

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-515183

(P2009-515183A)

(43) 公表日 平成21年4月9日(2009.4.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 27/26 3 1 5 H	2 G O 4 5
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-539508 (P2008-539508)
 (86) (22) 出願日 平成18年11月8日 (2006.11.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年7月4日 (2008.7.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2006/050375
 (87) 国際公開番号 W02007/072070
 (87) 国際公開日 平成19年6月28日 (2007.6.28)
 (31) 優先権主張番号 0522667.5
 (32) 優先日 平成17年11月8日 (2005.11.8)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 60/734,799
 (32) 優先日 平成17年11月9日 (2005.11.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508034613
 オクフォード ゲノメ スシエンセス (ユーケー) エルティーディー 英国 オーエックス2 オジェービー オクフォードシレ オクフォード ブクトン コウルト シー/オー ジャメス & コウベル
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 クリスチアン ロルフフ 英国 オーエックス14 4アールワイ オクフォードシレ オクフォード トヘ フォルム 86 ミルトン パルク アビングドン オクフォード ゲノメ スシエンセス (ユーケー) エルティーディー 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新たなタンパク質アイソフォーム及びその使用

(57) 【要約】

被験体における神経疾患の診断又は予防のためのスクリーニング法、被験体におけるそのような神経疾患の段階又は重症度の決定法、そのような神経疾患の発症のリスクのある被験体の同定法、又はそのような神経疾患を有する被験体へ投与される療法の作用のモニタリング法であり、(a)表1に列記されたタンパク質アイソフォーム番号1-6から選択される少なくとも1つのタンパク質アイソフォームを含む、被験体由来の体液又は組織の試験試料を分析すること；並びに、(b)前記試験試料中の前記タンパク質アイソフォームの存在量を、神経疾患がない1人以上からの試験試料中の前記タンパク質アイソフォームの存在量又は神経疾患がない被験体におけるそのタンパク質アイソフォームについて前もって決定された基準範囲と比較することを含み、前記神経疾患のより進行した状態の診断、又はスクリーニング若しくは予後における陽性結果を、神経疾患がない1人以上からの試験試料中の該タンパク質アイソフォーム(群)の存在量又は神経疾患がない被験体においてタンパク質アイソフォームについて前もって決定された基準範囲と比較して、試

MTPLLTLILVVLMLGLPLAQALDCHVCAYNQDNCNCFNMRCPAMVAYCMTTRTYVTPTRMKV

SKSCVPRCFETVYDGYSKHASITSCQYDLNCGIPLATLALAPILLATLWGLL

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体における神経疾患のスクリーニング又はその診断若しくは予後のための、被験体におけるこのような神経疾患の段階又は重症度を決定するための、このような神経疾患を発病するリスクのある被験体を同定するための、又はこのような神経疾患を有する被験体に施される療法の効果をモニターするための方法であって：

(a)表1に列記されたタンパク質アイソフォーム番号1-6から選択される少なくとも1つのタンパク質アイソフォームを含む、被験体からの体液又は組織の試験試料を解析すること；及び、

(b)前記試験試料中の前記タンパク質アイソフォーム(群)の存在量を、1人以上の神経疾患がないヒトからの試験試料中の前記タンパク質アイソフォーム(群)の存在量と、又は神経疾患がない被験体におけるそのタンパク質アイソフォームについて前もって決定された基準範囲と比較することを含み、前記神経疾患のより進行した状態の診断又はそのスクリーニングにおける陽性結果又はその予後を、1人以上の神経疾患がないヒトからの試験試料中の該タンパク質アイソフォーム(群)の存在量、又は神経疾患がない被験体におけるそのタンパク質アイソフォームについて前もって決定された基準範囲と比べ、試験試料中の該タンパク質アイソフォーム(群)の増加した存在量により示す、前記方法。

10

【請求項 2】

前記試料がCSF又は脳組織の試料である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記神経疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、又は鬱病である、請求項1又は2記載の方法。

20

【請求項 4】

前記工程(a)の解析が、特徴の二次元アレイを作製するための二次元電気泳動法によって行われる、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5】

前記工程(a)が、等電点電気泳動と、それに続くドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)を含む、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

前記工程(b)が、表1に列記されたタンパク質アイソフォームから選択された1つ以上のタンパク質アイソフォーム(群)を定量的に検出することを含む、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

30

【請求項 7】

前記定量的に検出する工程が、前記試料の少なくとも1つの一定分量を試験することを含み、前記試験工程は：

(a)前記一定分量を、予め選択されたタンパク質アイソフォームに対して免疫特異的な抗体(又はアフィポディーなどのその他の親和性試薬)と接触させること、及び、

(b)前記抗体(又はアフィポディーなどのその他の親和性試薬)と前記一定分量の少なくとも1種との間に生じた何らかの結合を定量的に測定すること、

を含む、請求項6記載の方法。

40

【請求項 8】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

前記定量的に検出する工程が、複数の一定分量を、複数の予め選択されたタンパク質アイソフォームの定量的検出のための複数の抗体(又はアフィポディーなどのその他の親和性試薬)で試験することを含む、請求項7記載の方法。

【請求項 10】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

被験体における神経疾患のスクリーニング又はその診断若しくは予後のための、被験体

50

におけるこのような神経疾患の段階又は重症度を決定するための、このような神経疾患を発病するリスクのある被験体を同定するための、又はこのような神経疾患を有する被験体に施される療法の効果をモニターするための方法であって：

試験被験体のCSF又は脳組織中の該タンパク質アイソフォーム(群)の存在量を、1人以上の神経疾患がないヒトからのCSF又は脳組織中の該タンパク質アイソフォーム(群)の存在量と、又は神経疾患がない被験体におけるそのタンパク質アイソフォームについて前もって決定された基準範囲と比較することを含み、前記神経疾患のより進行した状態の診断又はそのスクリーニングにおける陽性結果又はその予後を、1人以上の神経疾患がないヒトからのCSF又は脳組織中の該タンパク質アイソフォーム(群)の存在量、又は神経疾患がない被験体におけるそのタンパク質アイソフォームについて前もって決定された基準範囲と比べ、被験体のCSF又は脳組織中の該タンパク質アイソフォーム(群)の増加した存在量により示す、前記方法。

10

【請求項 1 2】

前記CSF又は脳組織中のタンパク質アイソフォームの存在量が、イメージング技術により決定される、請求項11記載の方法。

【請求項 1 3】

前記イメージング技術が、PET又はSPECTの使用に関連する、請求項12記載の方法。

【請求項 1 4】

前記イメージング技術が、標識されたアフィボディーの使用に関連している、請求項12記載の方法。

20

【請求項 1 5】

前記イメージング技術が、標識された抗体の使用に関連している、請求項12記載の方法。

【請求項 1 6】

前記被験体が、ニコチン経路において作用する薬物で治療されており、かつ前記方法は治療を最適化するために使用される、請求項1～15のいずれか1項記載の方法。

【請求項 1 7】

前記方法が、ニコチン経路において作用する薬物の評価のため、薬物を試験するため、又は薬物で治療するための患者を層別化するために使用される、請求項1～15のいずれか1項記載の方法。

30

【請求項 1 8】

表Iに列記されたタンパク質アイソフォーム番号1-6から選択された1つのタンパク質アイソフォームを含む医薬製剤。

【請求項 1 9】

表Iに列記されたタンパク質アイソフォーム番号1-6から選択された1つのタンパク質アイソフォームに免疫特異的に結合することが可能である抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)。

【請求項 2 0】

モノクローナル抗体である、請求項19記載の抗体。

【請求項 2 1】

請求項19又は請求項20記載の抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)を含む、神経疾患のスクリーニング、又は診断若しくは予後のためのキット。

40

【請求項 2 2】

請求項19又は請求項20記載の個別の抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)を複数含む、神経疾患のスクリーニング、又は診断若しくは予後のためのキット。

【請求項 2 3】

請求項19又は請求項20記載の抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)を治療的有効量及び医薬として許容し得る担体を含む、医薬組成物。

【請求項 2 4】

請求項19又は請求項20の抗体(若しくはアフィボディーなどのその他の親和性試薬)の結

50

合ドメインを含む前記抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)の断片又は誘導体の治療的有効量;及び

医薬として許容し得る担体と、
を含む医薬組成物。

【請求項25】

表Iに列記されたタンパク質アイソフォーム番号1-6から選択されたタンパク質アイソフォームをコードしている核酸の治療的有効量を、そのような治療又は予防を必要とする被験体へ投与することを含む、神経疾患を治療又は予防する方法。

【請求項26】

請求項19又は請求項20記載の抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)の治療的有効量を、そのような治療又は予防を必要とする被験体へ投与することを含む、神経疾患を治療又は予防する方法。

10

【請求項27】

表Iに列記されたタンパク質アイソフォーム番号1-6から選択されたタンパク質アイソフォームの機能を調節する薬剤の治療的有効量を、そのような治療又は予防を必要とする被験体へ投与することを含む、神経疾患を治療又は予防する方法。

【請求項28】

前記薬剤が核酸である、請求項27記載の方法。

【請求項29】

前記核酸が、タンパク質アイソフォームアンチセンス核酸、リボザイム、又はsiRNAである、請求項25又は26記載の方法。

20

【請求項30】

タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドと相互作用する薬剤をスクリーニングする方法であって:

- (a)タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームの生物学的活性部分、又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドを候補薬剤と接触させること;及び、
- (b)前記候補薬剤が、前記タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドと相互作用するか否かを決定すること;

ここで該タンパク質アイソフォームが、表Iに列記されたタンパク質アイソフォーム1-6から選択される、前記方法。

30

【請求項31】

前記タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドが、細胞により発現される、請求項30記載の方法。

【請求項32】

前記細胞が、組換えタンパク質アイソフォーム、組換えタンパク質アイソフォーム断片、又は組換えタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドを発現する、請求項31記載の方法。

【請求項33】

前記タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの発現又は活性を調節する薬剤をスクリーニングする方法であって:

40

- (a)タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドを発現する第1の細胞の集団を候補薬剤と接触させること;

- (b)該タンパク質アイソフォーム又は該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドを発現する第2の細胞の集団を対照薬剤と接触させること;及び、

- (c)前記第1及び第2の細胞の集団における該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、又は該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードしているmRNAのレベルを比較するか、あるいは前記第1及び第2の細胞の集団における細胞二次メッセンジャーの誘導のレベルを比較すること、を含み、

50

ここで該タンパク質アイソフォームが、表Iに列記されたタンパク質アイソフォーム1-6から選択される、前記方法。

【請求項34】

前記タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードするmRNA、又は該細胞二次メッセンジャーのレベルが、前記第2の細胞の集団におけるよりも前記第1の細胞の集団において高い、請求項33記載の方法。

【請求項35】

前記タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードするmRNA、又は該細胞二次メッセンジャーのレベルが、前記第2の細胞の集団におけるよりも前記第1の細胞の集団において低い、請求項33記載の方法。

10

【請求項36】

タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの発現又は活性を調節する薬剤をスクリーニング又は同定する方法であって：

- (a) 候補薬剤を第1の哺乳類又は哺乳類の群に投与すること；
- (b) 対照薬剤を第2の哺乳類又は哺乳類の群に投与すること；及び、

(c) 前記第1及び第2の群における該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの発現レベル、又は該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードするmRNAの発現レベルを比較すること、あるいは該第1及び第2の群における細胞二次メッセンジャーの誘導のレベルを比較すること、を含み、

20

ここで該タンパク質アイソフォームが、表Iに列記されたタンパク質アイソフォーム1-6から選択される、前記方法。

【請求項37】

前記哺乳類が、神経疾患の動物モデルである、請求項36記載の方法。

【請求項38】

前記タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードするmRNA、又は前記細胞二次メッセンジャーの発現レベルが、前記第2の群におけるよりも前記第1の群において高い、請求項36又は37記載の方法。

30

【請求項39】

前記タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードするmRNA、又は該細胞二次メッセンジャーの発現レベルが、前記第2の群におけるよりも前記第1の群において低い、請求項36又は37記載の方法。

【請求項40】

前記第1及び第2の群における該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードするmRNA、又は該細胞二次メッセンジャーのレベルを、正常な対照哺乳類における該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、又は該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードする前記mRNAのレベルと更に比較させる、請求項36記載の方法。

40

【請求項41】

前記候補薬剤の投与により、前記第1の群における該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、又は該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードする該mRNA、又は該細胞二次メッセンジャーのレベルを、前記第2の群における該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、又は該mRNA、又は該細胞二次メッセンジ

50

ヤーのレベルの方へと調節する、請求項36記載の方法。

【請求項 4 2】

前記哺乳類が、神経疾患を有するヒト被験者である、請求項36～41のいずれか1項記載の方法。

【請求項 4 3】

タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドと相互作用する薬剤をスクリーニング又は同定する方法であって、

(a) 候補薬剤を、該タンパク質アイソフォーム又は該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドと接触させること、及び、

(b) もしあれば、該薬剤と該タンパク質アイソフォーム又は該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドとの間の結合を定量的に検出すること、を含み、ここで該タンパク質アイソフォームが、表Iに列記されたタンパク質アイソフォーム1-6から選択される、前記方法。

10

【請求項 4 4】

タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの活性を調節する薬剤をスクリーニング又は同定する方法であって、

(a) 第1の一定分量にて、候補薬剤を、該タンパク質アイソフォーム又は該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドと接触させること、及び、

(b) 前記候補薬剤の添加後の第1の一定分量にて、該タンパク質アイソフォーム又は該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの活性を、対照一定分量の該タンパク質アイソフォーム若しくは該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの活性と、又は前もって決定された基準範囲と比較すること、を含み、ここで該タンパク質アイソフォームが、表Iに列記されたタンパク質アイソフォーム1-6から選択される、前記方法。

20

【請求項 4 5】

前記タンパク質アイソフォーム又は該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドが組換えタンパク質である、請求項43又は44記載の方法。

【請求項 4 6】

前記タンパク質アイソフォーム又は該タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドが固相上に固定されている、請求項43又は44記載の方法。

30

【請求項 4 7】

被験体における神経疾患のスクリーニング、診断若しくは予後のための、又は被験体に投与される抗神経障害薬若しくは抗神経障害療法の効果をモニターするための方法であって：

(a) 表Iに列記されたタンパク質アイソフォーム番号1-6から選択されたタンパク質アイソフォームをコードしているヌクレオチド配列に対して相補的な10個以上の連続したヌクレオチドを含む少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプローブを、該被験体由来の生体試料から得られたRNAと、又は該RNAから複製されたcDNAと接触させることであり、ここで該接触は、該ヌクレオチド配列が存在する場合に、該ヌクレオチド配列に対するプローブのハイブリダイゼーションが可能な条件下で行われること；

40

(b) もしあれば、該プローブと該ヌクレオチド配列との間のハイブリダイゼーションを検出すること；並びに、

(c) もしあれば、工程(b)で検出されたハイブリダイゼーションを、対照試料において検出されたハイブリダイゼーションと、又は前もって決定された基準範囲と比較すること、を含む、前記方法。

【請求項 4 8】

工程(a)が表Iに列記されたタンパク質アイソフォーム番号1-6から選択されたタンパク質アイソフォームをコードするヌクレオチド配列に対して相補的な10個以上の連続したヌクレオチドを含む複数のオリゴヌクレオチドプローブを、該被験体由来の生体試料から得られたRNAと、又は該RNAから複製されたcDNAと接触させることを含み、ここで該接触は、

50

該ヌクレオチド配列が存在する場合に、該ヌクレオチド配列に対するプローブのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で行われる、請求項47記載の方法。

【請求項49】

工程(a)が前記ヌクレオチド配列をDNAアレイに対してハイブリダイズする工程を含み、該アレイの1つ以上のメンバーは、異なるタンパク質アイソフォームをコードする複数のヌクレオチド配列に対して相補的なプローブである、請求項47記載の方法。

【請求項50】

前記タンパク質アイソフォームが、pI約8.13及び分子量約11768Daにより規定される、請求項1～49のいずれか1項記載の方法、製剤、抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)、キット又は組成物。

10

【請求項51】

前記タンパク質アイソフォームが、配列番号:2及び3の配列を含む、請求項1～50のいずれか1項記載の方法、製剤、抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)、キット又は組成物。

【請求項52】

前記タンパク質アイソフォームが、pI約6.72及び分子量約27959Daにより規定される、請求項1～49のいずれか1項記載の方法、製剤、抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)、キット又は組成物。

【請求項53】

前記タンパク質アイソフォームが、配列番号:2の配列を含む、請求項1～49及び52のいずれか1項記載の方法、製剤、抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)、キット又は組成物。

20

【請求項54】

前記タンパク質アイソフォームが、pI約7.25及び分子量約12234Daにより規定される、請求項1～49のいずれか1項記載の方法、製剤、抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)、キット又は組成物。

【請求項55】

前記タンパク質アイソフォームが、分子量約18171Daにより規定される、請求項1～49のいずれか1項記載の方法、製剤、抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)、キット又は組成物。

30

【請求項56】

前記タンパク質アイソフォームが、分子量約17391Daにより規定される、請求項1～49のいずれか1項記載の方法、製剤、抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)、キット又は組成物。

【請求項57】

前記タンパク質アイソフォームが、分子量約17980Daにより規定される、請求項1～49のいずれか1項記載の方法、製剤、抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)、キット又は組成物。

【請求項58】

前記タンパク質アイソフォームが、配列番号:3の配列を含む、請求項1～49及び請求項54～57のいずれか1項記載の方法、製剤、抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)、キット又は組成物。

40

【請求項59】

。

【請求項60】

前記神経疾患がアルツハイマー病である、請求項1～17又は25～58のいずれか1項記載の方法。

【請求項61】

前記神経疾患がパーキンソン病である、請求項1～17又は25～58のいずれか1項記載の方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(1. 緒言)

本発明は、神経疾患、特にアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、及び鬱病、並びにこれらの発症及び進行と関連した新たなタンパク質アイソフォームの同定に、並びに例えば臨床スクリーニング、診断、治療のための、更には薬物スクリーニング及び薬物開発のためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

(2. 発明の背景)

アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、及び鬱病などの神経疾患は、疾患の症状が個体間で非常に異なるため、診断が困難であることが多い。ある状態の陽性診断に至るか、又は鑑別診断から特定の疾患を除去するのに役立つ脳組織、脳脊髄液(CSF)、血液又は尿の試料などの体の試料中の物質或いは物質群を測定することが、非常に望ましいであろう。

【0003】

(アルツハイマー病)

