 연루된 유전자 발현; 신호 변환 분석, 예를 들어 세포내 칼슘, cAMP, cGMP, IP3의 변화, 호르몬 및 신경전달물질 방출의 변화; 리셉터 분석, 예를 들어 에스트로겐 리셉터 및 세포 성장; 성장 인자 분석, 예를 들어 EPO, 저산소증 및 적혈구 콜로니 형성 단위 분석; 효소 생성물 분석, 예를 들어 FAD-2 유도 기름 불포화; 전사 분석, 예를 들어 리셉터 유전자 분석; 및 단백질 생산 분석, 예를 들어 VEGF ELIS를 포함한다.

한 구체예에서, 복수의 후보 유전자가 제공되고, 제 1 징크핑거 단백질이 후보 유전자 중 1개의 발현을 조정하는데 사용되는 한편, 나머지 후보 유전자의 발현 패턴이 시험된다. 이 단계가 각 후보 유전자에 대해 반복되고, 발현 패턴의 변화를 사용하여 유전자의 생물학적 기능을 측정한다. 다음에, 발현 데이타를 분석하여 선택된 표현형에 관련된 경로로 나머지 유전자 또는 유전자의 캐스캐이드를 재구성할 수 있다.

본원에 설명된 바와 같이, 징크핑거 단백질은 선택된 어떤 대조표준 또는 후보 유전자의 발현을 조절하기 위해, 어떤 적합한 표적 부위를 인식하도록 디자인될 수 있다. 조절에 적합한 표적 유전자의 예는, VEGF, CCR5, ERα, Her2/Neu, Tat, Rev, HBV C, S, X, 및 P, LDL-R, PEPCK, CYP7, 피브리노겐, ApoB, ApoE, Apo(a), 레닌, NF-κB, I-κB, TNF-α, FAS 리간드, 아밀로이드 선구물질 단백질, 심방 천연 인자(atrial naturetic factor), ob-렙틴, ucp-1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, G-CSF, GM-CSF, Epo, PDGF, PAF, p53, Rb, 태아성 헤모글로빈, 디스트로핀, 에우트로핀, GDNF, NGF, IGF-1, VEGF 리셉터 flt 및 flk, 토포이소머라제, 텔로머라제, bcl-2, 사이클린, 안지오스타틴, IGF, ICAM-1, STATS, c-myc, c-myb, TH, PTI-1, 폴리갈락투로나제, EPSP 신타제, FAD2-1, 델타-12 불포화효소, 델타-9 불포화효소, 델타-15 불포화효소, 아세틸-CoA 카르복실라제, 아실-ACP-티오에스테라제, ADP-글루코스 피로포스피릴라제, 녹말 신타제, 셀룰로스 신타제, 수크로스 신타제, 노화-관련 유전자, 중금속 킬레이터, 지방산 히드로퍼옥시드 리아제, 바이러스 유전자, 원생동물 유전자, 진균 유전자, 및 박테리아 유전자를 포함한다. 일반적으로, 조절되는 적합한 유전자는 사이토카인, 림포카인, 성장 인자, 미토겐 인자, 주화성 인자, 종양-활성 인자, 리셉터, 칼륨 채널, G-단백질, 신호 변환 분자, 및 다른 질환-관련 유전자를 포함한다.

후보 유전자는 당업자에게 공지된 방법에 의해 선택되는데, 예를 들어 유전자 발현 마이크로어레이, 차등 cDNA 클로닝 빈도, 마이너스적 혼성화, 차등 디스플레이법, 관심의 세포 또는 조직으로부터의 EST의 클로닝, 녹아웃시 죽은 유전자의 확인, 특정한 발생적 또는 세포적 사건 또는 자극에 대한 반응에서 상향- 또는 하향-조절된 유전자의 확인, 어떤 질환 및 병원 상태에서 상향- 또는 하향-조절된 유전자의 확인, 돌연변이 및 RFLP의 확인, 유전 질환에 연루된다고 공지된 염색체 영역에 관련된 유전자의 확인, 예를 들어 병원성 유기체에서 시간적으로 조절된 유전자의 확인, SNP에 근거한 차이 등에 의해 선택된다.

전사 인자 기능에서 일반적인 테마는 간단한 결합 및, 어떤 경우 프로모터에 충분히 근접하는 것이 일반적으로 필요한 모든 것이라는 것이다. 프로모터에 상대적인 정확한 위치선정, 배향, 및 한계내의 거리는 대단한 문제가 되지 않는다. 어떤 경우에는, 인핸서가 관심의 유전자로부터 멀리 떨어진 위치에서 발견된다. 여기에 더하여, 유전자 발현의 리프레션에 대해서는 주로 전사 개시에 대한 간단한 입체장애면 충분하다. 이들 특징은 징크핑거 단백질을 위한 표적 부위를 선택하는데 있어 상당한 융통성을 허용한다. 따라서, 징크핑거 단백질에 의해 인식되는 표적 부위는, 조절성 도메인에 선택적으로 연결된 징크핑거 단백질에 의해 유전자 발현의 활성화 또는 리프레션을 허용하는 표적 유전자에 있는 어떤 적합한 부위일 수 있다. 바람직한 표적 부위는 전사 시작 부위에 인접한 영역, 또는 전사 시작 부위의 하류 또는 상류를 포함한다. 여기에 더하여, 표적 부위는 인핸서 영역, 리프레서 부위, RNA 중합효소 중단 부위, 및 특이적 조절성 부위(예를 들어, SP-1 부위, 저산소증 반응 요소, 핵 리셉터 인식 요소, p53 결합 부위), cDNA 코드화 영역 또는 발현된 서열 태그(EST) 코딩 영역에 있는 부위에 위치한다.하기 설명된 바와 같이, 전형적으로 각 핑거는 2 내지 4 염기쌍을 인식하며, 2-핑거 징크핑거 단백질은 4 내지 7bp 표적 부위에 결합하고, 3-핑거 징크핑거 단백질은 6 내지 10bp 부위에 결합하고, 6-핑거 징크핑거 단백질은 각 표적 부위가 6 내지 10bp인 2개의 인접한 표적 부위에 결합한다.

관련된 또는 개별적인 징크핑거 단백질에 의한 인접한 표적 부위의 인식은 징크핑거 단백질의 결합을 강화시키는데 사용될 수 있으며, 이로써 친화성이 표적 부위에 개별적으로 결합되었을 때의 징크핑거 단백질의 친화성보다 더 커진다, 한 구체예에서, 6-핑거 징크핑거 단백질은 아미노산 링커에 의해 연결된 융합 단백질로서 생성되며, 결과의 징크핑거 단백질은 대략 18 염기쌍 표적 부위를 인식한다(예를 들어, Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:5525-5530 (1997) 참조). 18 염기쌍 표적 부위는, 이 크기의 표적 부위가 $3x10^{10}$ 염기쌍마다 단지 1번만 생기고 사람 게놈의 크기가 $3.5x10^{9}$ 염기쌍이기 때문에, 사람 게놈에서 특이성을 제공할 것으로 기대된다(예를 들어, Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5525-5530 (1997) 참조). 다른 구체예에서, 6-핑거 징크핑거 단백질의 2-, 3-핑거 부분은 로이신 지퍼, STAT 단백질 N-말단 도메인, 또는 FK506 결합 단백질을 통해 비공유적으로 결합된다(예를 들어, O'Shea, Science 254:539 (1991); Barahmand-Pour et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 211:121-128 (1996); Klemm et al., Annu. Rev. Immunol. 16:569-592 (1998); Ho et al., Nature 382:822-826 (1996) 참조).

본원에 설명된 바와 같이, 2개의 징크핑거 단백질이 세포에 투여되어, 상이한 표적 유전자, 예를 들어 후보 유전자 및

대조표준 유전자, 또는 2개의 후보 유전자, 또는 동일한 유전자에 대한 상이한 표적 부위를 인식한다. 선택적으로, 복수의 징크핑거 단백질이 투여될 수도 있으며, 이것은 동일한 유전자에서 2개 이상의 상이한 표적 부위를 인식한다. 2개의 후보 유전자가 시험되는 때, 표현형은 제 1 및 제 2 유전자를 모두 필요로 할 수 있다. 후보 유전자는 내인성 유전자 또는 외인성 유전자일 수 있다. 한 구체예에서, 1개 이상의 후보 유전자가 선택된 표현형에 관련된다.

다른 구체예에서, 징크핑거 단백질은 하기 설명된 적어도 1개 이상의 조절성 도메인에 연결된다. 바람직한 조절성 도메인은 KRAB 및 VP16과 같은 전사 인자 리프레서 또는 활성인자 도메인, 보조-리프레서 및 보조-활성인자 도메인, DNA 메틸 트랜스페라제, 히스톤 아세틸트랜스페라제, 히스톤 디아세틸라제, 및 Fok1과 같은 엔도뉴클레아제를 포함한다. 유전자 발현의 리프레션에 대해서, 전형적으로 유전자의 발현은 약 20%(즉, 80%의 비-징크핑거 단백질 조정 발현), 더 바람직하게 약 50%(즉, 50%의 비-징크핑거 단백질 조정 발현), 더 바람직하게 약 75 내지 100%(즉, 20 내지 0%의 비-징크핑거 단백질 조정 발현)까지 감소된다. 유전자 발현의 활성화에 대해서, 전형적으로 발현은 약 1.5배(즉, 150%의 비-징크핑거 단백질 조정 발현), 바람직하게 2배(즉, 200%의 비-징크핑거 단백질 조정 발현), 더 바람직하게 5 내지 10배(즉, 500 내지 1000%의 비-징크핑거 단백질 조정 발현), 적어도 100배 이상까지 활성화된다.

또한, 조작된 징크핑거 단백질 활성인자 및 리프레서의 발현은 tet-조절 시스템 및 RU-486 시스템에 의해 대표되는 소분자 시스템에 의해 제어될 수 있다(예를 들어, Gossen & Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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); 및 Rendahl et al., Nat. Biotechnol. 16:757-761 (1998) 참조). 이것들은 징크핑거 단백질 활성인자 및 리프레서의 발현에 대해 소분자 제어를 부여하며, 따라서 관심의 표적 유전자(들)에 대한 소분자 제어를 부여한다.

정의

본원에 사용된 바와 같은, 다음의 용어는 다르게 명시되지 않는다면, 그것들이 속해진 의미를 가진다.

" 후보 유전자" 는 세포, 바이러스, 에피솜, 미생물, 원생동물, 진균, 동물, 식물, 엽록체, 또는 미토콘드리아 유전자로 간주한다. 또한, 이 용어는 미생물적 또는 바이러스적으로 감염된 세포에서 천연발생한 미생물 또는 바이러스 게놈의 일부인 미생물 또는 바이러스 유전자로 간주한다. 미생물 또는 바이러스 게놈은 염색체이거나, 또는 숙주 염색체에 통합될 수 있다. 또한, 이 용어는 EST로서 확인된 세포 유전자 뿐만 아니라, 내인성 및 외인성 유전자도 포함한다. 주로, 본 발명의 후보 유전자는 생물학적 기능이 알려지지 않은 것들이다. 선택된 분석은 유전자가 징크핑거 단백질을 사용한 후보 유전자 발현의 조절에 의하여 선택된 표현형에 관련되는지의 여부를 측정하는데 사용된다. 만일 생물학적 기능이 공지되어 있다면, 전형적으로 후보 유전자는 대조표준 유전자로서 작용하거나, 또는 1개 이상의 추가 유전자가 동일한 표현형에 관련되는지의 여부를 측정하는데 사용되거나, 또는 이 유전자가 특정한 표현형에 다른 유전자와 함께 참여하는지의 여부를 측정하는데 사용된다.

" 선택된 표현형" 은 세포 성장, 증식, 형태, 효소 기능, 신호 변환, 발현 패턴, 하류 발현 패턴, 리포터 유전자 활성화, 호르몬 방출, 성장 인자 방출, 신경전달물질 방출, 리간드 결합, 세포자살, 및 생성물 형성에 있어서의 변화와 같은, 분석에서 측정될 수 있는 어떤 표현형, 예를 들어 어떤 관찰가능한 특징 또는 기능적 효과로 간주한다. 그러한 분석은, 예를 들어 형질전환 분석, 예를 들어 증식, 앵커리지 의존성, 성장 인자 의존성, 병소 형성, 연한천에서의 성장, 누드 마우스에서 종양 증식, 및 누드 마우스에서 종양 혈관생성의 변화; 세포자살 분석, 예를 들어 DNA 사다리화 및 세포 죽음, 세포자살에 연루된 유전자 발현; 신호 변환 분석, 예를 들어 세포내 칼슘, cAMP, cGMP, IP3의 변화, 호르몬 및 신경전달물질 방출의 변화; 리셉터 분석, 예를 들어 에스트로겐 리셉터 및 세포 성장; 성장 인자 분석, 예를 들어 EPO, 저산

소증 및 적혈구 콜로니 형성 단위 분석; 효소 생성물 분석, 예를 들어 FAD-2 유도 기름 불포화; 전사 분석, 예를 들어 리셉터 유전자 분석; 및 단백질 생산 분석, 예를 들어 VEGF ELIS를 포함한다.

만일 후보 유전자의 유전자 발현의 조정이 선택된 표현형에서의 변화를 일으킨다면, 후보 유전자는 선택된 표현형에 "관련" 된다.

용어 "징크핑거 단백질" 또는 "ZFP" 는 아연에 의해 안정화된 DNA 결합 도메인을 갖는 단백질로 간주한다. 개별 DNA 결합 도메인이 전형적으로 "핑거" 로서 간주된다. 징크핑거 단백질은 최소 1-핑거, 전형적으로 2-핑거, 3-핑거, 또는 6-핑거를 가진다. 각 핑거는 DNA의 2 내지 4 염기쌍, 전형적으로 DNA의 3 또는 4 염기쌍을 결합시킨다. 징크핑거 단백질은 표적 부위 또는 표적 세그먼트라고 명명된 핵산 서열에 결합한다. 각 핑거는 전형적으로 아연을 좌표로 하는 대략 30 아미노산의 DNA-결합 하위-도메인을 포함한다.이들 단백질의 한 부류(Cys_2His_2 부류)를 특성화하는 모티프의 예는 $-Cys-(X)_{2-4}-Cys-(X)_{12}-His-(X)_{3-5}-His$(여기에서, X는 어떤 아미노산이다)이다. 연구들은 이 부류의 단일 징크 핑거가 단일 베타 턴의 시스테인 잔기 2개를 갖는 아연을 따라 있는 공통-세로좌표에 있는 2개의 불변 히스티딘 잔기를 함유하는 알파 헬릭스로 구성된다는 것을 증명했다(예를 들어, Berg & Shi, Science 271:1081-1085 (1996)).

"표적 부위" 는 징크핑거 단백질에 의해 인식되는 핵산 서열이다. 단일 표적 부위는 전형적으로 약 4 또는 약 10 염기쌍을 가진다. 전형적으로 2-핑거 징크핑거 단백질은 4 내지 7 염기쌍 표적 부위를 인식하고, 3-핑거 징크핑거 단백질은 6 내지 10 염기쌍 표적 부위를 인식하며, 6-핑거 징크핑거 단백질을 2개의 인접한 9 내지 10 염기쌍 표적 부위를 인식한다.

용어 "인접한 표적 부위" 는 0 내지 약 5 염기쌍까지 분리되어 있는 비-오버랩 표적 부위로 간주한다.

"K_d" 는 화합물의 해리 상수, 즉 주어진 분석 시스템을 사용하여 측정된 바, 주어진 조건(즉, [표적]<<K_d일 때)하에서 화합물(예를 들어, 징크핑거 단백질)과 그것의 표적의 최대 결합의 반(즉, 화합물 분자의 반이 표적에 결합된다)을 제공하는 화합물의 농도로 간주한다(예를 들어, 미국 특허 번호 5,789,538 참조). K_d를 측정하는데 사용되는 분석 시스템은, 그것이 징크핑거 단백질의 실제 K_d의 가장 정확한 측정을 제공하도록 선택되어야 한다. 징크핑거 단백질의 실제 K_d의 정확한 측정을 제공하는 한, 어떤 분석 시스템도 사용될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 징크핑거 단백질의 K_d는 본원에 설명된 바와 같은 전기영동도 이동 분석("EMSA")를 사용하여 측정된다. 징크핑거 단백질 순도 또는 활성도가 맞춰지지 않는다면, 본원에 설명된 방법을 사용하여 한 K_d계산은 주어진 징크핑거 단백질의 참 K_d를 과소평가할 수 있다. 선택적으로, 후보 유전자의 전사를 조정하는데 사용되는 징크핑거 단백질의 K_d는 약 100nM 미만, 또는 약 75nM 미만, 또는 약 50nM 미만, 또는 약 25nM 미만이다.

문단 "전사 개시 부위에 인접한" 은 전사 개시 부위의 상류 또는 하류인 약 50 염기 범위내의 표적 부위로 간주한다. 전사 개시 부위의 "상류" 는 전사 개시 부위의 5'의 약 50 염기 이상인 표적 부위로 간주한다. 전사 개시 부위의 "하류" 는 전사 개시 부위의 3'의 약 50 염기 이상인 표적 부위로 간주한다.

문단 "RNA 중합효소 중단 부위" 는 Uptain et al., Annu. Rev. Biochem. 66:117-172 (1997)에 설명된다.

세포에 발현 벡터, 핵산, 징크핑거 단백질, 또는 송달 부형제를 "투여하는 것" 은 네이키드 DNA의 투여를 포함하여, 형질도입, 트랜스펙션, 전기천공, 전위, 융합, 식균작용, 또는 바이오리스틱스 방법 등의, 즉 단백질 또는 핵산이 세포 멤브레인을 가로질러 바람직하게 세포의 핵으로 수송될 수 있는 어떤 수단을 포함한다.

"송달 부형제" 는 화합물, 예를 들어 리포솜, 독소, 또는 멤브레인 전위 폴리펩티드로 간주하며, 이것은 징크핑거 단백질을 투여하는데 사용된다. 또한, 송달 부형제는 징크핑거 단백질을 코드화하는 핵산, 예를 들어 지질:핵산 복합체, 발현 벡터, 바이러스 등을 투여하는데 사용될 수 있다.

용어 유전자의 "발현 조정", "발현 억제" 및 "발현 활성화" 는 유전자의 전사를 활성화 또는 억제하는 징크핑거 단백질의 능력으로 간주한다. 활성화는 전사 억제의 방지(즉, 유전자 발현의 리프레션의 방지)를 포함하고, 억제는 전사 활성화의 방지(즉, 유전자 활성화의 방지)를 포함한다.

" 유전자 발현의 리프레션을 방지하는 유전자 발현의 활성화" 는 리프레서 분자의 결합을 차단 또는 방지하는 징크핑거 단백질의 능력으로 간주한다.

" 유전자 활성화를 방지하는 유전자 발현의 억제" 는 활성인자 분자의 결합을 차단 또는 방지하는 징크핑거 단백질의 능력으로 간주한다.

조정은 표적 유전자의 발현에 의해 간접적 또는 직접적으로 영향 받는 어떤 파라미터를 측정함으로써 분석될 수 있다. 그러한 파라미터는, 예를 들어 본원에 설명된 바와 같은, RNA 또는 단백질 레벨의 변화, 단백질 활성의 변화, 생성물 레벨의 변화, 하류 유전자 발현의 변화, 리포터 유전자 전사의 변화(루시페라제, CAT, β-갈락토시다제, β-글루쿠로니다제, GFP (예를 들어, Mistili & Spector, Nature Biotechnology 15:961-964 (1997) 참조); 신호 변환, 인산화 및 탈인산화, 리셉터-리간드 상호작용, 2차 메신저 농도(예를 들어, cGMP, cAMP, IP3, 및 Ca^{2+})의 변화, 세포 성장, 및 신혈관생성 등을 포함한다. 이들 분석은 시험관내, 생체내, 및 생체외일 수 있다. 그러한 기능적 효과가 당업자에게 공지된 어떤 수단에 의해 측정될 수 있으며, 예를 들어 본원에 설명된 바와 같은, 예를 들어 화학발광, 형광, 색채반응, 항체 결합, 유도 마커, 리간드 결합 분석에 의한, RNA 또는 단백질 레벨 측정, RNA 안정성 측정, 하류 또는 리포터 유전자 발현 확인; cGMP 및 이노시톨 트리포스페이트(IP3)와 같은 세포내 2차 메신저의 변화; 세포내 칼슘 레벨의 변화; 사이토카인 방출 등에 의해 측정된다.

징크핑거 단백질에 의해 유전자 발현 조정의 레벨을 측정하게 위해서, 징크핑거 단백질과 접촉된 세포가, 억제 또는 활성화의 정도를 시험하기 위해 대조표준 세포, 예를 들어 징크핑거 단백질이 없거나 또는 비-특이적 징크핑거 단백질을 갖는 세포와 비교된다. 대조표준 샘플은 100%의 상대 유전자 발현 활성값으로 지정된다. 유전자 발현의 조정/억제는, 대조표준에 상대적인 유전자 발현 활성값이 약 80%, 바람직하게 50%(즉, 대조표준 활성의 0.5배), 더 바람직하게 25%, 더 바람직하게 5 내지 0%일 때 달성된다. 유전자 발현의 조정/활성화는, 대조표준에 상대적인 유전자 발현 활성값이 110%, 더 바람직하게 150%(즉, 대조표준 활성의 1.5배), 더 바람직하게 200 내지 500%, 더 바람직하게 1000 내지 2000% 이상일 때 달성된다.

" 전사 활성인자" 및 " 전사 리프레서" 는, 상기 설명된 바와 같은 전사를 조정하는 능력을 가지는 단백질 또는 단백질의 이펙터 도메인으로 간주한다. 그러한 단백질은, 예를 들어 전사 인자 및 보조-인자(예를 들어, KRAB, MAD, ERD, SID, 핵 인자 kappa B 하위-단위 p65, 초기 성장 반응 인자 1, 및 핵 호르몬 리셉터, VP16, VP64), 엔도뉴클레아제, 인테그라제, 재조합효소, 메틸트랜스페라제, 히스톤 아세틸트랜스페라제, 히스톤 디아세틸라제 등을 포함한다. 활성인자 및 리프레서는 보조-활성인자 및 보조-리프레서를 포함한다(예를 들어, Utley et al., Nature 394: 498-502 (1998) 참조).

" 조절성 도메인" 은 DNA 결합 도메인, 즉 징크핑거 단백질에 테더되었을 때, 전사 조정 활성을 가지는 단백질 또는 단백질 도메인으로 간주한다. 전형적으로, 조절성 도메인은 징크핑거 단백질에 공유적 또는 비-공유적으로 연결되어 전사 조정을 행한다. 또는 달리, 징크핑거 단백질은 조절성 도메인 없이 단독으로 작용하여 전사 조정을 행할 수 있다.

용어 " 이종성" 은 상대적인 용어로서, 핵산의 부분에 관련하여 사용되었을 때, 핵산이 천연에서 서로 동일한 관계에서 발견되지 않는 2개 이상의 하위-서열을 포함한다는 것을 나타낸다. 예를 들어, 재조합적으로 생성된 핵산은 전형적으로, 새로운 기능의 핵산을 만들기 위해 합성적으로 배열된 무관한 유전자로부터의 2개 이상의 서열, 예를 들어 한 공급원으로부터의 프로모터 및 다른 공급원으로부터의 코딩 영역을 가진다. 따라서, 이러한 관계에 있어서, 2개의 핵산은 서로 이종성이다. 세포에 첨가되었을 때, 재조합 핵산은 또한 세포의 내인성 유전자에 대해 이종성일 것이다. 따라서, 염색체에서, 이종성 핵산은 염색체에 통합된 비-자생(비-천연발생) 핵산, 또는 비-자생(비-천연발생) 염색체외 핵산을 포함할 것이다.