アルツハイマー病(AD)は、ますます優勢に成りつつある神経変性疾患の型であり、65歳以上の人々の間の認知症の症例全体のおよそ50-60%を占めている。世界中で現在推定15,000,000人が冒されており、人口における高齢者の相対的増加のため、その有病率は、次の20~30年にわたって増大する可能性が高い。アルツハイマー病は、臨床症状の発症から死亡までの間に約8.5年の平均期間を有する進行性の疾患である。より高度な精神機能と関連した脳領域の錐体神経死及び神経細胞シナプスの喪失は、著しくかつ進行性の認知機能障害によって特徴付けられる典型的な総合症状を生じる(Francisらの文献, 1999, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 66:137-47)。

【0004】

現在、アルツハイマー病の診断には、慎重な病歴及び理学的検査；詳細な神経学的及び精神医学的検査；ADと見せかけた根底にある代謝的疾患及び医学的疾患を除外するための実験室血液研究；精神状態評価及び形式的認知検査；並びに脳のコンピューター断層撮影又は磁気共鳴映像；が必要である(Iqbal, K., Mortimer, J.A., Winblad, B., Wisniewski, HM編 『アルツハイマー病及び関連障害における研究的進歩(Research Advances in Alzheimer's Disease and Related disorders.)』中、Growdon, J.H.の文献, 1995, 『アルツハイマー病診断における進歩(Advances in the diagnosis of Alzheimer's Disease.)』、ニューヨーク, NY: John Wiley & Sons社 1995: 139-153)。

【0005】

アルツハイマー病の生物マーカーの現在の候補には：(1)プレセニリン1(PS1)、プレセニリン2(PS2)及びアミロイド前駆体タンパク質(APP)遺伝子の突然変異；(2)アポリポタンパク質E(ApoE)の対立遺伝子の検出；並びに(3)CSFにおけるアミロイドB-ペプチド(AB)、タウタンパク質及びニューロン系状タンパク質(NTP)の濃度の変化を含む。例えば、Neurobiology of Aging 19: 109-116(1998)の総説を参照されたい。PS1、PS2及びAPP遺伝子の突然変異は、早期発症家族性アルツハイマー病の指標である。しかし、早期発症家族性アルツハイマー病は、かなり珍しく；現在、世界中で120家族だけが、決定的な突然変異を保有することが知られている(Neurobiology of Aging, 19:109-116(1998))。ApoEの4対立遺伝子の検出は、アルツハイマー病の遅発型及び散発型と相関することが示された。しかし、4は、アルツハイマー病に罹患していない多くの個体において検出され、かつ4が存在しないことは、アルツハイマー病を排除しないため、4単独ではアルツハイマー病のための生物マーカーとして使用することができない(Neurobiology of Aging, 19:109-116(1998))。

【0006】

10

20

30

40

50

アルツハイマー病のCSFにおいて、ABペプチドAB42の減少及びタウタンパク質の増加は、アルツハイマー病の存在と相関することが示された(Neurobiology of Aging, 19:109-116(1998)。しかし、アルツハイマー病の生物マーカーとしてのA₄₂及びタウタンパク質の特異性及び感度は、大きくない。例えば、診断的に情報価値のあるCSFタウタンパク質のカットオフレベルを決定することは、困難であった。また、死後の被験体のCSFにおける高レベルのNTPは、アルツハイマー病の存在と相関することが示されてきた(Neurobiology of Aging, 19:109-116(1998)。

【0007】

タクリン、ドネペジル、リバスチグミン及びガランタミンなどのアセチルコリンエステラーゼ阻害剤は、現在ADに利用できる主な治療である；しかし、療法に対する患者の反応には大差がある。

メマンチンは、正常な活性を妨害することなく過剰なグルタミン酸受容体活性を遮断する新たなクラスの薬物に属する。グルタミン酸は、CNS外傷及び虚血後の細胞死を引き起こす神経毒性イベントに、及びいくつかの神経変性障害に關与する興奮性アミノ酸(EAA)神経伝達物質である(一つの神経細胞によるグルタミン酸の放出は、その隣の活性を刺激する)。多すぎるグルタミン酸は、極めて有毒である。脳卒中に続いて生じるか、又はハンチントン病のような認知症を来す疾病の脳損傷の多くは、脳における過剰なグルタミン酸活性の結果であると考えられている。アルツハイマー病で生じる活性化などの病的活性化の間に、認知機能の進行性の欠陥を引き起こすかもしれない。グルタミン酸受容体の過剰活性化は神経細胞の損傷を引き起こし、神経変性認知症における認知欠陥及び神経細胞喪失の両方の原因になるであろう(Lipton, SA.の文献, Curr Alzheimer Res.(2005)2:155-65)。メマンチンは、欧州にて使用を認可されており、米国FDAによって検討中である。アルツハイマー病以外に、メマンチンは、現在認知症及び鬱病において治験中である。一連の第二世代のメマンチン誘導体が現在開発中である。

【0008】

(鬱病)

鬱病は、最も一般的で、重篤で、かつしばしば生命の脅威となる神経精神医学的疾患の一つであり、所与の1年の期間内に米国の人口の9.5%が冒していると考えられている。これは、大鬱病又は単極性(UP)鬱病及び双極性(BP)鬱病に細分することができる。自殺は、双極性疾患又は再発性疾患のいずれかを有する個体の死亡原因の10%~20%であり、双極性疾患における自殺のリスクは、単極性鬱病におけるものよりも高いであろう(Simpson及びJamisonの文献, J Clin Psychiatry, 1999, 60:53-56に概説される)。BPは、気分昂揚(躁病)及び鬱病の発症によって特徴づけられる(Goodwinらの文献, 1990, 『躁鬱病(Manic Depressive Illness)』, Oxford University Press, ニューヨーク)。

【0009】

BP鬱病は、更に細分することができ、BP Iは、患者が1つ以上の躁病を発症する場合であり、BP IIは、軽躁病の発症を経験するが、完全な躁病発症の基準には合わない場合である。また、BPは、広く定義された表現型を有する単極性大鬱病性疾患(MDD)である家系に共に分離されることが多い(Freimer及びReusの文献, 1992, 『神経性疾患の分子的及び遺伝的基盤(The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease)』中, Rosenbergら編, パターワース, ニューヨーク, 951-965頁; McInnes及びFreimerの文献, 1995, Curr. Opin. Genet. Develop., 5, 376-381)。種々の形態の鬱病の発症及び進行に關連するタンパク質並びにタンパク質アイソフォームの同定は、罹患個体の効果的診断、予後及び治療にとって望ましいだろう。

【0010】

また、大気分障害は、多くのその他の有害な健康關連効果と關連し、身体障害及び早死に伴うコストは、米国単独で毎年43,000,000,000ドルの経済的負担に相当する。数百万の生命に対するこれらの疾患の破壊的影響にもかかわらず、これらの疾患が存在する鬱病の鑑別診断には、いまだ不確定さがある。(Goldmanらの文献, 1999, J Gen Med. 14, 569-80; Schatzbergの文献, 1998, J Clin Psychiatry, 59, suppl 6:5-12; Goodwin及びJamis

10

20

30

40

50

onの文献, 1990 『躁鬱病(Manic Depressive Illness)』, ニューヨーク, Oxford University Press)。

【0011】

大鬱病は、症候群の診断であり：患者の病歴及び理学的検査に基づいて、その他の精神疾患及び一般的な医学的状态を考慮することが適切かもしれないが(Goldmanらの文献, J Gen Intern Med. 1999, 14, 569-580)、これらの病因及び病態生理学に関しては非常に限られた知識しかない(Ikonomovらの文献, 1999, Am J Psychiatry, 156, 1506-1514)。遺伝的分離解析及び双生児研究により、BADの遺伝的因子が示唆された(Bertelsonらの文献, 1977, Br. J. Psychiat. 130, 330-351; Freimer及びReusの文献, 1992, 『神経性疾患の分子的及び遺伝的基盤(The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease)』中, Rosenbergら編, パターワース, NY, 951-965頁; Paulsらの文献, 1992, Arch. Gen. Psychiat. 49, 703-708)。BPに關与する遺伝子に關してのいくつかの局在が、染色体18p及び21q上に提唱され、かつ可能性のある遺伝子座の候補領域が、現在明確に定義されているが、この疾患と關連する遺伝子はいまだ同定されていない(Berrettiniらの文献, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91, 5918-5921; Murrayらの文献, 1994, Science 265, 2049-2054; Paulらの文献, 1995, Am. J. Hum. Genet. 57, 636-643; Maierらの文献, 1995, Psych. Res. 59, 7-15)。

10

大鬱病は、認知疾患及び情動疾患の両方について評価される患者において頻繁に診断され、多くの鬱病患者は、実際に、臨床的に認知欠陥により特徴づけられる(Emery 及び Oxmanの文献, 1992, Am J Psychiatry, 149, 305-317)。

20

【0012】

現在の治療は、以下の薬剤の主要なクラスに分類することができる：気分安定剤：リチウム、ジバルプロエックス、カルバマゼピン、ラモトリジン；抗鬱薬：三環系抗鬱薬(例えば、デシプラミン、クロミプラミン、ノルトリプチリン)、選択的なセロトニン再取り込み阻害剤(フルオキセチン(プロザック)、セルトラリン(ゾロフト)、パロキセチン(パキシル)、フルボキサミン(ルボックス)及びシタロプラム(セレクサ)を含むSSRI)、MAOI、プロピオン(ウェルプトリン)、ベンラファキシン(エフェクサー)及びミルタザピン(レメロン)；並びに非定型抗精神病薬：クロザピン、オランザピン、リスペリドン。しかし、現在使用される気分安定剤及び死亡率低減剤の有効性に関する細胞的及び分子的基礎は、完全には解明されないままである(Manjiらの文献, 1999, J Clin Psychiatry, 60, 27-39)。かなりの数の患者は、リチウムなどの既存の療法に十分に反応しない、その一方でその他大勢は、助けられるが、重大な病的状態に苦しみ続ける(Chouの文献, 1991, J Clin Psychopharmacol, 11, 3-21)。重篤な気分障害の有意な罹患率及び死亡率の認識、並びにかなりの割合の患者が既存の治療に十分に反応しないという評価の増加により、急速に、強力に、特異的に働き、かつ主要な公衆衛生の重要性の1つである副作用がより少ない新たな治療薬を開発する課題が作り出された(Bebchukらの文献, Arch Gen Psychiatry 2000 57, 95-7)。

30

【0013】

グルタミン酸アンタゴニストであるラモトリジンは、標準的療法で急性気分症状発現を治療した患者の気分症状発現(鬱病、躁病、軽躁病、混合症状発現)の発生までの時間を遅らせるための双極性I疾患である成人の維持療法に關して、FDAに承認されている。高(躁病的な)状態から低(鬱病的な)状態に気分変動できないことによって特徴づけられる重篤な慢性疾患である双極性障害(1)は、米国において最も一般的な精神疾病の一つである(Bhagwagar Zらの文献, Expert Opin Pharmacother. (2005)8: 1401-8)。

40

【0014】

(多発性硬化症)

多発性硬化症(MS)は、軸索が保たれる炎症性の脱髄疾患であり、若年成人における神経性身体障害の最も一般的な原因であると考えられている。MSの発症の平均年齢は30歳であるが、2つの優勢な年齢層がある。大部分の患者は、発症時に21~25歳の間であり、少数の割合が41~45歳である。西欧諸国では、人口100,000人あたり80人を上回る人々が冒さ

50

れている(Kurtzke, J.F.の文献,(1980), Neurology(N.Y.), 7: 261-279)。カナダ及び英国の数例の双生児の研究により、二卵性双生児及び兄弟姉妹における2%と比較して、一卵性双生児では約30%が一致することが示された(Ebers, G.C.らの文献,(1986), New Engl J Med. (315): 1638-42; Mumford, C.J.らの文献, 『英国の島での双生児における多発性硬化症の調査(The British Isles survey of multiple sclerosis in twins)』(1994) Neurology, 1004: 44, 11-15)。現在の証拠により、複数の遺伝子が相互作用してMSに対する感受性を増加させるであろうことが示唆されている。(Norseworthyの文献,(1999) Nature, 399: suppl. A40-A47)。

【 0 0 1 5 】

遺伝学及び遺伝子タイピングは、MSの遺伝的リスクを定義するための助けとなるであろうが、MSの診断、予後及び治療の有用性には、ほとんど助けとならないであろう。MSが単一疾患であるかどうか、並びに視神経脊髄炎、横断性脊髄炎、バロー同心円硬化症、急性MSのマルチプル変異型及び急性散在性脳脊髄炎を含む一般的ではない炎症性の脱髄性CNS症候群とどのような関連があるかは、未だに分らないままである(Norseworthyの文献, 『多発性硬化症の原因及び治療の決定における進歩(Progress in determining the cause and treatment of multiple sclerosis)』(1999)Nature 399: suppl. A40-A47)。

【 0 0 1 6 】

MS患者の剖検により、比較的軸索が保たれた脱髄によって特徴づけられる中枢神経系における複数の病変(プラーク)の存在、並びに神経膠症及び異なる程度の炎症が明らかになった。視覚神経、脊髄及び室周囲領域を含む特定の頻発部位が存在しているが、脳又は脊髄のあらゆる部分が冒され得る(Lumsden, C.E.の文献(1970) In Vinken P. J. Bruyn, GW, 編, 『臨床神経学ハンドブック(Handbook of Clinical Neurology)』9巻 Amsterdam, North Holland, 217-309頁)。MSのような炎症性神経疾患の大部分において、細胞及び/又は分子レベルでの変化と神経系の構造及び機能との関連についてはほとんど知られていない。

【 0 0 1 7 】

診断は、臨床的なもののままである。診断には、時間及び空間的に分散した病変の提示、並びに同じ病像を生じ得るその他の状態の排除が必要である。ポスター基準として公知のMSの臨床的分類には、誘発反応及びMRIの異常、並びにCSFにおける免疫異常が含まれる(Poster C. M.らの文献,(1983) Ann Neurol 13: 227-231)。症状時のMSの症候は、研究された集団で変化するが、患者の24%に感覚の症候が、患者の31%に視神経炎が、患者の17%に肢弱体が、並びに患者の25%に脳幹及び小脳の症候が含まれる(Thompson, A. J.らの文献,(1986) Q. J. Med. 225: 69-80)。結果として、MSは、広範囲にわたる臨床症状及び経過を有し、かつ任意の所与の患者の臨床経過は、予測不可能である。大部分のMS患者において、それは、再発及び寛解する経過で始まり、この場合、神経性機能障害の発症が数週間持続する。疾患の経過にわたって完治の見込みがないと、患者は、進行性段階(二次進行)に突入する。この疾患段階の間に、患者は、重篤な不可逆的身体障害を発病する。患者の約1/3は、良性MSを有し、二次進行は発病しない。およそ10%の患者は、再発及び寛解(一次進行性MS)することなく発症から進行性身体障害を発病する。MSにおいて、生化学的な変化は、ほとんど同定されていなかった。結果として、細胞及び/又は分子が原因となる欠陥及び神経病態の同定並びに特性付けが、神経疾患の治療の改善のために必要である。悪化又は再発の可能性のため、迅速な診断、特に以下のように患者を分類することは、非常に有益になるであろう：

1. 良性MS対進行性MS
2. 一次進行性MS対二次進行性MS
3. 一次進行性MS及び二次進行性MSの特異的病態生理学的サブタイプ

【 0 0 1 8 】

治療戦略には、3つの目的がある：1、疾患の経過を修飾すること、2、再発の期間と重症度に影響を及ぼすこと、並びに3、対症療法及び神経リハビリテーション。

現在、MSには、生存している患者における診断及び予後に有用な客観的な生化学マーカー

ーがない。MS患者のCSFにおける疾患特異的タンパク質(DSP)の同定は、疾患病態に重要な洞察を提供し、よりよい診断及び治療ストラテジーの機会を提供するであろう。MS患者の脳脊髄液(CSF)の等電点電気泳動により、MS患者の95%においてオリゴクローナル性バンドの存在が明らかとなった(McLeanらの文献,(1990) Brain, 113:1269-89)。しかし、MRIと同様に、この知見は、MS患者に対して特異的でなく、ギラン バレー症候群、サルコイドーシス及び慢性髄膜炎を含むその他の神経疾患においても検出される。従って、個々の神経疾患、並びに急性及び慢性CNS疾患を区別する特異性及び感度には、個別のタンパク質というよりむしろ、疾患に関連したタンパク質のレパートリーの選別が必要であろう。

【0019】

多発性硬化症の組織病理学的報告及びその動物モデルでは、活性な病変における軸索の傷害とグルタミン酸代謝の障害との関連の証拠を示し、グルタミン酸レベルは、多発性硬化症の患者の特定の脳領域において上昇している(Srinivasan Rらの文献, Brain (2005) 128:1016-25)。多発性硬化症患者は、彼らの髄液に有毒レベルのグルタミン酸を有しており、脳卒中治療として試験されていたグルタミン酸を遮断する化合物は、多発性硬化症の実験モデルにおいても有効性を示す(Smith Tの文献, Nature Med (2000) 6:62; Pitt Dらの文献 Nature Med (2000) 6:67)。

【0020】

(パーキンソン病)

パーキンソン病は、年齢に関連した神経変性疾患であり、平均の発症年齢は55歳である。米国において、約1,000,000名が本疾患に罹患している。症例の95%は散発性であり、明白な遺伝的関連はない。パーキンソン病は、深刻な有病率及び罹患者間の死亡率の上昇を引き起こす。パーキンソン病患者の身体障害、生産性喪失、及び医薬治療に関連したコストは、年間260億ドルを超える。

【0021】

パーキンソン病は、安静時振戦、寡動、運動緩慢、無動、筋固縮、前屈姿勢、反射障害を特徴とし、患者の25%以上では、受動的に発現された認知異常、遅延した反応、鬱病、及び認知症を特徴とする(Dauer, W.及びPrzedborski, S.の文献, 『パーキンソン病：機序とモデル(Parkinson's disease: mechanisms and models)』, Neuron, 39:889-909 (2003))。パーキンソン病の神経病理学的特徴は、黒質緻密部におけるドパミン神経細胞の減少、神経細胞内のレビー小体として公知のタンパク質性封入体の存在、及び線条体ドパミンレベルの低下である(Schapira, A. H. V.及びOlanow, C. W.の文献, 『パーキンソン病における神経保護：謎、通説、誤解(Neuroprotection in Parkinson disease, Mysteries, myths and misconceptions)』, Journal of the American Medical Association, 291:358-364 (2004))。

【0022】

パーキンソン病においては、背内側面の神経細胞が影響を受ける正常な加齢に比べ、より多くの神経細胞が、黒質緻密部の腹外側部分及び尾部から脱落している(Fearnley, J. M.及びLees, A. J.の文献, 『加齢とパーキンソン病：黒質領域の選択性(Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity)』, Brain, 114:2283-2301 (1991))。線条体ドパミン神経末端は、神経細胞本体の破壊以前に変性するように見える(Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K.及びSeitelberger, F.の文献, 『脳ドパミン及びパーキンソン病及びハンチントン病の症候：臨床、形態、及び神経化学の相関(Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations)』, Journal of Neurological Science, 20:415-455 (1973))。

【0023】

PDの病理進行には、遺伝性素因、基底核における増加した重金属(すなわち鉄及びマンガンの)沈着、ミトコンドリア呼吸鎖活性の低下と増加した酸化ストレスの組合せ、並びに興奮毒性を含む、複数の要因が関連している。多くの証拠が、PD運動症状が臨床的に明らかになる以前に主な神経変性は既に脳にはびこることを示唆していることから考え、

顕在化した決定的臨床症状が存在しないとしても、PDを明確かつ特異的に同定する早期PDの推定となる生物学的指標を確定するために、膨大な努力が現在成されている。

【0024】

(現在のパーキンソン病治療) :

現在利用可能なパーキンソン病療法は、対症療法であり、治癒的又は疾患-修飾する療法はわかっていない。レボドパ治療は、本疾患の管理療法の中心であるが、長期治療は、5年以内の運動症状の変動及びジスキネジーの発生に関連している(Rascol, O., Brooks, D. J., Korczyn, A. D., DeDeyn, P. P., Clarke, C. E., Lang, A. E.の文献、『ロピニロール又はレボドパ治療を受ける患者におけるジスキネジー発症率の5年試験(A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa)』, New England Journal of Medicine, 342:1484-1491 (2000))。ドパミンと反対に作用するコリン作動性神経細胞を阻害する抗コリン作用薬を用い、振戦及び筋固縮を治療する。カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ阻害剤は、レボドパの3-O-メチルドパへの末梢及び中枢での代謝を妨害し、その結果レボドパの「wearing-off」時間を延長する。

10

【0025】

モノアミノオキシダーゼ-B(ドパミンを触媒する酵素)の阻害剤は、脳内のドパミンの作用を延長し、かつ症状恩恵を提供することが示されているが、このような阻害剤は、神経保護作用を有することはわかっていない。モノアミノオキシダーゼ-B阻害剤のクラスの薬物は、セレギリン及びアマタジンがある(Romrell, J., Fernandez, H. H., Okun, M. S.の文献、『現在のパーキンソン病療法の論理的根拠(Rationale for current therapies in Parkinson's disease)』, Expert Opinions in Pharmacotherapeutics, 4:1747-1761 (2003))。

20

全般的に、現在の薬理的治療の有効性は、極めて限定的であり、パーキンソン病治療に向けた改善された方法が依然必要とされている。

【0026】

(概要)

既存の、多くは不適当な、上記の神経学的状態及び神経精神医学的状态のための試験に時間がかかりすぎるため、並びにその費用のため、

・神経学的状態のサブセットが診断に含まれるか、又は除外されるべきであることを示す、

30

・これらの神経学的状態のうちの1つの陽性診断を導く(又は、逆に、それを潜在的疾患の一覧から除外することを可能にする)、

のいずれかであろう、脳組織、CSF、血液若しくは尿などの試料中の物質又は物質群を測定できることが、非常に望まれるであろう。

【0027】

加えて、遺伝学及び遺伝子タイピングは、これらの状態の遺伝的リスクを定義するための助けとなるであろうが、これらの状態の診断、予後及び治療の有用性はかなり低いであろう。タンパク質のインピボにおける翻訳後修飾及びプロセッシングは、実際はこのような状態に高度に関係しており、直接タンパク質を検出し、及び定量化することができる技術のみによってモニターすることができる。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0028】

(3. 発明の要旨)

本発明は、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、及び鬱病を含む神経疾患のスクリーニング、診断及び治療のための、並びに上記状態の治療のための薬物のスクリーニング及び開発のための方法及び組成物を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0029】

50

本発明の第1の態様は、本明細書に開示したような本発明の少なくとも1つのタンパク質アイソフォーム若しくはこれらの任意の組合せの存在又はレベルを検出するために、例えば二次元電気泳動によって、又はタンパク質の造影により、例えば脳脊髄液(CSF)又は脳組織の試料を解析することを含む神経疾患の同定の方法を提供する。また、これらの方法は、療法の結果の臨床スクリーニング、予後、モニタリングのために；特定の治療的処置に最も反応しそうな患者を同定するために；薬物スクリーニング及び薬物開発；並びに薬物療法のための新たな標的の同定；に適している。

【0030】

本発明の第2の態様は、本発明のタンパク質アイソフォームに対して免疫特異的に結合することが可能である抗体、例えばモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体及びキメラ(二重特異性)抗体(又はアフィポディーなどのその他の親和性試薬)を提供する。

本発明の第3の態様は、上に詳述した方法に使用してもよく、かつ単一若しくは複数の製剤又は抗体(又はアフィポディーなどのその他の親和性試薬)を、必要に応じて、その他の試薬、ラベル、基質、及び使用に関する説明書と共に含んでもよいキットを提供する。キットは、疾患診断のために使用してもよく、又は新たな診断薬及び/若しくは治療薬の同定のためのアッセイ法であってもよい。

【0031】

本発明の第4の態様は、神経疾患を有する被験体において、本発明のタンパク質アイソフォームの発現若しくは活性(例えば、結合活性)、又はその両方を調節する(例えば、アップレギュレートする、若しくはダウンレギュレートする)薬剤の治療的有効量を被験体に投与することを含む、神経疾患の治療法を提供する。

本発明の第5の態様は、本発明のタンパク質アイソフォーム、その類似体若しくは関連ポリペプチドの特徴、例えばその発現又は結合活性を調節する(例えば、アップレギュレートする、若しくはダウンレギュレートする)薬剤をスクリーニングする方法を提供する。

その他の目的及び利点は、以下の事例的図面を併せることで、次の詳細な記述の総説から明らかになるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

(5.発明の詳細な記載)

以下に詳細に記述する本発明は、例えば哺乳動物被験体において神経疾患をスクリーニング、診断及び治療するために、及び薬物スクリーニング及び薬物開発のために有用なタンパク質アイソフォーム、並びに対応する方法、組成物及びキットを提供する。また、本発明は、神経疾患を治療又は予防するための、哺乳動物被験体に対する治療的組成物の投与を包含する。哺乳動物被験体は、非ヒト哺乳類であってもよいが、好ましくはヒト、より好ましくはヒト成人、すなわち少なくとも21歳(特に少なくとも35歳、少なくとも50歳、少なくとも60歳、少なくとも70歳又は少なくとも80歳)のヒト被験者である。本発明の方法及び組成物は、生きた被験体をスクリーニング、診断及び治療するために有用であるだけでなく、例えば同病を発病するリスクのある被験体の家族のメンバーを同定するために、被験体の死後の診断のためにも使用してよい。

以下の定義は、本開示の概説の際の補助のために提供される。

【0033】

(5.1. 定義)

「診断」は、診断、予後、モニタリング、臨床試験の参加者を選択すること、特定の治療的処置に反応する可能性が最も高い患者を同定することをいう。「治療」は、療法、予防及び予防法をいう。

「薬剤」は、医薬組成物及び診断用組成物を調製するために使用してもよいが、又はこのような目的のために独立して使用してもよい化合物、核酸、ポリペプチド、断片、アイソフォーム若しくはその他の材料であってもよい全ての材料をいい、全てが本発明に従う。

。

10

20

30

40

50

【0034】

当該技術分野において使用されるように、並びに本明細書におけるその使用及び意味の一つの態様において、「タンパク質アイソフォーム」は、同じ遺伝子によってコードされるが、それらのpI若しくはMW又は両方が異なるポリペプチドの変異体をいう。このようなアイソフォームは、それらのアミノ酸組成が(例えば、選択的mRNA又はプレmRNAプロセッシング、例えば選択的スプライシング又は限定加水分解の結果として)異なることができ、及び加えて、又は代わりに、差動的翻訳後修飾(例えば、グリコシル化、アシル化、リン酸化)によって生じてよい。しかし、本明細書で使用される「タンパク質アイソフォーム」という用語には、予想されるポリペプチド/野生型ポリペプチドの両方及びそれらの任意の変異体を含むことに留意すべきである。

10

【0035】

「タンパク質アイソフォーム類似体」は、タンパク質アイソフォームと類似の、若しくは同一の機能を有するが、必ずしもタンパク質アイソフォームのアミノ酸配列と類似の若しくは同一のアミノ酸配列を含む必要はないポリペプチドか、又はタンパク質アイソフォームのものと類似の若しくは同一の構造を有するポリペプチドをいう。本明細書に使用されるポリペプチドのアミノ酸配列は、それが以下の基準の少なくとも1つを満足させる場合に、タンパク質アイソフォームのものと「類似」する：(a)ポリペプチドが、タンパク質アイソフォームのアミノ酸配列と少なくとも30%(より好ましくは、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも99%)同一であるアミノ酸配列を有する；(b)ポリペプチドが、タンパク質アイソフォームの少なくとも5アミノ酸残基(より好ましくは、少なくとも10アミノ酸残基、少なくとも15アミノ酸残基、少なくとも20アミノ酸残基、少なくとも25アミノ酸残基、少なくとも40アミノ酸残基、少なくとも50アミノ酸残基、少なくとも60アミノ酸残基、又は少なくとも70アミノ酸残基)をコードするヌクレオチド配列に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる；又は、(c)ポリペプチドが、タンパク質アイソフォームをコードするヌクレオチド配列と少なくとも30%(より好ましくは、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも99%)同一であるヌクレオチド配列によってコードされる。本明細書に使用される、タンパク質アイソフォームのものと「類似の構造」をもつポリペプチドは、タンパク質アイソフォームのものと類似の二次、三次又は四次構造を有するポリペプチドをいう。ポリペプチドの構造は、X線結晶学、核磁気共鳴及び結晶電子顕微鏡法を含むが、これらに限定されない当業者に公知の方法によって決定される。

20

30

【0036】

「タンパク質アイソフォーム融合タンパク質」は、(i)タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片のアミノ酸配列、及び(ii)異種ポリペプチド(すなわち、非タンパク質アイソフォーム、非タンパク質アイソフォーム断片又は非タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド)のアミノ酸配列を含むポリペプチドをいう。

40

【0037】

「タンパク質アイソフォーム相同体」は、タンパク質アイソフォームのものと類似のアミノ酸配列を含むポリペプチドをいうが、必ずしもタンパク質アイソフォームと類似の又は同一の機能を有する必要はない。

「タンパク質アイソフォーム相同分子種」は：(i)タンパク質アイソフォームのものと類似のアミノ酸配列を含み、及び(ii)タンパク質アイソフォームのものと類似の又は同一の機能を有する、非ヒトポリペプチドをいう。

「タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド」は、タンパク質アイソフォーム相同体、タンパク質アイソフォーム類似体、タンパク質アイソフォーム相同分子種又はその任意

50

の組合せをいう。

【0038】

「キメラ抗体」は、マウスmAbに由来するヒト免疫グロブリン定常領域及び可変領域を有するものなどの、異なる部分が異なる動物種に由来する分子をいう。(例えば、Cabillyらの米国特許第4,816,567号；及びBossらの米国特許第4,816397号；を参照され、これらは、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

「誘導体」は、アミノ酸残基置換、欠失又は付加の導入によって変化された第2のポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをいう。誘導体ポリペプチドは、第2のポリペプチドと類似の又は同一の機能を有する。

【0039】

「断片」は、第2のポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも5アミノ酸残基(好ましくは、少なくとも7、例えば、少なくとも10アミノ酸残基、少なくとも15アミノ酸残基、少なくとも20アミノ酸残基、少なくとも25アミノ酸残基、少なくとも40アミノ酸残基、少なくとも50アミノ酸残基、少なくとも60アミノ酸残基、少なくとも70アミノ酸残基)のアミノ酸配列を含むペプチド又はポリペプチドをいう。タンパク質アイソフォームの断片は、第2のポリペプチドの機能的活性を有していても、又は有していなくてもよい。

【0040】

「倍数変化」には、「倍数増大」及び「倍数減少」を含み、第2の試料(若しくは試料セット)と比較しての第1の試料若しくは試料セットにおけるタンパク質アイソフォームの存在量の相対的な増大若しくは減少、又は、ポリペプチドの発現若しくは活性の相対的な増大若しくは減少をいう。観察される増大又は減少は、使用される技術に応じて変化するであろうが、タンパク質アイソフォーム又はポリペプチドの倍数変化は、当業者に公知のいずれの技術によって測定してもよい。好ましくは、倍数変化は、下記「実施例」に説明されたようにここでは決定される。

【0041】

タンパク質アイソフォーム若しくはタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの発現又は活性に関して「調節する」とは、タンパク質アイソフォーム若しくはタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの発現のアップレギュレーション若しくはダウンレギュレーション、又は活性の刺激若しくは阻害をいう。当業者であれば、本開示に基づいて、このような調節を当業者に公知のアッセイ法によって決定することができることを理解するであろう。

【0042】

「神経疾患」は、発達異常、疾患、傷害又は毒素によって生じる中枢神経系の構造若しくは機能の障害として定義される。これには、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、及び鬱病(特に双極性II型鬱病)などの障害を含む。

「治療」は、予防法(予防)のための、又は患者が苦しめられている場合は虚弱若しくは疾病を治癒させるための、患者に対する医薬の投与又は医学技法の実行をいう。

【0043】

2つのアミノ酸配列の、又は2つの核酸配列のパーセント同一性は、一般に最適な比較目的のために配列を整列させて(例えば、配列を最良に整列するために、一次配列にギャップを導入することができる)、対応する位置にてアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較することによって決定することができる、又は決定される。「最良の整列」は、最良のパーセント同一性を生じる2つの配列の整列である。パーセント同一性は、比較される配列における同一のアミノ酸残基又はヌクレオチドの数(すなわち、%同一性=同一の位置の#/位置の合計#×100)によって決定される。

【0044】

2つの配列間のパーセント同一性の決定は、当業者に公知の数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。2つの配列を比較するための数学的アルゴリズムの例には、Karlin及びAltschulの文献、(1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268のアルゴリズム、Karlin及びAltschulの文献、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5

10

20

30

40

50

877のような修飾されたものがある。Altschulらの文献、(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410のNBLAST及びXBLASTプログラムには、このようなアルゴリズムが組み込まれている。本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得るために、NBLASTプログラム、スコア=100、語長=12でBLASTヌクレオチド検索を行うことができる。本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得るために、BLASTタンパク質検索をXBLASTプログラム、スコア=5、語長=3で行うことができる。比較目的のためにギャップがある整列を得るためには、Altschulらの文献、(1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載されているようなGapped BLASTを利用することができる。或いは、分子間の距離関係を検出する繰り返し検索を行うために、PSI-Blastを使用することができる(同上)。BLAST、Gapped BLAST及びPSI-Blastプログラムを利用するとき、それぞれのプログラム(例えば、XBLAST及びNBLAST)のデフォルトパラメータを使用することができる。http://www.ncbi.nlm.nih.gov.を参照されたい。

10

【0045】

配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの別の例は、Myers及びMillerによるCABIOS (1989)のアルゴリズムである。GCG配列整列ソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)には、このようなアルゴリズムが組み込まれている。当該技術分野において公知の配列分析のためのその他のアルゴリズムは、Torellis及びRobbottの文献、(1994) Comput. Appl. Biosci., 10:3-5に記載されているADVANCE及びADAM; Pearson及びLipmanの文献、(1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444-8に記述されたFASTAを含む。FASTA内で、ktupは、検索の感度及び速度を設定する制御オプションである。

20

【0046】

本明細書に使用される「二次元電気泳動」(2D電気泳動)には、等電点電気泳動と、それに続く及び変性電気泳動を含む技術を意味し;これにより、複数の分離されたタンパク質を含む二次元ゲル(2Dゲル)が生じる。好ましくは、変性電気泳動する工程には、ドデシル硫酸ナトリウムの存在下におけるポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)を使用する。特に好ましいのは、両方とも1997年12月1日に出願された国際出願番号97GB3307(WO98/23950として公開)、及び米国特許第6,064,754号(これらのそれぞれは、その全体が引用により本明細書に組み込まれ、ページ23-35のプロトコールを特に参照されたい)に記述された高度に正確かつ自動化可能な方法及び装置(「好ましい技術」)である。簡潔には、好ましい技術では、生体試料中の生体分子(例えば、糖タンパク質を含むタンパク質)を同定し、選択し、及び特徴づけるための効率的な、コンピューターを利用した方法及び装置を提供する。これらの電気泳動移動度及び等電点に従って二次元ゲル上で生体分子を分離することによって二次元アレイを作製する。二次元のアレイにおいて検出される複数の生体分子の同一性、見かけ上の分子量、等電点及び相対的存在量を表す、コンピューターで作製したアレイのデジタルプロフィールを作製し、これにより複数の生体試料からのプロフィールのコンピューターを媒介した比較、並びに分離された利益対象のタンパク質のコンピューター支援切除が可能になる。

30

【0047】

蛍光標識されたタンパク質を検出するための特別のスキヤナーは、WO96/36882に、及びDavid A. Basiji博士、表題「内部反射オプティクス及び位相感受性検出(総内部反射、電気泳動)を使用する高スループット蛍光スキヤナーの開発(Development of a Highthroughput Fluorescence Scanner Employing Internal Reflection Optics and PhaseDetection (Total Internal Reflection, Electrophoresis))」のワシントン大学国際学位論文要旨集(1997)の58/12-B巻、6686ページに記載されており、その各々の内容は、引用により本明細書に組み込まれる。これらの文書は、高速にて自動化された、統合された操作のために特異的にデザインされたイメージスキヤナーを記述する。スキヤナーは、蛍光色素又は銀染色液、並びに貯蔵蛍光スクリーンで染色されたゲルのイメージをとることができる。Basijiの学位論文は、調整された蛍光をレーザー散乱又は均一な蛍光によるベースラインノイズと区別するための位相敏感検波系を提供するが、本スキヤナーは、非位相敏感様式で

40

50

も作動することができる。この位相敏感検波能は、従来の蛍光イメージングシステムと比較して、1桁以上まで機器の感度を増大させるだろう。感度の増大により、上流の機器に対する試料調製負荷が減少すると共に、イメージ品質の増強により、その過程の下流でのイメージ分析が単純化する。