유사하게, 이종성 단백질은, 단백질이 천연에서 서로 동일한 관계에서 발견되지 않는 2개 이상의 하위-서열을 포함한다는 것을 나타낸다(예를 들어, "융합 단백질", 여기에서 2개의 하위-서열은 단일 핵산 서열에 의해 코드화된다). 예를 들어, 재조합 기술의 소개에 관해 Ausubel(상동) 참조.

용어 "재조합"은, 예를 들어 세포, 핵산, 단백질 또는 백터에 관련하여 사용되었을 때, 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이종성 핵산 또는 단백질의 도입, 또는 자생 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되거나, 또는 세포가 그렇게 변형된 세포로부터 유도된다는 것을 나타낸다. 따라서, 예를 들어 재조합 세포는, 세포의 자생(천연발생) 형태내에서 발견되지 않는 유전자를 발현하거나, 또는 다른 방식으로 정상적 또는 비정상적으로 발현되거나 발현중이거나 또는 전혀 발현되지 않은 자생 유전자의 제 2 카피를 발현한다.

"프로모터"는 전사를 지시하는 핵산 제어 서열의 어레이로서 정의된다. 본원에 사용된 바와 같이, 프로모터는 전형적으로, 어떤 RNA 중합효소 II형 프로모터, TATA 요소, 인핸서, CCAAT 박스, SP-1 부위 등의 경우에서와 같이, 전사 시작 부위에 가까운 필수 핵산 서열을 포함한다. 본원에 사용되는 바와 같이, 프로모터는 또한 말단 인핸서 또는 리프레서 요소를 선택적으로 포함하며, 이것은 전사 시작 부위에서부터 수천 염기쌍 만큼이나 위치할 수 있다. 프로모터는 주로 폴리펩티드와 같은 DNA-결합 부분, 예를 들어 핵 리셉터, Gal4, lac 리프레서 등에 의한 트랜스액티베이션에 반응하는 요소를 가진다.

"구성적" 프로모터는 대부분의 환경 및 개발 조건하에서 활성인 프로모터이다. "유도" 프로모터는 어떤 환경 또는 개발 조건하에서 활성인 프로모터이다.

용어 "작동가능하게 연결된"은 핵산 발현 제어 서열(프로모터, 또는 전사 인자 결합 부위의 어레이와 같은)과 제 2 핵산 서열간의 기능적 결합으로 간주하며, 여기에서 발현 제어 서열은 제 2 서열에 상응하는 핵산의 전사를 지시한다.

"발현 백터"는 숙주 세포에서 특정한 핵산의 전사, 및 선택적으로 숙주 세포에서 발현 벡터의 통합 또는 복제를 허락하는 일련의 명시된 핵산 요소를 갖는, 재조합적 또는 합성적으로 생성된 핵산 구성물이다. 발현 벡터는 바이러스 또는 비-바이러스 기원의 플라스미드, 바이러스 또는 핵산 단편의 부분일 수 있다. 전형적으로, 발현 벡터는 "발현 카세트"를 포함하며, 이것은 프로모터에 작동가능하게 연결된 전사될 핵산을 포함한다. 또한, 용어 발현 벡터는 프로모터에 작동가능하게 연결된 네이키드 DNA를 포함한다.

"숙주 세포"는 징크핑거 단백질, 또는 징크핑거 단백질을 코드화하는 발현 벡터 또는 핵산을 함유하는 세포를 의미한다. 숙주 세포는 전형적으로 발현 벡터의 복제 및/또는 발현을 지원한다. 숙주 세포는 E. coli와 같은 원핵 세포, 또는 이스트, 진균, 원생동물, 고등 식물, 곤충과 같은 진핵 세포, 또는 양서류 세포, 또는 CHO, HeLa, 293, COS-1와 같은 포유류 세포 등, 예를 들어 배양된 세포(시험관내), 이식편 및 1차 배양물(시험관내 및 생체외), 및 생체내 세포일 수 있다.

"핵산"은 단일- 또는 이중-가닥 형태의 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드, 및 그것들의 중합체로 간주한다. 이 용어는 공지의 뉴클레오티드 유사체 또는 변형된 주쇄 잔기 또는 결합을 함유하는 핵산을 포함하며, 이것은 합성적, 천연발생적, 및 비-천연발생적일 수 있고, 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 가진다. 그러한 유사체의 예는, 제한없이 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2-O-메틸 리보뉴클레오티드, 펩티드-핵산(PNA)을 포함한다.

달리 나타내지 않는다면, 특정한 핵산 서열은 또한, 명백하게 나타낸 서열 뿐만 아니라, 보존성으로 변형된 그것의 변이체(예를 들어, 축퇴성 코돈 치환) 및 상보성 서열을 암묵적으로 포함한다. 구체적으로, 축퇴성 코돈 치환은 1개 이상의 선택(또는 모든) 코돈의 3번째 위치가 혼합-염기 및/또는 디옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성시킴으로써 달성될 수 있다(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081(1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1995); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). 용어 핵산은 유전자, cDNA, mRNA, 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드와 상호 교환가능하게 사용된다.

용어 " 폴리펩티드" , " 펩티드" 및 " 단백질" 은 본원에서 상호 교환가능하게 사용되며, 아미노산 잔기의 중합체로 간주한다. 또한, 이 용어들은 천연발생 아미노산 중합체 및 비-천연발생 아미노산 중합체 뿐만 아니라, 1개 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연발생 아미노산의 인공적 화학 의태체인 아미노산 중합체에도 적용한다.

용어 " 아미노산" 은 천연발생 및 합성 아미노산 뿐만 아니라, 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 의태체로 간주한다. 천연발생 아미노산은 유전 코드에 의해 코드화되는 것들 뿐만 아니라, 나중에 변형되는 아미노산, 예를 들어 히드록시프롤린, γ-카르복시글루타메이트, 및 O-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 천연발생 아미노산과 기본적 화학 구조가 동일한 화합물, 즉 수소에 결합된 α-탄소, 카르복실기, 아미노기, 및 R기, 예를 들어 호모세핀, 노르로이신, 메티오닌 술폭시드, 메티오닌 메틸 술포늄을 가지는 화합물로 간주한다.그러한 유사체는 변형된 R 기(예를 들어, 노르로이신) 또는 변형된 펩티드 주쇄를 가지지만, 천연발생 아미노산과 기본적 구조는 동일하다. 아미노산 의태체는 아미노산의 일반적인 화학 구조와는 다른 구조를 가지지만, 천연발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 화학적 화합물로 간주한다.

아미노산은 통상적으로 공지된 3-문자 기호, 또는 IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission에 의해 추천된 1-문자 기호로 본원에서 간주될 수 있다. 마찬가지로, 뉴클레오티드도 통상적으로 승인된 단일-문자 코드에 의해 간주될 수 있다.

" 보존성으로 변형된 변이체" 는 아미노산 및 핵산 서열 모두에 적용한다. 특정한 핵산 서열에 관하여, 보존성으로 변형된 변이체는 동일한 또는 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 코드화하는 핵산, 또는 본질적으로 동일한 서열로 아미노산 서열을 코드화하지 않는 핵산으로 간주한다.유전 코드의 축퇴성 때문에, 다수의 기능적으로 동일한 핵산은 어떤 주어진 단백질을 코드화한다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 코드화한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해 명시되는 모든 위치에서, 이 코돈은 코드화되는 폴리펩티드의 변경 없이 설명된 상응하는 코돈 중 어느 것으로 변경될 수 있다. 그러한 핵산 변이가 보존성으로 변형된 변이의 일종인 " 사일런트 변이" 이다. 폴리펩티드를 코드화하는 본원의 모든 핵산 서열은 또한, 핵산의 모든 가능한 사일런트 변이를 설명한다. 당업자는 핵산에 있는 각 코돈(보통 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG, 및 보통 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG 제외)이 변형되어, 기능적으로 동일한 분자를 얻을 수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 코드화하는 핵산의 각 사일런트 변이는 각각의 설명된 서열에서 암묵적이다.

아미노산 서열에 관해서, 당업자는, 코드화되는 서열에서 단일 아미노산 또는 적은 퍼센트의 아미노산을 변경, 첨가 또는 결실하는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 서열에 대한 개별적인 치환, 결실 또는 첨가가, 변경이 화학적으로 유사한 아미노산을 갖는 아미노산의 치환을 가져오는 " 보존성으로 변형된 변이체" 라는 것을 인지할 것이다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존성 치환표가 본 분야에 잘 공지되어 있다. 여기에 더하여, 그러한 보존성으로 변형된 변이체는 본 발명의 다형 변이체, 종간 상동체, 및 대립유전자를 배제하지 않는다.

다음의 8개 군은 각각 서로에 대한 보존성 치환인 아미노산을 함유한다.

1) 알라닌(A), 글리신(G);

2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E);

3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q);

4) 아르기닌(R), 리신(K);

5) 이소로이신(I), 로이신(L), 메티오닌(M), 발린(V);

6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W);

7) 세린(S), 트레오닌(T); 및

8) 시스테인(C), 메티오닌(M)

(예를 들어, Creighton, Proteins (1984) 참조)

징크핑거 단백질의 디자인

본 발명의 징크핑거 단백질은 선택된 후보 유전자에서 선택된 표적 부위를 인식하도록 조작된다. 전형적으로, SP-1, SP-1C 또는 ZIF268과 같은, 어떤 적합한 Cys_2-His_2 징크핑거 단백질로부터의 주쇄가 조작된 징크핑거 단백질을 위한 스캐폴드로서 사용된다(예를 들어, Jacobs, EMBO J. 11:4507 (1992); Desjarlais & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2256-2260 (1993) 참조). 다음에, 다수의 방법을 사용하여 표적에 대한 높은 친화성을 갖는 징크핑거 단백질을 디자인 및 선택할 수 있다(예를 들어, 바람직하게 약 25nM 미만의 K_d를 갖는). 상술된 바와 같이, 징크핑거 단백질은 높은 친화성으로 표적 후보 유전자의 어떤 적합한 표적 부위에 결합하도록 디자인 또는 선택될 수 있다. 1999년 1월 12일자로 제출된 공동 계류중인 특허 출원 USSN 09/229,007(본원에 참고자료로 포함됨)은 선택된 표적 부위에 대한 징크핑거 단백질의 디자인, 구성 및 발현 방법을 포괄적으로 설명한다.

예를 들어, 파지 디스플레이, 무작위 돌연변이유발, 조합 라이브러리, 컴퓨터/추론 디자인, 친화성 선택, PCR, cDNA 또는 게놈 라이브러리로부터의 클로닝, 합성 구성 등의 본 분야에 공지된 어떤 적합한 방법이 징크핑거 단백질을 코드화하는 핵산을 디자인 및 구성하는데 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 5,786,538; Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:344-348 (1995); Jamieson et al., Biochemistry 33:5689-5695 (1994); Rebar & Pabo, Science 263:671-673 (1994); Choo & Klug, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11163-11167 (1994); Choo & Klug, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11168-11172 (1994); Desjarlais & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2256-2260 (1993); Desjarlais & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7345-7349 (1992); Pomerantz et al., Science 267:93-96 (1995); Pomerantz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5525-5530 (1997); Greisman & Pabo, Science 275:657-661 (1997); Desjarlais & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11-99-111-3 (1994) 참조).

바람직한 구체예에서, 1999년 1월 12일자로 제출된 공동 계류중인 출원 USSN 09/229,007은 표적 유전자를 선택하고, 1 내지 6(또는 그 이상)의 D-able 부위(하기 정의 참조)를 함유하는 유전자내의 표적 부위를 확인하는 방법을 제공한다. 이들 방법을 사용하여, 다음에, 미리 선택된 부위에 결합하는 징크핑거 단백질이 합성될 수 있다. 표적 부위를 선택하는 이들 방법은, 표적 세그먼트에 있는 1개 이상의 D-able 부위의 존재가, D-able 부위가 결여된 표적 세그먼트에 결합하는 징크핑거 단백질에 상대적인, D-able 부위에 결합하도록 선택된 또는 디자인된 징크핑거 단백질에 더 높은 결합 친화성에 대한 잠재력을 수여한다는 것을 인정하는 것을 어느 정도 전제로 한다.이 식견을 지지하는 실험적인 증거가 1999년 1월 12일자로 제출된 공동 계류중인 출원 USSN 09/229,007의 실시예 2 내지 실시예 9에 제공된다.

D-able 부위 또는 하위-부위는, 적합하게 디자인된 단일 징크핑거가 표적 부위의 3개 염기보다는 오히려 4개 염기에 결합하는 것을 허용하는 표적 부위의 영역이다. 그러한 징크핑거는 이중-가닥 표적 세그먼트(표적 가닥)의 1개 가닥상의 염기 트리플렛 및 나머지 가닥상의 4번째 염기에 결합한다(1999년 1월 12일자로 제출된 공동 계류중인 출원 USSN 09/229,007의 도 2 참조). 4개 염기 표적 세그먼트에 단일 징크핑거의 결합은 표적 가닥의 서열 및 징크핑거의 아

미노산 서열을 모두 속박한다. 표적 가닥내의 표적 부위는 "D-able" 부위 모티프 5' NNGK 3'를 포함해야 하며, 여기에서 N 및 K는 통상 IUPAC-IUB 다의성 코드이다. 그러한 부위에 결합하는 징크핑거는 -1 위치에 아르기닌 잔기, 및 +2 위치에 아스파르트산(또는 덜 바람직하게 글루탐산)을 포함해야 한다. -1 위치의 아르기닌 잔기는 D-able 부위에 있는 G 잔기와 상호작용한다. 징크핑거의 +2 위치의 아스파르트산(또는 글루탐산) 잔기는 D-able 부위에 있는 K 염기에 상보하는 맞은편 가닥의 염기와 상호작용한다. 아스파르트산(기호 D)과 맞은편 가닥 염기(4번째 염기) 사이의 상호작용이 D-able 부위라는 명칭을 수여한다. D-able 부위 공식으로부터 명백한 바에 따라, 2가지 아류의 D-able 부위: 5' NNGG 3' 및 5' NNGT 3'이 있다. 전자의 부위에 대해서, 징크핑거의 +2 위치의 아스파르트산 및 글루탐산은 D-able 부위에 마주한 가닥에 있는 C와 상호작용한다. 후자의 부위에서, 징크핑거의 +2 위치의 아스파르트산 및 글루탐산은 D-able 부위에 마주한 가닥에 있는 A와 상호작용한다. 일반적으로, NNGG가 NNGT보다 바람직하다.

3개의 핑거를 갖는 징크핑거 단백질의 디자인에서, 표적 부위는 단백질의 적어도 1개 핑거, 선택적으로 2개 핑거 또는 3개 핑거가 D-able 부위를 결합시키는 잠재력을 가지도록 선택되어야 한다. 그것은 공식 5'-NNx aNy bNzc-3'를 갖는 더 큰 표적 유전자내에서 표적 부위를 선택함으로써 달성될 수 있으며, 여기에서

각각의 세트 (x, a), (y, b) 및 (z, c)는 (N, N) 또는 (G, K)이고;

(x, a), (y, b) 및 (z, c) 중 적어도 1개는 (G, K)이고;

N 및 K는 IUPAC-IUB 다의성 코드이다.

다른 말로서, 3개 세트 (x, a), (y, b) 및 (z, c) 중 적어도 1개는 세트 (G, K)이며, 이것은 이 세트의 제 1 위치가 G이고, 제 2 위치가 G 또는 T라는 것을 의미한다. 3개 세트 중 (G, K)가 아닌 것들(만약 있다면)은 (N, N)이며, 이것은 이 세트의 제 1 위치가 어떤 뉴클레오티드에 의해 점유될 수 있고, 이 세트의 제 2 위치가 어떤 뉴클레오티드에 의해 점유될 수 있다는 것을 의미한다. 예를 들어, 세트 (x, a)는 (G, K)일 수 있고, 세트 (y, b) 및 (z, c)는 모두 (N, N)일 수 있다.

공식 5'-NNx aNy bNzc-3'에서, NNx aNy 및 bNzc의 트리플렛은 징크핑거 단백질의 3개 핑거에 의해 결합된 표적 가닥상의 염기 트리플렛을 나타낸다. 만일 x, y 및 z 중 단지 1개만이 G이고 이 G 다음이 K라면, 표적 가닥은 단일 D-able 하위-부위를 포함한다. 예를 들어, 단지 x가 G이고 a가 K인 것만으로도, 이 부위는 5'-NNG KNy bNzc-3'(하위-부위를 강조하여 나타냄)를 해석한다. z를 제외한 x 및 y가 모두 G이고 a 및 b가 K라면, 표적 부위는 2개의 오버랩 D-able 하위-부위: 5'-NNGNG KNzc-3'(D-albe 하위-부위를 보더체 및 이탤릭체로 나타냄)를 가진다. 만일 x, y 및 z 3개가 모두 G이고 a, b 및 c가 K라면, 표적 세그먼트는 3개의 D-able 하위-부위: 5'-NNG KNG KNG K-3'(D-albe 하위-부위를 보더체, 이탤릭체 및 밑줄로 나타냄)를 포함한다.

따라서, 이들 방법은 표적 유전자를 선택하고, 상술된 바와 같이 공식 5'-NNx aNy bNzc-3'에 따라 표적 부위를 유전자의 가능한 하위-서열내에서 계통적으로 탐색함에 의해 행해진다. 어떤 그러한 방법에서, 잠재적 표적 유전자의 어느 한쪽 가닥상의 10 연속 염기의 모든 가능한 하위-서열이 평가되어, 그것이 상기 공식에 따르는지의 여부와 만약 그렇다면 얼마나 많은 D-able 부위가 존재하는지의 여부가 측정된다. 전형적으로, 그러한 비교는 컴퓨터에 의해 수행되며, 공식에 따르는 표적 부위의 리스트가 출력된다. 선택적으로, 그러한 표적 부위는 얼마나 많은 D-able 부위가 존재하느냐에 따라 상이한 하위-세트로 출력될 수 있다.

변형으로서, 본 발명의 방법은 각각 독립적으로 상기 공식에 따르는 제 1 및 제 2 표적 세그먼트를 확인한다. 그러한 방법에서 이 2개의 표적 세그먼트는 표적 유전자에서 서로 인접하거나 또는 근접하도록(즉, 약 0 내지 5 염기내) 강제된다. 근접한 표적 세그먼트를 선택하는 기본적 전략은, 각각 제 1 및 제 2 표적 세그먼트에 특이적인 2개의 징크핑거 단

백질의 결합에 의해 형성된 징크핑거 단백질의 디자인을 허용하는 것이다. 이들 이론은 얼마든지의 핑거를 갖는 징크핑거 단백질에 의해 결합되는 표적 부위를 선택하는데까지 확장될 수 있다. 예를 들어, 9-핑거 단백질에 대한 적합한 표적 부위는 각각 상기 공식을 따르는 3개 세그먼트를 가질 것이다.

상기 방법에 의해 확인된 표적 부위는 다른 기준에 의해 더 평가될 수 있거나, 또는 그러한 부위에 특이적인 징크핑거 단백질의 디자인 또는 선택(필요하다면), 및 생산에 직접 사용될 수 있다.잠재적 표적 부위를 평가하기 위한 더 이상의 기준은 유전자내의 특정한 영역에 대한 근접성이다. 만일 징크핑거 단백질이 단독으로(즉, 징크핑거 단백질과 리프레션 부분의 연결 없이) 세포 유전자를 리프레션하는데 사용된다면, 최적 위치는, 전사 복합체의 형성을 방해하기 위해(Kim & Pabo, J. Biol. Chem. 272:29795-296800 (1997)), 또는 본질적인 인핸서 결합 단백질과 경쟁하기 위해, 전사 억제 부위의 50bp 상류 또는 하류에 있거나 또는 이것내에 있는 것으로 나타난다. 그러나, 만일 징크핑거 단백질이 KRAB 리프레서 도메인 또는 VP16 활성인자 도메인과 같은 기능 도메인에 융합된다면, 결합 부위의 위치는 상당히 더 융통성이 있고, 공지된 조절성 영역의 바깥쪽에 있을 수 있다. 예를 들어, KRBR 도메인은 KRBR이 결합되는 곳으로부터 적어도 3kbp까지 프로모터에서 전사를 리프레션할 수 있다(Margolin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4059-4513 (1994)). 따라서, 조절성 서열과 같은, 표적 유전자를 갖는 논증가능한 생물학적 의미가 있는 세그먼트를 필수적으로 포함하거나 또는 오버랩하지 않는 표적 부위가 선택될 수 있다. 표적 세그먼트를 더 평가하기 위한 다른 기준은, 그러한 세그먼트 또는 관련 세그먼트에 결합하는 선행하는 징크핑거 단백질의 효용성, 및/또는 주어진 표적 세그먼트를 결합시키는 새로운 징크핑거 단백질 디자인의 용이성을 포함한다.

표적 세그먼트가 선택된 후, 세그먼트에 결합하는 징크핑거 단백질이 여러가지 접근법에 의해 제공될 수 있다. 가장 간단한 접근법은, 표적 부위에 결합한다고 이미 공지된 현행 콜렉션으로부터의 사전-특성화된 징크핑거 단백질을 제공하는 것이다. 그러나, 많은 예에서, 그러한 징크핑거 단백질은 존재하지 않는다. 다른 접근법이 또한 새로운 징크핑거 단백질을 디자인하는데 사용될 수 있으며, 이것은 현행 징크핑거 단백질 및 그것들 각각의 결합 친화성에 대한 데이타베이스 정보를 사용한다. 더 이상의 접근법은 상기 논의된 바와 같은 치환 규칙을 기초로 하여 징크핑거 단백질을 디자인하는 것이다. 더 이상의 대안은 파지 디스플레이와 같은 실험적 과정에 의해 주어진 표적에 대한 특이성을 갖는 징크핑거 단백질을 선택하는 것이다. 어떤 그러한 방법에서, 징크핑거 단백질의 각 핑거는 다른 핑거에 독립적으로 디자인되거나 또는 선택된다. 예를 들어, 각 핑거는 상이한 선재하는 징크핑거 단백질로부터 얻어질 수 있거나, 또는 각 핑거는 개별적으로 재조합 및 선택될 수 있다.

일단 징크핑거 단백질이 주어진 표적 세그먼트에 대해 선택되거나, 디자인되거나, 또는 달리 제공되고, 이 징크핑거 단백질 또는 그것을 코드화하는 DNA가 합성된다. 징크핑거 단백질을 코드화하는 DNA를 합성 및 발현하는 방법의 예가 하기 설명된다. 다음에, 징크핑거 단백질 또는 그것을 코드화하는 폴리뉴클레오티드가 발현의 조정, 또는 징크핑거 단백질이 결합한 표적 부위를 함유하는 표적 유전자의 분석에 사용될 수 있다.

징크핑거 단백질의 발현 및 정제

징크핑거 단백질 폴리펩티드 및 핵산이 재조합 유전학 분야의 통상적인 기술을 사용하여 만들어질 수 있다. 본 발명에서 사용되는 일반적 방법을 개시하는 기본 텍스트는 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed. 1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); 및 Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel et al., eds., 1994))를 포함한다. 여기에 더하여, 본질적으로 어떤 핵산은 여러 상업적 공급원 중 어느 것으로부터 주문된 것일 수 있다. 유사하게, 펩티드 및 항체도 여러 상업적 공급원 중 어느 것으로부터 주문된 것일 수 있다.

두 가지 다른 방법이 새로 디자인된 DNA-결합 펩티드를 발현하는데 필요한 코딩 서열을 만드는데 전형적으로 사용된다. 한 프로토콜은 6개의 오버랩 올리고뉴클레오티드를 이용하는 PCR-기초 조립 과정이다(공동 계류중인 특허 출원

USSN 09/229,037의 도 1 참조). 3개의 올리고뉴클레오티드가 인식 헬릭스 사이의 DNA-결합 도메인의 일부를 코드화하는 " 보편적" 서열에 상응한다. 이들 올리고뉴클레오티드는 모든 징크핑거 구성물에 변함 없이 남아있다. 나머지 3개의 " 특이적" 올리고뉴클레오티드는 인식 헬릭스를 코드화하도록 디자인된다. 이들 올리고뉴클레오티드는 인식 헬릭스상의 -1, 2, 3 및 6 위치에 주로 치환을 함유하며, 이로써 이 올리고뉴클레오티드가 각각의 상이한 DNA-결합 도메인에 대해 특이적으로 된다.