【0048】

より高度に好ましいスキャナーは、上記したスキャナーの変更バージョンであるApollo 2スキャナー(Oxford Glycosciences社, オックスフォード, UK)である。Apollo 2スキャナーでは、ゲルは、精密親ねじ駆動システム上のスキャナーを通して輸送される。これは、Basijiの学位論文に記述されたベルト駆動系の上にガラス板を敷設することにより、イメージング光学系を越えて正確にゲルを輸送する再現性のある手段を提供するので、これは好ましい。

10

【0049】

Apollo 2スキャナーでは、ゲルを、公知の位置にガラス板をしっかりと保持する3つのアライメントに対して固定させる。上記の精密輸送系と組合せてこれを行うことにより、ゲルの絶対位置を予測し、及び記録することができる。これにより、ゲル上のそれぞれの特徴の座標をより正確に決定し、所望の場合、特徴の切除のための切断ロボットに伝達することができるように保証する。Apollo 2スキャナーでは、ゲルを保持するキャリアは、イメージ形状を修正するために使用するための4つの一体となった蛍光マーカを有する。これらのマーカは、走査が正確に行われたことを確認する品質管理機能である。

【0050】

20

Basijiの学位論文に記述されたスキャナーと比較して、Apollo 2スキャナーの光学部品は、反転されていた。Apollo 2スキャナーでは、レーザー、鏡、導波管及びその他の光学部品が走査されるガラス板の上にある。Basijiの学位論文に記述されたスキャナーは、これらの構成成分を下に有する。Apollo 2スキャナーでは、光路がガラス板を通ったままであるように、ガラス板がスキャナゲル側下方に載置されている。こうすることによって、ガラス板から壊れて離れるであろうゲルのいずれの粒子も、オブティクス内よりもむしろ機器の底部の上に落下する。これにより、系の機能に影響を及ぼすことはなく、その信頼性を増加させる。

【0051】

30

更に好ましいのは、信号出力が、全くピーク飽和することなく、又はシグナルの二乗根コード化もなく、完全な16ビットデータにデジタル化される、Apollo 3スキャナーである。また、走査ビームの経路に沿って検出感度の何らかの変動を補正するために、補正アルゴリズムも適用されている。この変動は、オブティクスの異常及び導波管全体の収集効率の相違によるものである。較正は、全体に均一な蛍光をもつパースペックスプレートを使用して行われる。このプレートのスキャンにから受けたデータを使用して、それぞれの画素レベルから目標レベルにシグナルを増やすために必要な増倍率を決定する。次いで、これらの要素をゲルのその後のスキャンに使用して、あらゆる内部の光学的変動を除く。

【0052】

40

「特徴」とは、2Dゲルで検出される点をいい、「本発明のタンパク質アイソフォームと関連した特徴」という用語は、神経疾患がない被験体由来の試料(例えば、CSFの試料)と比較して、神経疾患を有する被験体由来の試料(例えば、CSFの試料)において差動的に存在する特徴をいう。本明細書に使用される特徴(又はタンパク質アイソフォーム)は、特徴又はタンパク質アイソフォームを検出するための方法(例えば、2D電気泳動法又は免疫アッセイ法)が、第1及び第2の試料に適用したときに異なるシグナルを与えるときに、第2の試料に関して第1の試料中に「差動的に存在する」。特徴又はタンパク質アイソフォームは、特徴若しくはタンパク質アイソフォームが第2の試料におけるよりも第1の試料において豊富なことを示す場合、又は特徴若しくはタンパク質アイソフォームが第1の試料において検出可能であり、かつ第2の試料において実質的に検出不可能である場合に、第2の試料に関して第1の試料において「増大」されている。逆に、特徴又はタンパク質アイソフォームは、特徴若しくはタンパク質アイソフォームが第2の試料におけるよりも第1の試料

50

において豊富ではないことを示す場合、又は特徴若しくはタンパク質アイソフォームが第1の試料において検出不可能であり、かつ第2の試料において検出可能である場合に、第2の試料に関して第1の試料において「減少」されている。

【0053】

特に、2つの試料における特徴の相対的存在量は、2工程で、その規準化されたシグナルを基準として決定される。最初に、試料における特徴を検出することにより得られたシグナルを、適切な背景パラメーター、例えば(a)解析される試料の総タンパク質(例えば、ゲル上に添加される総タンパク質)に対して；又は(b)より好ましくは、試料における全てのタンパク質のそれぞれの合計として検出される総シグナルに対して；参照することにより規準化される。

10

【0054】

第2に、第2の試料に関して第1の試料(又は試料セット)において「差動的に存在する」特徴を同定するために、1つの試料又は試料セットにおける特徴に対して規準化したシグナルを、別の試料又は試料セットにおける同じ特徴に対して規準化したシグナルと比較する。

【0055】

本明細書に使用される脳脊髄液(CSF)は、『医学実務における生理学的基礎(Physiological Basis of Medical Practice)』(J.B.West編集、William and Wilkins, ボルチモア, MD 1985)に記載されているように、中枢神経系の大部分を囲む液体をいう。CSFには、心室CSF及び腰椎CSFを含む。

20

被験体由来の脳組織の試料は、例えば、被験体の側頭葉から得ることができる。

「被験体」という言及は、典型的には、ヒト被験体を意味する。

【0056】

(5.2本発明のタンパク質アイソフォーム)

本発明の一つの態様において、神経疾患のスクリーニング、治療又は診断のための本発明のタンパク質アイソフォームと関連した1つ以上の特徴の発現を検出又は定量化するために、二次元電気泳動を使用して、被験体、好ましくは生きた被験体からのCSF又は脳組織を解析する。

本発明の態様に従って、本明細書に開示した本発明の新たなタンパク質アイソフォームと関連した特徴は、神経疾患を有する被験体由来のCSF及び/又は脳組織試料を試料神経疾患がない被験体由来のCSF及び/又は脳組織に対して比較することによって同定された。神経疾患がない被験体には、公知の疾患又は状態をもたない被験体(健康人)を含む。

30

【0057】

本発明の新たなタンパク質アイソフォームは全て、前駆体タンパク質：SwissProtアクセス番号：Q9BZG9をもつLy-6/神経毒-様タンパク質1(LYNX1遺伝子産物)(<http://www.expasy.org>にて入手できる)に由来する。この前駆体タンパク質のアミノ酸配列は、図1に図示してあり(同じく配列番号:1参照のこと)、推定されたシグナルペプチド及びC-terプロペプチドには、下線を引いてある。推定シグナルペプチドは、配列番号:1の残基1-20である。成熟タンパク質は、配列番号:1の残基21-93である。C-terプロペプチドは、配列番号:1の残基94-116である。

40

【0058】

「前駆体タンパク質Ly-6に由来した」は、そのタンパク質アイソフォームが典型的には、配列番号:1に対応するアミノ酸又はそれらの断片のその変異体(変異体の断片を含む)を有することを意味する。変異体は、参照として配列番号:1を用い、配列番号:1と70%又はそれよりも多い、例えば75%又はそれよりも多い、例えば80%又はそれよりも多い、例えば85%又はそれよりも多い、特に90%又はそれよりも多い、若しくは95%又はそれよりも多い、例えば99%又はそれよりも多い配列同一性を有するタンパク質を含む。特異的変異体は、参照として配列番号:1のタンパク質を用い、配列番号:1の残基21-93と70%又はそれよりも多い、例えば80%又はそれよりも多い、特に90%又はそれよりも多い、若しくは95%又はそれよりも多い、例えば99%又はそれよりも多い配列同一性を有するタンパク質

50

を含む。断片は、長さが7又はそれよりも長いアミノ酸、例えば10又はそれよりも長いアミノ酸、例えば15又は20又は25又は40又は50又は60又は70又はそれよりも長いアミノ酸の断片を含む。

【0059】

本発明の新たなタンパク質アイソフォームの存在量は、驚くべきことに、正常対照及び神経疾患の患者の健康状態と相関されることが見いだされた。例えば、図2は、正常対照のCSF、及び8種の異なる神経疾患に冒された8群の患者のCSFにおける本発明の好ましいタンパク質アイソフォームの相対的存在量を図示する。好ましいタンパク質アイソフォームの存在量の増加は、以下の疾患において認められる：パーキンソン病、多発性硬化症、及び双極性II型鬱病。

10

加えて、図3は、正常対照及びAD患者のCSFにおける本発明の好ましいタンパク質アイソフォームの相対的存在量を図示する。ここでも再度、疾患試料中において増加した存在量のタンパク質アイソフォームが観察される。

最後に、本発明のタンパク質アイソフォームは、AD患者の多くの側頭葉組織の1Dゲル分析によっても検出されたが、非-認知症対照の脳組織からは一度も検出されなかった。

【0060】

下記表Iは、脳脊髄液及び脳組織において同定された本発明の代表的タンパク質アイソフォームを例示している。CSFは2Dゲルにより分析され、従って表Iは、これらのpI及びMWの両方の登録を報告しているのに対し、脳組織は、1Dゲルにより分析され、そのため対応する登録は、確定されたpIを有さない。

20

【0061】

【表1】

表I:

組織	pI	MW (Da)	トリプシン処理配列 [配列番号]	タンパク質アイソフォーム番号
CSF	6.72	27959	CFETVYDGYSK [2]	1
CSF	7.25	12234	TYYPTR [3]	2
CSF	8.13	11768	TYYPTR [3], CFETVYDGYSK [2]	3
側頭葉		18171	TYYPTR [3]	4
側頭葉		17391	TYYPTR [3]	5
側頭葉		17980	TYYPTR [3]	6

30

【0062】

本発明の好ましいタンパク質アイソフォームは、pI約8.13及び分子量約11768Daを有する、CSFから同定されたタンパク質アイソフォームである。このタンパク質アイソフォームは典型的には、配列番号2及び3の配列を含む。

40

別の本発明のタンパク質アイソフォームは、pI約7.25及び分子量約12234Daを有する、CSFから同定されたタンパク質アイソフォームである。このタンパク質アイソフォームは典型的には、配列番号:3の配列を含む。

別の本発明のタンパク質アイソフォームは、pI約6.72及び分子量約27959Daを有する、CSFから同定されたタンパク質アイソフォームである。このタンパク質アイソフォームは典型的には、配列番号:2の配列を含む。

【0063】

別の本発明のタンパク質アイソフォームは、分子量約18171Daを有する、側頭葉から同定されたタンパク質アイソフォームである。このタンパク質アイソフォームは典型的には

50

、配列番号:3の配列を含む。

別の本発明のタンパク質アイソフォームは、分子量約17391Daを有する、側頭葉から同定されたタンパク質アイソフォームである。このタンパク質アイソフォームは典型的には、配列番号:3の配列を含む。

別の本発明のタンパク質アイソフォームは、分子量約17980Daを有する、側頭葉から同定されたタンパク質アイソフォームである。このタンパク質アイソフォームは典型的には、配列番号:3の配列を含む。

【0064】

特に本発明のタンパク質アイソフォームのタンパク質前駆体(LYNX1タンパク質)は、ニコチン性アセチルコリン受容体に結合し(Ibanez-Tallon I.らの文献, 2004, Neuron, 43, 305311)、それらを調節する(ニコチン受容体電流を増強するように(Miwa JM,らの文献, (1999), Neuron, 23, 105114))ことが示されている。本発明のタンパク質アイソフォームは、脳のCA-1領域が冒されるアルツハイマー病症例において劇的に差動的に発現されることがわかり; 並びに、Fabian-Fineらは、海馬のCA1領域の7ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニットの局在を明らかにした(Fabian-Fine R.らの文献, J. of Neuroscience, 2001, 21(20):79938003)。

【0065】

任意の所与のタンパク質アイソフォームについて、神経疾患を有する被験体由来の試料を解析することにより得られるシグナルは、神経疾患がない被験体由来の同試料を解析することにより得られたシグナルと比較して、使用される特定の解析プロトコール及び検出技術に依存する。従って、当業者であれば、本記述に基づき、いずれの研究室でも、使用の際の解析プロトコール及び検出技術に従って、神経疾患がない被験体における任意のタンパク質アイソフォームについての適切な基準範囲を確立することができることを理解するであろう。特に、解析される試験試料のそれぞれのバッチには、神経疾患を有することが公知の被験体由来の少なくとも1つの陽性対照タンパク質アイソフォーム試料、又は神経疾患がないことが公知の被験体由来の少なくとも1つの陰性対照タンパク質アイソフォーム試料(及びより好ましくは陽性及び陰性対照試料の両方)が含まれる。一つの実施態様において、特徴の発現レベルは、バックグランド値に相対的に決定され、これは、(a)領域において問われる特定の特徴と同等である、及び(b)実質的に識別可能なタンパク質特徴を含まない、イメージの近位の領域から得られるシグナルのレベルとして定義される。

【0066】

当業者であれば容易に認識するであろうとおり、測定される所与の特徴又はタンパク質アイソフォームのMW及びpIは、2D電気泳動法のそれぞれの工程のために、及びランダムマークマッチングのために使用される正確なプロトコールに応じて、ある程度変化するのである。本明細書に使用される、「MW」及び「pI」という用語は、それぞれ下記の第6節において同定される参照プロトコールに従って慎重に測定される特徴又はタンパク質アイソフォームのダルトンでの見かけ上の分子量及び見かけ上の等電点を意味すると定義される。参照プロトコールを行うとき、及び試料が2回反復又はそれより多い回数での反復で実行されるときに、測定されるタンパク質アイソフォームの平均のpIの変動は典型的には3%未満であり、及び測定されるタンパク質アイソフォームの平均MWの変動は典型的には5%未満である。当業者が参照プロトコールからの派生を望む場合、(a)参照プロトコールによって、(b)派生法によって、検出されるそれぞれのタンパク質アイソフォームについてMW及びpIを比較する較正実験を行うべきである。

【0067】

本発明のタンパク質アイソフォームは、例えば検出、治療、診断若しくは薬物開発又は医薬製品のために使用することができる。本発明の一つの実施態様において、被験体(例えば、神経疾患を有することが疑われる被験体)由来のCSF又は脳生検を、本発明のタンパク質アイソフォームの定量的検出のために、2D電気泳動法によって解析する。神経疾患のない被験体又は被験体群由来のCSF又は脳生検(例えば、対照試料又は前もって決定された基準範囲)に比較しての、被験体由来のCSF又は脳生検における本発明のタンパク質アイソ

10

20

30

40

50

フォームの存在量の増加は、神経疾患の存在を示す。

好ましい実施態様において、被験体由来のCSF又は脳生検を、複数のタンパク質アイソフォームの定量的検出のために解析する。

【0068】

従って本発明に従い、本発明者らは、被験体における神経疾患のスクリーニング又は診断又は予後の方法、被験体におけるそのような神経疾患の段階又は重症度を決定する方法、そのような神経疾患を発病するリスクのある被験体を同定する方法、又はそのような神経疾患を有する被験体へ投与される療法の作用をモニタリングする方法を提供し、該方法は：

(a)被験体由来の体液又は組織の試験試料を分析することであり、該試料が表1に列記されたタンパク質アイソフォームから選択された少なくとも1種のタンパク質アイソフォームを含むこと；及び

(b)試験試料中の該タンパク質アイソフォーム(群)の存在量を、神経疾患を有さない1名以上由来の試験試料中の該タンパク質アイソフォーム(群)の存在量、又は神経疾患のない被験体においてそのタンパク質アイソフォームについて前もって決定された基準範囲と比較すること；を含み、ここで診断又はスクリーニングにおける陽性結果又は該神経疾患のより進行した状態の予後は、試験試料中の該タンパク質アイソフォーム(群)の存在量の、神経疾患のない1名以上由来の試験試料中の該タンパク質アイソフォーム(群)の存在量、又は神経疾患のない被験体においてそのタンパク質アイソフォームについて前もって決定された基準範囲と比べた、増加で示される。

【0069】

試料は好都合なことに、体液、例えば尿、より好ましくは血液(又は血清)の試料、更に特定するとCSF又は脳組織の試料である。

工程(a)の分析は好都合なことに、特徴の二次元アレイを作製する、二次元電気泳動により実行される。例えばこれは、等電点電気泳動、それに続くドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)を含んでよい。

【0070】

工程(b)は好都合なことに、タンパク質アイソフォーム(群)の定量的検出を含む。好適な定量的検出は、(a)予め選択されたタンパク質アイソフォームに免疫特異的である抗体(又はアフィニティーなどのその他の親和性試薬)により一定分量を接触させること；並びに、(b)抗体及び一定分量中の少なくとも1つの種の間で起きた結合を定量的に測定することにより、少なくとも1種の一定分量の試料を試験することを含む。好都合なことに抗体はモノクローナル抗体である。複数の一定分量を、複数の抗体(例えば、モノクローナル抗体)により試験することができる。

「定量的検出」は、絶対的定量的検出に加え、標準に対し又は他の試料に対し定量的な検出を包含している。

【0071】

本発明のこの局面を実行する別の様式において、本発明者らは、被験体の神経疾患をスクリーニング又は診断又は予後する方法、被験体におけるそのような神経疾患の段階又は重症度を決定する方法、そのような神経疾患を発症するリスクのある被験体を同定する方法、若しくはそのような神経疾患を有する被験体へ投与される療法の作用をモニタリングする方法を提供し、該方法は：

試験被験体のCSF又は脳組織中の該タンパク質アイソフォーム(群)の存在量を、神経疾患のない1名以上のCSF又は脳組織中の該タンパク質アイソフォーム(群)の存在量、又は神経疾患のない被験体においてそのタンパク質アイソフォームについて前もって決定された基準範囲と比較すること；を含み、ここで診断又はスクリーニングにおける陽性結果又は該神経疾患のより進行した状態の予後は、試験被験体のCSF又は脳組織中の該タンパク質アイソフォーム(群)の存在量の、神経疾患のない1名以上のCSF又は脳組織中の該タンパク質アイソフォーム(群)の存在量、又は神経疾患のない被験体においてそのタンパク質アイソフォームについて前もって決定された基準範囲と比べた、増加で示される。

【0072】

CSF又は脳組織中のタンパク質アイソフォームの存在量は、以下に考察されるようなイメージング技術により適宜決定することができる。例えば、存在量は、全脳又は領域、例えば海馬CA-1領域の脳組織において決定される。

一つの実施態様において、神経疾患はアルツハイマー病である。別の実施態様において、神経疾患はパーキンソン病である。別の実施態様において、神経疾患は多発性硬化症である。別の実施態様において、神経疾患は、鬱病、特に双極性II型鬱病である。

【0073】

一つの実施態様において、タンパク質アイソフォーム(又はタンパク質アイソフォーム群の一つ)は、表1の第一の登録により規定されたタンパク質である。別の実施態様において、タンパク質アイソフォーム(又はタンパク質アイソフォーム群の一つ)は、表1の第二の登録により規定されたタンパク質である。別の実施態様において、タンパク質アイソフォーム(又はタンパク質アイソフォーム群の一つ)は、表1の第四の登録により規定されたタンパク質である。別の実施態様において、タンパク質アイソフォーム(又はタンパク質アイソフォーム群の一つ)は、表1の第五の登録により規定されたタンパク質である。別の実施態様において、タンパク質アイソフォーム(又はタンパク質アイソフォーム群の一つ)は、表1の第六の登録により規定されたタンパク質である。好ましい実施態様において、タンパク質アイソフォーム(又はタンパク質アイソフォーム群の一つ)は、表1の第三の登録により規定されたタンパク質である。

【0074】

上に示したように、タンパク質アイソフォームは、アイソフォームが神経疾患と関連したことが以前から知られていなかった公知のタンパク質の新たなアイソフォームである。加えて、それぞれのタンパク質アイソフォームについて、本発明は：(a)製剤、例えば単離されたタンパク質アイソフォームを含む医薬製剤；(b)製剤、例えばタンパク質アイソフォームの1つ以上の断片を含む医薬製剤；及び(c)前記タンパク質アイソフォームに、前記断片に、又は前記タンパク質アイソフォームと前記断片の両方に結合する抗体(又は、アフィポディーなどのその他の親和性試薬)を提供する。本明細書に使用されるタンパク質アイソフォームは、その他のタンパク質が実質的に存在しない、すなわち存在する総タンパク質の10%未満(特に、5%未満、特に1%未満)が混入タンパク質(類)である製剤のときに、「単離されている」。別のタンパク質は、2D電気泳動法によって測定すると単離されたタンパク質アイソフォームのものとは有意に異なるpI又はMWを有するタンパク質又はタンパク質アイソフォームである。本明細書に使用される「有意に異なる」pI又はMWは、参照プロトコールに従って行われる2D電気泳動法で、その他のタンパク質をタンパク質アイソフォームから分解することができるものである。

【0075】

一つの実施態様において、タンパク質アイソフォームに関して表1で同定されるアミノ酸配列をもつペプチドを含む単離されたタンパク質であって、タンパク質アイソフォームに関しての表1で同定される値の10%以内の(特に5%以内の、さらに特に1%以内の)pI及びMWを有する前記タンパク質を提供する。

【0076】

本発明のタンパク質アイソフォームは、本明細書に記述した好ましい技術、キナーゼアッセイ法、酵素アッセイ法、結合アッセイ法及びその他の機能的アッセイ法、免疫アッセイ法及びウエスタンブロッティング法を含むが、限定されない任意の当業者に公知の方法によって、定性的又は定量的に検出することができる。一つの実施態様において、タンパク質アイソフォームは、そのMW及びpIによって二次元ゲル上で分離して、ゲルを染色することによって視覚化される。一つの実施態様において、タンパク質アイソフォームは、蛍光色素で染色し、蛍光スキャナーでイメージングされる。Sypro Red(Molecular Probes社、ユージーン、Oregon)は、この目的に適した色素である。代替りの色素には、1999年10月5日に出願のUSSN 09/412,168に開示されており、その全体は引用により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0077】

或いは、タンパク質アイソフォームは、免疫アッセイ法で検出することができる。一つの実施態様において、免疫アッセイ法は：タンパク質アイソフォームが存在する場合に免疫特異的結合を生じることができる条件下で、試料を抗タンパク質アイソフォーム抗体(又はアフィポディーなどのその他の親和性試薬)と接触させること；及び抗体による任意の免疫特異的結合の量を検出又は測定すること；によって行われる。抗タンパク質アイソフォーム抗体は、本明細書に記述した方法及び技術によって產生することができる。特に、抗タンパク質アイソフォーム抗体は、優先して、同じタンパク質のその他のアイソフォームに対するよりもむしろタンパク質アイソフォームに対して結合する。特定の実施態様において、抗タンパク質アイソフォーム抗体は、同じタンパク質の前記その他のアイソフォームに対して少なくとも2倍よりも高い親和性で、特に少なくとも5倍よりも高い親和性で、更に特に少なくとも10倍よりも高い親和性で、タンパク質アイソフォームと結合する。

10

【0078】

タンパク質アイソフォームは、ゲルから適切な膜(例えば、PVDF膜)に転写して、その後、ウエスタンブロットなどの技術を使用する競合的及び非競合的アッセイ系、並びに本明細書に記述したような抗タンパク質アイソフォーム抗体(又はアフィポディーなどの他の親和性試薬)又は本記述に基づいて当業者が理解するであろうような関心対象のタンパク質アイソフォームに対して生じたその他のものを使用する「サンドイッチ」免疫アッセイ法を含むが、これらに限定されない適切なアッセイ法でプローブすることができる。免疫ブロットは、同じ遺伝子によってコードされるその他のアイソフォーム由来のタンパク質アイソフォームを免疫特異的に区別するために必要な選択性を示す抗タンパク質アイソフォーム抗体を同定するために使用することができる。

20

【0079】

一つの実施態様において、組織切片における抗体(又はアフィポディーなどのその他の親和性試薬)の結合を使用して、タンパク質アイソフォーム局在又は1つ以上のタンパク質アイソフォームのレベルを検出することができる。具体的実施態様において、タンパク質アイソフォームに対する抗体を使用して、タンパク質アイソフォームの実質的なレベル変化が神経疾患を指し示すタンパク質アイソフォームのレベルについて、被験体由来の組織試料(例えば、脳生検)をアッセイすることができる。本明細書に使用される「実質的なレベル変化」は、神経疾患がない被験体におけるレベル又は参照レベルと比較して増減されるレベルを意味する。所望の場合、神経疾患による影響を受けない身体部分から採取された同じ被験体由来の対応した試料と比較を行うことができる。

30

【0080】

ウエスタンブロット法、放射免疫アッセイ法、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、「サンドイッチ」免疫アッセイ法、免疫沈降アッセイ法、沈降反応法、ゲル拡散沈降反応法、免疫拡散法アッセイ法、凝集アッセイ法、補体結合アッセイ法、免疫放射線アッセイ法、蛍光免疫法及びプロテインA免疫アッセイ法などの技術を使用する競合的及び非競合的アッセイ系を含むが、これらに限定されない任意の適切な免疫アッセイ法を使用して、タンパク質アイソフォームを検出することができる。

40

【0081】

例えば、タンパク質アイソフォームは、二段階サンドイッチアッセイ法により、流体試料(例えば、CSF、血液、尿又は組織ホモジネート)において検出することができる。最初の工程では、タンパク質アイソフォームを捕獲するために、捕獲試薬(例えば、抗タンパク質アイソフォーム抗体又はアフィポディーなどの他の親和性試薬)を使用する。捕獲試薬は、任意に固相上に固定することができる。第2工程では、直接又は間接的に標識された検出試薬を使用して、捕獲されたタンパク質アイソフォームを検出する。一つの実施態様において、検出試薬は、レクチンである。このタンパク質アイソフォームと同じコアタンパク質を有するその他のアイソフォームに対して、又は抗体によって認識される抗原決定基を共有するその他のタンパク質に対してよりもむしろこのタンパク質アイソフォーム

50

に優先して結合するレクチンは、この目的のために使用することができる。好ましい実施態様において、選ばれたレクチンは、このタンパク質アイソフォームと同じコアタンパク質を有する前記その他のアイソフォームに対して、又は抗体によって認識される抗原決定基を共有する前記その他のタンパク質に対してよりも少なくとも2倍高い親和性で、より好ましくは少なくとも5倍高い親和性で、更により好ましくは少なくとも10倍高い親和性で、このタンパク質アイソフォームと結合する。本記述に基づいて、所与のタンパク質アイソフォームを検出するために適したレクチンは、当該技術分野において周知技術の方法を使用して、例えばSumarらの文献、『疾患に関連した糖型の指標としてのレクチン(Lectins as Indicators of Disease-Associated Glycoforms)』、Gabius H-J & Gabius S(編集)、1993、『レクチン及び糖鎖生物学(Lectins and Glycobiology)』、158-174ページ中(これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる)のページ158~159の表1に列挙された1つ以上レクチンを試験することによって容易に同定することができる。所望のオリゴ糖特異性をもつレクチンは、例えば2Dゲルにおいて、ニトロセルロース膜などの適切な固体基質への転写後の2Dゲルのレプリカにおいて、又は抗体による捕獲後の二段階アッセイ法において、これらがタンパク質アイソフォームを検出する能力によって同定することができる。代替の実施態様において、検出試薬は、抗体、例えばリン酸化されたアミノ酸と免疫特異的に結合する抗体などのその他の翻訳後修飾を免疫特異的に検出する抗体である。このような抗体の例には、ホスホチロシンと結合するもの(BD Transduction Laboratory社、カタログ番号:P11230-050/P11230-150;P11120;P38820;P39020)、ホスホセリンと結合するもの(Zymed Laboratories社、サウスサンフランシスコ、CA、カタログ番号61-8100)及びホスホスレオニンと結合するもの(Zymed Laboratories社、サウスサンフランシスコ、CA、カタログ番号71-8200、13-9200)を含む。

10

20

30

40

50

【0082】

所望の場合、タンパク質アイソフォームをコードしている遺伝子、関連した遺伝子(例えば、配列相同性を有する遺伝子)、又は相補配列を含む関連した核酸配列若しくは部分配列もハイブリダイゼーションアッセイに使用することができる。タンパク質アイソフォームをコードするヌクレオチド又は少なくとも8ヌクレオチド、好ましくは少なくとも12ヌクレオチド及び最も好ましく少なくとも15ヌクレオチドを含むこれらの部分配列は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用することができる。ハイブリダイゼーションアッセイ法は、タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子の異常な発現と関連した状態、障害若しくは疾病状態の検出、治療、診断又はモニタリングのために、又は神経疾患の示唆的な徴候若しくは症候がある被験体の鑑別診断のために使用することができる。特に、このようなハイブリダイゼーションアッセイ法は：核酸を含む被験体の試料を、ハイブリダイゼーションを生じることができるような条件下で、タンパク質アイソフォームをコードするDNA又はRNAにハイブリダイズすることができる核酸プローブと接触させること、及び生じるハイブリダイゼーションを検出又は測定すること；を含む方法によって行うことができる。ヌクレオチドは、後述するように、神経疾患を有する被験体の療法のために使用することができる。

【0083】

また、本発明は、抗タンパク質アイソフォーム抗体(又はアフィポディーなどのその他の親和性試薬)を含む診断キットを提供する。加えて、このようなキットは、以下の1つ以上を任意に含んでもよい：(1)診断、予後、治療モニタリング又はこれらの適用の任意の適切な組合せに関して抗タンパク質アイソフォーム抗体を使用するための説明書；(2)抗体に対する標識された結合パートナー；(3)抗タンパク質アイソフォーム抗体が固定された固相(試薬ストリップなど)；及び(4)診断的、予後的若しくは治療的使用又は任意の適切なこれらの組合せに関して法的承認を示すラベル又は挿入。抗体に対する標識された結合パートナーが提供されない場合、抗タンパク質アイソフォーム抗体自体を検出可能なマーカー、例えば化学発光、酵素的、蛍光又は放射性的の部分で標識することができる。

【0084】

また、本発明は、タンパク質アイソフォームをコードするRNAにハイブリダイズするこ

とができる核酸プローブを含むキットを提供する。具体的実施態様において、キットは、1つ以上容器に、適切な反応条件下でポリメラーゼ連鎖反応法(例えば、Innisらの文献、1990、『PCR プロトコール(PCR Protocols)』, Academic Press社, サンディエゴ, CAを参照されたい)、リガーゼ連鎖反応(EP 320,308を参照されたい)、Q の使用、レプリカーゼ、環状プローブ反応又は当該技術分野において公知のその他の方法などによりタンパク質アイソフォームをコードする核酸の少なくとも一部の増幅を開始することができるプライマー対(例えば、それぞれ6~30ヌクレオチド、より好ましくは10~30ヌクレオチド、及び更に好ましくは10~20ヌクレオチドのサイズ範囲のもの)を含む。

【0085】

また、複数のタンパク質アイソフォーム又はそれぞれタンパク質アイソフォームをコードする複数の核酸の検出が可能なキットも提供される。キットには、例えば標準又は対照として使用するために、単離されたタンパク質アイソフォームタンパク質又はタンパク質アイソフォームをコードする核酸の予め定められた量を更に任意に含むことができる。

【0086】

(5.3 臨床研究における使用)

本発明の診断法及び組成物は、例えば神経疾患のための療法を評価して、臨床研究をモニターするのを補助することができる。一つの実施態様において、候補分子は、神経疾患がない被験体において、又は下記の薬物で治療された被験体に見いだされるレベルまで神経疾患を有する被験体におけるタンパク質アイソフォームレベルを回復する能力について試験される：例えば、下記薬剤を用いた鬱病の治療後である：気分安定剤 - リチウム、ジバルプロエクス、カルバマゼピン、ラモトリジン；抗鬱薬 - 三環系抗鬱薬(例えば、デシプラミン、クロルイミプラミン、ノルトリプチリン)、選択的セロトニン再取込み阻害薬(フルオキセチン(プロザック)、セルトラリン(ゾロフト)、パロキセチン(パキシル)、フルボキサミン(ルボックス)及びシタロプラム(セレкса)を含むSSRI)、MAOI、ブプロピオン(ウェルプトリン)、ベンラファキシン(エフェクサー)及びミルトラザピン(レメロン)；及び非定型抗精神病薬：クロザピン、オランザピン、リスペリドンである。レボドパ、抗コリン作用薬、ロピニロール、カテコール-0-メチルトランスフェラーゼ阻害剤、又はB型モノアミンオキシダーゼの阻害剤(セレギリン及びアマンタジン)を用いた、パーキンソン病の治療後。コリンエステラーゼ阻害剤を用いたアルツハイマー病の治療後。インターフェロン-1b(ベータセロン(登録商標)、ベータフェロン(登録商標))、インターフェロン-1a(アボネックス(登録商標)、レピフ(登録商標))、グラチラマーアセテート(コバキソン(登録商標))、静脈免疫グロブリンを用いた再発寛解型のMSの治療後、及び非神経障害値で又はその近くでタンパク質アイソフォームレベルを保持するための副腎皮質ステロイドを用いた急性の再発療法の治療後(Noseworthyの文献,(1999) Nature 399:suppl. A40-A47))。1つ以上のタンパク質アイソフォームのレベルをアッセイすることができる。

【0087】

別の実施態様において、本発明の方法及び組成物は、神経疾患を有する個体を同定するための臨床研究に入るための個体をスクリーニングするために使用され；次いで、すでに神経疾患を有する個体を研究から除外する、又は治療若しくは解析のための別のコホートに配置することができる。所望の場合、これらの候補は、特定の条件で個体を同定するために同時にスクリーニングすることができ；これらの選別のための手順は、当技術分野において周知である。

【0088】

好ましい実施態様において、本発明の方法及び組成物は、ニコチン性受容体経路に影響を及ぼす神経疾患及び治療の状況で使用される。このような治療には、例えば、経真皮ニコチンパッチの形のニコチン治療を含み、エクアドルのカエル*Epipedobates tricolor*の皮膚から単離されたニコチンアゴニストであるエピバチジン、ニコチンアゴニストABT-418、ABT-594、若しくはSIB-1508を基にすることができる。

【0089】

(5.4 タンパク質アイソフォームの精製)

特定の態様において、本発明は、単離された哺乳動物タンパク質アイソフォーム、好ましくはヒトタンパク質アイソフォーム、及び抗原決定基を含む(すなわち、抗体若しくはアフィビディーなどのその他の親和性試薬によって認識することができる)か、又はさもなくば機能的に活性のあるその断片、並びに前述のものをコードする核酸配列を提供する。本明細書に使用される「機能的に活性な」とは、完全長(野生型)タンパク質アイソフォームと関連した1つ以上の機能的な活性、例えばタンパク質アイソフォーム基質又はタンパク質アイソフォーム結合パートナーに対する結合、抗原性(抗タンパク質アイソフォーム抗体に対する結合)、免疫原性、酵素活性などを示す材料をいう。

【0090】

具体的実施態様において、本発明は、少なくとも5アミノ酸、少なくとも10アミノ酸、少なくとも50アミノ酸又は少なくとも75アミノ酸を含むタンパク質アイソフォームの断片を提供する。また、タンパク質アイソフォームの領域の一部又は全てを欠いている断片が提供され、このような断片を含むタンパク質(例えば、融合タンパク質)も提供される。上記のものをコードする核酸が提供される。

10

【0091】

タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームの一部、又はタンパク質アイソフォームの前駆体をコードする組換え核酸がいったん同定されると、該遺伝子産物を解析することができる。これは、例えば該産物の放射性標識と、それに続くゲル電気泳動、免疫アッセイ法などによる解析を含む、所与の産物の物理的又は機能的特性に基づいたアッセイ法によって、達成することができる。

20

【0092】

本明細書において同定されたタンパク質アイソフォームは、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー及びサイズカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、差動的溶解度を含む標準的方法、又はタンパク質の精製に関する他の標準技術のいずれかによって単離、及び精製することができる。

【0093】

或いは、一旦タンパク質アイソフォームをコードする組換え核酸が同定されると、タンパク質アイソフォームの全てのアミノ酸配列を、組換え核酸に含まれる遺伝子コード領域のヌクレオチド配列から推論することができる。その結果、タンパク質は、当該技術分野において公知の標準的化学法(例えば、Hunkapillerらの文献、1984, Nature 310:105-111を参照されたい)によって合成することができる。

30

別の代替的实施態様において、未変性のタンパク質アイソフォームは、上記のものなどの標準的方法(例えば、免疫親和性精製)によって、天然の供与源から精製することができる。

【0094】

好ましい実施態様において、タンパク質アイソフォームは、前述の好ましい技術によって単離される。分取スケールでの操作に関しては、Westermeyerの文献、1993、『電気泳動の実践(Electrophoresis in Practice)』(VCH、ワインハイム、独国)、197-209ページ(これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる)に記述された方法に従って、2 pH単位以下のpH範囲を有する狭い範囲の「ズームゲル」が等電点工程のためには好ましく；この修飾により、より大量の標的タンパク質をゲル上に添加することができ、これにより、ゲルから回収することができる単離されたタンパク質アイソフォームの量が増加される。分取スケール操作についてこのような方法を使用したときは、好ましい技術により、一回の操作において、典型的には100ngまでの単離されたタンパク質アイソフォームを提供し、1000ngまでの単離されたタンパク質アイソフォームを提供することができる。当業者であれば、ズームゲルを、ゲル等電点電気泳動を使用するいずれの分離戦略にも使用することができることを認識するであろう。