PCR 합성은 2 단계로 수행된다. 먼저, 이중-가닥 DNA 주형이 저온 아닐링 단계가 있는 4 사이클 PCR 반응에서 6개의 올리고뉴클레오티드(보편적인 3개, 특이적인 3개)를 조합함에 의해 만들어지고, 이로써 올리고뉴클레오티드가 아닐링되어 DNA " 스캐폴드" 를 형성한다. 스캐폴드에 있는 갭은 고-성능 열안정성 중합효소에 의해 채워지며, 또한 Taq 및 Pfu 중합효소의 조합도 충분하다. 구성의 제 2 단계에서, 징크핑거 주형은 셔틀 벡터에, 또는 발현 벡터에 직접적으로 클로닝되는 한쪽 말단에서 제한 효소를 결합시키도록 디자인된 외부 프라이머에 의해 증폭된다.

새로 디자인된 DNA-결합 단백질을 클로닝하는 다른 방법은 바람직한 징크핑거 단백질의 특이적 영역을 코드화하는 상보성 올리고뉴클레오티드를 아닐링하는데 의존한다. 이 특정한 적용은 올리고뉴클레오티드가 최종 리게이션 단계 전에 인산화되는 것을 필요로 한다. 이것은 보통 아닐링 반응을 셋업하기 전에 수행되지만, 또한 키나제화가 아닐링 후 일어날 수도 있다. 간단히 말해서, 단백질의 일정한 영역을 코드화하는 " 보편적" 올리고뉴클레오티드가 그것들의 상보성 올리고뉴클레오티드로 아닐링된다. 추가적으로, 핑거 인식 헬릭스를 코드화하는 " 특이적" 올리고뉴클레오티드가 그것들 각각의 상보성 올리고뉴클레오티드로 아닐링된다. 이들 상보성 올리고는 상술된 프로토콜에서 중합효소에 의해 이미 채워졌던 영역을 채우도록 디자인된다. 보편적 올리고 1 및 핑거 3에 상보하는 올리고는 선택된 벡터에 클로닝하는데 사용된 제한 부위에 특이적인 오버행 서열이 이탈되도록 조작된다.

두번째 조립 프로토콜은 다음 양태에서 처음 프로토콜과는 상이하다: 새로 디자인된 징크핑거 단백질을 코드화하는 " 스캐폴드" 가 전적으로 합성 DNA로 이루어지며, 이로써 중합효소로 채워지는 단계가 삭제되고, 추가적으로 벡터에 클로닝되는 단편이 증폭을 필요로 하지 않는다. 마지막으로, 서열-특이적 오버행을 이탈시키는 디자인이 삽입 단편의 제한 효소 절단에 대한 필요를 없앤다.

새로 디자인된 징크핑거 단백질을 코드화하는 결과의 단편이 발현 벡터에 리게이션된다. 통상적으로 이용되는 발현 벡터는, 이것들에 제한되는 것은 아니지만 변형된 pMAL-c2 박테리아 발현 벡터(뉴잉글랜드 바이오랩스, " NEB") 또는 진핵 발현 벡터인 pcDNA(프로메가)를 포함한다.

당업자에게 공지된 단백질을 정제하는 어떤 적합한 방법이 본 발명의 징크핑거 단백질을 정제하는데 사용될 수 있다(Ausubel(상동), Sambrook(상동) 참조). 여기에 더하여, 예를 들어 박테리아 세포, 곤충 세포, 이스트 세포, 포유류 세포 등의 어떤 적합한 숙주 세포가 사용될 수 있다.

한 구체예에서, 박테리아 균주 JM109에서 말토스 결합 단백질에 융합된 징크핑거 단백질(MBP-ZFP)의 발현은 아밀로스 칼럼(NEB)을 통한 간단한 정제를 허용한다. pMal-c2 발현 플라스미드에서 MBP-ZFP 융합이 IPTG 유도 tac 프로모터(NEB)의 제어하에 있으므로, 발현 수준이 높은 징크핑거 키메라 단백질이 IPTG의 도입에 의해 얻어질 수 있다. MBP-ZFP 융합 플라스미드를 함유하는 박테리아를 10 μM $ZnCl_2$, 0.02% 글루코스 및 50μg/ml 암피실린을 함유하는 2x YT 배지에 접종하고 37℃에서 흔든다. 중간-지수적 성장에서 IPTG를 0.3mM로 가하고 배양물을 흔든다. 3시간 후 박테리아를 원심분리하여 수집하고, 초음파처리하여 파괴한 후, 불용성 물질을 원심분리하여 제거한다. MBP-ZFP 단백질은 아밀로스-결합 수지상에 포획하고, 20mM 트리스-HCl(pH 7.5), 200mM NaCl, 5mM DTT 및 50 μM $ZnCl_2$를 함유하는 완충액으로 광범하게 세척한 후, 본질적으로 동일한 완충액중의 말토스로 용출한다(정제는 NEB의 표준 프로토콜을 기초로 한다). 정제된 단백질을 정량하고 생화학적 분석을 위해 저장한다.

정제된 단백질의 생화학적 특성, 예를 들어 K_d가 어떤 적합한 분석에 의해 특성화될 수 있다. 한 구체예에서, K_d는 전기영동도 이동 분석(" EMSA")에 의해 특성화된다(Buratowski & Chodosh, in Current Protocols in Molecular Biology pp. 12.2.1 - 12.2.7(Ausubel ed., 1996); 또한 본원에 참고자료로서 포함되는, 미국 특허 번호 5,789,538, 1999년 1월 12일자로 제출된 USSN 09/229,007 참조). 친화성은 낮은 고정된 양의 표지된 이중 - 가닥 올리고뉴클레오티드 표적에 대해 정제된 단백질을 적정함으로써 측정된다. 표적은 천연 서열에서 발견된 3bp에 의해 측면 위치된 천연 결합 부위 서열(9 또는 18bp)을 포함한다. 결합 부위 및 측면 서열의 외부는 불변 서열이다. 아닐링된 올리고뉴클레오티드 표적은, T4 파지 폴리뉴클레오티드 키나제를 사용한 표적의 효과적인 표지화를 허용하는 1bp 5' 오버행을 가진다. 분석에 대해서, 표적은 40nM 이하의 농도(실제 농도는 최저 단백질 희석보다 적어도 10배 낮게 유지된다)로 첨가되고, 반응은 적어도 45분간 평형을 유지하도록 허용된다. 여기에 더하여, 반응 혼합물은 또한 10mM 트리스(pH 7.5), 100mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 0.1mM $ZnCl_2$, 5mM DTT, 10% 글리세롤, 0.02% BSA를 함유한다(폴리 (dIdC) 또는 (dAdT)(파마시아)가 또한 10 내지 100μg/μℓ로 첨가될 수 있다).

평형을 이룬 반응물이 트리스/글리신 완충액에서 45분간 예비 - 전개된 10% 폴리아크릴아미드 겔위에 로딩된다. 결합 및 비결합된 표지된 표적이 150V에서 전기영동을 사용하여 분해된다(또는 달리, 4% 폴리아크릴아미드 스태커를 함유하는 10 내지 20% 구배의 트리스 - HCl 겔이 사용될 수 있다). 건조된 겔이 방사선사진법 또는 인영상화에 의해 시각화되고, 겉보기 K_d가 최대 결합의 반을 제공하는 단백질 농도를 계산함으로써 측정된다.

또한, 유사한 분석은 단백질 제조물에서 활성 부분을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 활성 부분은 단백질이 고농도의 표적 DNA에 대해 적정되는 경우 화학량론적 겔 이동에 의해 측정된다. 적정은 100, 50 및 25%의 표적에서 행해진다(보통 마이크로몰 수준).

다른 구체예에서, 파지 디스플레이 라이브러리가 선택된 표적 부위에 대한 높은 친화성을 갖는 징크핑거 단백질을 선택하는데 사용될 수 있다. 이 방법은 다른 종류의 돌연변이 징크핑거 단백질 라이브러리의 생성과, 이어서 친화성 선택법을 사용한 바람직한 DNA - 결합 특성을 갖는 단백질의 분리를 포함한다는 점에서 직접 디자인과는 근본적으로 다르다. 이 방법을 사용하기 위해서, 실험자는 전형적으로 다음과 같이 진행한다.

먼저, 징크핑거 단백질 유전자가 돌연변이되어 결합 특이성 및 친화성에 중요한 영역에 다양성을 도입한다. 전형적인 적용에서, 이것은 -1, +2, +3 및 +6 위치, 및 아마도 +1, +5, +8 또는 +10과 같은 악세사리 위치에서 단일 핑거의 무작위화에 의해 완수된다.

다음에, 돌연변이된 유전자는, 예를 들어 외피 단백질 pIII를 코드화하는 사상 파지의 유전자 III과의 융합체인 파지 또는 파지미드 벡터로 클론된다. 이 징크핑거 유전자가 멤브레인 수출 신호 펩티드를 코드화하는 유전자 III의 세그먼트와 나머지 pIII 사이에 삽입되고, 이로써 징크핑거 단백질이 성숙한 진행된 단백질에서 pIII와의 아미노 - 말단 융합체로서 발현된다. 파지미드 벡터를 사용한 때, 돌연변이된 징크핑거 유전자는 또한 파지 입자로의 pIII의 조립에 필요한 C - 말단 영역을 최소한으로 코드화하는 절단된 버전의 유전자 III에 융합될 수 있다.

결과의 벡터 라이브러리는 E. coli로 형질전환되고, 외피 단백질 pIII와의 융합체로서 표면에 변이체 징크핑거 단백질을 발현하는 사상 파지를 생성하는데 사용된다(파지미드 벡터가 사용된다면, 이 단계는 헬퍼 파지를 사용한 초감염이 필요하다). 다음에, 파지 라이브러리는 표적 DNA 부위와 함께 인큐베이션되고, 친화성 선택법을 사용하여 벌크 파지로부터 높은 친화성으로 표적을 결합한 파지를 분리한다. 전형적으로, DNA 표적은 고체 지지체상에 고정되고, 다음에 이것이 가장 단단히 결합한 파지를 제외한 모든 것을 제거하기에 충분한 조건하에서 세척된다. 세척 후, 지지체상에 남아있는 어떤 파지가 징크핑거 - DNA 결합을 전적으로 파괴하는 조건하에서 용출에 의해 회수된다.

회수된 파지를 사용하여 신선한 E. coli를 감염시키고, 다음에 이것을 증폭하여 새로운 배치의 파지 입자를 생성하는데 사용한다. 다음에, 단단한 바인더가 서열화 및/또는 스크리닝법을 사용하여 확인될 수 있도록 단단한 바인더로 파지 풀을 충분히 부화시킬 필요가 있기 때문에, 결합 및 회수 단계를 여러번 반복한다.

조절성 도메인

본 발명의 징크핑거 단백질은 선택적으로 유전자 발현의 조정을 위한 조절성 도메인에 결합될 수 있다. 징크핑거 단백질은 1개 이상의 조절성 도메인에 공유적으로 또는 비-공유적으로 결합될 수 있으며, 2개 이상의 도메인은 동일한 도메인의 2개 카피, 또는 2개의 상이한 도메인이다. 조절성 도메인은 융합 단백질의 일부로서, 예를 들어 아미노산 링커에 의하여 징크핑거 단백질에 공유적으로 연결될 수 있다. 또한, 징크핑거 단백질은 비-공유 이량체화 도메인, 예를 들어 로이신 지퍼, STAT 단백질 N 말단 도메인, 또는 FK506 결합 단백질에 의하여 조절성 도메인에 결합될 수 있다(예를 들어, O'Shea, Science 254:539 (1991); Barahmand-Pour et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 211:121-128 (1996); Klemm et al., Annu. Rev. Immunol. 16:569-592 (1998); Ho et al., Nature 382:822-826 (1996); 및 Pomeranz et al., Biochem. 37:965 (1998) 참조). 조절성 도메인은 징크핑거 단백질의 C- 또는 N-말단을 포함하는 어떤 적합한 위치에서 징크핑거 단백질에 결합될 수 있다.

징크핑거 단백질에 부가되는 통상적인 조절성 도메인은, 예를 들어 전사 인자로부터의 이펙터 도메인(활성인자, 리프레서, 보조-활성인자, 보조-리프레서), 사일런서, 핵 호르몬 리셉터, 종양유전자 전사 인자(예를 들어, myc, jun, fos, myb, max, mad, rel, ets, bcl, myb, mos 패밀리 구성원 등); DNA 수선 효소 및 그것들의 관련 인자 및 변형인자; DNA 재배열 효소 및 그것들의 관련 인자 및 변형인자; 염색질 관련 단백질 및 그것들의 변형인자(예를 들어, 키나제, 아세틸라제 및 디아세틸라제); 및 DNA 변형 효소(예를 들어, 메틸트랜스페라제, 토포이소머라제, 헬리카제, 리가제, 키나제, 포스파타제, 중합효소, 엔도뉴클레아제) 및 그것들의 관련 인자 및 변형인자를 포함한다.

조절성 도메인을 얻을 수 있는 전사 인자 폴리펩티드는, 조절되는 기본적 전사에 연루되는 것들을 포함한다. 그러한 폴리펩티드는 전사 인자, 그것들의 이펙터 도메인, 보조-활성인자, 사일런서, 핵 호르몬 리셉터를 포함한다(예를 들어, 전사에 연루되는 단백질 및 핵산 요소에 대한 리뷰는 Goodrich et al., Cell 84:825-30 (1996); 일반적인 전사 인자에 대한 리뷰는 Barnes & Adcock, Clin. Exp. Allergy 25 Suppl. 2:46-9 (1995) 및 Roeder, Methods Enzymol. 273:165-71 (1996) 참조). 전사 인자에 대한 데이타베이스는 공지되어 있다(예를 들어, Science 269:630 (1995) 참조). 핵 호르몬 리셉터 전사 인자는, 예를 들어 Rosen et al., J. Med. Chem. 38:4855-74 (1995)에 설명된다. 전사 인자의 C/EBP 패밀리는 Wedel et al., Immunobiology 193:171-85 (1995)에 리뷰된다. 핵 호르몬 리셉터에 의한 전사 조절을 매개하는 보조-활성인자 및 보조-리프레서는, 예를 들어 Meier, Eur. J. Endocrinol. 134(2):158-9 (1996); Kaiser et al., Trends Biochem. Sci. 21:342-5 (1996); 및 Utley et al., Nature 394:498-502 (1998)에 리뷰된다. 조혈작용의 조절에 연루되는 GATA 전사 인자는, 예를 들어 Simon, Nat. Genet. 11:9-11 (1995); Weiss et al., Exp. Hematol. 23:99-107에 설명된다. TATA 박스 결합 단백질(TBP) 및 그것의 관련 TAF 폴리펩티드(이것은 TAF30, TAF55, TAF80, TAF110, TAF150, 및 TAF250을 포함한다)는 Goodrich & Tjian, Curr. Opin. Cell Biol. 6: 403-9 (1994) 및 Hurley, Curr. Opin. Struct. Biol. 6:69-75 (1996)에 설명된다. 전사 인자의 STAT 패밀리는, 예를 들어 Barahmand-Pour et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 211:121-8 (1996)에 리뷰된다. 질환에 연루되는 전사 인자는 Aso et al., J. Clin. Invest. 97:1561-9 (1996)에 리뷰된다.

한 구체예에서, 사람 KOX-1 단백질로부터의 KRAB 리프레션 도메인이 전사 리프레서로서 사용된다(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)). 다른 구체예에서, KRAB 보조-리프레서인 KAP-1이 KRAB와 함께 사용된다(Friedmanetal., Genes Dev. 10:2067-2078 (1996)). 또는, KAP-1이 징크핑거 단백질과 함께 단독으로 사용될 수 있다. 전사 리프레서로 작용하는 다른 바람직한 전사 인자 및 전사 인자 도메인은, MAD(예를 들어, Sommer et al., J. Biol. Chem. 273:6632-6642 (1998); Guptaet al., Oncogene 16:1149-1159 (1998); Queva et al., Oncogene 16:967-977 (1998); Larsson et al., Oncogene 15:737-748 (1997); Laherty et al., Cell 89:349-356 (1997); 및 Cultrar

o et al., Mol Cell. Biol. 17:2353-2359 (1997) 참조); FKHR(간상육종 유전자의 포크형 머리; Ginsberg et al., Cancer Res. 15:3542-3546 (1998); Epstein et al., Mol. Cell. Biol. 18: 4118-4130 (1998)); EGR-1(초기 성장 반응 유전자 생성물-1; Yan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8298-8303 (1998); 및 Liu et al., Cancer Gene Ther. 5: 3-28 (1998)); ets2 리프레서 인자 리프레서 도메인(ERD; Sgouras et al., EMBO J. 14:4781-4793 (1995)); 및 MAD smSIN3 상호작용 도메인(SID; Ayer et al., Mol. Cell. Biol. 16:5772-5781 (1996)) 을 포함한다.

한 구체예에서, HSV VP16 활성화 도메인이 전사 활성인자로서 사용된다(예를 들어, Hagmann et al., J. Virol. 71: 5952-5962 (1997) 참조). 활성화 도메인을 공급할 수 있는 다른 바람직한 전사 인자는, VP64 활성화 도메인(Seipel et al., EMBO J. 11:4961-4968 (1996)); 핵 호르몬 리셉터(예를 들어, Torchia et al., Curr. Opin. Cell. Biol. 10:373-383 (1998) 참조); 핵 인자 kappa B의 p65 하위-단위(Bitko & Barik, J. Virol. 72:5610-5618(1998) 및 Doyle & Hunt, Neuroreport 8:2937-2942 (1997)); 및 EGR-1(초기 성장 반응 유전자 생성물-1; Yan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8298-8303 (1998); 및 Liu et al., Cancer Gene Ther. 5:3-28 (1998))를 포함한다.

또한, 키나제, 포스파타제, 및 유전자 조절에 연루된 폴리펩티드 변형시키는 다른 단백질이 징크핑거 단백질용 조절성 도메인으로 유용하다. 그러한 변형인자는 주로, 예를 들어 호르몬에 의해 매개되는 전사를 스위치온 또는 스위치오프하는데 연루된다. 전사 조절에 연루되는 키나제는 Davis, Mol. Reprod. Dev. 42:459-67 (1995), Jackson et al., Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res. 28:279-86 (1993), 및 Boulikas, Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 5:1-77 (1995)에 리뷰되며, 포스파타제는, 예를 들어 Schonthal & Semin, Cancer Biol. 6:239-48 (1995)에 리뷰된다. 핵 티로신 키나제는 Wang, Trends Biochem. Sci. 19:373-6 (1994)에 설명된다.

설명된 바와 같이, 유용한 도메인이 또한 종양유전자(예를 들어, myc, jun, fos, myb, max, mad, rel, ets, bcl, myb, mos 패밀리 구성원) 및 그것들의 관련 인자 및 변형인자로부터 얻어질 수 있다. 종양유전자는, 예를 들어 Cooper, Oncogenes, The Jones and Bartlett Series in Biology(2nd ed., 1995)에 설명된다. ets 전사 인자는 Waslylk et al., Eur. J. Biochem. 211:7-18 (1993) 및 Crepieux et al., Crit. Rev. Oncog. 5:615-38 (1994)에 리뷰된다. Myc 종양유전자는, 예를 들어 Ryan et al., Biochem. J. 314:713-21 (1996)에 리뷰된다. jun 및 fos 전사 인자는, 예를 들어 The Fos and Jun Families of Transcription Factors(Angel & Herrlich, eds. 1994)에 설명된다. max 종양유전자는 Hurlin et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 59:109-16에 설명된다. myb 유전자 패밀리는 Kanei-Ishii et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 211:89-98 (1996)에 리뷰된다. mos 패밀리는 Yew et al., Curr. Opin. Genet. Dev. 3:19-25 (1993)에 리뷰된다.

징크핑거 단백질은 DNA 수선 효소 및 그것들의 관련 인자 및 변형인자로부터 얻어진 조절성 도메인을 포함할 수 있다. DNA 수선 시스템은, 예를 들어 Vos, Curr. Opin. Cell Biol. 4:385-95 (1992); Sancar, Ann. Rev. Genet. 29:69-105 (1995); Lehmann, Genet. Eng. 17:1-19 (1995); 및 Wood, Ann. Rev. Biochem. 65:135-67 (1996)에 리뷰된다. 또한, DNA 재배열 효소 및 그것들의 관련 인자 및 변형인자가 조절성 도메인으로서 사용될 수 있다(예를 들어, Gangloff et al., Experientia 50:261-9 (1994); Sadowski, FASEB J. 7:760-7 (1993) 참조).

유사하게, 조절성 도메인은 DNA 변형 효소(예를 들어, DNA 메틸트랜스페라제, 토포이소머라제, 헬리카제, 리가제, 키나제, 포스포타제, 중합효소) 및 그것들의 관련 인자 및 변형인자로부터 유도될 수 있다. 헬리카제는 Matson et al., B

ioessays, 16:13-22 (1994)에 리뷰되고, 메틸트랜스페라제는 Cheng, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:4-10 (1995)에 설명된다. 또한, 히스톤 디아세틸라제(Wolffe, Science 272: 371-2 (1996))와 같은, 염색질 관련 단백질 및 그것들의 변형인자(예를 들어, 키나제, 아세틸라제 및 디아세틸라제)가 선택된 징크핑거 단백질에 부가되는 도메인으로서 유용하다. 한 바람직한 구체예에서, 조절성 도메인은 전사 리프레서로 작용하는 DNA 메틸트랜스페라제이다(예를 들어, Van den Wyngaert et al., FEBS Lett. 426:283-289 (1998); Flynn et al., J. Mol. Biol. 279:101-116 (1998); Okano et al., Nucleic Acids Res. 26:2536-2540 (1998); 및 Zardo & Caiafa, J. Biol. Chem. 273:16517-16520 (1998) 참조). 다른 바람직한 구체예에서, Fok1과 같은 엔도뉴클레아제가 전사 리프레서로 사용되며, 이것은 유전자 절단에 의하여 작용한다(예를 들어, W0 95/09233; 및 PCT/US94/01201 참조).

염색질 및 DNA 구조, 운동 및 위치를 제어하는 인자 및 그것들의 관련 인자 및 변형인자; 미생물(예를 들어, 원핵생물, 진핵생물 및 바이러스)로부터 유도된 인자 및 그것들에 관련되거나 또는 그것들을 변형시키는 인자가 또한 키메라 단백질을 얻는데 사용될 수 있다. 한 구체예에서, 재조합효소 및 인테그라제가 조절성 도메인으로 사용된다. 한 구체예에서, 히스톤 아세틸트랜스페라제가 전사 활성인자로서 사용된다(예를 들어, Jin & Scotto, Mol. Cell. Biol. 18:4377-4384 (1998); Wolffe, Science 272:371-372 (1996); Taunton et al., Science 272:408-411 (1996); 및 Hassig et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3519-3524 (1998) 참조). 다른 구체예에서, 히스톤 디아세틸라제가 전사 리프레서로서 사용된다(예를 들어, Jin & Scotto, Mol. Cell. Biol. 18:4377-4384 (1998); Syntichaki & Thireos, J. Biol. Chem. 273:24414-24419 (1998); Sakaguchi et al., Genes Dev. 12:2831-2841(1998); 및 Martinez et al., J. Biol. Chem. 273:23781-23785 (1998) 참조).