40

【0095】

従って、本発明は、単離されたタンパク質アイソフォーム、単離されたタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、及び単離されたタンパク質アイソフォーム又はタンパク質

50

アイソフォーム関連ポリペプチドの誘導体若しくは断片を提供し；前述のいずれも、組換えDNA技術によって、又は化学物質合成法によって産生することができる。

【0096】

(5.5 タンパク質アイソフォームをコードするDNAの単離)

タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子をクローニングするための詳細な実施態様を、限定ではなく例示手段として下記に示してある。

DNA及びRNAを含み、かつタンパク質アイソフォーム若しくはその断片又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードする配列を含む本発明のヌクレオチド配列は、従来の化学物質アプローチ又はポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)増幅を使用するなどの当該技術分野において公知の方法を使用して合成してもよい。また、例えば本発明のヌクレオチド配列は、cDNAライブラリー、ゲノムライブラリー又は発現ライブラリーをスクリーニングすることによるものを含む、タンパク質アイソフォーム相同体又はタンパク質アイソフォーム相同分子種をコードする遺伝子の同定及びクローニングができる。

10

【0097】

例えば、PCR技術によってタンパク質アイソフォームをコードする遺伝子をクローニングするために、アンカーされた縮重オリゴヌクレオチド(又は最も見込みのあるオリゴヌクレオチドのセット)を、同じタンパク質の一部として同定された全てのタンパク質アイソフォームペプチド断片についてデザインすることができる。種々の条件下でのPCR反応を、1つ以上の種に由来する関連したcDNA及びゲノムDNA(例えば、脳組織に由来又は免疫系の細胞に由来)で行うことができる。また、ベクトレット(vectorette)反応を、オリゴヌクレオチド(それは、好ましくは入れ子状態である)を使用して、任意の入手可能なcDNA及びゲノムDNAで上記のように行うことができる。ベクトレットPCRは、一方のプライマーのみの配列が公知である状況において、特異的DNA断片の増幅を可能にする方法である。従って、これは、配列情報が一端にて利用できるだけであるDNAのストレッチに対するPCRの適用を拡張する(Arnold Cの文献, 1991, PCR Methods Appl. 1(1): 39-42; Dyer KDの文献, Biotechniques, 1995, 19(4): 550-2)。ベクトレットPCRは、例えばゲノムライブラリー又はcDNAライブラリープールを鋳型として使用して、タンパク質アイソフォームペプチド断片をコードするアンカーされた縮重オリゴヌクレオチド(又は最も見込みのあるオリゴヌクレオチド)であるプローブで行ってもよい。

20

【0098】

アンカーされた縮重オリゴヌクレオチド(及び最も見込みのあるオリゴヌクレオチド)は、全てのタンパク質アイソフォームペプチド断片についてデザインすることができる。これらのオリゴヌクレオチドは、cDNA及びゲノムDNAライブラリーを含むフィルターに対して標識、及びハイブリダイズさせてよい。同じタンパク質由来の異なるペプチドに対するオリゴヌクレオチドは、ライブラリーの同じメンバーを同定することが多い。cDNA及びゲノムDNAライブラリーは、任意の適切な、又は所望の哺乳動物種、例えばヒトから得てもよい。

30

【0099】

本発明のタンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム断片をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列は、例えばこれらが、その他のタンパク質をコードする遺伝子の相補的ストレッチに選択的にハイブリダイズする能力にとって有用である。適用に応じて、種々のハイブリダイゼーション条件を使用して、タンパク質アイソフォームをコードするヌクレオチドの配列に対し、少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%若しくは99%同一の又は100%同一のヌクレオチド配列を得てもよい。

40

【0100】

高度な選択性に関して、二重鎖を形成するために、相対的にストリンジェントな条件(例えば、低い塩又は高温条件)が使用される。本明細書に使用される、「高度にストリンジェントな条件」は、65℃にて0.5M NaHPO₄、7%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1mM EDTAでのフィルターに結合したDNAに対するハイブリダイゼーション、及び68℃にて0.1×S

50

SC / 0.1% SDS中での洗浄を意味する (Ausubel F.M. ら編, 1989, 『分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)』, Vol.1, Green Publishing Associates社, 及びJohn Wiley & Sons社, ニューヨーク, 2.10.3頁; その全体は引用により本明細書に組み込まれる)。一部の適用については、二重鎖形成のためにあまりストリンジェントでない条件が必要とされる。本明細書に使用される、「適度にストリンジェントな条件」は、42℃にて0.2×SSC / 0.1% SDSにおいて洗浄することを意味する (Ausubel らの文献, 1989、上記)。また、ハイブリダイゼーション条件は、ホルムアミドの量を増加しつつ添加することによってよりストリンジェントにさせ、ハイブリッド二重鎖を不安定にすることができる。従って、特定のハイブリダイゼーション条件は、容易に操作することができ、一般に所望の結果に応じて選択される。一般に、50%のホルムアミドの存在下において便利なハイブリダイゼーション温度は：タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子の断片と95~100%同一であるプローブのためには、42℃; 90~95%の同一性のためには37℃; 及び70~90%の同一性のためには32℃; である。

10

20

30

40

50

【0101】

ゲノムライブラリーの調製において、DNA断片が生成され、そのうちの幾つかがタンパク質アイソフォームの一部又は全体をコードすると考えられる。DNA断片を調製するための任意の適切な方法を本発明に使用してもよい。例えば、DNAは、種々の制限酵素を使用して特異的部位にて切断してもよい。或いは、マンガンの存在下においてDNaseを使用してDNAを断片化してもよく、又は例えば超音波処理によってDNAを物理的に剪断することができる。次いで、DNA断片は、アガロース電気泳動法及びポリアクリルアミドゲル電気泳動法、カラムクロマトグラフィー並びにショ糖濃度勾配遠心法を含むが、これらに限定されない標準的技術によって、サイズに従って分離することができる。次いで、DNA断片は、プラスミド、コスミド、バクテリオファージ・ラムダ又はT4を含むが、これらに限定されない、適切なベクター、及び酵母人工染色体(YAC)に挿入することができる。(例えば、Sambrookらの文献, 1989, 『分子クローニング、実験室マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)』, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, コールドスプリングハーバー, NY; Glover, D.M. (編), 1985, 『DNAクローニング: 実用的アプローチ(DNA Cloning: A Practical Approach)』, MRL Press社, オックスフォード, U.K. Vol. 1, II; Ausubel F.M. ら編, 1989, 『分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)』, Vol. 1, Green Publishing Associates社, 及びJohn Wiley & Sons社, ニューヨークを参照されたい)。ゲノムライブラリーは、標識プローブに対する核酸ハイブリダイゼーションによってスクリーニングしてもよい(Benton 及び Davisの文献, 1977, Science, 196:180; Grunstein及びHognessの文献, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3961)。

【0102】

本記述に基づき、最適な当該技術分野において周知のアプローチを使用して、タンパク質アイソフォームの任意のペプチドのアミノ酸配列に対応する標識された縮重オリゴヌクレオチドプローブでゲノムライブラリーをスクリーニングしてもよい。使用される任意のプローブは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド又は少なくとも100ヌクレオチドである。好ましくは、プローブは、10ヌクレオチド以上、及びより好ましくは15ヌクレオチド以上である。

【0103】

任意のタンパク質アイソフォームについて、アクセッション番号によって先に記載した配列から得られる縮重プローブ又はプローブを、スクリーニングに使用してもよい。縮重プローブの場合、これらは、タンパク質アイソフォームのトリプシン消化ペプチドのタンデム質量スペクトルから得られる部分アミノ配列情報から構築することができる。このような遺伝子をスクリーニングするために、遺伝子又はその相補物に対して相補的な任意のプローブを使用してもよく; 好ましくは、プローブは、10ヌクレオチド以上、より好まし

くは15ヌクレオチド以上である。

【0104】

ライブラリーをスクリーニングするとき、関心対象のタンパク質アイソフォーム又はその断片をコードするDNAを挿入したクローンは、対応する縮重オリゴヌクレオチドプローブのセットの1つ以上のメンバー(又はこれらの相補物)にハイブリダイズすると考えられる。ゲノムライブラリーに対するこのようなオリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションは、当該技術分野において公知の方法を使用して行う。例えば、オリゴヌクレオチドプローブの上述した縮重セット又はこれらの相補物の1つと(又はこのようなセット又はその相補物の任意のメンバーと)のハイブリダイゼーションは、上記したとおりの高度にストリンジェント若しくは適度にストリンジェントな条件下で行うことができ、又は50 にて2×SSC、1.0%SDS中で実行可能であり、及び高度にストリンジェント又は適度にストリンジェントなハイブリダイゼーションに関しては、先に記述した洗浄条件を使用して洗浄することができる。

10

【0105】

本発明の更に別の態様において、タンパク質アイソフォーム全体、タンパク質アイソフォームの断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド若しくはタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片をコードするヌクレオチド配列又は前述いずれかを含むクローンは、また発現ライブラリーをスクリーニングすることによって得てもよい。例えば、関連した供与源由来のDNAを単離して、ランダムな断片を調製し、その結果発現ベクター(例えば、バクテリオファージ、プラスミド、ファージミド又はコスミド)に結合させ、ベクター内に挿入された配列は、その中にベクターが導入された宿主細胞によって発現可能である。次いで、種々のスクリーニングするアッセイ法を使用して、発現されたタンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドを選択することができる。一つの実施態様において、種々の本発明の抗タンパク質アイソフォーム抗体(又はアフィビディーなどの他の親和性試薬)を使用して、当該技術分野において公知の方法を使用して所望のクローンを同定することができる。例えば、Harlow及びLaneの文献、1988、『抗体：実験室マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual)』、Cold Spring Harbor Laboratory Press, コールドスプリングハーバー、NY、付録IVを参照されたい。ライブラリーからのコロニー又はプラークを抗体と接触させて、抗体に結合するクローンを同定する。

20

30

【0106】

ある実施態様において、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームの断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド若しくはタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片をコードするDNAを含むコロニー又はプラークは、Olsvickらの文献、第29回 ICAAC(29th ICAAC)、ヒューストン、TX、1989(引用により本明細書に組み込まれる)に従い、DYNAビーズを使用して検出することができる。抗タンパク質アイソフォーム抗体をトシル化されたDYNAビーズM280に架橋させ、次いで、これらの抗体含有ビーズを組換えポリペプチドを発現するコロニー又はプラークと接触させる。タンパク質アイソフォーム若しくはタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドを発現するコロニー又はプラークは、任意のビーズに結合するものとして同定される。

40

【0107】

或いは、抗タンパク質アイソフォーム抗体(又はアフィビディーなどの他の親和性試薬)は、シリカ又はセライト7樹脂などの適切な支持体に非特異的に固定することができる。次いで、この材料を、本明細書に記述したようにタンパク質アイソフォームタンパク質又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドを発現する細菌コロニーに吸着させるために使用する。

【0108】

別の態様において、PCR増幅を使用して、全てのタンパク質アイソフォームをコードする実質的に純粋なDNA(すなわち、実質的に混入する核酸を含まないDNA)又はその一部をゲノムDNAから単離してもよい。好ましくは、このようなDNAは、少なくとも95%純粋で、よ

50

り好ましくは少なくとも99%純粋である。本明細書に開示したタンパク質アイソフォームのペプチド配列に対応するオリゴヌクレオチド配列、縮重又はその他のものをプライマーとして使用することができる。

【0109】

PCRは、例えば、Perkin-Elmer Cetusサーマルサイクラー、及びTaqポリメラーゼ(Gene Amp7又はAmpliTaq DNAポリメラーゼ)を使用することによって行うことができる。PCR反応における使用に関して、いくつかの異なる縮重プライマーを合成するのに選択することができる。また、PCR反応のプライミングに使用されるハイブリダイゼーション条件のストリンジエンシーを変化させて、縮重プライマーとDNAの対応配列との間のヌクレオチド配列類似性の可能をより高く、又はより低くさせることができる。タンパク質アイソフォームをコードする配列のセグメントを無事に増幅した後、そのセグメントを分子的にクローニングし、及びシーケンスして、完全なゲノムクローンを単離するためのプローブとして利用してもよい。次に、これにより、遺伝子の完全なヌクレオチド配列の決定、その発現の解析及び以下に記述したような機能解析のためのそのタンパク質産物の産生が可能になる。

10

【0110】

また、タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子は、核酸ハイブリダイゼーションによるmRNA選択、続くインビトロでの翻訳によって同定することもできる。この手順では、ハイブリダイゼーションによって相補mRNAを単離するために、断片が使用される。このようなDNA断片は、入手可能な、別の種(例えば、マウス、ヒト)のタンパク質アイソフォームをコードする精製されたDNAであってもよい。単離されたmRNAの単離された産物のインビトロ翻訳産物の免疫沈降解析又は機能的アッセイ法(例えば、インビトロでの凝集能力；受容体に対する結合)により、従って、mRNA、及び所望の配列を含む相補DNA断片を同定する。加えて、細胞から単離されたポリソームの、タンパク質アイソフォームを特異的に認識する固定された抗体(又はアフィポディーなどの他の親和性試薬)に対する吸着により、特異的mRNAを選択してもよい。タンパク質アイソフォームをコードする放射標識されたcDNAは、鋳型として選択されたmRNA(吸着ポリソーム由来)を使用して合成することができる。次いで、放射標識されたmRNA又はcDNAをプローブとして使用して、その他のゲノムのDNA断片の中からタンパク質アイソフォームをコードするDNA断片を同定してもよい。

20

【0111】

タンパク質アイソフォームをコードするゲノムDNAを単離するための変形例には、公知の配列から遺伝子配列自体を化学的に合成すること、又はタンパク質アイソフォームをコードするmRNAに対するcDNAを作製することを含むが、これに限定されない。例えば、タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子のcDNAクローニングのためのRNAは、タンパク質アイソフォームを発現する細胞から単離することができる。当業者であれば、本記述から、その他の方法を使用してもよく、また本発明の範囲内であることを理解するであろう。

30

【0112】

任意の適切な真核細胞を、タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子の分子クローニングのための核酸供与源として役立てることができる。タンパク質アイソフォームをコードする核酸配列は、脊椎動物、哺乳動物、霊長類、ヒト、ブタ、ウシ、ネコ、トリ、ウマ、イヌ又はマウス供与源から単離することができる。DNAは、クローン化DNA(例えば、DNA「ライブラリー」)から当該技術分野において公知の標準的方法によって、化学合成によって、cDNAクローニングによって、又は所望の細胞から精製したゲノムDNA若しくはその断片のクローニングによって得てもよい。(例えば、Sambrookらの文献、1989、『分子クローニング、実験室マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)』, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, コールドスプリングハーバー, ニューヨーク; Glover, D.M. (編), 1985, 『DNAクローニング: 実用的アプローチ(DNA Cloning: A Practical Approach)』, MRL Press社, オックスフォード, UK, Vol. 1, IIを参照されたい)。ゲノムDNAに由来するクローンは、コード領域に加えて調節領域及びイントロンDNA領域

40

50

を含んでいてもよく；cDNAに由来するクローンでは、エキソン配列のみを含むと考えられる。

【0113】

次いで、同定され、及び単離された遺伝子又はcDNAは、任意の適切なクローニングベクターに挿入することができる。当該技術分野において公知の多数のベクター-宿主系を使用してもよい。当業者に公知のとおり、選択されるベクター系は、使用する宿主細胞に適合性であるべきである。このようなベクターには、ラムダ誘導体などのバクテリオファージ、PBR322若しくはpUCプラスミド誘導体又はBluescriptベクター(Stratagene社)などのプラスミド、又はアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス又はレトロウイルスなどの修飾ウイルスを含むが、これらに限定されない。クローニングベクターへの挿入は、例えば相補的な粘着末端を有するクローニングベクターにDNA断片を結合することによって達成することができる。しかし、DNA断片化に使用される相補的制限部位がクローニングベクターに存在しない場合、DNA分子の末端を酵素で修飾してもよい。或いは、ヌクレオチド配列(リンカー)をDNA末端に結合することにより、所望の任意の部位を産生してもよく；これらの結合されたリンカーには、制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする特異的な化学的に合成されたオリゴヌクレオチドを含んでいてもよい。代替法において、タンパク質アイソフォームをコードする切断されたベクター及び遺伝子をホモポリマー末端化することによって修飾してもよい。組換え分子は、遺伝子配列の多くのコピーが産生されるように、トランスフォーメーション、トランスフェクション、感染、電気穿孔法などを介して宿主細胞に導入することができる。

10

20

【0114】

具体的実施態様において、タンパク質アイソフォームをコードする単離された遺伝子、cDNA又は合成DNA配列を組み込んだ組換えDNA分子での宿主細胞のトランスフォーメーションにより、遺伝子の複数のコピーの産生が可能になる。従って、遺伝子は、形質転換体を培養して、形質転換体から組換えDNA分子を単離し、及び必要に応じて、単離された組換えDNAから挿入された遺伝子を回収することにより、多量に得られるであろう。

【0115】

本発明のヌクレオチド配列は、未変性のタンパク質アイソフォームと実質的に同じアミノ酸配列をもつアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、機能的に同等なアミノ酸をもつアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームの断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

30

【0116】

具体的実施態様において、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードする単離された核酸分子は、1つ以上のアミノ酸置換、付加又は欠失がコードされたタンパク質に導入されるように、1つ以上のヌクレオチド置換、付加又は欠失をタンパク質アイソフォームのヌクレオチド配列に導入することによって作製することができる。例えば部位特異的変異誘発及びPCRを媒介した突然変異誘発を含む当業者に公知の標準的技術を、突然変異を導入するために使用することができる。好ましくは、1つ以上の予測される非必須アミノ酸残基にて保存的アミノ酸置換がなされる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が同様の電化をもつ側鎖を有するアミノ酸残基で置換されたものである。同様の電化をもつアミノ酸残基鎖を有する側鎖のファミリーは、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、無電荷の極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、無極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、分枝側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)及び芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)をもつアミノ酸を含む。或いは、突然変異は、飽和突然変異誘発になどより、コード配列の全部又は一部の中にランダムに導入することができ、生じる突然変異体を生物活

40

50

性についてスクリーニングして、活性を保持する突然変異体を同定することができる。突然変異誘発に続いて、コードされるタンパク質を発現させることができ、タンパク質の活性を決定することができる。

【0117】

(5.6 タンパク質アイソフォームをコードするDNAの発現)

タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム類似体、タンパク質アイソフォーム関連ペプチド、又は前述のいずれかの断片若しくはその他の誘導体をコードするヌクレオチド配列を、適切な発現ベクター、すなわち挿入されたタンパク質コード配列の転写及び翻訳のために必要なエレメントを含むベクターに挿入することができる。また、必要な転写シグナル及び翻訳シグナルは、タンパク質アイソフォーム若しくはそのフランキン