폴리펩티드 도메인 사이, 예를 들어 2개의 징크핑거 단백질 사이 또는 징크핑거 단백질과 조절성 도메인 사이에 링커 도메인이 포함될 수 있다. 그러한 링커는 전형적으로, 약 5 내지 200 아미노산의 폴리 gly 서열과 같은 폴리펩티드 서열이다. 바람직한 링커는 전형적으로, 재조합 융합 단백질의 일부로서 합성되는 유연한 아미노산 하위-서열이다. 예를 들어, 한 구체예에서, 링커 DGGGS가 2개의 징크핑거 단백질을 연결하는데 사용된다. 다른 구체예에서, 2개의 징크핑거 단백질을 연결하는 유연한 링커는 서열 TGEKP를 포함하는 아미노산 하위-서열이다(예를 들어, Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 5525-5530 (1997) 참조). 다른 구체예에서, 링커 LRQKDGERP가 2개의 징크핑거 단백질을 연결하는데 사용된다. 다른 구체예에서, 다음의 링커들이 2개의 징크핑거 단백질을 연결하는데 사용된다: GGRR(Pomerantz et al. 1995, 상동), $(G_4S)n$(Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1156-1160(1996); 및 GGRRGGGS; LRQRDGERP; LRQKDGGGSERP; LRQKD$(G_3S)_2$ERP. 또는 달리, 유연한 링커는 DNA-결합 부위 및 펩티드 자체를 모두 모델링할 수 있는 컴퓨터 프로그램을 사용하거나(Desjarlais & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2256-2260 (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11099-11103 (1994)), 또는 파지 디스플레이법에 의해 합리적으로 디자인될 수 있다.

다른 구체예에서, 화학적 링커가 합성적 또는 재조합적으로 생성된 도메인 서열을 연결하는데 사용된다. 그러한 유연한 링커는 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 폴리(에틸렌 글리콜) 링커는 쉐어워터 폴리머스, 아이엔씨(앨라배머 헌트스빌)로부터 입수가능하다. 이들 링커는 선택적으로 아미드 결합, 술프히드릴 결합, 또는 헤테로작용기 결합을 가진다. 징크핑거 단백질과 조절성 도메인의 공유결합에 더하여, 비-공유적 방법이 조절성 도메인에 결합된 징크핑거 단백질을 생성하는데 사용될 수 있다.

조절성 도메인에 더하여, 주로 징크핑거 단백질은, 정제의 용이성, 발현 모니터링, 또는 세포 및 준세포 위치 모티터링을 위해, 말토스 결합 단백질(MBP), 글루타티온 S 트랜스페라제(GST), 헥사히스티딘, c-myc, 및 FLAG 에피토프와 같은 융합 단백질로서 발현된다.

징크핑거 단백질을 코드화하는 핵산의 서브클로닝 및 발현

선택된 징크핑거 단백질을 코드화하는 핵산은 전형적으로, 복제, 발현을 위해, 예를 들어 K_d의 측정을 위해, 원핵 또는 진핵 세포로의 형질전환을 위한 벡터로 클론된다. 그러한 벡터는 전형적으로, 원핵 벡터, 예를 들어 플라스미드, 또는 셔틀 벡터, 또는 징크핑거 단백질을 코드화하는 핵산의 저장 또는 제조 또는 단백질의 생성을 위한 곤충 벡터와 같은 진핵 벡터, 또는 징크핑거 단백질의 발현 및 선택적으로 유전자 발현의 조절을 위한 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 등)와 같은 진핵 벡터이다. 다음에, 징크핑거 단백질을 코드화하는 핵산이 식물 세포, 동물 세포, 포유류 세포 또는 사람 세포, 진균 세포, 박테리아 세포, 또는 원생동물 세포에 투여될 수 있다.

클론된 유전자 또는 핵산의 발현을 얻기 위해서, 징크핑거 단백질은 전형적으로 전사를 지시하는 프로모터를 함유하는 발현 벡터로 서브클론된다. 적합한 박테리아 및 진핵 프로모터가 본 분야에 잘 공지되어 있으며, 예를 들어 Sambrook 등의 Molecular Cloning, A Laboratory Manual(2nd ed. 1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); 및 Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel et al., eds., 1994)에 설명된다. 징크핑거 단백질을 발현하기 위한 박테리아 발현 시스템은, 예를 들어 E. coli, Bacillus sp., 및 Salmonella(Palva et al., Gene 22:229-235 (1983))에서 이용가능하다. 그러한 발현 시스템용 키트는 상업적으로 입수가능하다. 포유류 세포, 이스트, 및 곤충 세포용 진핵 발현 시스템은 본 분야에 잘 공지되어 있으며, 또한 상업적으로 입수가능하다.

징크핑거 단백질 핵산의 발현을 지시하는데 사용되는 프로모터는 특정한 적용에 의존한다. 예를 들어, 강력한 구성적 프로모터가 징크핑거 단백질의 발현 및 정제에 전형적으로 사용된다. 반대로, 징크핑거 단백질이 유전자 조절을 위해 생체내에 투여된 때는, 구성적 또는 유도 프로모터 중 어느 하나가 징크핑거 단백질의 특정한 용도에 따라 사용된다. 또한, 프로모터는 전형적으로, 트랜스액티베이션에 반응하는 요소, 예를 들어 저산소증 반응 요소, Gal4 반응 요소, lac 리프레서 반응 요소, 및 tet-조절 시스템 및 RU-486 시스템과 같은 소분자 제어 시스템을 포함할 수 있다(예를 들어, Gossen & Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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); 및 Rendahl et al., Nat. Biotechnol. 16:757-761 (1998) 참조).

프로모터에 더하여, 발현 벡터는 전형적으로, 진핵 또는 원핵 중 어느 하나인 숙주 세포에서 핵산의 발현에 필요한 모든 추가적 요소를 함유하는 전사 단위 또는 발현 카세트를 함유한다. 따라서, 전형적인 발현 카세트는, 예를 들어 징크핑거 단백질을 코드화하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터, 및 예를 들어 전사체, 전사 종결, 리보솜 결합 부위 또는 번역 종결의 효과적인 폴리아데닐화에 필요한 신호를 함유한다. 카세트의 추가적 요소는, 예를 들어 인핸서, 및 이종성 스플라이스 인트론 신호를 포함할 수 있다.

세포로 유전 정보를 수송하는데 사용되는 특정한 발현 벡터는 의도된 징크핑거 단백질 용도, 예를 들어 식물, 동물, 박테리아, 진균, 원생동물 등에서의 발현을 고려하여 선택된다(하기 실시예에서 설명된 발현 벡터 참조). 표준 박테리아 발현 벡터는 pBR322 기제 플라스미드와 같은 플라스미드, pSKF, pET23D, 및 GST 및 LacZ와 같은 상업적으로 입수가능한 융합 발현 시스템을 포함한다. 바람직한 융합 단백질은 말토스 결합 단백질 " MBP" 이다. 그러한 융합 단백질은 징크핑거 단백질의 정제에 사용된다. 또한, c-myc 또는 FLAG와 같은 에피토프 태그가 재조합 단백질에 부가되어, 분리, 발현 모니터링, 및 세포 및 준세포 위치 모니터링을 위한 편리한 방법을 제공할 수 있다.

진핵 바이러스로부터의 조절성 요소를 함유하는 발현 벡터는 주로 진핵 발현 벡터, 예를 들어 SV40 벡터, 유두종 바이러스 벡터, 및 Epstein-Barr 바이러스로부터 유도된 벡터에서 사용된다. 진핵 벡터의 다른 예는 pMSG, pAV009/A+, pMT010/A+, pMAMneo-5, 바쿨로바이러스 pDSVE, 및 SV40 초기 프로모터, SV40 후기 프로모터, CMV 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 뮤린 유방 종양 바이러스 프로모터, Rous 육종 바이러스 프로모터, 폴리헤드린 프로모터, 또는 진핵 세포에서 효과적인 발현을 나타내는 다른 프로모터의 지시하에 단백질의 발현을 허용하는 어떤 다른 벡터를 포함한다.

어떤 발현 시스템은 네오마이신, 티미딘 키나제, 히그로마이신 B 포스포트랜스페라제, 및 디히드로폴레이트 환원효소와 같은, 안정하게 트랜스펙션된 셀라인을 선택하기 위한 마커를 가진다. 또한, 폴리헤드린 프로모터 또는 다른 강력한 바큘로바이러스 프로모터 지시하의 징크핑거 단백질 코드화 서열을 갖는, 곤충 세포에서 바큘로바이러스 벡터를 사용하는 것과 같은, 고수율 발현 시스템이 적합하다.

또한, 발현 벡터에 전형적으로 포함되는 요소는 재조합 플라스미드가 잠복해 있는 박테리아의 선택을 허락하기 위한 항생제 내성을 코드화하는 유전자, E. coli에서 기능하는 복제단위, 및 재조합 서열의 삽입을 허용하기 위한 플라스미드의 비본질적 영역에 있는 유일한 제한 부위를 포함한다.

표준 트랜스펙션 방법을 사용하여 다량의 단백질을 발현하는 박테리아, 포유류, 이스트 또는 곤충 셀라인이 생성되고, 다음에 이것이 표준 기술을 사용하여 정제된다(예를 들어, Colley et al., J. Biol. Chem. 264:17619-17622 (1989); Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, vol. 182(Deutscher, ed., 1990) 참조). 진핵 및 원핵 세포의 형질전환이 표준 기술에 따라 수행된다(예를 들어, Morrison, J. Bact. 132:349-351 (1977); Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology 101:347-362(Wu et al., eds, 1983) 참조).

숙주 세포에 외래 뉴클레오티드 서열을 도입하는 잘 공지된 과정 중 어느 것이 사용될 수 있다. 이것들은 칼슘 포스페이트 트랜스펙션, 폴리브렌, 원형질 융합, 전기천공, 리포솜, 미세주사, 네이키드 DNA, 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터, 에피솜성 및 통합성, 그리고 숙주 세포에 클론된 게놈 DNA, cDNA, 합성 DNA 또는 다른 외래 유전 물질을 도입하는 다른 잘 공지된 방법 중 어느 것의 사용을 포함한다(예를 들어, Sambrook 등, 상동 참조). 선택된 단백질을 발현할 수 있는 숙주 세포에 적어도 1개의 유전자를 성공적으로 도입할 수 있는 특정한 유전적 조작 과정이 사용되는 것만이 필수적이다.

유전자 발현의 조절을 위한 징크핑거 단백질을 코드화하는 벡터

종래의 바이러스 및 비-바이러스 기제 유전자 전달 방법이 포유류 세포 또는 표적 조직에 조작된 징크핑거 단백질을 코드화하는 핵산을 도입하는데 사용될 수 있다. 그러한 방법은 세포에 징크핑거 단백질을 코드화하는 핵산을 시험관내 또는 생체내로 투여하는데 사용될 수 있다. 비-바이러스 벡터 송달 시스템은 DNA 플라스미드, 네이키드 핵산, 및 리포솜과 같은 송달 부형제와의 복합체인 핵산을 포함한다. 바이러스 벡터 송달 시스템은 DNA 및 RNA를 포함하며, 이것은 세포로 송달 후 에피솜 또는 통합 게놈 중 어느 하나를 가진다. 유전자 치료법 과정의 리뷰는, 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 Doerfler and Bohm(eds) (1995); 및 Yu et al., Gene Therapy 1:13-26 (1994) 참조.

조작된 징크핑거 단백질을 코드화하는 핵산의 비-바이러스 송달 방법은 리포펙션, 미세주사, 바이오리스틱스, 비로솜, 리포솜, 면역리포솜, 다양이온 또는 지질;핵산 콘쥬게이트, 네이키드 DNA, 인공 비리온, 및 제제-증진된 DNA 흡수를 포함한다. 리포펙션은, 예를 들어 US 5,049,386, US 4,946,787 및 US 4,897,355에 설명되고, 리포펙션 시약은 상업적으로 판매된다(Transfectam ™ 및 Lipofectin ™). 폴리뉴클레오티드의 효과적인 리셉터-인식 리포펙션에 적합한 양이온 및 중성 지질은 Felgner, WO 91/17424, WO 91/16024의 것들을 포함한다. 송달은 세포(생체외 투여) 또는 표적 조직(생체내 투여)으로 될 수 있다.

면역지질 복합체와 같은 표적화된 리포솜을 포함하여, 지질:핵산 복합체의 제조는 당업자에게 잘 공지되어 있다(예를 들어, 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., CancerRes. 52:4817-4820 (1992); 미국 특허 번호 4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085, 4,837,028, 및 4,946,787 참조).

조작된 징크핑거 단백질을 코드화하는 핵산의 송달을 위한 RNA 또는 DNA 기제 시스템의 사용은, 신체에서 특이적 세포에 대해 바이러스를 표적화하고, 핵에 탑재된 바이러스를 트래픽킹하는 고도로 발달된 과정의 이점을 가진다. 바이러스 벡터는 피험체에 직접 투여될 수 있거나(생체내), 또는 그것들은 시험관내에서 세포를 처리하는데 사용될 수 있으며, 이 변형된 세포가 환자에게 투여된다(생체외). 징크핑거 단백질의 송달을 위한 종래의 바이러스 기제 시스템은, 유전자 전달을 위한 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스 및 단순포진 바이러스 벡터를 포함한다. 바이러스 벡터는 현재 세포 및 조직으로 유전자를 전달하는 가장 효과적이고 다목적인 방법이다. 숙주 게놈으로의 통합이 레트로바이러스, 렌티바이러스, 및 아데노-관련 바이러스 유전자 전달 방법을 사용하여 가능하며, 주로 삽입된 트랜스젠의 장기적 발현을 가져온다. 추가적으로, 높은 형질도입 효능이 많은 상이한 세포 종류 및 표적 조직에서 관찰되었다.

레티노바이러스의 외래 피막 단백질을 결합시킴으로써 굴성이 변경될 수 있으며, 이로써 표적 세포의 잠재적 표적 집단이 확대된다. 렌티바이러스 벡터는 비-분할 세포를 형질도입하거나 또는 감염시키고, 전형적으로 높은 바이러스 역가를 생성할 수 있는 레티로바이러스 벡터이다. 따라서, 레티노바이러스 유전자 전달 시스템의 선택은 표적 조직에 의존한다. 레티노바이러스 벡터는 6 내지 10kb 까지의 외래 서열에 대한 패키지 용량을 갖는 시스-작용 긴 말단 반복체로 이루어진다. 최소 시스-작용 LTR이 벡터의 복제 및 패키지에 충분하며, 다음에 이것이 표적 세포에 치료적 유전자를 통합하는데 사용되어, 영구적인 트랜스젠 발현을 제공한다. 광범위하게 사용되는 레티노바이러스 벡터는 뮤린 백혈병 바이러스 (MuLV), 긴팔원숭이 백혈병 바이러스(GaLV), 유인원 면역결핍 바이러스(SIV), 사람 면역결핍 바이러스(HIV), 및 그것들의 조합을 기초로 하는 것들을 포함한다(예를 들어, 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 참조).

징크핑거 단백질의 일시적 발현이 바람직한 경우의 적용에서는, 아데노바이러스 기제 시스템이 전형적으로 사용된다. 아데노바이러스 기제 벡터는 많은 세포 종류에서 매우 높은 효능으로 형질도입할 수 있으며, 세포 분할은 필요하지 않다. 그러한 벡터에 있어서, 높은 역가 및 발현 수준이 얻어졌다. 이 벡터는 비교적 간단한 시스템에서 다량으로 생성될 수 있다. 또한, 아데노-관련 바이러스(" AAV") 벡터가, 예를 들어 핵산 및 펩티드의 시험관내 생성에서 표적 핵산을 갖는 세포를 형질도입하는데 사용되고, 생체내 및 생체외 유전자 치료법 과정에 사용된다(예를 들어, West et al., Virology 160: 38-47(1987); 미국 특허 번호 4,797,368; WO 93/24641; Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994); Muzyczka, J. Clin. Invest. 94:1351 (1994) 참조). 재조합 AAV 벡터의 구성이 미국 특허 번호 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, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 (1984); 및 Samulski et al., J. Virol. 63:03822-3828 (1989)를 포함하여, 많은 간행물에서 설명된다.

패키지 세포가 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 형성하는데 사용된다. 그러한 세포는 아데노바이러스를 패키지하는 293 세포, 및 레트로바이러스를 패키지 하는 ψ2 세포 또는 PA317 세포를 포함한다. 유전자 치료법에 사용되는 바이러스 벡터는 보통, 바이러스 입자로 핵산 백터를 패키징하는 생산자 셀라인에 의해 생성된다. 이 벡터는 전

형적으로 패키지와 이어지는 숙주로의 통합에 필요한 최소의 바이러스 서열, 발현될 단백질용의 발현 카세트로 대체된 다른 바이러스 서열을 함유한다. 상실한 바이러스 기능은 패키지 셀라인에 의해 트랜스로 공급된다. 예를 들어, 유전자 치료법에 사용되는 AAV 벡터는 전형적으로 패키징 및 숙주 세포로의 통합에 필요한 AAV 게놈으로부터의 ITR 서열만을 가진다. 바이러스 DNA는 셀라인에 패키징되며, 이것은 다른 AAV 유전자를 코드화하는 헬퍼 플라스미드, 즉 rep 및 cap를 함유하지만, ITR 서열은 결여되어 있다. 또한, 이 셀라인은 헬퍼인 아데노바이러스로 감염된다. 헬퍼 바이러스는 헬퍼 플라스미드로부터 AAV 벡터의 복제 및 AAV 유전자의 발현을 촉진한다. 헬퍼 플라스미드는 ITR 서열의 결여로 인해 의미 있는 양으로 패키징되지 않는다. 아데노바이러스로의 오염은, 예를 들어 아데노바이러스가 AAV보다 더 민감한 열처리에 의해 감소될 수 있다.

많은 상황에서, 벡터는 특정한 조직 종류에 대해 높은 정도의 특이성으로 송달되는 것이 바람직하다. 바이러스 벡터는 전형적으로, 바이러스 외부 표면에 바이러스 외피 단백질을 갖는 융합 단백질로서 리간드를 발현함으로써 주어진 세포 종류에 대한 특이성을 가지도록 변형된다. 이 리간드는 관심의 세포 종류에 존재한다고 공지된 리셉터에 대한 친화성을 가지도록 선택된다. 예를 들어, Han et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9747-9751 (1995)는 Moloney 뮤린 백혈병 바이러스가 gp70에 융합된 사람 헤레굴린을 발현하도록 변형될 수 있으며, 이 재조합 바이러스가 사람 상피 성장 인자 리셉터를 발현하는 어떤 사람 유방암 세포를 감염시킨다. 이 원리는 다른 쌍의 리간드 융합 단백질을 발현하는 바이러스와 리셉터를 발현하는 표적 세포로 확장될 수 있다. 예를 들어, 사상 파지가 실질적으로 어떤 선택된 세포 리셉터에 대한 특이적 결합 친화성을 갖는 항체 단편(예를 들어, FAB 또는 Fv)를 디스플레이하도록 조작될 수 있다. 상기 설명은 주로 바이러스 벡터에 적용되지만, 동일한 원리가 비-바이러스 벡터에도 적용될 수 있다. 그러한 벡터는 특이적 표적 세포에 의한 흡수를 장려한다고 생각되는 특이적 흡수 서열을 함유하도록 조작될 수 있다.

발현 벡터는 하기 설명된 바와 같이, 개별 피험체에 투여함에 의해, 전형적으로 전신적 투여(예를 들어, 정맥내, 복강내, 근육내, 피하 또는 두개내 주입) 또는 국부적 적용에 의해 생체내로 송달될 수 있다. 또는 달리, 네이키드 DNA가 투여될 수 있다. 또는 달리, 벡터는 개별 피험체로부터 외식된 세포(예를 들어, 림프구, 골수 흡인, 조직 생체검사) 또는 보편적 도너 조혈 줄기세포와 같이, 생체외에서 세포로 송달되고, 이어서 보통 벡터가 결합된 세포를 선택한 후, 세포를 환자에 재이식할 수 있다.

투여는 혈액 또는 조직 세포와의 궁극적인 접촉으로 분자를 도입하는데 보통 사용되는 경로 중 어느 것에 의한다. 그러한 핵산을 투여하는 적합한 방법이 이용가능하며 당업자에게 잘 공지되어 있고, 1가지 이상의 경로가 특정한 조성물을 투여하는데 사용될 수 있지만, 특정한 경로가 다른 경로보다 주로 더욱 즉각적이고 더욱 효과적인 반응을 제공할 수 있다.

제약학적으로 허용되는 운반체가 투여되는 특정한 조성물, 그리고 조성물을 투여하는데 사용되는 특정한 방법에 의해 어느 정도 결정된다. 따라서, 본 발명의 제약학적 조성물의 광범위한 적합한 조제물이 하기 설명된다(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989 참조).

징크핑거 단백질용 송달 부형제

징크핑거 단백질과 같은 폴리펩티드 화합물의 투여에 있어서 중요한 인자는, 폴리펩티드가 세포의 플라즈마 멤브레인, 또는 핵과 같은 세포내 구획의 멤브레인을 횡단하는 능력을 가지는 것을 보증하는 것이다. 세포 멤브레인은 작은 비이온성 친지질성 화합물은 자유롭게 투과할 수 있고, 극성 화합물, 거대분자 및 치료제또는 진단제는 본래 투과할 수 없는 지질-단백질 2중층으로 이루어진다. 그러나, 세포 멤브레인을 가로질러 징크핑거 단백질과 같은 폴리펩티드를 전위시키는 능력을 가지는 단백질 및 리포솜과 같은 다른 화합물이 설명되었다.

예를 들어, " 멤브레인 전위 폴리펩티드" 는 멤브레인-전위 운반체로서 작용하는 능력을 가지는 친양쪽성 또는 소수성 아미노산 하위-서열을 가진다. 한 구체예에서, 홈도메인 단백질이 세포 멤브레인을 가로질러 전위하는 능력을 가진다. 홈도메인 단백질의 가장 짧은 내부이행성 펩티드인 Antennapedia는 아미노산 위치 43에서 58까지의 단백질의 제 3 헬릭스인 것으로 판명되었다(예를 들어, Prochiantz, Current Opinion in Neurobiology 6:629-634 (1996) 참조). 다른 하위-서열인 신호 펩티드의 h(소수성) 도메인이 유사한 세포 멤브레인 전위 특성을 가지는 것으로 판명되었다(예를 들어, Lin et al., J. Biol. Chem. 270:14255-14258 (1995) 참조).

세포로 징크핑거 단백질의 흡수를 용이하게 하기 위해, 본 발명의 징크핑거 단백질에 연결될 수 있는 펩티드 서열의 예는, 이것들에 제한되는 것은 아니지만, HIV의 tat 단백질의 11 아미노산 펩티드, p16 단백질의 아미노산 84에서 103까지에 상응하는 20 잔기 펩티드 서열(Fahraeus et al., Current Biology 6:84 (1996) 참조); Antennapedia의 60 아미노산 길이 홈도메인의 제 3 헬릭스(Derossi et al., J. Biol. Chem. 269:10444 (1994)); Kaposi 섬유아세포 성장 인자(K-FGF) h 영역과 같은 신호 펩티드의 h 영역(Lin et al., 상동); 또는 HVS로부터의 VP22 전위 도메인(Elliot & O'Hare, Cell 88:223-233 (1997))을 포함한다. 증진된 세포 흡수를 제공하는 다른 적합한 화학적 부분이 또한 징크핑거 단백질에 연결될 수 있다.

또한, 독소 분자가 세포 멤브레인을 가로질러 폴리펩티드를 수송하는 능력을 가질 수 있다. 주로, 그러한 분자는 적어도 2개의 부분(" 2성분 독소" 로 명명): 전위 또는 결합 도메인 또는 폴리펩티드 및 개별 독소 도메인 또는 폴리펩티드로 이루어진다. 전형적으로, 전위 도메인 또는 폴리펩티드는 세포 리셉터에 결합하고, 다음에 독소가 세포로 수송된다. Clostridium perfringens iota 독소, 디프테리아 독소(DT), Pseudomonas 외독소 A(PE), 백일해 독소(PT), Bacillus anthracis 독소, 및 백일해 아데닐산 고리화효소(CYA)를 포함하여, 몇몇 박테리아 독소가 내부 또는 아미노-말단 융합체로서 세포 시토졸에 펩티드를 송달하려는 시도에서 사용되었다. (Arora et 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., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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 etal., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10277-10281 (1992); 및 Novak et al., J. Biol. Chem. 267:17186-17193 (1992)).

그러한 하위-서열은 세포 멤브레인을 가로질러 징크핑거 단백질을 전위시키는데 사용될 수 있다. 징크핑거 단백질은 그러한 서열에 편리하게 융합되거나, 또는 그러한 서열로부터 유도될 수 있다. 전형적으로, 전위 서열은 융합 단백질의 일부로서 제공된다. 선택적으로, 링커가 징크핑거 단백질 및 전위 서열을 연결하는데 사용될 수 있다. 어떤 적합한 링커, 예를 들어 펩티드 링커가 사용될 수 있다.

또한, 징크핑거 단백질은 리포솜 및 면역리포솜과 같은 리포솜 유도체에 의하여 동물 세포, 바람직하게 포유류 세포에 도입될 수 있다. 용어 " 리포솜" 은 1개 이상의 같은 중심으로 정돈된 지질 2중층으로 이루어진 소낭으로 간주하며, 이것은 수성상을 캡슐처럼 싸고있다. 수성상은 전형적으로 세포로 송달될 화합물, 즉 징크핑거 단백질을 함유한다.

리포솜은 플라즈마 멤브레인과 융합하며, 이로써 시토졸로 약물을 방출한다. 또는 달리, 리포솜은 수송 소낭에 있는 세포에 의해 식균작용되거나 또는 흡수된다. 일단 엔도솜 또는 파고솜에서, 리포솜이 수송 소낭의 멤브레인을 분해하거나 또는 이것과 융합하고, 그것의 내용물을 방출한다.

리포솜에 의한 약물 송달의 현행 방법에서, 리포솜은 궁극적으로 투과가능하게 되며, 표적 조직 또는 세포에서 캡슐로 덮인 화합물을 방출한다(이 경우에, 징크핑거 단백질). 전신적 또는 조직 특이적 송달에 대해서, 이것은, 예를 들어 수동적 방식으로 달성될 수 있으며, 여기에서 리포솜 2중층은 신체에서 다양한 제제가 작용하는 동안의 시간에 걸쳐 분해된다.또는 달리, 활성 약물 방출은 리포솜 소낭에서의 투과능력 변화를 유도하는 제제를 사용하는 것을 포함한다. 리포솜 멤브레인은, 환경이 리포솜 멤브레인에 가까운 산성으로 될 때 그것들이 탈안정화되도록 구성될 수 있다(예를 들어, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7851 (1987); Biochemistry 28:908 (1989) 참조). 리포솜이 표적 세포에 의해 세포내섭취될 때, 예를 들어 그것들은 탈안정화되고 그것들의 내용물을 방출한다. 이 탈안정화는 푸소지네시스(fusogenesis)라고 명명된다. 디올레오일포스파티딜에틴올아민(DOPE)이 많은 " 푸소젠" 시스템의 베이스이다.

그러한 리포솜은 전형적으로 징크핑거 단백질 및 지질 성분, 예를 들어 중성 및/또는 양이온성 지질을 포함하며, 선택적으로 정해진 세포 표면 리셉터 또는 리간드(예를 들어, 항원)에 결합하는 항체와 같은 리셉터-인식 분자를 포함한다. 리포솜을 제조하는데 이용가능한 여러가지 방법이, 예를 들어 Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng 9:467 (1980), 미국 특허 번호 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, 4,774,085, 4,837,028, 4,946,787, PCT 공보 번호 WO 91/17424, Deamer & Bangham, Biochim. Biophys. Acta 443:629-634 (1976); Fraley, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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., Proc. Natl. Acad Sci. USA 85:242-246 (1988); Liposomes(Ostro(ed.), 1983, Chapter 1); Hope et al., Chem. Phys. Lip. 40:89 (1986); Gregoriadis, Liposome Technology (1984) 및 Lasic, Liposomes: from Physics to Applications (1993)에 설명된다. 적합한 방법은, 예를 들어 초음파처리, 추출, 고압/균질화, 미세유동화, 세제 투석, 작은 리포솜 소낭의 칼슘-유도 융합 및 에테르-융합 방법을 포함하며, 이것 모두가 본 분야에 잘 공지되어 있다.

본 발명의 어떤 구체예에서, 특정한 세포 종류, 조직 등에 특이적인 표적화 부분을 사용하여 본 발명의 리포솜을 표적화하는 것이 바람직하다. 여러가지 표적화 부분(예를 들어, 리간드, 리셉터 및 단일클론 항체)를 사용하는 리포솜의 표적화가 이전에 설명되었다(예를 들어, 미국 특허 번호 4,957,773 및 4,603,044 참조).

표적화 부분의 예는, 전립선 암 특이적 항원 및 MAGE와 같은, 이상형성물에 관련된 항원에 특이적인 단일클론 항체를 포함한다. 또한, 종양이 c-erbB2와 같은 종양유전자의 활성화 또는 과발현에 기인하는 유전자 생성물을 검출함에 의해 진단될 수 있다. 여기에 더하여, 많은 종양이 알파페토프로테인(AFP) 및 발암태아성 항원(CEA)과 같은, 태아 조직에 의해 보통 발현되는 항원을 발현한다. 바이러스 감염 부위는 간염 B 핵 및 표면 항원(HBVc, HBVs), 간염 C 항원, Epstein-Barr 바이러스 항원, 사람 면역결핍 1-형 바이러스(HIV1) 및 유두종 바이러스 항원과 같은, 다양한 바이러스 항원을 사용하여 진단될 수 있다. 염증은 인테그린(예를 들어, VCAM-1), 셀렉틴 리셉터(예를 들어, ELAM-1)과 같은, 염증 부위에서 발현되는 표면 분자에 의해 특이적으로 인식되는 분자를 사용하여 검출될 수 있다.

리포솜에 표적화 제제를 커플링하는 표준 방법이 사용될 수 있다. 이들 방법은 일반적으로 표적화 제제의 부착을 활성화할 수 있는 리포솜 지질 성분, 예를 들어 포스파티딜에탄올아민, 또는 지질 유도된 블레오마이신과 같은 유도된 친지질성 성분을 포함한다. 항체 표적화된 리포솜이, 예를 들어 단백질 A를 결합시키는 리포솜을 사용하여 구성될 수 있다(Renneisen et al., J. Biol. Chem., 265:16337-16342 (1990) 및 Leonetti et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2448-2451 (1990 참조).

징크핑거 단백질에 의한 유전자 발현의 조절을 측정하는 분석

여러가지 분석법이 후보 유전자와 선택된 표현형의 관련을 측정하는데 사용될 수 있다. 징크핑거 단백질에 의해 조절된 특정한 유전자의 활성이, 예를 들어 면역분석(예를 들어, ELISA 및 항체를 사용한 면역조직화학 분석), 혼성화 분석(예를 들어 RNase 보호, 노던, 제자리 혼성화, 올리고뉴클레오티드 어레이 연구), 색채 분석, 증폭 분석, 효소 활성 분석, 종양 성장 분석, 표현형 분석, cDNA 어레이 연구 등을 사용하여, 예를 들어 단백질 또는 mRNA 레벨, 생성물 레벨, 효소 활성, 종양 성장; 리포터 유전자의 전사 활성화 또는 리프레션; 2차 메신저 레벨(예를 들어 cGMP, cAMP, IP3, DAG, Ca^{2+}); 사이토카인 및 호르몬 생성 레벨; 및 신혈관생성을 측정함으로써, 여러가지의 시험관내 및 생체내 분석법을 사용하여 평가될 수 있다.

징크핑거 단백질은 주로 먼저, 배양된 세포, 예를 들어 293 세포, CHO 세포, VERO 세포, BHK 세포, HeLa 세포, COS 세포 등을 사용하여 시험관내에서 활성에 대해 시험된다. 바람직하게, 사람 또는 마우스 세포가 사용된다. 징크핑거 단백질은 주로 먼저, 리포터 유전자를 사용하는 일시적 발현 시스템을 사용하여 시험되고, 다음에 표적 후보 유전자의 조절이 세포 및 동물에서 생체내 또는 생체외로 모두 시험된다. 징크핑거 단백질은 세포에서 재조합적으로 발현되거나, 동물에 이식된 세포에서 재조합적으로 발현되거나, 또는 트랜스제닉 동물에서 재조합적으로 발현될 뿐만 아니라, 하기 설명된 송달 부형제를 사용하여 동물 또는 세포에 단백질로서 투여될 수도 있다. 세포는 고정되거나, 용액중에 있거나, 동물에 주사되거나, 또는 트랜스제닉 또는 비-트랜스제닉 동물에서 천연발생할 수 있다.

유전자 발현의 조정 및 후보 유전자와 선택된 표현형의 관련이 본원에 설명된 시험관내 또는 생체내 분석법 중 어느 하나를 사용하여 시험된다. 후보 유전자를 포함하는 세포 또는 피험 동물이 징크핑거 단백질과 접촉되고, 표현형 조정의 정도를 시험하기 위해 대조표준 유전자 및 제 2 후보 유전자와 비교된다. 유전자 발현의 조절에 대해서, 징크핑거 단백질은 200nM 이하, 바람직하게 100nM 이하, 더 바람직하게 50nM, 가장 바람직하게 25nM 이하의 K_d를 선택적으로 가진다.

징크핑거 단백질의 효과가 상술된 파라미터 중 어느 것을 시험함에 의해 측정될 수 있다. 어떤 적합한 유전자 발현, 표현형, 또는 생리학적 변화가 징크핑거 단백질의 영향을 평가하는데 사용될 수 있다. 기능적인 결과가 무손상 세포 또는 동물을 사용하여 측정된 때, 또한 종양 성장, 신혈관생성, 호르몬 방출, 공지된 특성화되지 않은 유전 마커에 대한 전사 변화(예를 들어, 노던 블롯 또는 올리고뉴클레오티드 어레이 연구), 세포 성장 또는 pH 변화와 같은 세포 대사의 변화, 및 cGMP와 같은 세포내 2차 메신저의 변화와 같은 여러가지 효과를 측정할 수 있다.

선택된 표현형에 대한 분석의 예는, 예를 들어 형질전환 분석, 예를 들어 증식, 앵커리지 의존성, 성장 인자 의존성, 병소 형성, 연한천에서의 성장, 누드 마우스에서 종양 증식, 및 누드 마우스에서 종양 혈관생성의 변화; 세포자살 분석, 예를 들어 DNA 사다리화 및 세포 죽음, 세포자살에 연루된 유전자 발현; 신호 변환 분석, 예를 들어 세포내 칼슘, cAMP, cGMP, IP3의 변화, 호르몬 및 신경전달물질 방출의 변화; 리셉터 분석, 예를 들어 에스트로겐 리셉터 및 세포 성장; 성장 인자 분석, 예를 들어 EPO, 저산소증 및 적혈구 콜로니 형성 단위 분석; 효소 생성물 분석, 예를 들어 FAD-2 유도 기름 불포화; 전사 분석, 예를 들어 리셉터 유전자 분석; 및 단백질 생산 분석, 예를 들어 VEGF ELIS를 포함한다.

한 구체예에서, 선택된 표현형에 대한 분석은 시험관내에서 수행된다. 한 바람직한 시험관내 분석 포멧에서, 배양된 세포에서 유전자 발현의 징크핑거 단백질 조절은 ELISA 분석법을 사용하여 단백질 생성을 측정함에 의해 시험된다.

다른 구체예에서, 후보 유전자 발현의 징크핑거 단백질 조절은 표적 유전자 mRNA 발현의 레벨을 측정함에 의해 시험관내에서 측정된다. 유전자 발현의 레벨은, 예를 들어 PCR, LCR 또는 혼성화 분석법, 예를 들어 노던 혼성화, RNase 보호, 점 블롯팅을 사용하는 증폭을 사용하여 측정된다. RNase 보호가 한 구체예에서 사용된다. 단백질 또는 mRNA의 레벨이 본원에 설명된 바와 같이, 직접적 또는 간접적으로 표지된 검출 제제, 예를 들어 형광 또는 방사성 표지된 핵산, 방사성 또는 효소 표지된 항체 등을 사용하여 검출된다.

또는 달리, 리포터 유전자 시스템이, 루시페라제, 녹색형광 단백질, CAT, 또는 β-gal과 같은 리포터 유전자에 작동가능하게 연결된 표적 유전자 프로모터를 사용하여 고안될 수 있다. 리포터 구성물은 전형적으로 배양된 세포에 공동-트랜스펙션된다. 선택된 징크핑거 단백질로 처리한 후, 리포터 유전자 전사, 번역, 또는 활성의 양이 당업자에게 공지된 표준 기술에 따라 측정된다.

후보 유전자 발현의 징크핑거 단백질 조절을 모니터하는데 유용한 분석 포멧의 다른 예는 생체내에서 수행된다. 이 분석법은 특히 신혈관형성과 같은 종양 지원에 연루된 유전자인 종양 촉진 유전자(예를 들어, VEGF)의 발현을 억제하거나, 또는 p53과 같은 종양 억제인자 유전자를 활성화하는 징크핑거 단백질을 시험하는데 유용하다. 이 분석법에서, 선택된 징크핑거 단백질을 발현하는 배양된 종양 세포가 무흉선 마우스, 조사된 마우스, 또는 SCID 마우스와 같은 면역손상된 마우스에게 피하적으로 주사된다. 적합한 시간, 바람직하게는 4 내지 8주 후, 종양 성장이, 예를 들어 부피 또는 그것의 2개의 최대 크기로 측정되고, 대조표준과 비교된다. 통계적으로 의미 있는 감소를 가지는(예를 들어, 스튜던트 T 테스트를 사용하여) 종양이 억제된 성장을 가진다고 말한다. 또는 달리, 종양 신혈관생성의 정도가 또한 측정될 수 있다. 내피 세포 특이적 항체를 사용하는 면역분석법이 종양의 혈관생성 및 종양에 있는 혈관의 수를 염색하는데 사용된다. 혈관수에 있어서 통계적으로 의미 있는 감소를 가지는(예를 들어, 스튜던트 T 테스트를 사용하여) 종양이 억제된 신혈관생성을 가진다고 말한다.

또한, 트랜스제닉 및 비-트랜스제닉 동물이 생체내에서 후보 유전자 발현의 조절을 시험하는 구체예로서 사용된다. 트랜스제닉 동물은 전형적으로 선택된 징크핑거 단백질을 발현한다. 또는 달리, 선택된 징크핑거 단백질을 일시적으로 발현하는 동물, 또는 송달 부형제중의 징크핑거 단백질이 투여된 동물이 사용될 수 있다. 후보 유전자 발현의 조절이 본원에 설명된 분석법 중 어느 하나를 사용하여 시험된다. 동물이 관찰되고, 예를 들어 약물, 미토겐, 바이러스, 병원균, 독소 등을 사용하여 도전된 기능적 변화에 대해 분석된다.

약물 송달에 대한 트랜스제닉 마우스 및 시험관내 고-처리량 분석

징크핑거 단백질 기술의 더 이상의 적용은 셀라인 및 트랜스제닉 동물에서 유전자 발현을 조작하는 것이다. 일단 선택된 후보 유전자가 표현형에 관련된 후, 후보 유전자가 약물 치료법 표적으로 유효화되고, 세포 및 트랜스제닉 동물 기초 분석이 고-처리량 약물 스크리닝을 위해 개발된다. 후보 유전자를 발현하는 셀라인 또는 동물이 후보 유전자의 발현을 조절하는 징크핑거 단백질과 함께 제공된다. 징크핑거 단백질은 전형적으로 징크핑거 단백질을 코드화하는 핵산으로서 제공되지만, 그것은 또한 단백질로서 투여될 수도 있다. 다음에, 셀라인 또는 동물이 시험 화합물과 접촉되어 후보 유전자 및 선택된 표현형에 대한 화합물의 효과를 측정한다. 징크핑거 단백질 기술은, 예를 들어 징크핑거 단백질의 발현이 소분자 시스템을 사용하는 조건을 만들수 있기 때문에, 고-처리량 세포-기초 및 동물 분석법을 개선한다.

치료제 징크핑거 단백질에 대한 고-처리량 분석법의 한 구체예에서, 징크핑거 단백질은 본원에 설명된 소분자 조절 시스템을 사용하여 셀라인 또는 동물에서 후보 유전자의 조절에 사용될 수 있다. 징크핑거 단백질-기제 리프레서의 발현 및/또는 기능은 발생 동안 스위치오프되거나, 또는 세포 또는 동물에서 마음대로 스위치온될 수 있다. 이 접근법은 징크핑거 단백질 발현 모듈만의 부가에 의존하며, 상종성 재조합은 필요하지 않다. 징크핑거 단백질 리프레서가 트랜스 우성이기 때문에, 생식계통 전달 또는 동형접합성에 대한 관계는 없다. 이들 쟁점은 빈약하게 특성화된 유전자 후보(cDNA 또는 EST 클론)에서부터 마우스 모델까지 나아가는데 필요한 시간 및 노동에 극적으로 영향을 미친다. 이 능력은 치료적 중재에 대한 유전자 표적을 신속하게 확인 및/또는 유효화하고, 신규 모델 시스템을 생성하고, 복잡한 생리학적 현상(발생, 조혈, 형질전환, 신경 기능 등)의 분석을 허락하는데 사용될 수 있다. 키메라 표적화된 마우스가 Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, (1988); Teratocarcinomas and Embryonic Stem

Cells: A Practical Approach, Robertson, ed., (1987); 및 Capecchi et al., Science 244:1288 (1989)에 따라서 유도될 수 있다.

징크핑거 단백질의 용량

본 발명의 관계에서, 피험체 또는 세포에 투여되는 용량은 원하는 표현형을 달성하기에 충분해야 한다. 특정한 투약량 섭생이 실험 셋팅에서, 예를 들어 기능 유전자학 연구에서, 그리고 세포 또는 동물 모델에서 표현형 변화를 측정하는데 유용할 수 있다. 용량은 치료될 세포 또는 환자의 체중 또는 표면적 뿐만 아니라, 사용된 특정한 징크핑거 단백질의 효능 및 K_d, 표적 세포의 핵 부피, 및 세포 또는 환자의 조건에 의해 결정된다. 또한, 용량의 크기가 특정한 세포 또는 환자에 특정한 화합물 또는 벡터의 투여에 수반되는 어떤 부작용의 존재, 성질 및 정도에 의해 결정된다.

표적 부위에 대략 99% 결합하기 위한 징크핑거 단백질의 최대로 효과적인 투약량은 세포 당 징크핑거 단백질 분자가 약 $1.5x10^5$ 내지 $1.5x10^6$ 카피 미만인 범위내로 계산된다. 이 결합 레벨에 대한 세포 당 징크핑거 단백질의 수는 HeLa 세포핵의 부피(대략 $1000\mu m^3$ 또는 10^{12} L; Cell Biology(Altman & Katz, eds. (1976))를 사용하여 다음과 같이 계산된다. HeLa 핵이 상대적으로 크기 때문에, 이 투약량 수는 표적 세포핵의 부피를 사용하여 필요에 따라 재계산된다. 또한, 이 계산은 다른 부위에 의해 결합하는 징크핑거 단백질에 대한 경쟁을 고려하지 않는다. 또한, 이 계산은 징크핑거 단백질이 본질적으로 모두 핵에 국소화된다는 것을 가정한다. $100xK_d$의 값을 사용하여 표적 부위에 대략 99% 결합을 계산하고, $10xK_d$값을 사용하여 표적 부위에 대략 90% 결합을 계산한다.

예를 들어, K_d = 25nM

ZFP + 표적 부위 ↔ 복합체

즉, DNA + 단백질 ↔ DNA:단백질 복합체

K_d = [DNA][단백질] / [DNA:단백질 복합체]

ZFP의 50%가 결합된 때, K_d = [단백질]

그래서, [단백질] = 25nM일 때, 핵 부피는 10^{-12} L이고,

[단백질] = $(25x10^{-9}$ 몰/L)$(10^{-12}$ L/핵)$(6x10^{23}$ 분자/몰)

= 50% 결합에 대해 15,000분자/핵

99% 표적이 결합된 때, $100xK_d$ = [단백질]

$100xK_d$ = [단백질] = 2.5μM

$(2.5x10^{-6}$ 몰/L) $(10^{-12}$ L/핵)$(6x10^{23}$ 분자/몰)

= 표적 부위의 99% 결합에 대해 핵 당 약 1,500,000 분자

또한, 징크핑거 단백질을 코드화하는 발현 벡터의 적합한 용량이 프로모터로부터 징크핑거 단백질 발현의 평균 속도 및 세포에서 징크핑거 단백질 분해의 평균 속도를 고려함에 의해 계산될 수 있다. 바람직하게, 야생형 또는 돌연변이 HSV TK와 같은 약한 프로모터가 상술된 바와 같이 사용된다. 미생물에서 징크핑거 단백질의 용량은 사용된 특정한 징크핑거 단백질의 분자량을 고려함에 의해 계산된다. 투여될 징크핑거 단백질의 유효량을 결정하는데 있어서, 징크핑거 단백질 또는 징크핑거 단백질을 코드화하는 핵산의 혈중 플라즈마 레벨, 잠재적 징크핑거 단백질 독성, 표현형의 진행, 및

항-징크핑거 단백질 항체의 생성이 평가된다. 투여는 단독으로 또는 나눠진 용량으로 투여될 수 있다.

제약학적 조성물 및 투여

징크핑거 단백질 및 징크핑거 단백질을 코드화하는 발현 벡터가 유전자 발현의 조정을 위해 피험체 또는 세포에 직접 투여될 수 있다. 조직 또는 세포와의 궁극적인 접촉으로 징크핑거 단백질을 도입하는데 보통 사용되는 경로 중 어느 것에 의해 유효량이 투여된다. 징크핑거 단백질은 어떤 적합한 방식, 바람직하게 제약학적으로 허용되는 운반체와 함께 투여된다. 그러한 조정인자를 투여하는 적합한 방법이 입수가능하며 당업자에게 잘 공지되어 있고, 1개 이상의 경로가 특정한 조성물을 투여하는데 사용될 수 있지만, 주로 특정한 경로가 다른 경로보다 더 즉각적이고 더 효과적인 반응을 제공한다.

제약학적으로 허용되는 운반체는 투여될 특정한 조성물에 의해서 뿐만 아니라, 조성물을 투여하는데 사용되는 특정한 방법에 의해서 어느 정도 결정된다. 따라서, 본 발명의 제약학적 조성물의 광범위한 적합한 조제물이 있다(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. (1985) 참조).

징크핑거 단백질, 그것을 코드화하는 핵산은, 단독으로 또는 다른 적합한 성분과의 조합으로, 흡입에 의해 투여되는 에어로졸 조제물(즉, 그것들은 뿜어질 수수 있다)로 만들어질 수 있다. 에어로졸 조제물은 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등과 같은, 일정기압이 유지된 허용되는 추진제안에 두어질 수 있다.