10

グ領域をコードする未変性の遺伝子又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド若しくはそのフランキング領域をコードする未変性の遺伝子によって供給することもできる。本発明において種々の宿主ベクター系を利用してタンパク質コード配列を発現させてもよい。これらには、ウイルス(例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、その他)で感染される哺乳動物細胞系；ウイルス(例えば、バキュロウイルス)で感染される昆虫細胞系；微生物、例えば酵母を含む酵母ベクター；又はバクテリオファージ、DNA、プラスミドDNA若しくはコスミドDNAで形質転換される細菌；を含むが、これらに限定されない。ベクターの発現エレメントにより、これらの強度及び特異性が変化する。利用される宿主ベクター系に応じて、多数の適切な転写エレメント及び翻訳エレメントのうちのいずれか

20

1つを使用してよい。具体的実施態様において、ヒト遺伝子をコードするヌクレオチド配列(又はヒトタンパク質アイソフォームの機能的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列)が発現される。更に別の実施態様において、タンパク質アイソフォームのドメインを含むタンパク質アイソフォームの断片が発現される。

【0118】

ベクターへのDNA断片の挿入のために前述した任意の方法を使用して、適切な転写シグナル及び翻訳調節シグナル、並びにタンパク質コード配列からなるキメラ遺伝子を含む発現ベクターを構築してもよい。これらの方法には、インビトロでの組換えDNA技術及び合成技術、並びにインビボでの組換え(遺伝的組換え)を含んでもよい。タンパク質アイソフォーム又はその断片をコードする核酸配列の発現は、タンパク質アイソフォーム又は断片が組換えDNA分子で形質転換された宿主において発現されるように、第2の核酸配列によ

30

って調節されていてもよい。例えば、タンパク質アイソフォームの発現は、当該技術分野において公知の任意のプロモーター又はエンハンサーエレメントによって制御されていてもよい。タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を制御するために使用してもよいプロモーターには、SV40初期プロモーター領域(Bernoist及びChambonの文献, 1981, Nature, 290:304-310)、ラウス肉腫ウイルスの3'末端反復配列に含まれるプロモーター(Yamamotoらの文献, 1980, Cell, 22:787-797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagnerらの文献, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445)、メタロチオネイン遺伝子の制御配列(Brinsterらの文献, 1982, Nature, 296:39-42)、テトラサイクリン(Tet)プロモーター(Gossenらの文

40

献, 1995, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:5547-5551)； λ -ラクタマーゼプロモーター(Villa-Kamaroffらの文献, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731)、又はtacプロモーター(DeBoerらの文献, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25；また、Scientific American, 1980, 242:74-94の『組換え細菌から有用なタンパク質(Useful proteins from recombinant bacteria)』も参照されたい)などの原核生物発現ベクター；ノパリンシンセターゼプロモーター領域(Herrera-Estrellaらの文献, Nature, 303:209-213)又はカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター(Gardnerらの文献, 1981, Nucl. Acids Res. 9:2871)及び光合成酵素リブ्रोースピホスフェートカルボキシラーゼのプロモーター(Herrera-Estrellaらの文献, 1984, Nature, 310:115-120)を含む植物発現ベクター；Gal 4プロモーター、ADC(アルコールデヒドロゲナーゼ)プロモーター、PGK(ホスホグリセロールキナーゼ)プロモーター、アルカリホスファターゼプロモータ

50

ーなどの酵母又はその他の真菌由来のプロモーターエレメント、並びに以下の組織特異性を示し、かつトランスジェニック動物において利用される動物転写調節領域：膵臓腺房細胞において活性であるエラストーゼI遺伝子制御領域(Swiftらの文献, 1984, *Cell*, 38:639-646; Ornitzらの文献, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonaldの文献, 1987, *Hepatology*, 7:425-515);膵臓細胞において活性であるインスリン遺伝子制御領域(Hanahanの文献, 1985, *Nature*, 315:115-122)、リンパ球において活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域(Grosschedlらの文献, 1984, *Cell*, 38:647-658; Adamesらの文献, 1985, *Nature*, 318:533-538; Alexanderらの文献, 1987, *Mol. Cell Biol.* 7:1436-1444)、精巣、乳房、リンパ性及び肥満細胞において活性であるマウス乳癌ウイルス制御領域(Lederらの文献, 1986, *Cell*, 45:485-495)、肝臓において活性であるアルブミン遺伝子制御領域(Pinkertらの文献, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276)、肝臓において活性である胎仔タンパク質遺伝子制御領域(Krumlaufらの文献, 1985, *Mol. Cell Biol.* 5:1639-1648; Hammerらの文献, 1987, *Science*, 235:53-58);肝臓において活性である1-アンチトリプシン遺伝子制御領域(Kelseyらの文献, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171)、骨髄性細胞において活性であるβ-グロビン遺伝子制御領域(Mogamらの文献, 1985, *Nature*, 315:338-340; Kolliasらの文献, 1986, *Cell*, 46:89-94);脳のオリゴデンドロサイト細胞において活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域(Readheadらの文献, 1987, *Cell*, 48:703-712);骨格筋において活性であるミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域(Saniの文献, 1985, *Nature*, 314:283-286);神経細胞において活性であるニューロン特異的エノラーゼ(NSE)(Morelliらの文献, 1999, *Gen. Virol.* 80:571-83);神経細胞において活性である脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子制御領域(Tabuchiらの文献, 1998, *Biochem. Biophysic. Res. Com.* 253:818-823);アストロサイトにおいて活性であるグリア原線維酸性タンパク質(GFAP)プロモーター(Gomesらの文献, 1999, *Braz J Med Biol Res* 32(5):619-631; Morelliらの文献, 1999, *Gen. Virol.* 80:571-83)並びに視床下部において活性である性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域(Masonらの文献, 1986, *Science*, 234:1372-1378);を含むが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0119】

具体的実施態様において、タンパク質アイソフォームをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーター、1つ以上の複製開始点及び任意に1つ以上の選択可能なマーカー(例えば、抗生物質耐性遺伝子)を含むベクターが使用される。

【0120】

具体的実施態様において、発現構築物は、3つのpGEXベクター(グルタチオンS-トランスフェラーゼ発現ベクター; Smith及びJohnsonの文献, 1988, *Gene* 7:31-40)のそれぞれのEcoRI制限部位内にタンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドコード配列をサブクローニングすることによって作製される。これにより、サブクローンから正確な読み枠でタンパク質アイソフォーム産物又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの発現が可能になる。

【0121】

哺乳動物宿主細胞では、多数のウイルスに基づいた発現系を利用してよい。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合には、タンパク質アイソフォームコード配列又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドコード配列をアデノウイルス転写/翻訳調節複合体、例えば後期プロモーター及び三部構成リーダー配列に結合してもよい。次いで、このキメラ遺伝子をインビトロ又はインビボでの組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入してもよい。ウイルスゲノムの非必須領域(例えば、領域E1又はE3)における挿入は、生存可能で、かつ感染した宿主において抗体分子を発現することができる組換えウイルスを生じるであろう(例えば、Logan及びShenkの文献, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359を参照されたい)。また、挿入される抗体コード配列の効率的な翻訳のために、特異的開始シグナルが必要とされるかもしれない。これらのシグナルには、ATG開始コドン及び隣接配列を含む。更にまた、開始コドンは、完全な挿入物の翻訳を保証するために、所望のコード配列の読み枠と同調していなければならない。これらの外来性翻

訳制御シグナル及び開始コドンは、天然及び合成の両方の種々の起源であることができる。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーター、などの包含によって増強してもよい。(Bittnerらの文献, 1987, *Methods in Enzymol.* 153: 51-544を参照されたい)。

【0122】

タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードする遺伝子の挿入を含む発現ベクターは、例えば3つの一般的アプローチによって同定することができる: (a) 核酸ハイブリダイゼーション、(b) 「マーカー」遺伝子機能の有無、及び(c) 挿入配列の発現。第1のアプローチでは、発現ベクターに挿入されたタンパク質アイソフォームをコードする遺伝子の存在は、タンパク質アイソフォームをコードする挿入された遺伝子に相同的な配列を含むプローブを使用する核酸ハイブリダイゼーションによって検出することができる。第2のアプローチでは、ベクターへのタンパク質アイソフォームをコードする遺伝子の挿入によって生じる一定の「マーカー」遺伝子機能(例えば、チミジンキナーゼ活性、抗生物質耐性、トランスフォーメーション表現型、バキュロウイルスにおける封入体形成など)の有無に基づいて組換えベクター/宿主系を同定、及び選択することができる。例えば、タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子がベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入される場合、タンパク質アイソフォーム挿入物をコードする遺伝子を含む組換え体は、マーカー遺伝子機能の非存在によって同定することができる。第3のアプローチでは、組換えによって発現される遺伝子産物(すなわち、タンパク質アイソフォーム)をアッセイすることにより、組換え発現ベクターを同定することができる。このようなアッセイ法は、例えばインビトロアッセイ系におけるタンパク質アイソフォームの物理的又は機能的な特性、例えば抗タンパク質アイソフォーム抗体(又はアフィボデーなどのその他の親和性試薬)との結合に基づくことができる。

【0123】

加えて、挿入配列の発現を調節するか、又は所望の特異的様式で遺伝子産物を修飾及びプロセッシングする宿主細胞株を選択してもよい。一定のプロモーターからの発現は、ある種の誘導因子の存在下において上昇させることができ; こうして、遺伝子操作されたタンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの発現を制御してもよい。更にまた、異なる宿主細胞は、翻訳、並びに翻訳後プロセッシング及び修飾(例えば、タンパク質のグリコシル化、リン酸化)について特徴的かつ固有のメカニズムを有する。発現される外来タンパク質の所望の修飾及びプロセッシングを保証するために、適切な株化細胞又は宿主系を選ぶことができる。例えば、細菌系における発現では、非グリコシル化産物を産生するであろうし、酵母における発現では、グリコシル化された産物を産生するであろう。遺伝子産物の適当な転写一次産物のプロセッシング、グリコシル化及びリン酸化のための細胞機構を有する真核生物宿主細胞を使用してもよい。このような哺乳動物宿主細胞には、CHO、VERO、BHK、Hela、COS、MDCK 293、3T3、WI38及び特に例えばSK-N-AS、SK-N-FI、SK-N-DZヒト神経芽細胞腫(Sugimoto Tらの文献 1984 *J. Natl. Cancer Inst.* 73, 51-57)、SK-N-SHヒト神経芽細胞腫(*Biochim. Biophys. Acta* 1982 704, 450-460)、Daoyヒト小脳系髄芽腫(Heらの文献 1992 *Cancer Res.* 52, 1144-1148)、DBTRG-05MGグリア芽細胞腫細胞(Kruseらの文献, 1992 *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28A, 609-614)、IMR-32ヒト神経芽細胞腫(*Cancer Res.* 1970 30, 2110-2118)、1321N1ヒト星細胞腫(*Proc Natl Acad Sci USA* 1977 74, 4816)、MOG-G-CCMヒト星細胞腫(*Br J Cancer*, 1984 49, 269)、U87MGヒトグリア芽細胞腫-星細胞腫(*Acta Pathol Microbiol Scand*, 1968; 74:465-486)、A172ヒトグリア芽細胞腫(Olopadeらの文献, 1992 *Cancer Res.* 52: 2523-2529)、C6ラットグリオーマ細胞(Bendaらの文献 1968 *Science*, 161, 370-371)、Neuro-2aマウス神経芽細胞腫(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1970 65, 129-136)、NB41A3マウス神経芽細胞腫(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1962 48, 1184-1190)、SCPヒツジ脈絡叢(Bolinらの文献, 1994 *J. Virol. Methods* 48, 211-221)、G355-5、PG-4ネコ正常アストロサイト(Haapalaらの文献, 1985 *J. Virol.* 53, 827-833)、Mpfフェレット脳(Trowbridgeらの文献, 1982 *In Vitro* 18 952-960)などの神経細胞系、並びに例えばCTX TNA2ラット正常皮質脳(Radany

10

20

30

40

50

らの文献,1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6467-6471)などの正常株化細胞を含むが、これらに限定されない。更にまた、異なるベクター/宿主発現系では、異なる範囲でプロセッシング反応をもたらすであろう。

【0124】

組換えタンパク質の長期の多収率の産生のためには、安定な発現が好ましい。例えば、差動的に発現されるタンパク質又は経路遺伝子タンパク質を安定に発現する株化細胞を設計してもよい。ウイルス複製開始点を含む発現ベクターを使用するよりはむしろ、宿主細胞は、適切な発現調節エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)及び選択可能なマーカーによって制御されるDNAで形質転換することができる。外来性DNAの導入に続いて、操作した細胞を栄養強化培地中で1~2日間培養させ、次いで選択培地に切り替えてもよい。組換えプラスミド内の選択可能なマーカーが選択に対する耐性を与え、細胞が安定にそれらの染色体にプラスミドを組み込んで、増殖して増殖巣を形成させることができ、次にこれをクローニングして、株化細胞に拡大することができる。この方法を都合よく使用して、差動的に発現されるタンパク質又は経路遺伝子タンパク質を発現する株化細胞を操作してもよい。このような操作された株化細胞は、特に差動的に発現されるタンパク質又は経路遺伝子タンパク質の内因性活性に影響を及ぼす化合物のスクリーニング及び評価に有用であろう。

10

【0125】

単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子(Wiglerらの文献, 1977, Cell 11:223)、ヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(Szybalska及びSzybalskiの文献, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026)及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(Lowyらの文献, 1980, Cell 22:817)を含むが、これらに限定されない、多数の選択系を使用してよく、それぞれtk-、hgprt-又はaprt-細胞において使用することができる。また、抗代謝剤耐性を、メトトレキサートに対する耐性を与えるdhfr遺伝子(Wiglerらの文献, 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hareらの文献, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); ミコフェノール酸に対する耐性を与えるgpt遺伝子(Mulligan及びBergの文献, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); アミノ配糖体G-418に対する耐性を与えるneo遺伝子(Colberre-Garapinらの文献, 1981, J. Mol. Biol. 150:1); 及びハイグロマイシンに対する耐性を与えるhygro遺伝子(Santerreらの文献, 1984, Gene 30:147); 用の選択の基礎として使用することができる。

20

30

【0126】

その他の実施態様において、タンパク質アイソフォーム、断片、類似体又は誘導体は、融合又はキメラタンパク質産物(異種タンパク質配列に対するペプチド結合を介して連結されたタンパク質、断片、類似体又は誘導体を含む)として発現してもよい。例えば、本発明のポリペプチドを免疫グロブリン(IgA、IgE、IgG、IgM)の定常ドメイン又はその一部(CH1、CH2、CH3又はその任意の組合せ及びその一部)と融合させて、キメラポリペプチドを生じてもよい。このような融合タンパク質は、精製を容易にし、インビボでの半減期を増大し、及び免疫系に対する上皮関門を越える抗原の送達を増強するであろう。インビボでの半減期の増大及び精製の容易は、ヒトCD4-ポリペプチドの最初の2つのドメイン及び哺乳動物免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質について示されており、例えばEP 394,827; Trauneckerらの文献、Nature, 331:84-86(1988)を参照されたい。免疫系に対する上皮関門を越える抗原の送達の増強は、IgG又はFc断片などのFcRn結合パートナーに抱合された抗原(例えば、インスリン)について証明されている(例えば、PCT公報WO96/22024及びWO99/04813を参照されたい)。

40

【0127】

タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームの断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片をコードする核酸は、発現されたポリペプチドの検出及び精製の補助のために、エピトープタグ(例えば、赤血球凝集素(「HA」)タグ又はflagタグ)に融合させることができる。例えば、Jankechtらの文献によって記述された系では、ヒト株化細胞に発現された変性させていない

50

融合タンパク質を手早く精製することができる(Janknechtらの文献, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 8972-897)。

【0128】

タンパク質アイソフォーム融合タンパク質は、当該技術分野において公知の方法によって所望のアミノ酸配列をコードする適切な核酸配列を互いに適当なコードするフレームで結合させること、及び当該技術分野において一般に公知の方法によってキメラ産物を発現することによって作製することができる。或いは、タンパク質アイソフォーム融合タンパク質は、例えばペプチド合成機を使用することによって、タンパク質合成技術によって作製されてもよい。

cDNA及びゲノム配列は両方とも、クローニングすること、及び発現させることができる

10

【0129】

(5.7 タンパク質アイソフォームのドメイン構造)

本発明によって提供されるタンパク質アイソフォームの一部のドメインは、当該技術分野において公知であり、科学文献において記述されていた。更に、タンパク質アイソフォームのドメインは、当業者に公知の技術を使用して同定することができる。例えば、タンパク質アイソフォームの1つ以上のドメインは、以下のプログラム：ProDom、TMpred及びSAPSの1つ以上を使用することにより同定することができる。ProDomは、ポリペプチドのアミノ酸配列を、蓄積したドメインのデータベースと比較する(例えば、<http://www.toulouse.inra.fr/prodom.html> ; Corpet F., Gouzy J. 及び Kahn D.の文献, 1999, Nucleic Acids Res., 27 : 263-267を参照されたい)。TMpredは、ポリペプチドの膜貫通領域及びこれらの向きを予測する。このプログラムは、天然に存在する膜貫通タンパク質のデータベースであるTMbaseの統計解析に基づくアルゴリズムを使用する(例えば、http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html ; Hofmann 及び Stoffelの文献,(1993)『TMbase -膜貫通タンパク質分節のデータベース(TMbase-A database of membrane spanning proteins segments)』 Biol. Chem. Hoppe-Seyler 347,166を参照されたい)。SAPSプログラムは、電荷クラスター、リピート、疎水性部分、構造ドメインのような統計学的に有意な特徴についてポリペプチドを解析する(例えば、Brendelらの文献, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2002-2006を参照されたい)。従って、本記述に基づいて、当業者であれば、酵素活性又は結合活性を有するタンパク質アイソフォームのドメインを同定することができ、更にこのようなドメインをコードするヌクレオチド配列を同定することができる。次いで、これらのヌクレオチド配列は、タンパク質アイソフォームの酵素活性又は結合活性を保持するタンパク質アイソフォーム断片の組換え発現のために使用することができる。

20

30

【0130】

本記述に基づいて、当業者であれば、酵素活性又は結合活性を有するタンパク質アイソフォームのドメインを同定することができ、更にこのようなドメインをコードするヌクレオチド配列を同定することができる。次いで、これらのヌクレオチド配列は、タンパク質アイソフォームの酵素活性又は結合活性を保持するタンパク質アイソフォーム断片の組換え発現のために使用することができる。