예를 들어, 정맥내, 근육내, 피내, 및 피하 경로에 의한 것과 같은 비경구적 투여에 적합한 조제물은 산화방지제, 완충액, 세균발육 저지제, 및 조제물을 의도된 레시피언트의 혈액과 등장이 되게 하는 용매를 함유할 수 있는 수성 및 비수성 등장 멸균 주사 용액, 및 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정제, 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다. 본 발명의 실행에서, 조성물은, 예를 들어 정맥내 주입에 의해, 경구적으로, 국부적으로, 복강내적으로, 정맥내적으로, 또는 수막강내적으로 투여될 수 있다. 화합물의 조제물은 앰플 및 바이알과 같은 단위-용량 또는 수회-용량 밀봉 용기에 존재할 수 있다. 주입 용액 및 현탁액은 이전에 설명된 종류의 멸균 분말, 과립, 및 정제로부터 제조될 수 있다.

본 명세서에 인용된 모든 공보 및 특허 출원은 각 개별 공보 또는 특허 출원이 참고자료로 포함되는 것으로 구체적으로 그리고 개별적으로 나타내어졌던 것처럼, 참고자료로 본원에 포함된다.

전술한 발명이 이해를 확실히하기 위하여 실례 및 실시예의 방식으로 일부 상세하게 설명되며, 어떤 변화 및 변형이 첨부된 청구항의 정신 및 범위를 벗어나지 않고 만들어질 수 있다는 것이 본 발명의 교시에 비추어 당업자에게 쉽게 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 유전자 발현을 조절하기 위한 징크핑거 단백질을 사용한 표적 유효화의 도식적 표현이다.

도 2는 징크핑거 단백질 발현 구성물을 나타낸다.

도 3은 유전자 발현의 징크핑거 단백질 조절을 위한 루시페라제 리포터 구성물을 나타낸다.

도 4는 루시페라제 리포터 유전자 활성화에 대한 징크핑거 단백질의 효과를 나타낸다.

도 5는 징크핑거 단백질에 의한 사람 VEGF 자생 리포터 유전자의 활성화를 나타낸다.

실시예

다음의 실시예들은 단지 예시의 방식으로 제공되며, 본 발명을 제한하지 않는다. 당업자는 여러 가지 중요하지 않은 파라미터는 본질적으로 유사한 결과를 얻기 위해 변화 또는 변형될 수 있다는 것을 인지할 것이다.

실시예 I

표적 유효화용 징크핑거 단백질을 사용한 사람 VEGF의 표적화

표적 유효화에 있어 중요한 고려사항은 표적화된 유전자와 결과의 표현형 사이의 관계를 효과적으로 측정하고 정확하게 평가하는 것이다.

이 실시예는, 예를 들어 유전자의 발현 또는 유전자 생성물의 기능을 조절할 수 있는 치료적 화합물의 개발을 위한 표적으로서 유전자를 유효화하기 위한 징크핑거 단백질 기술의 사용을 증명한다. 이 과정은 다음의 단순한 가정을 기초로 한다(도 1).

만일 유전자 X가 ZFP-A1에 의해 상향-조절된다면, 이것은 X1 부위에서 특이적으로 표적화화고, 표현형 Q가 관찰된다.

만일 유전자 X가 ZFP-A2에 의해 상향-조절된다면, 이것은 상이한 부위 X2에서 특이적으로 표적화화고, 동일한 표현형 Q가 관찰된다.

만일 유전자 X가 ZFP-B1에 의해 하향-조절된다면, 이것은 X3 부위(X3은 X1 또는 X2일 수 있다)에서 표적화화고, 상이한 표현형 Z가 관찰된다.

만일 ZFP-A1, ZFP-A2, 또는 ZFP-B1가 표현형 Q에 연루되지 않는 유전자를 표적화하는데 사용된다면, 이 유전자와 관련된 표현형 변화는 관찰되지 않아야 한다. 사람 및 마우스 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 유전자를 이 실시예에서 표적 유효화에 대해 선택했다. VEGF는 저산소증에 의해 유도된 내피 세포-특이적 미토겐인 대략 46kDa 당단백질이다. VEGF는 티로신 키나제 리셉터 Flt-1(VEGFR-1) 및 Flk-1/KDR (VEGFR-2)과의 상호작용에 의하여 내피 세포에 결합한다. VEGF가 맥관형성에서 매우 중요한 역할을 하므로, 치료제의 개발에 있어 이 유전자를 표적화하는 것이 대단히 관심을 끈다. VEGF 유전자의 억제(하향-조절)는 암 및 당뇨병 망막변증 치료에 사용될 수 있으며, 이 유전자의 활성화(상향-조절)은 국소빈혈 심장 및 조직 질환에 사용될 수 있다. 이들 2가지 바람직한 표현형의 변화는 VEGF 징크핑거 단백질 기술을 사용하는 표적 유효화에 이상적인 VEGF 유전자를 만든다.

시험관내에서 생화학적 친화성 및 특이성에 대한 징크핑거 단백질의 시험

징크핑거 단백질에 대한 DNA 표적 부위를 표적화된 유전자의 전사 부위 주변 영역에서 선택했다. 제 1 표적을 대다수의 인핸서 요소가 위치한 전사 개시 부위의 대략 1kb 상류 영역내에서 선택했다. 각 3-핑거 징크핑거 단백질은 9bp DNA 서열을 인식한다. DNA-결합 특이성을 증가시키기 위해서, 2개의 3-핑거 징크핑거 단백질을 함께 융합하여, 가장 근접하여 있는 2개의 9bp DNA 서열을 표적화한다(Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5525-5530 (1997)).

사람 SP-1 또는 뮤린 Zif268 전사 인자를 디자인된 징크핑거 단백질의 구성을 위한 선조 분자로 사용했다. 표적 DNA 서열을 인식하는 아미노산 서열(핑거)을 본원에 설명된 인식 규칙을 기초로 하여 디자인했다. 디자인된 징크핑거 단백질 유전자를 6 오버랩 올리고뉴클레오티드를 이용하는 PCR-기초 과정을 사용하여 구성했다. VEGF를 표적화하는 징크핑거 단백질 유전자를 디자인하고 조립하는 방법은 USSN 09/229,037에 상세히 설명된다.

디자인된 징크핑거 단백질 유전자를 KpnI 및 BamHI로 절단한 후 pMAL-KNB 벡터로 처음으로 클론했다(도 2). pMAL-KNB 벡터를 pMAL-c2 벡터로부터 변형한다(뉴잉글랜드 바이오랩스, 메사츄세츠). 징크핑거 단백질을 박테리아로부터 정제하고, 생화학적 친화성 및 특이성 분석을 행했다. 이들 시험관내 분석 방법은 본원 및 공동 계류중인 출원 USSN 09/229,037에 설명된다.

일시적으로 트랜스펙션된 세포에서 루시페라제 프로모터의 활성화 및 리프레션

높은 생화학적 친화성 및 특이성을 갖는 징크핑거 단백질을 pcDNA-NVF 또는 pcDNA-NKF에 있는 KpnI 및 BamHI 부위로 서브클론한다(도 2). pcDNA-NVF 구성물은 핵 위치 신호를 코드화하는 CMV 프로모터-제어 서열, 단순포진 바이러스 VP16 활성화 도메인, 및 Flag 펩티드를 함유한다. 이 구성물은 포유류 세포에 도입되는 때, 표적화된 유전자를 상향-조절하도록 디자인되었다. pcDNA-NKF 구성물은 VP16 도메인 대신 Kruppel-관련 박스(KRAB) 리프레션 도메인을 함유하고, 표적화된 유전자를 하향-조절하는데 사용했다. 이들 구성물은 공동 계류중인 출원 USSN 09/229,037에 상세하게 설명된다.

리포터 플라스미드 시스템은 pGL3-프로모터 및 pGL3-제어 벡터(프로메가, 위스콘신)를 기초로 한다. 징크핑거 단백질 표적 부위의 3개의 세로로 나란한 반복부를 SV40 프로모터의 상류에 삽입했다(도 3). pGLP 리포터를 사용하여 유전자 발현의 상향-조절에 대해 조작된 징크핑거 단백질의 활성을 평가하고, pGLC 리포터를 사용하여 유전자 발현의 ZFP-KRAB 활성화 억제의 효과를 측정했다. 이들 구성물은 공동 계류중인 USSN 09/229,037에 상세하게 설명된다.

이 실시예에서 사용된 대조표준 플라스미드를 도 2에 나타낸다. pcDNA-NVF(또는 pcDNA-NKF)가 ZFP가 없는 이펙터이다. pcV-RAN(또는 pcK-RAN)는 공지된 DNA-결합 능력을 가지지 않는 조작된 징크핑거 단백질을 제외한 모든 성분을 발현한다(도 2). pcV-RAN(또는 pcK-RAN) 구성물에 있는 징크핑거 단백질 서열은:

VPGKKKQHICHIQGCGKVYG GHDTVVGHLRWHTGERPFMCTWSYCGKRFTAADEVGLHKRTHTGEKKFACPECP KRFMLVVATOLHIKTHQNKKGGS이며, 밑줄친 것이 핑거이다. 이들 대조표준 구성물을 사용하여, DNA 결합 도메인의 부재하에 조절 도메인(VP16 또는 KRAB)의 효과를 조사했다. pc-ZFP-cat 플라스미드는 특이적으로 디자인된 징크핑거 단백질을 발현하지만, 기능 도메인(VP16 또는 KRAB)은 pcDNA3.1/CAT 벡터(nt 1442에서 1677)(인비트로겐, 캘리포니아)에 있는 클로로암페니콜 아세틸트랜스페라제(CAT)로부터 분리된 234bp 단편으로 대체했다(도 2). 이 대조표준 플라스미드를 사용하여 DNA 결합 도메인이 단독으로 유전자 발현에 대한 어떤 효과를 가지는지의 여부를 시험했다. 다른 대조표준은 상이한 DNA 서열을 인식하는 징크핑거 단백질을 발현하는 이펙터 및 비-특이적 징크핑거 단백질 표적 서열을 함유하는 리포터를 포함한다.

다음의 실시예는 디자인된 징크핑거 단백질의 효과를 증명하며, 이것은 293 세포에서 루시페라제 리포터 유전자를 활성화한다. 표적화된 서열 GGGGTTGAG을 M6-1892S로 명명하고, 이것은 사람 VEGF 유전자의 프로모터 영역에 있다. 이 9bp DNA 서열을 인식하는 징크핑거 단백질을 본원 및 USSN 09/229,037에 설명된 바와 같이 디자인 및 조립한다. 징크핑거 단백질의 DNA 서열 및 아미노산 서열을 하기 나타낸다.

```
   KpnI
5'GGTACCGGGCAAGAAGAAGCAGCACATCTGCCACATCCAGGGCTGTGGTAAAGTT
    V  P  G  K  K  K  Q  H  I  C  H  I  Q  G  C  G  K  V

TACGGCCGCTCCGACAACCTGACCCGCCACCTGCGCTGGCACACCGGCGAGAGGCCT
 Y  G  R  S  D  N  L  T  R  H  L  R  W  H  T  G  E  R  P
       ( 핑거 1: GAG)
TTCATGTGTACATGGTCCTACTGTGGTAAACGCTTCACCAACCGCGACACCCTGGCC
 F  M  C  T  W  S  Y  C  G  K  R  F  T  N  R  D  T  L  A
                                      ( 핑거 2: GTT)
CGCCACAAGCGTACCCACACCGGTGAGAAGAAATTTGCTTGTCCGGAATGTCCGAAG
 R  H  K  R  T  H  T  G  E  K  K  F  A  C  P  E  C  P  K

CGCTTCATGCGCTCCGACCACCTGTCCAAGCACATCAAGACCCACCAGAACAAGAAG
 R  F  M  R  S  D  H  L  S  K  H  I  K  T  H  Q  N  K  K
          ( 핑거 3: GGG)
GGTGGATCC-3'
 G  G  S
    BamHI
```

조립된 징크핑거 단백질의 KpnI-BamHI DNA 단편을 pMAL-KNB 벡터의 KpnI-BamHI 부위로 클론했다. 표적 부위에 결합하는 디자인된 징크핑거 단백질의 능력을 E. coli로부터의 재조합 단백질을 발현 및 정제하고, 전기영동도 이동 분석 (EMSA)을 수행하여 입증했다. 상기 나타낸 단백질의 결합 친화성(K_d)은 EMSA에 의해 측정된 바 20nM이었다. 다음에, 이 KpnI-BamHI ZFP 단편을 pcDNA-NVF 벡터의 KpnI-BamHI 부위로 서브클론하고, pcV-VF471A로 명명했다. M6-1892S 부위의 3개의 세로로 나란한 반복부를 함유하는 루시페라제 리포터 플라스미드를 만들고 pGLP-VF471x3으로 명명했다.

모든 플라스미드 DNA를 퀴아겐 플라스미드 정제 키트를 사용하여 제조했다. 사람 배아 신장 293 세포를 6-웰 플레이트의 각 웰에 다음날 대략 70% 합류점에 도달하는 밀도로 접종했다. 세포를 Lipofectamene(기브코-비알엘, 메릴랜드) 또는 GenePORTER(진 테라피 시스템 아이엔씨, 캘리포니아) 트랜스펙션 시약을 사용하여, 50ng 이펙터 DNA(ZFP-발현 플라스미드), 900ng 리포터 DNA 및 100ng pCMV-LacZ DNA로 공동-트랜스펙션했다. 공동-발현된 β-갈락토시다제 활성을 대조표준으로 사용하여 루시페라제 활성을 정규화했다. 세포 용해액을 트랜스펙션 후 40 내지 48 시간에서 수집했다. 루시페라제 분석을 Dual- Lignt 루시페라제 및 β-갈락토시다제 리포터 분석 시스템(트로픽스, 메사츄세츠)를 사용하여 수행했다. 전형적인 루시페라제 분석 결과를 도 4에 나타낸다.

이 실시예는, 이 디자인된 ZFP-발현 플라스미드 pcV-VF471A가 대조표준 플라스미드 pcV-RNA와 비교했을 때 8배까지 루시페라제 유전자 발현을 자극할 수 있다는 것을 증명했으며, 이것은 공지된 DNA 결합 능력을 가지지 않았다. VP16 도메인이 전사 조절 활성을 가지지 않는 펩티드로 대체되었을 때, 이 징크핑거 단백질 (pcV-VF471A-cat)은 루시페라제 유전자를 트랜스-활성화하는 능력을 상실했다. 이 디자인된 징크핑거 단백질(pcV-VF471A)은 상이한 징크핑거 단백질 결합 부위를 함유하는 리포터로부터 루시페라제 발현을 활성화하는데 실패했으며, 이로써 트랜스-활성화 효과가 서열 특이적임을 나타낸다. 따라서, 이 실시예에서 조절 도메인 (VP16)과 조합된 DNA 결합 도메인(VF471A ZFP)은 적합한 표적 부위에서 유전자를 켤 수 있다.

일시적으로 트랜스펙션된 세포에서 표적화된 유전자의 자생 프로모터를 함유하는 리포터의 시험

간단한 리포터 시스템과 자생 리포터 시스템 사이의 차이는 자생 리포터 플라스미드 구성물이 표적화된 유전자의 프로모터를 함유한다는 것이다. 자생 리포터 시스템의 유일한 이점은 단일 자생 리포터 플라스미드 구성물이 프로모터에 관한 다중 징크핑거 단백질의 효과를 분석하는데 사용될 수 있다는 것이다.

pGLP-자생 리포터를 pGL3-프로모터의 SV40 프로모터를 이 프로모터를 함유하고 표적화된 유전자의 서열이 측면에 있는 DNA 단편으로 대체함으로써 구성했다(도 3). 이 실시예에서, 사람 VEGF 유전자의 자생 리포터 구성물을 사람 게놈 DNA로부터의 3319bp 단편을 PCR-증폭함에 의해 생성했다. 이 단편은 VEGF 프로모터 및 그것의 측면 영역을 함유한다. VEGF ATG 코돈을 루시페라제 코딩 영역과 융합했다. 네스트-PCR을 증폭을 위해 수행한다. 외부 프라이머는

hVEGFUI(5'-GAATTCTGTGCCCTCACTCCCCTGG; Gen Bank 서열 M63971에 기초한 nt 1에서 25) 및 VEGFD2(5'-ACCGCTTACCTTGGCATGGTGGAGG; nt 3475에서 3451)였다. 내부 프라이머 쌍은

hVEHFU2(5'-ACACACCTTGCTGGGTACCACCATG; nt 71에서 95, KpnI 부위를 밑줄침) 및 VEGFD1(5'-GCAGAAAGTcCATGGTTTCGGAGGCC; nt 3413에서 3388, T와 C 치환이 밑줄친 NcoI 부위를 생성했다)였다. 네스트 PCR 생성물을 KpnI 및 NcoI로 절단하고, pGL3-프로모터 플라스미드의 KpnI-NcoI 벡터 단편과 리게이션했다. 사람 VEGF 자생 리포터 플라스미드를 pGLPVFH로 명명했다.

유사한 전략을 사용하여 마우스 게놈 DNA로부터 2070bp 단편을 증폭했다. 외부 프라이머는

mVEGFU2(5'-TGTTTAGAAGATGAACCGTAAGCCT; GenBank 서열 U41383에 기초한 nt 1에서 25) 및 VEGFD2(5'-ACCGCTTACCTTGGCATGGTGGAGG; M63971에 기초한 nt 3475에서 3451)였다. 내부 프라이머는

mVEGF(5'-GCCCCCATTGGtACCCTGGCTTCAGTTCCCTGGCAACA; nt 155에서 192; C와 T 교환이 밑줄친 KpnI 부위를 만들었다) 및

VEGFD(5'-GCAGAAAGTcCATGGTTTCGGAGGCC; M63971에 기초한 nt 3413에서 3388; T와 C 치환이 밑줄친 NcoI 부위를 생성했다)였다. VEGFD2 및 VEGFD1 프라이머를 사용하여 사람 및 마우스 게놈 DNA를 모두 증폭했는데, 이것은 이 서열들이 이 영역에서 매우 상동성이기 때문이다(Shima et al. J. Biol. Chem. 271:3877 (1996)). 뮤린 VEGF 자생 리포터 플라스미드를 pGLPmVF로 명명했다.

다음의 실시예는 2개의 디자인된 징크핑거 단백질이 293 세포에서 사람 VEGF 자생 프로모터 유전자를 상향-조절할 수 있다는 것을 증명한다. 한 징크핑거 단백질(pcV-M6-2009A)을 전사 시작 부위의 362bp 상류에 위치한 근접 부위 GAAGGGGGC를 표적화하도록 디자인하고, 다른 하나(pcV-M6-111S)를 전사 시작 부위의 2240nt 상류에 위치한 말단 부위 ATGGGGGTG를 표적화하도록 디자인했다. 상술된 루시페라제 리포터 분석과 유사하게, 50 내지 100ng의 이펙터 DNA를 90ng의 자생 리포터 DNA 및 100ng의 pCMVlacZ DNA로 공동-트랜스펙션한다. 루시페라제 활성을 전사 후 대략 40시간에서 측정하고, 도 5에 폴드 활성화로서 나타낸다.

세포 배양물에서 내인성 사람 및 마우스 VEGF 유전자를 활성화 또는 리프레션하는 제 1 징크핑거 단백질

이들 조작된 징크핑거 단백질이 세포 배양물에서 내인성 사람 및 마우스 VEGF 유전자를 활성화 또는 리프레션할 수 있는지의 여부를 시험하기 위해서, 일시적인 트랜스펙션 실험을 수행했다. 사람 293 세포 및 마우스 유방 상피 세포 C127I(Shima et al., JBC 271:3877 (1996))는 내인성 VEGF 단백질을 낮은 레벨로 발현하며, 이것을 사용하여 VEGF 활성화에 대한 징크핑거 단백질의 효과를 평가한다. 사람 아교모세포 U87MG 세포, 마우스 신경모세포 NB41 세포(Levy et al., Growth Factors 2:9 (1989)) 및 래트 교종 GS-9L 세포(Conn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1323 (1990))는 내인성 VEGF 단백질을 높은 수준으로 발현하며, 이것을 사용하여 징크핑거 단백질의 리프레션 효과를 시험했다. 이들 세포를 6-웰 플레이트의 각 웰에 다음날 대략 70% 합류점이 되는 밀도로 접종했다. 0.1 내지 1g 이펙터 DNA를 세포 종류에 따라 Lipofectamine 또는 GenePORTER 트랜스펙션 시약 중 어느 하나를 사용하여 세포를 트랜스펙션하는데 보통 사용한다. 트랜스펙션 후 대략 14시간에서, 세포에 신선한 배지를 공급하고 24시간 동안 더 배양했다. 다음에, 배지를 수집하고, 내인성 VEGF 레벨을 VEGF ELISA 분석 키트(R & D 시스템, 미네소타)을 사용하여 측정한다.

VEGF M6-111S 및 M6-2009S ZFP를 제 1 징크핑거 단백질로서 디자인하여, 사람 VEGF 유전자 조절에서 그것들의 활성을 시험했다. 표 1의 결과는 제 1 징크핑거 단백질이 293 세포에서 사람 내인성 VEGF 유전자 발현을 상당히 활성화한다는 것을 나타냈다.

293 세포에서 징크핑거 단백질에 의한 사람 내인성 VEGF 유전자의 활성화

	이펙터	표적	위치*	리포터	폴드 활성화
벡터대조표준	pcV-RAN		N/F	pGLPVFH	1
제 1 ZFP	pcV-M6-111S	ATGGGGGTC	-2252	pGLPVFH	4.1
제 1 ZFP	pcV-M6-2009S	GAAGGGGGC	-363	pGLPVFH	4.5
제 2 ZFP	pcV-M6-120S	GGGGGTGCC	-2243	pGLPVFH	13.8
제 2 ZFP	pcV-M6-1878S	GAGTGTGTG	-536	pGLPVFH	4.2

* 표적 부위와 VEGF 전사 개시 부위 사이의 거리

N/F: VEGF 프로모터 영역 부근에서 발견되지 않음

표적화된 유전자를 리프레션하기 위해서, 디자인된 징크핑거 단백질 도메인을 pcDNA-NKF 벡터로 클론했다. 적합한 세포로 DNA를 트랜스펙션한 후, ZFP-KRAB 융합 단백질은 공동-트랜스펙션된 루시페라제 리포터 유전자 뿐만 아니라, 내인성 유전자를 억제할 수 있다. 본원에 사용된 예는 pcK-M6-11S이다. 표 1에 나타낸 바와 같이, M6-111S ZFP는 표적 서열 ATGGGGGTG을 인식한다. M6-111S ZFP가 KRAB 리프레션 도메인에 융합되었을 때, 공동-트랜스펙션된 루시페라제 리포터 유전자에 대해 대략 80% 리프레션 및 내인성 VEGF 유전자 발현에 대해 대략 40% 리프레션이 달성되었다.

세포 배양물에서 내인성 사람 및 마우스 VEGF 유전자를 활성화 또는 리프레션하는 제 2 징크핑거 단백질

제 1 징크핑거 단백질을 사용하여 관찰된 생리학적 효과가 VEGF 유전자에 대한 효과에 기인하며, 다른 유전자 표적의 조절과 같은 다른 부작용에는 기인하지 않는다는 것을 확인하기 위해서, 제 1 징크핑거 단백질과는 상이한 부위에서 VEGF 유전자를 표적화하는 제 2 징크핑거 단백질을 조작했다. 표 1에 나타낸 바와 같이, 2개의 제 2 징크핑거 단백질은 또한 배양된 세포에서 내인성 VEGF 유전자 발현을 활성화한다. 이들 결과는 징크핑거 단백질 기술이 유전자 발현을 조절하고, 치료제를 위한 표적으로서 유전자를 유효화하는데 사용될 수 있다는 것을 증명했다.

VEGF 생리학에 연루되지 않는 유전자를 표적화하는 제 3 징크핑거 단백질

제 1 및 제 2 징크핑거 단백질을 사용하여 관찰된 생리학적 효과가 VEGF 유전자에 대한 특이적 효과에 기인하며, 어떤 비-특이적 DNA-결합 또는 진압 효과에는 기인하지 않는다는 것을 확인하기 위해서, VEGF 생리학에 연루되지 않는 유전자를 표적화하는 제 3 징크핑거 단백질을 음성 대조표준으로 사용한다. 예를 들어, 사람 EPO 유전자 발현을 조절하기 위해 디자인된 징크핑거 단백질을 특이성 대조표준으로 사용한다(실시예 II 참조). 또한, EPO는 저산소증에 의해 영향을 받으며, 따라서 저산소증 분석법을 사용하는 VEGF 표적 유효화에 대한 대조표준으로서 유용하다. VEGF 억제는 당뇨병 망막병증을 특이적으로 전도한다. 이 결과는 약물 발견 및 개발을 위한 분자 표적으로서 VEGF를 유효화한다.

설치류에서 당뇨병 망막병증에 대한 VEGF 억제 효과의 시험

당뇨병 망막병증은 노동 연령의 사람들 중에서 실명의 가장 흔한다. 증가된 VEGF 발현이 당뇨병 망막병증의 병리에 대한 주요한 공헌자이다. 이 질환을 치료하는 전략 중 하나는 치료적 화합물을 사용하여 내인성 VEGF 유전자 발현을 억제하는 것이다. 상술된 바와 같이, 징크핑거 단백질은 치료적 표적으로서 VEGF를 유효화하는 수단을 제공한다. 아데노-관련 바이러스(AAV) 및/또는 레티노바이러스-기제 바이러스 벡터를 상술된 바와 같이 구성한다. 이들 바이러스 벡터는 상술된 바와 같은 KRAB 리프레션 도메인과 융합된 징크핑거 단백질을 발현한다. 바이러스를 생성하고, 정제하고, 동물에 주사한다. 조작된 징크핑거 단백질의 효능을 이전에 설명된 바와 같은 망막 신혈관생성의 억제에 의해 평가한다(Admais et al., Arch. Ophthalmol. 114:66 (1996); Pierce et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:905 (1995); Aiello et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10457 (1995); Smith et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 35:101, 1994). 제 2 및 제 3 징크핑거 단백질을 발현하는 바이러스 벡터를 포함하여, 모든 필수적인 대조표준이 또한 사용된다.

설치류에서 말초 동맥 질환에 대한 VEGF 활성화 효과의 시험

부대적인 동맥 발생을 증대시키기 위한 VEGF에 의한 말초 맥관형성의 자극은 국소빈혈 혈관 질환을 갖는 환자를 위한 잠재적인 신규 치료법이다. 상술된 바와 동일한 전략이 마우스 말초 동맥 질환 모델을 사용하여 표적으로서 VEGF를 유효화하는데 사용된다. VP16 활성화 도메인에 융합된 징크핑거 단백질을 발현하는 AAV 또는 레티노바이러스 벡터를 상술된 바와 같이 구성한다. 징크핑거 단백질의 효능을 이전에 설명된 과정과 유사하게 평가한다(Couffinhal et al., Am. J. Pathol. 152:1667 (1998); Takeshita et al., Lab. Invst. 75:487 (1996); Isner et al., Human Gene Therapy 7:959 (1996)). 제 2 및 제 3 징크핑거 단백질을 발현하는 바이러스 벡터를 포함하여, 모든 필수적인 대조표준을 또한 사용한다. VEGF 과발현은 부대적인 동맥 성장을 유인한다. 이 결과는 약물 발견 및 개발을 위한 표적으로서 VEGF를 유효화한다.

실시예 II

적혈구생성 표적 개발

포유류 적혈구생성을 증식 및 파생 신호를 제공하는 어떤 인자(들)에 의한 적혈구 선조의 자극에 의하여 자극한다. 저산소증이 많은 생리학적으로 관련된 과정을 제어하는 유전자의 발현을 유도하는 강력한 신호이다(Ratcliffe et al. J. Exp. Biol. 201: 1153 (1998)). 이 과정 중 하나는 어떤 조직이 추가의 적혈구 세포의 생성을 위한 인자(들)을 방출하는 " 리퀘스트" 이다. 이 현상은 저산소 조건을 사용하여 상이한 셀라인 및/또는 조직을 자극하고, 배양 상청액을 샘플링하고, 뮤린 골수 배양물로부터의 적혈구 콜로니 형성 단위의 자극에 대해 시험함으로써 검출될 수 있다. 이 방식에서 저산소증에 반응하는 것으로 판명된 셀라인 또는 조직은 저산소증 유도성 방식으로 적혈구생성 성장 인자를 발현하는 것 같다. 저산소 처리시 그러한 세포 또는 조직에서 상이하게 발현된 유전자의 분석은 적혈구생성 성장 인자 발현 유전자의 확인을 가져와야 한다. 징크핑거 단백질 기술이 그러한 상이한 유전자 발현 실험을 위한 분석 도구로서 사용될 수 있으며, 가상 적혈구생성 성장 인자 유전자를 유효화하는데 사용될 수 있다.

수집된 세포 종류(사람 혈종 셀라인 Hep3B를 포함함)를 적합한 배지에서 배양하고, 가습된 5% CO_2 - 95% 공기 인큐베이터에서 37℃에서 유지한다. 저산소 조건은 18시간 동안 1% O_2 ~ 5% CO_2 ~ 94% N_2 를 흘림으로써 달성한다(Goldberg et al., Blood 77:271 (1991)). 배양 상청액을 수집하고 콜로니 형성 분석으로 시험한다 (Muller et al., Exp. Hematol. 21:1353 (1993); Eaves & Eaves, Blood 52:1196 (1978)). 사람 혈종 Hep3B 셀라인은 저산소 유도시 적혈구생성 성장 인자(들)을 생성하는 것으로 판명되며(Goldberg et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7972 (1987)), 이 셀라인을 더 이상의 특성화에 사용한다.

한가지 진행중인 가설은 적혈구 세포 생성의 자극에 대해 반응할 수 있는 세포 유전자 중 1개 이상이 저산소증에 의해 달성된다는 것이다. 이 유전자(들)는 차등 디스플레이(진헌터, 테네시), PCR-Select cDNA 섭트랙션(클론테크, 캘리포니아), 또는 마이크로어레이(아피메트릭스, 캘리포니아)와 같은, 상이한 유전자 발현 실험을 수행함으로써 확인될 수 있다. 정상 및 저산소 조건하에서 성장한 Hep3 세포로부터 추출된 RNA의 유전자 발현 패턴을 비교한다.

다수의 유전자가 저산소 세포에서 상향-조절되는 것 같다. 대략 18개 유전자가 저산소증에 의해 상향-조절되는 것으로 확인되었다(Ratcliffe et al,. J. Exp. Biol. 201:1153 (1998)). 광범위하게 연구되고 있는 에리트로포이에틴(EPO) 유전자 및 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 유전자를 기능 유전자학 및 적혈구 성장 인자를 코드화하는 유전자의 확인에 징크핑거 단백질 기술의 적용을 증명하기 위해 이 실험에 사용한다.

상기 실험으로부터 확인된 후보 유전자의 DNA 서열을 기초로 하여, 제 1 징크핑거 단백질을 프로모터에 근접하여 위치한 DNA를 표적화하도록 디자인한다. 징크핑거 단백질 구성 및 특성화 과정은 실시예 I에 설명된 바와 동일하다. 높은 DNA-결합 친화성 및 선택성을 갖는 징크핑거 단백질(3-핑거 또는 6-핑거 단백질)을 HSV VP-16 활성화 도메인 또는 KRAB 리프레션 도메인 중 어느 하나와 융합하여 리스트에 있는 개별 유전자의 발현을 활성화하거나 또는 차단한다.

이들 디자인된 ZFP-VP16 구성물을 개별적으로, 비-저산소 조건하에 Gene PORTER 트랜스펙션 시약(진 테라피 시스템, 아이엔씨. CA)를 사용하여 Hep3 세포로 일시적으로 트랜스펙션한다. 트랜스펙션 후 48시간에서, 상청액을 수집하고, 콜로니 형성 분석을 수행한다. 징크핑거 단백질 상향-조절시 적혈구 생성을 유도하는 유전자(들)를 적혈구생성 성장 인자를 코드화하는 유전자(들)로 고려한다. 이 결과는 에리트로포이에틴(EPO) 유전자가 적혈구생성 조절에 반응할 수 있고, 모든 다른 시험된 유전자(VEGF를 포함함)는 그렇지 않다는 것을 나타낸다. 실시예 I에 설명된 모든 필수적인 징크핑거 단백질 제어를 이 실시예에서도 사용한다.

유전자를 확인하고 유효화하는 다른 방식은, 이들 징크핑거 단백질을 KRAB 도메인과 융합하고, Hep3 세포를 트랜스펙션 후 14시간에서 저산소증에 의해 자극한다는 것을 제외하고는, 상술된 유사한 실험을 수행하는 것이다. EPO 유전자 발현을 리프레션하도록 디자인된 징크핑거 단백질이 Hep3 세포로 트랜스펙션된 때, 콜로니 형성에 근거한 활성의 감소가 관찰되거나 또는 관찰되지 않는다. EPO 유전자 이외의 유전자를 표적화하는 모든 징크핑거 단백질은 저산소증 유도하에 적혈구 생성에 영향을 미치지 않는다.

유전자 기능을 더 유효화하기 위해서, EPO 유전자의 상이한 부위에서 표적화하는 제 2 징크핑거 단백질을 구성한다. 이들 제 2 징크핑거 단백질은 VP16 활성화 도메인과 융합될 때, EPO 유전자 발현을 활성화하고, 적혈구 생성을 자극한다. 역으로, KRAB 리프레션 도메인과 융합될 때, 이들 징크핑거 단백질은 저산소증 조건하에 EPO 유전자 발현을 억제하고, 적혈구 생성을 자극하는데 실패한다.

실시예 III

유방암 표적 유전자 발견

어떤 유방 종양의 성장은 에스트로겐 호르몬의 존재에 의존한다. 에스트로겐은 형질전환된 표현형의 유지에 필요한 유전자의 상향-조절에 연루되는 것 같다. 이들 조직로부터 유도된 셀라인(MCF-7, BT20 및 T47D)은 배양물에서의 성장을 위해 에스트로겐에 대한 의존성을 보유한다. 따라서, 에스트로겐이 의존성 셀라인에 있는 본질적 유전자의 발현을 자극한다는 것이 명백하다. 이들 에스트로겐-유도 유전자의 발견은 유방암을 치료하기 위한 새로운 약물의 개발을 위한 유용한 분자 표적이다. 에스트로겐-의존성 세포 성장에 필요한 에스트로겐-유도 유전자를 확인하기 위한 징크핑거 단백질의 사용이 본원에 설명된다. 더욱이, 새로 발견된 표적은 징크핑거 단백질 및 적합한 대조표준을 사용하여 유효화된다.

ER-반응성 유전자의 확인

MCF-7 세로를 단기간(1주) 및 장기간(28주) 동안 에스트로겐(에스트라디올)의 부재하에 성장시켜, 에스트라디올-유도 유전자의 전사가 기본 레벨에 도달하도록한다. 세포를 페놀레드는 없고 10% 목탄-제거 태아소혈청(FCS)(히클론), 10ug/ml 인슐린 및 0.5nM 에스트라디올로 보충된 Dulbecco's 변형 이글 배지(DMEM)를 함유하는 162ml 플라스크에서 증식시킨다. 80% 합류점에 도달했을 때, 세포를 트립신화하고, 에스트라디올이 없는 신선한 배지로 옮긴다. 이 플라스크를 5% CO2의 가습 분위기에서 37℃에서 인큐베이션한다.

에스트로겐-반응성 유전자 발현을 세포에 에스트라디올을 첨가하여 자극한다. 에스트라디올의 부재하에 성장한 세포를 에스트라디올이 없는 신선한 배지에 분배한다. 1개 플라스크는 10nM 에스트라디올(에탄올에 용해된)을 받고, 나머지는 에스트라디올을 함유하지 않는 동일한 양의 에탄올을 받는다. 자극 및 미자극된 세포를 모두 6시간 후 수집한다.

RNA를 세포로부터 분리하여 표준 RNA 분리 키트를 사용하여 상이하게 발현된 유전자를 확인한다. 에스트로겐 반응성 유전자를 다음 방법 중 하나 또는 조합을 사용하여 확인한다: 클론테크의 PCR-Select와 같은 마이너스적 혼성화, 진로직에 의해 제공된 READS 기술과 같은 차등 디스플레이법, 또는 퍼킨엘머의 GenScope, 인시트의 GEM 기술과 같은 cDNA 어레이, 또는 아피메트릭스에 의해 제공된 고밀도 올리고뉴클레오티드 메트릭스 기술.

다수의 상이하게 발현된(에스트라디올 활성화된) 유전자가 확인되어야 한다. 이들 유전자에 대한 cDNA를 서열화하고, 후보 유전자의 리스트에 올린다. 에스트로겐 리셉터를 포함하여, 많은 유전자가 확인될 것으로 기대된다.

에스트로겐-반응성 유전자의 초기 유효화

징크핑거 단백질을 상술되고 공동 계류중인 출원 USSN 09/229,037에 설명된 바와 같이, 후보 유전자 리스트의 개별 구성원 각각을 표적화하도록 조작한다. 후보 유전자의 서열을 유일하고 쉽게 표적화가능한 9bp 서열에 대해 스캔한다. 이 과정은 이전에 서열화된 유전자에 매치하는 데이타베이스를 탐색하는 것을 포함하며, 추가의 서열을 얻을 수 있고, 상기 발생된 cDNA 서열의 정확성을 확인할 수 있다.

이들 디자인된 징크핑거 단백질을 기능 도메인에 융합하고, 이로써 상술된 바와 같이, 후보 유전자의 발현을 상향-조절 및 녹다운한다. 사용되는 기능 도메인은 Kruppel-관련 박스(KRAB) 리프레션 도메인 및 단순포진 바이러스(HSV-1) VP16 활성화 도메인이다.

후보 유전자의 리프레션

리프레션 연구를 위해서, 개별 징크핑거 단백질이 잠복해 있는 세포를 에스트로겐-의존성 기능을 차단하는 것으로 인한 성장 실패에 대해 분석한다. 에스트로겐 리셉터는 MCF-7에서의 성장에 본질적인 것으로 성립되었고; 그러므로 이들 세포는 ER 유전자 또는 다른 에스트로겐 의존성 기능이 하향-조절에 대해 표적화될 때 성장할 수 없어야 한다.

세포를 에스트라디올을 함유 및 미함유하는 이전에 설명된 배지에서 배양했다. SV40 NLS 및 KRAB에 징크핑거 단백질을 융합하도록 구성된 진핵 발현 벡터는 상술된다. 트랜스펙션을 기브코-비알엘로부터 상업적으로 입수가능한 리포솜 제제인 Lipofectamine을 사용하여 행했다. 모든 플라스미드 DNA를 퀴아겐 Midi DNA 정제 시스템을 사용하여 제조한다. 이펙터 플라스미드 10g을 Opti-MEM의 총부피 1600㎕으로 100ng Lipofectamine(50㎕)와 혼합한다. 또한, pCMV β-gal 플라스미드(프로메가)를 트랜스펙션 효능에 대한 내부 대조표준으로서 DNA 혼합물에 포함시킨다. 30분 인큐베이션한 후, DMEM 6.4ml를 가하고, 혼합물을 세포위에 층으로 만든다. 5시간 후, DNA-Lipofectamine 혼합물을 제거하고, 10% 목탄-제거 FCS, 10㎍/ml 인슐린 및 10nM 에스트라디올을 함유하는 신선한 배양 배지를 세포위에 층으로 만든다.

생존도를 트리판 블루 배제 및 성장 모니터링에 의해 분석한다. 세포를 트립신화하고, 원심분리하여 농축하고, 대략 10^6 세포/ml로 재현탁한다. 0.4% 트리판 블루 용액을 혈구계산기 슬라이드상의 동일한 부피의 세포에 가한다. 총세포 및 염색된 세포를 현미경 아래에서 계수한다. 성장을 DNA 합성을 측정함에 의해 모니터한다. 방사성 [^{3}H]티미딘(30 Ci/mmol에서 50 μCi; 아메르샴)을 가하고, 세포를 17시간 동안 더 성장시킨다. 배지를 제거하고, 세포를 1% SDS를 사용하여 제자리 용해한다. 세포 용해액을 15% 트리클로로아세트산(TCA)를 사용하여 침전시키고, Whatman 3M 필터 디스크를 사용하여 여과하여 수집고, 5% TCA 다음에 에탄올로 세척한다. 필터를 건조시키고, 티미딘 결합을 액체 섬광계수에 의해 정량한다.

후보 유전자의 활성화

MCF-7 세포의 에스트로겐-독립적 성장에 대해 분석하기 위해, 리스트의 각 구성원의 활성화를 수행한다. 진핵 발현 벡터를 상술된 바와 같이 구성한다. 기브코-비알엘로부터 상업적으로 입수가능한 리포솜 제제인 Lipofectamine을 사용하여 트랜스펙션을 행한다. 모든 플라스미드 DNA를 퀴아겐 Midi DNA 정제 시스템을 사용하여 제조한다. 트랜스펙션을 상술된 바와 같이 수행한다.

생존도를 트리판 블루 배제 및 성장 모니터링에 의해 분석한다. 세포를 트립신화하고, 원심분리하여 농축하고, 대략 10^6 세포/ml로 재현탁한다. 0.4% 트리판 블루 용액을 혈구계산기 슬라이드상의 동일한 부피의 세포에 가한다. 총세포 및 염색된 세포를 현미경 아래에서 계수한다. 성장을 DNA 합성을 측정함에 의해 모니터한다. 방사성 [^{3}H]티미딘(30 Ci/mmol에서 50 μCi; 아메르샴)을 가하고, 세포를 17시간 동안 더 성장시킨다. 배지를 제거하고, 세포를 1% SDS를 사용하여 제자리 용해한다. 세포 용해액을 15% 트리클로로아세트산(TCA)를 사용하여 침전시키고, Whatman 3M 필터 디스크를 사용하여 여과하여 수집고, 5% TCA 다음에 에탄올로 세척한다. 필터를 건조시키고, 티미딘 결합을 액체 섬광계수에 의해 정량한다.

2차 유효화

추가의 시험은 리프레서 및 활성인자 연구의 제 1 라운드 동안 확인된 후보 유전자를 유효화할 것이다. 이들 징크핑거 단백질을 후보 유전자에 있는 2개의 다른 분리된 표적 부위를 표적화하도록 디자인한다. 추가적으로, 징크핑거 단백질의 특이성 및 친화성을 18bp를 인식하는 6-핑거 분자를 형성하도록 2개의 3-핑거 징크핑거 단백질 도메인을 융합함에 의해 개선한다.

3-핑거 징크핑거 단백질을 디자인하고, 생성하고, 본원에 설명된 바와 같이 EMSA에 의해 분석한다. 징크핑거 단백질이 쉽고 신뢰할만하게 디자인될 수 있는 적합한 서열의 위치를 정하기 위해서, 후보 유전자의 추가적 서열화가 필요할 수 있다. 더욱이, 추가의 서열은 뉴클레오티드 서열 데이타베이스에서 발견될 수 있다. 표적 서열을 2개의 9bp 서열이 서로 5bp내에 있도록 선택하고, 이로써 징크핑거 단백질 쌍의 결합을 허용한다. 허용가능한 친화성 및 특이성을 갖는 결합한 3-핑거 징크핑거 단백질의 쌍을 확인한 후, 이 도메인을 PCR에 의해 연결하여, 6-핑거 분자의 핑거 4에서 6을 구성하는 도메인을 증폭한다. 비구조적이고 유연할 것으로 예상되는 펩티드 서열을 코드화하는 짧은 DNA 서열을 증폭 동안 이 도메인의 N-말단에 가한다.

각 구성물을 배양물중에서 성장한 MCF-7 세포로 일시적으로 트랜스펙션하고, 상술된 바와 같은 성장 실패(리프레션) 또는 에스트로겐-독립적 성장을 기록한다.

이종이식편을 사용한 표적 유효화

종양 성장에 대한 변경된 표적 유전자 발현의 효과를 누드 마우스의 이종이식편에 의해 평가한다. 징크핑거 단백질을 코드화하는 유전자를 상술된 바와 같은 아데노-관련 바이러스(AAV) 또는 레티노바이러스-기제 바이러스 벡터로 클

론한다. 징크핑거 단백질을 KRAB 또는 VP16 도메인 중 어느 하나에 융합한다. 결과의 재조합 바이러스를 생성하고, 정제하여 MCf-7 세포를 감염시키는데 사용한다. 이들 트랜스제닉 세포를 누드 마우스에 피하적으로 도입한다(Bissery et al., Semin. Oncol. 22:3-16 (1995)). 종양을 주 2회 측정하여 종양 중량을 추정한다(Bissery et al., Semin. Oncol. 22:3-16 (1995); Kubota et al., J. Surg Oncol. 64:115-121 (1997)). 실험을 종양 중량이 100 내지 300mg이 되거나, 또는 동물이 죽을 때까지 진행한다.

종료점 분석은 가능한 죽음의 원인을 측정하기 위한 흉부 및 복부 공동에 대한 현미경 시험을 포함할 것이다. 추가적 분석은 조직 샘플 및 중량 측정을 위해 절제된 종양의 병력학적 분석을 포함할 것이다.

실시예 IV

식물에서 지방산 포화 표적 발견

야채 기름의 품질을 지방산 측쇄 성분의 포화 정도에 의해 어느 정도 결정한다. 과도한 불포화(1개 또는 2개 이상의 이중결합)는 더 많은 산화 및 악취의 경향이 있는 불량한 품질의 기름을 가져온다. 기름 생성 종자에 있는 생합성 기구의 성분이 불포화도를 결정한다. 생성물이 지방산 불포화에 연루되는 유전자의 발현을 억제하는 것이 더 고품질의 기름을 가져올 수 있다. 징크핑거 단백질을 차등 유전자 발현 실험용 프로브로서 사용하여, 지방산 포화의 레벨을 설정하는데 어떤 역할을 하는 유전자를 확인한다. 제 1, 제 2 및 제 3 징크핑거 단백질을 사용하여 새로 발견된 유전자 기능을 유효화한다. 마지막으로, 고품질의 기름을 생성하는 트랜스제닉 식물을 생성한다.

무작위 돌연변이유발을 통한 후보 유전자의 생성

출발 물질은 대두(Glycine max) 종자 또는 식물이다. 돌연변이유발을 화학적 처리 또는 무작위 DNA 삽입 중 어느 하나에 의해 수행한다(Katavic et al., Plant. Physiol. 108:399-409 (1995); Martienssen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2021-2026 (1998); Hohn & Puchta, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:8321-8323 (1999); Facciotti et al., Nature Biotech. 17:593-597 (1999)).

종자의 화학적 돌연변이유발을 16시간 동안 0.3%(v/v) 에틸메탄술포네이트 (EMS)중에서 소킹하여 수행한다(Haughn & Somerville, Mol. Gen. Genet. 204:430-434 (1986)). M1 종자를 증식하여 자가-수정하도록 허용하고, 다음에 M2 종자를 무작위적으로 수집하여 증식한 후, 또 다른 자가-수정 라운드를 행하여 M3 종자를 형성한다. 종자 및 결과의 식물의 지방산 조성물을 하기 설명된 바와 같이 분석한다.

또는 달리, 무작위 DNA 삽입을 식물에서 개발된 많은 시스템을 사용한 전위에 의해 수행할 수 있다(Martienssen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2021-2026 (1998)).

지방산 및 지질 분석에 의한 잠재적 후보 유전자의 확인

지방산 및 지질 조성물을 Katavic법에 따라 대략 20 내지 30의 M3 종자에 대해 측정한다(Plant Physiol. 108:399-409 (1995)). 성숙한 식물 조직을 또한 유사하게 분석한다. 종자를 지방산 포화도에 따른 카테고리로 분류한다.

발현 프로파일을 실시예 III에 설명된 방법 중 하나을 사용하여, 상승된 또는 감소된 불포화도를 발현하는 종자에 대해 생성한다(주목: 오메가-6-불포화효소를 코드화하는 FAD2-1가 더 낮은 레벨의 다불포화 장쇄 지방산인 종자에서 저발현된 유전자일 것으로 기대된다). 일단 특정한 유전자가 변경된 표현형에 참여하는 것으로 확인되고, cDNA가 서열화에 대해 선택된다.

제 1 징크핑거 단백질을 사용한 초기 표적 유효화

징크핑거 단백질을 상술되고 공동 계류중인 출원 USSN 09/229,037에 설명된 바와 같이, 후보 유전자 리스트의 개별 구성원 각각을 표적화하도록 조작한다. 후보 유전자의 서열을 유일하고 쉽게 표적화가능한 9bp 서열에 대해 스캔한다. 이 과정은 이전에 서열화된 유전자에 매치하는 데이타베이스를 탐색하는 것을 포함하며, 추가의 서열을 얻을 수 있고, 상기 발생된 cDNA 서열의 정확성을 확인할 수 있다.

이들 디자인된 징크핑거 단백질을 기능 도메인에 융합하고, 이로써 상술된 바와 같이, 후보 유전자의 발현을 상향-조절 및 녹다운한다. 사용되는 기능 도메인은 Kruppel-관련 박스(KRAB) 리프레션 도메인 및 단순포진 바이러스(HSV-1) VP16 활성화 도메인이다.

ZFP-기능 도메인 융합을 코드화하는 유전자를 pCAMBIA1301과 같은 식물 발현 벡터로 클론한다. 이 벡터는 다음의 부속물을 가진다: 1) 히그로마이신 내성을 코드화하는 유전자와 같은 선택성 마아커; 2) Agrobacterium-매개 형질전환을 위한 좌 및 우 T-DNA 보더; 3) 바람직한 프로모터(CaMV 35S, 나핀 또는 파세올린 프로모터와 같은)의 하류에 징크핑거 단백질 유전자의 삽입을 허용하는 편리한 제한 부위; 4) Nos와 같은 식물 폴리아데닐화 신호; 5) GUS 리포터 유전자.

디자인된 징크핑거 단백질을 리포터 유전자의 활성화 또는 리프레션을 분석함으로써 바람직한 표적에 대한 활성에 대해 시험한다. 징크핑거 단백질 및 리포터를 독립적으로 발현하는 단일 플라스미드를 사용한다. 표적 서열을 GUS 유전자의 전사 출발 부위에 가까운 DNA에 삽입한다. 담배 유합조직으로 리포터 구성물의 형질전환을 표준 공동-배양 과정에 의해 수행한다(Grayburn et al., Biotechnol. 10:675-678 (1992)). GUS 분석을 형광 분석을 사용하여 수행한다(Jefferson, Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405 (1987)).

EMSA에 의해 평가된 바의 허용가능한 친화성, 및 리포터 분석에 의해 평가된 바의 생체내 기능을 증명한 징크핑거 단백질을 미성숙 종자의 자엽으로부터 유도된 배발생 배양물을 증식하는 입자 충격에 의해 대두 체배아로 형질전환한다(Liu et al., Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46:33-42 (1996)).

각 ZFP를 가지는 플라스미드에 대한 10 내지 20의 개별 형질전환 사건으로부터 유도된 조직 및 종자를 분리하여 지방산 및 지질 프로파일을 평가한다. 상기 징크핑거 단백질을 사용하여 형질전환된 때, 변경된 지방산 또는 지질 프로파일을 생성하는 후보 유전자를 제 2 및 제 3 디자인으로 선택하며, 이것은 더욱 특이적인 징크핑거 단백질을 생성할 것이다.

불포화 경로로 표적을 더 유효화하는 제 2 및 제 3 징크핑거 단백질

추가의 시험은 리프레서 및 활성인자 연구의 제 1 라운드 동안 확인된 후보 유전자를 유효화하는 것을 사용한다. 이들 징크핑거 단백질을 후보 유전자에 있는 2개의 다른 분리된 표적 부위를 표적화하도록 디자인한다. 추가적으로, 징크핑거 단백질의 특이성 및 친화성을 18bp를 인식하는 6-핑거 분자를 형성하도록 2개의 3-핑거 징크핑거 단백질 도메인을 융합함에 의해 개선한다.

3-핑거 징크핑거 단백질을 디자인하고, 생성하고, 본원에 설명된 바와 같이 EMSA에 의해 분석한다. 징크핑거 단백질이 쉽고 신뢰할만하게 디자인될 수 있는 적합한 서열의 위치를 정하기 위해서, 후보 유전자의 추가적 서열화가 필요할 수 있다. 더욱이, 추가의 서열은 뉴클레오티드 서열 데이타베이스에서 발견될 수 있다. 표적 서열을 2개의 9bp 서열이 서로 5bp내에 있도록 선택하고, 이로써 징크핑거 단백질 쌍의 결합을 허용한다. 허용가능한 친화성 및 특이성을 갖는 결합한 3-핑거 징크핑거 단백질의 쌍을 확인한 후, 이 도메인을 PCR에 의해 연결하여, 6-핑거 분자의 핑거 4에서 6을 구성하는 도메인을 증폭한다. 비구조적이고 유연할 것으로 예상되는 펩티드 서열을 코드화하는 짧은 DNA 서열을 증폭 동안 이 도메인의 N-말단에 가한다.

6-핑거 징크핑거 단백질을 리프레션 또는 활성화 도메인 중 어느 하나에 융합하고, 본원에 설명된 바와 같이, 담배 유합조직 리포터 연구에서 먼저 분석한 후, 대두 식물에서 분석한다.

상술된 제 2 징크핑거 단백질에 의해 표적화된 때, 변경된 지방산 또는 지질 프로파일을 생성하는 후보 유전자를 제 3 징크핑거 단백질의 디자인을 위해 선택한다. 제 2 징크핑거 단백질을 사용하여 표적화한 것으로부터 분리된 유전자의 제 2 영역을 선택한다. 다시, 18bp를 결합하도록 디자인된 징크핑거 단백질을 디자인하고, 본원에 설명된 바와 같이 시험한다. 이들 징크핑거 단백질을 대두에 도입하고, 지방산 및 지질 프로파일에 대한 결과의 변경을 다시 시험한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

후보 유전자의 생물학적 기능을 확인하는 방법으로서, 이 방법이

(i) 제 1 후보 유전자를 선택하는 단계;

(ii) 제 1 후보 유전자의 제 1 표적 부위에 결합하는 제 1 징크핑거 단백질, 및 제 2 유전자의 표적 부위에 결합하는 제 2 징크핑거 단백질을 제공하는 단계;

(iii) 제 1 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자와 접촉하는 조건하에서 제 1 세포를 배양하고, 제 2 징크핑거 단백질이 제 2 후보 유전자와 접촉하는 조건하에서 제 2 세포를 배양하는 단계로서, 여기에서 제 1 및 제 2 징크핑거 단백질이 제 1 및 제 2 후보 유전자의 발현을 조정하는 단계; 및

(iv) 선택된 표현형을 분석하여, 제 1 후보 유전자가 선택된 표현형에 관련되는지의 여부를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 제 1 후보 유전자의 제 2 표적 부위에 결합하는 제 3 징크핑거 단백질을 제공하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 복수의 후보 유전자를 선택하고, 각 후보 유전자의 표적 부위에 결합하는 복수의 징크핑거 단백질을 제공하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 제 2 유전자가 대조표준 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 제 1 후보 유전자가 적어도 약 200 뉴클레오티드 길이의 EST에 의해 부분적으로 코드화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제 1 항에 있어서, 제 1 후보 유전자 및 제 2 유전자가 모두 선택된 표현형에 관련되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제 1 항에 있어서, 제 1 및 제 2 세포가 동일한 세포이고, 이 세포가 제 1 및 제 2 후보 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제 1 항에 있어서, 제 1 및 제 2 후보 유전자가 내인성 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제 1 항에 있어서, 후보 유전자의 발현이 적어도 약 50%까지 억제되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

제 1 항에 있어서, 후보 유전자의 발현이 적어도 약 150%까지 활성화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

제 1 항에 있어서, 징크핑거 단백질이 조절성 도메인을 포함하는 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.

제 1 항에 있어서, 징크핑거 단백질의 발현이 외인성 제제의 투여에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13.

제 11 항에 있어서, 징크핑거 단백질이 적어도 2개의 조절성 도메인을 포함하는 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14.

제 1 항에 있어서, 세포를 동물 세포, 식물 세포, 박테리아 세포, 원생동물 세포, 또는 진균 세포로 구성된 군으로부터 선택하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.

제 14 항에 있어서, 세포가 포유류 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.

제 15 항에 있어서, 세포가 사람 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17.

제 1 항에 있어서, 발현의 조정이 유전자 발현의 리프레션을 방지하는 유전자 발현의 활성화인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.

제 1 항에 있어서, 발현의 조정이 유전자 활성화를 방지하는 유전자 발현의 억제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19.

제 11 항에 있어서, 조절성 도메인을 전사 리프레서, 메틸트랜스페라제, 전사 활성인자, 히스톤 아세틸트랜스페라제, 및 히스톤 디아세틸라제로 구성된 군으로부터 선택하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

제 1 항에 있어서, 제 1 및 제 2 징크핑거 단백질이 프로모터에 작동가능하게 연결된 징크핑거 단백질 핵산을 포함하는 발현 벡터에 의해 코드화되며, 방법이 세포에 이 발현 벡터를 최초로 투여하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21.

제 20 항에 있어서, 징크핑거 단백질의 발현이 소분자 제어하에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22.

제 21 항에 있어서, 제 1 징크핑거 단백질의 발현 및 제 2 징크핑거 단백질의 발현이 상이한 소분자 제어하에 있고, 제 1 및 제 2 징크핑거 단백질이 모두 조절성 도메인을 포함하는 융합 단백질이며, 제 1 및 제 2 징크핑거 단백질이 동일한 세포에서 발현되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23.

제 22 항에 있어서, 제 1 및 제 2 징크핑거 단백질이 모두 유전자 발현을 리프레션하는 조절성 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24.

제 20 항에 있어서, 발현 벡터가 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25.

제 24 항에 있어서, 발현 벡터가 레트로바이러스 발현 벡터, 아데노바이러스 발현 벡터, 또는 AAV 발현 벡터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26.

제 20 항에 있어서, 징크핑거 단백질이 유도 프로모터에 작동가능하게 연결된 핵산에 의해 코드화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27.

제 1 항에 있어서, 세포가 각 징크핑거 단백질을 약 $1.5x10^{6}$ 카피 미만으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28.

제 1 항에 있어서, 표적 부위가 후보 유전자의 전사 개시 부위의 상류인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29.

제 1 항에 있어서, 표적 부위가 후보 유전자의 전사 개시 부위에 인접해 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30.

제 1 항에 있어서, 표적 부위가 후보 유전자의 전사 개시 부위의 RNA 중합효소 중단 부위 하류에 인접해 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31.

후보 유전자의 생물학적 기능을 확인하는 방법으로서, 이 방법이

(i) 복수의 후보 유전자를 확인하는 단계;

(ii) 제 1 후보 유전자의 제 1 표적 부위에 결합하는 제 1 징크핑거 단백질을 제공하는 단계;

(iii) 제 1 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자와 접촉하는 조건하에서 제 1 세포를 배양하는 단계로서, 여기에서 제 1 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자의 발현을 조정하는 단계;

(iv) 후보 유전자의 발현 패턴을 측정하고, 제 1 후보 유전자가 선택된 표현형에 관련되는지의 여부를 측정하는 단계; 및

(v) 각 후보 유전자에 대해 (ii)부터 (iv)의 단계를 반복하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32.

제 31 항에 있어서, 제 1 후보 유전자의 제 2 표적 부위에 결합하는 제 2 징크핑거 단백질을 제공하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33.

제 31 항에 있어서, 후보 유전자 중 적어도 1개가 적어도 약 200 뉴클레오티드 길이의 EST인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34.

제 31 항에 있어서, 적어도 2개의 후보 유전자가 선택된 표현형을 일으키는데 필요한 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35.

제 31 항에 있어서, 후보 유전자가 내인성 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36.

제 31 항에 있어서, 후보 유전자의 발현이 적어도 약 50%까지 억제되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37.

제 31 항에 있어서, 후보 유전자의 발현이 적어도 약 150%까지 활성화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38.

제 31 항에 있어서, 징크핑거 단백질이 조절성 도메인을 포함하는 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39.

제 38 항에 있어서, 조절성 도메인이 소분자 제어하에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40.

제 38 항에 있어서, 징크핑거 단백질이 적어도 2개의 조절성 도메인을 포함하는 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41.

제 31 항에 있어서, 세포를 동물 세포, 식물 세포, 박테리아 세포, 원생동물 세포, 또는 진균 세포로 구성된 군으로부터 선택하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42.

제 41 항에 있어서, 세포가 포유류 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43.

제 42 항에 있어서, 세포가 사람 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44.

제 31 항에 있어서, 발현의 조정이 유전자 발현의 리프레션을 방지하는 유전자 발현의 활성화인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45.

제 31 항에 있어서, 발현의 조정이 유전자 활성화를 방지하는 유전자 발현의 억제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46.

제 38 항에 있어서, 조절성 도메인을 전사 리프레서, 메틸트랜스페라제, 전사 활성인자, 히스톤 아세틸트랜스페라제, 및 히스톤 디아세틸라제로 구성된 군으로부터 선택하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47.

제 31 항에 있어서, 징크핑거 단백질이 프로모터에 작동가능하게 연결된 징크핑거 단백질 핵산을 포함하는 발현 벡터에 의해 코드화되며, 방법이 세포에 이 발현 벡터를 최초로 투여하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48.

제 47 항에 있어서, 징크핑거 단백질의 발현이 소분자 제어하에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 49.

제 47 항에 있어서, 발현 벡터가 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50.

제 49 항에 있어서, 발현 벡터가 레트로바이러스 발현 벡터, 아데노바이러스 발현 벡터, 또는 AAV 발현 벡터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51.

제 47 항에 있어서, 징크핑거 단백질이 유도 프로모터에 작동가능하게 연결된 핵산에 의해 코드화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52.

제 31 항에 있어서, 세포가 징크핑거 단백질을 약 $1.5x10^{6}$ 카피 미만으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53.

제 31 항에 있어서, 표적 부위가 후보 유전자의 전사 개시 부위의 상류인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54.

제 31 항에 있어서, 표적 부위가 후보 유전자의 전사 개시 부위에 인접해 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55.

제 31 항에 있어서, 표적 부위가 후보 유전자의 전사 개시 부위의 RNA 중합효소 중단 부위 하류에 인접해 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56.

후보 유전자의 생물학적 기능을 확인하는 방법으로서, 이 방법이

(i) 제 1 후보 유전자를 선택하는 단계;

(ii) 제 1 후보 유전자의 제 1 표적 부위에 결합하는 제 1 징크핑거 단백질, 및 제 1 후보 유전자의 제 2 표적 부위에 결합하는 제 2 징크핑거 단백질을 제공하는 단계;

(iii) 제 1 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자와 접촉하는 조건하에서 제 1 세포를 배양하고, 제 2 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자와 접촉하는 조건하에서 제 2 세포를 배양하는 단계로서, 여기에서 제 1 및 제 2 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자의 발현을 조정하는 단계; 및

(iv) 선택된 표현형을 분석하여, 제 1 후보 유전자가 선택된 표현형에 관련되는지의 여부를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 57.

제 56 항에 있어서, 제 2 후보 유전자의 표적 부위에 결합하는 제 3 징크핑거 단백질을 제공하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58.

제 56 항에 있어서, 복수의 후보 유전자를 선택하고, 각 후보 유전자의 표적 부위에 결합하는 복수의 징크핑거 단백질을 제공하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59.

제 57 항에 있어서, 제 2 후보 유전자가 대조표준 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 60.

제 56 항에 있어서, 제 1 후보 유전자가 적어도 약 200 뉴클레오티드 길이의 EST인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 61.

제 57 항에 있어서, 제 1 후보 유전자 및 제 2 유전자가 모두 선택된 표현형을 일으키는데 필요한 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 62.

제 56 항에 있어서, 제 1 및 제 2 세포가 동일한 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 63.

제 56 항에 있어서, 제 1 후보 유전자가 내인성 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 64.

제 56 항에 있어서, 제 1 후보 유전자의 발현이 적어도 약 50%까지 억제되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 65.

제 56 항에 있어서, 제 1 후보 유전자의 발현이 적어도 약 150%까지 활성화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 66.

제 56 항에 있어서, 제 1 징크핑거 단백질이 조절성 도메인을 포함하는 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 67.

제 66 항에 있어서, 조절성 도메인이 소분자 제어하에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 68.

제 66 항에 있어서, 징크핑거 단백질이 적어도 2개의 조절성 도메인을 포함하는 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 69.

제 56 항에 있어서, 세포를 동물 세포, 식물 세포, 박테리아 세포, 원생동물 세포, 또는 진균 세포로 구성된 군으로부터 선택하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 70.

제 69 항에 있어서, 세포가 포유류 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 71.

제 71 항에 있어서, 세포가 사람 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 72.

제 56 항에 있어서, 발현의 조정이 유전자 발현의 리프레션을 방지하는 유전자 발현의 활성화인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 73.

제 56 항에 있어서, 발현의 조정이 유전자 활성화를 방지하는 유전자 발현의 억제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 74.

제 66 항에 있어서, 조절성 도메인을 전사 리프레서, 메틸트랜스페라제, 전사 활성인자, 히스톤 아세틸트랜스페라제, 및 히스톤 디아세틸라제로 구성된 군으로부터 선택하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 75.

제 56 항에 있어서, 제 1 및 제 2 징크핑거 단백질이 프로모터에 작동가능하게 연결된 징크핑거 단백질 핵산을 포함하는 발현 벡터에 의해 코드화되며, 방법이 세포에 이 발현 벡터를 최초로 투여하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 76.

제 75 항에 있어서, 징크핑거 단백질의 발현이 소분자 제어하에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 77.

제 76 항에 있어서, 제 1 징크핑거 단백질의 발현 및 제 2 징크핑거 단백질의 발현이 상이한 소분자 제어하에 있고, 제 1 및 제 2 징크핑거 단백질이 모두 조절성 도메인을 포함하는 융합 단백질이며, 제 1 및 제 2 징크핑거 단백질이 동일한 세포에서 발현되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 78.

제 77 항에 있어서, 제 1 징크핑거 단백질이 유전자 발현을 리프레션하는 조절성 도메인을 포함하고, 제 2 징크핑거 단백질이 유전자 발현을 활성화하는 조절성 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 79.

제 75 항에 있어서, 발현 벡터가 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 80.

제 79 항에 있어서, 발현 벡터가 레트로바이러스 발현 벡터, 아데노바이러스 발현 벡터, 또는 AAV 발현 벡터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 81.

제 75 항에 있어서, 징크핑거 단백질이 유도 프로모터에 작동가능하게 연결된 핵산에 의해 코드화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 82.

제 56 항에 있어서, 세포가 각 징크핑거 단백질을 약 $1.5x10^{6}$ 카피 미만으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 83.

제 56 항에 있어서, 제 1 또는 제 2 표적 부위가 제 1 후보 유전자의 전사 개시 부위의 상류인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 84.

제 56 항에 있어서, 제 1 또는 제 2 표적 부위가 제 1 후보 유전자의 전사 개시 부위에 인접해 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 85.

제 56 항에 있어서, 제 1 또는 제 2 표적 부위가 제 1 후보 유전자의 전사 개시 부위의 RNA 중합효소 중단 부위 하류에 인접해 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 86.

후보 유전자의 생물학적 기능을 확인하는 방법으로서, 이 방법이

(i) 제 1 후보 유전자를 선택하는 단계;

(ii) 제 1 후보 유전자의 제 1 표적 부위에 결합하는 제 1 징크핑거 단백질을 제공하는 단계;

(iii) 제 1 후보 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자와 접촉하는 조건하에서 제 1 세포를 배양하는 단계로서, 여기에서 제 1 징크핑거 단백질이 제 1 후보 유전자의 발현을 조정하는 단계; 및

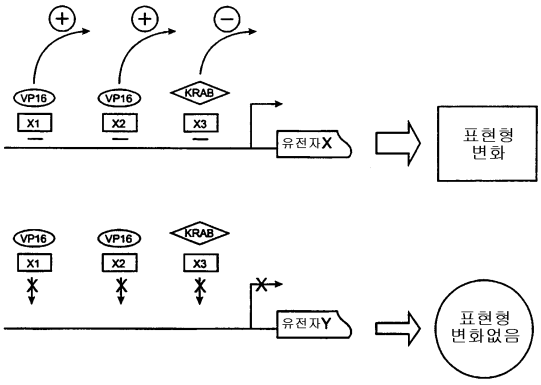
(iv) 선택된 표현형을 분석하여, 제 1 후보 유전자가 선택된 표현형에 관련되는지의 여부를 확인하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

도면

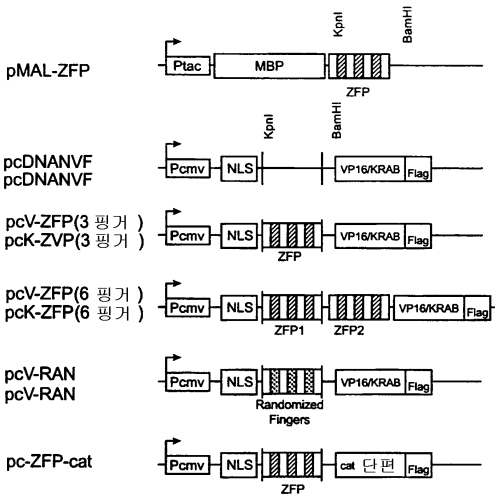
도면 1

ZFP 기술을 사용한 표적 유효화



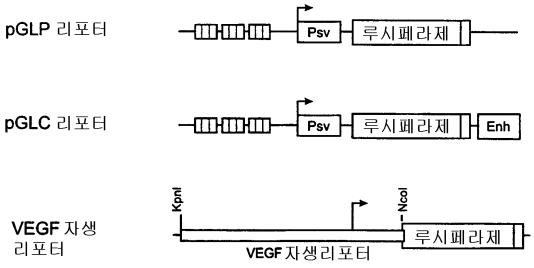
도면 2

ZFP 발현 구성물 및 대조표준 구성물



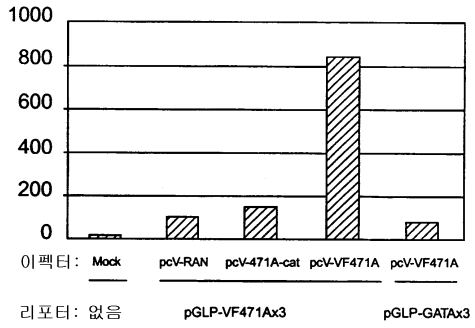
도면 3

루시페라제 리포터 구성물



도면 4

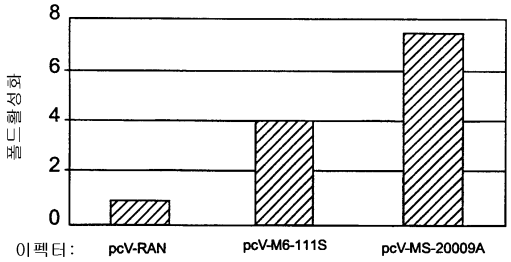
루시페라제 리포터 유전자 활성화에 대한 VEGF 471A ZFP의 효과



50 ng 이펙터 대 900 ng 리포터

도면 5

293 세포에서 ZFP에 의한 사람 VEGF 자생리포터 유전자의 활성화



100 ng 이펙터 대 900 ng pGLPVFH 리포터