40

【0131】

一つの実施態様において、タンパク質アイソフォームは、公知のポリペプチドの同定されたドメインと十分に類似したアミノ酸配列を有する。本明細書に使用される「十分に類似した」という用語は、第1及び第2のアミノ酸又はヌクレオチド配列が、共通の構造ドメイン若しくは共通の機能的活性又は両方を有するか又はコードするように、第2のアミノ酸又はヌクレオチド配列に対して同一又は同等の(例えば、類似した側鎖をもつ)アミノ酸残基又はヌクレオチドの十分な数を含む第1のアミノ酸又はヌクレオチド配列をいう。

【0132】

タンパク質アイソフォームドメインは、当業者に周知の技術を使用してその機能を評価することができる。例えば、ドメインは、当業者に公知の技術を使用して、そのキナーゼ

50

活性について、又はそのDNAに結合する能力について評価することができる。キナーゼ活性は、例えばポリペプチドが基質をリン酸化する能力を測定することによって評価することができる。DNA結合活性は、例えば電気泳動移動度シフトアッセイ法で、ポリペプチドがDNA結合エレメントに結合する能力を測定することによって評価することができる。

【0133】

(5.8 タンパク質アイソフォームに対する親和性試薬の産生)

当業者によれば、3つの主な型の親和性試薬-モノクローナル抗体、ファージディスプレイ抗体及びアフィポディー又はドメイン抗体(dAb)などの小分子がある。一般に、本発明に従った適用において、抗体の使用が明示される場合、その他の親和性試薬(例えば、アフィポディー又はドメイン抗体)を使用してもよい。

10

【0134】

(5.8.1 タンパク質アイソフォームに対する抗体の産生)

本発明に従って、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム類似体、タンパク質アイソフォーム関連タンパク質又は前述のいずれかの断片若しくは誘導体を免疫原として使用して、このような免疫原に免疫特異的に結合する抗体を産生してもよい。このような免疫原は、上記の方法を含む任意の便利な手段によって単離することができる。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体又はキメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片及びF(ab')断片、Fab発現ライブラリーによって産生される断片、抗イディオタイプ(抗-Id)抗体、並びに上記のいずれかのエピトープ結合断片を含むが、これらに限定されない。本明細書で使用される「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含む分子をいう。例えば、『基礎免疫学』(Fundamental Immunology), 第3版, W.E. Paul, 編, Raven Press, N.Y. (1993); Wilsonの文献, (1994) J. Immunol. Methods 175:267-273; Yarmushの文献, (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97を参照されたい。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子のいずれのクラス(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD及びIgA)又はサブクラスであることもできる。用語抗体は、抗原へ結合する能力を保持している抗原-結合部位、すなわち「抗原に結合する部分」(例えば、断片、部分配列、相補性決定領域(CDR))を含み、これは(i)VL、VH、CL及びCH1ドメインからなる単価断片である、Fab断片；(ii)ヒンジ領域でジスルフィド結合により連結された2個のFab断片を含む二価断片である、F(ab')₂断片；(iii)VH及びCH1ドメインからなる、Fd断片；(iv)抗体の1本の腕のVL及びVHドメインからなる、Fv断片、(v)VHドメインからなる、dAb断片(Wardらの文献, (1989) Nature, 341:544-546)；並びに、(vi)単離された相補性決定領域(CDR)を含む。単鎖抗体も、用語「抗体」に含まれる。

20

30

40

【0135】

「特異的に結合」(又は「免疫特異的に結合」)という用語は、抗体がその標的だけに結合することを示すことは意図されない。むしろ、抗体は、非標的分子に対するその親和性と比較したときに、その標的に対するその親和性が約5倍より高い場合に、「特異的に結合する」。好ましくは、抗体の親和性は、非標的分子に対するその親和性よりも標的分子に対して少なくとも約5倍、好ましくは10倍、より好ましくは25倍、更により好ましくは50倍及び最も好ましくは100倍以上高い。好ましい実施態様において、抗体又はその他の結合剤と抗原との間の特異的結合は、少なくとも 10^6 M^{-1} の結合親和性を意味する。好ましい抗体は、少なくとも約 10^7 M^{-1} 、及び好ましくは約 10^8 M^{-1} ~ 約 10^9 M^{-1} 、約 10^9 M^{-1} ~ 約 10^{10} M^{-1} 、又は約 10^{10} M^{-1} ~ 約 10^{11} M^{-1} の間の親和性で結合する。

【0136】

親和性は、 $K_d = k_{off} / k_{on}$ として算出される(k_{off} は、解離速度定数であり、 k_{on} は、会合速度定数であり、及び K_d は平衡定数である。親和性は、平衡時に、様々な濃度(c)での、標識されたりガンドの結合した画分(r)を測定することにより決定することができる。

データは、スキッチャード式を使用してグラフで示してある： $r/c = K(n-r)$ ；

式中

r = 平衡時の結合したりガンドのモル数 / 受容体のモル数；

50

c = 平衡時の遊離リガンド濃度 ;
 K = 平衡会合定数 ; 及び
 n = 受容体分子1個あたりのリガンド結合部位の数。

【 0 1 3 7 】

図式解法により、 r/c をY軸にプロットし、対して r をX軸にプロットし、こうしてスキッチャードプロットを作製する。親和性は、この直線の負の勾配である。 k_{off} は、結合した標識リガンドを過剰な非標識リガンドとで競合させることによって決定することができる(例えば、米国特許第6,316,409を参照されたい)。ターゲティング薬剤のその標的分子に対する親和性は、好ましくは少なくとも約 1×10^{-6} モル/リットルであり、より好ましくは少なくとも約 1×10^{-7} モル/リットル、更により好ましくは少なくとも約 1×10^{-8} モル/リットル、更により好ましくは少なくとも約 1×10^{-9} モル/リットル、及び最も好ましくは少なくとも約 1×10^{-10} モル/リットルである。スキッチャード解析による抗体親和性測定は、当技術分野において周知である。例えば、van Erpらの文献、J. Immunoassay, 12 : 425-43, 1991 ; Nelson及びGriswoldの文献、Comput. Methods Programs Biomed. 27 : 65-8, 1988を参照されたい。

10

【 0 1 3 8 】

一つの実施態様において、タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子の遺伝子産物を認識する抗体を調製してもよい。例えば、これらのタンパク質アイソフォーム及び/又はそれらのアイソフォームを認識する抗体は、上の表1に収載されたタンパク質アイソフォームを認識する抗体を含む。別の実施態様において、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム類似体、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド又は前述のいずれかの誘導体若しくは断片を認識する抗体を産生するために、当業者に公知の方法が使用される。当業者は、抗体の産生に、例えば、『抗体、実験マニュアル(Antibodies, A Laboratory Manual)』、Harlow 及びDavid Lane編、Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、コールドスプリングハーバー、N.Y.に説明されたような、多くの手順を利用することができることを認めるであろう。当業者は、抗体を模倣している結合断片又はFab断片も、様々な手順により遺伝的情報から調製することができることも理解するであろう(『抗体操作：実践法(Antibody Engineering: A Practical Approach)』(Borrebaeck, C. 編), 1995, Oxford University Press社, オックスフォード ; J. Immunol. 149, 3914-3920 (1992))。

20

30

【 0 1 3 9 】

本発明の一つの実施態様において、タンパク質アイソフォームの特異的ドメインに対する抗体が産生される。具体的実施態様において、タンパク質アイソフォームの親水性断片が、抗体産生のための免疫原として使用される。

【 0 1 4 0 】

抗体産生において、所望の抗体のスクリーニングは、当該技術分野において公知の技術、例えばELISA(酵素結合免疫吸着検定法)によって達成することができる。例えば、タンパク質アイソフォームの特異的ドメインを認識する抗体を選択するために、作製したハイブリドーマを、このようなドメインを含むタンパク質アイソフォーム断片と結合する産物についてアッセイしてもよい。第1のタンパク質アイソフォーム相同体に特異的に結合するが、第2のタンパク質アイソフォーム相同体と特異的に結合しない(又は、より強く結合しない)抗体の選択のためには、第1のタンパク質アイソフォーム相同体に対する陽性結合及び第2のタンパク質アイソフォーム相同体に対する結合の欠如(又は、結合の減少)を基礎として選択することができる。同様に、タンパク質アイソフォームに特異的に結合するが、同じタンパク質の異なるアイソフォーム(タンパク質アイソフォームと同じコアペプチドを有する異なる糖型など)に特異的に結合しない(又は、より強く結合しない)抗体の選択のためには、タンパク質アイソフォームに対する陽性結合及び異なるアイソフォーム(例えば、異なる糖型)に対する結合の欠如(又は、結合の減少)を基礎として選択することができる。従って、本発明は、タンパク質アイソフォームの異なるアイソフォーム又はアイソフォーム群(例えば、糖型)よりもタンパク質アイソフォームに対してより高い親和性

40

50

(特に少なくとも2倍、特に更に少なくとも5倍、より詳しくは少なくとも10倍より高い親和性にて)で結合する抗体(特に、モノクローナル抗体)を提供する。

【0141】

本発明の方法に使用してもよいポリクローナル抗体は、免疫動物の血清に由来する抗体分子の不均一な集団であり、また、分画されていない免疫血清を使用することもできる。当該技術分野において公知の種々の手順を使用して、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームの断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片に対するポリクローナル抗体を産生してもよい。特定の実施態様において、タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドのエピトープに対するウサギポリクローナル抗体は、例えばポリクローナル又はモノクローナル抗体の産生のために得ることができ、ウサギ、マウス、ラットなどを含むが、これらに限定されない種々の宿主動物に、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームの断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片の未変性の又は合成の(例えば、組換え)バージョンを注射することによって免疫することができる。このような免疫化のために適した単離されたタンパク質アイソフォームは、本明細書に記述した好ましい技術などの発見技術を用いて得てもよい。タンパク質アイソフォームをゲル電気泳動によって精製する場合、タンパク質アイソフォームは、ポリアクリルアミドゲルより前の抽出の有無にかかわらず、免疫化のために使用することができる。宿主種に応じて、完全又は不完全フロイントのアジュバント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの界面活性物質、ブルニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノール、及びBCG(カルメット ゲラン菌)又はコリネバクテリウム・パルバム(*Corynebacterium parvum*)などのアジュバントを含むが、これらに限定されない種々のアジュバントを使用して、免疫応答を増強してもよく、更なるアジュバントも当該技術分野において周知である。

10

20

30

40

50

【0142】

タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームの断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片に向けられたモノクローナル抗体(mAbs)の調製のためには、例えば、連続した培養における株細胞によって抗体分子の産生を提供する任意の技術、例えば最初にKohler及びMilstein(1975, *Nature*, 256:495-497)によって開発されたハイブリドーマ技術、並びにトリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborらの文献, 1983, *Immunology Today*, 4:72)及びヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ技術(Coleらの文献, 1985, 『モノクローナル抗体及び癌治療(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)』中, Alan R. Liss社, 77-96頁)を使用してよい。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及びそのいずれかのサブクラスを含む免疫グロブリンのクラスに由来するものであることができる。本発明のmAbsを産生するハイブリドーマは、インビトロ又はインビボで培養してもよい。本発明の更なる実施態様において、モノクローナル抗体は、公知の技術を利用して無菌動物において産生することができる(PCT/US90/02545(引用により本明細書に組み込まれる))。

【0143】

モノクローナル抗体は、ヒトモノクローナル抗体及びキメラモノクローナル抗体(例えば、ヒト-マウスキメラ)を含むが、これらに限定されない。ヒト化抗体は、1つ以上の非ヒト種由来の相補性決定領域(CDR)及びヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する非ヒト種由来の抗体分子である。(例えば、Queen、米国特許第5,585,089号を参照されたく、これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる)。キメラ抗体は、異なる部分がヒト免疫グロブリン定常領域及びマウスmAb由来の可変領域を有するものなどの異なる種由来である分子である(Cabillyらの米国特許第4,816,567号; Bossらの米国特許第4,816,397号を参照されたく、これらはその全体がその全体が引用により本明細書に組み込まれる。)

【 0 1 4 4 】

キメラモノクローナル抗体及びヒト化モノクローナル抗体は、当該技術分野において公知の組換えDNA技術によって、例えばPCT公開番号WO87/02671；欧州特許出願第184,187号；欧州特許出願第171,496号；欧州特許出願第173,494号；PCT公開番号WO86/01533；米国特許第4,816,567号；欧州特許出願第125,023号；Betterらの文献、1988、Science, 240：1041-1043；Liuらの文献、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84：3439-3443；Liuらの文献、1987、J. Immunol. 139：3521-3526；Sunらの文献、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84：214-218；Nishimuraらの文献、1987、Canc. Res. 47：999-1005；Woodらの文献、1985、Nature, 314：446-449；及びShawらの文献、1988、J. Natl. Cancer Inst. 80：1553-1559；Morrisonの文献、1985、Science, 229：1202-1207；Oiらの文献、1986、Bio/Techniques4：214；米国特許第5,225,539号；Jonesらの文献、1986、Nature, 321：552-525；Verhoeyanらの文献、(1988) Science, 239：1534；及びBeidlerらの文献、1988、J. Immunol. 141：4053-4060；に記述された方法を使用して産生することができる。

10

【 0 1 4 5 】

完全ヒト抗体は、特にヒト被験者の治療的処置のために望ましく、このような抗体は、内因性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子を発現することができないが、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを使用して産生することができる。トランスジェニックマウスには、選択された抗原、例えば本発明のタンパク質アイソフォームの全て又は一部を通常の様式で免疫する。抗原に向けられたモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を使用して得ることができる。トランスジェニックマウスにより収容されたヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間に再編成し、その後クラススイッチ及び体細胞突然変異を受ける。従って、このような技術を使用して、治療的に有用なIgG、IgA、IgM及びIgE抗体を産生することができる。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概要については、Lonberg及びHuszarの文献(1995、Int. Rev. Immunol. 13:65-93)を参照されたい。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術及びこのような抗体を産生するためのプロトコルの詳細な考察については、例えば米国特許第5,625,126号；米国特許第5,633,425号；米国特許第5,569,825号；米国特許第5,661,016号；及び米国特許第5,545,806号；を参照されたい。加えて、アブジェニクス社(Abgenix, Inc.)(フリーモント, CA)及びジェンファーム(Genpharm)(サンノゼ, CA)などの会社は、上に記述したものと類似の技術を使用して選択された、抗原に向けられたヒト抗体を提供することに従事することができる。

20

30

【 0 1 4 6 】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「誘導選択(guided selection)」と呼ばれる技術を使用して産生ことができ、このアプローチでは、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えばマウス抗体を使用して、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を誘導する(Jespersらの文献,(1994) Biotechnology 12：899-903)。

【 0 1 4 7 】

また、本発明の抗体は、当該技術分野において公知の種々のファージディスプレイ法を使用して産生することができる。ファージディスプレイ法では、機能的抗体ドメインが、これらをコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面上に展示される。ファージディスプレイ技術は、選択された標的に結合するためのポリペプチドのライブラリーを作出しかつスクリーニングするために使用することができる。例えば、Cwirlaらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-82, 1990；Devlinらの文献、Science 249, 404-6, 1990；Scott及びSmithの文献、Science 249, 386-88, 1990；並びに、Ladnerらの米国特許第5,571,698号を参照されたい。ファージディスプレイ法の基本的概念は、スクリーニングされるポリペプチドをコードしているDNAとそのポリペプチドの間の物理的関係の確立である。この物理的関係は、そのポリペプチドをコードしているファージゲノムを封入しているキャプシドの一部としてポリペプチドを展示する、ファージ粒子により提供される。ポリペプチドとそれらの遺伝的物質の間の物理的関係の確立は、異なるポリペプチドを有する非常に多数のファージの同時大量スクリーニングを可能にする。標的へ

40

50

の親和性を伴うポリペプチドを展示するファージはその標的へ結合し、これらのファージは、標的への親和性スクリーニングにより濃厚化される。これらのファージにより展示されるポリペプチドの同一性は、それらの各ゲノムにより決定することができる。これらの方法を用い、次に所望の標的に対する結合親和性を有すると同定されたポリペプチドは、通常的手段により大量に合成することができる。例えば、米国特許第6,057,098号が参照されることとし、全ての表、図面及び特許請求の範囲を含む、その全体は引用により本明細書に組み込まれる。特に、このようなファージは、レパトリー又はコンビナトリアル抗体ライブラリー(例えば、ヒト又はマウス)から発現される抗原結合ドメインを示すために利用することができる。関心対象の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて、例えば標識抗原、又は固体表面若しくはビーズに結合若しくは捕獲された抗原を使用して選択又は同定することができる。これらの方法に使用されるファージは、典型的にはファージ遺伝子III又は遺伝子VIIIタンパク質のいずれかに組換えで融合されたFab、Fv又はジスルフィド安定化されたFv抗体ドメインと共にファージから発現されるfd及びM13結合ドメインを含む繊維状ファージである。本発明の抗体を作製するために使用することができるファージディスプレイ法は、Brinkmanらの文献、*J. Immunol. Methods*, 182 : 41-50(1995) ; Amesらの文献、*J. Immunol. Methods*, 184 : 177-186(1995) ; Kettleboroughらの文献、*Eur. J. Immunol.* 24 : 952-958(1994) ; Persicらの文献、*Gene*, 187 9-18(1997) ; Burtonらの文献、*Advances in Immunology*, 57:191-280 (1994) ; PCT出願番号PCT/GB91/01134 ; PCT公報WO90/02809 ; WO91/10737 ; WO 92/01047 ; WO 92/18619 ; WO 93/11236 ; WO 95/15982 ; WO 95/20401 ; 及び米国特許第5,698,426号 ; 第5,223,409号 ; 第5,403,484号 ; 第5,580,717号 ; 第5,427,908号 ; 第5,750,753号 ; 第5,821,047号 ; 第5,571,698号 ; 第5,427,908号 ; 第5,516,637号 ; 第5,780,225号 ; 第5,658,727号 ; 第5,733,743号及び第5,969,108号 ; (それぞれ、その全体が引用により本明細書に組み込まれる)に開示したものを含む。

10

20

30

40

50

【0148】

上記の文献に記載されているように、ファージ選択の後、ファージ由来の抗体コード領域を単離して、ヒト抗体を含む抗体全体又はその他の所望の抗原結合断片を産生するために使用すること、及び哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母及び細菌を含む任意の所望の宿主において、例えば以下に詳細に記述したように発現させることができる。また、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂断片を組換えで産生する技術も、PCT公開WO92/22324 ; Mullinaxらの文献、*BioTechniques*, 12(6) : 864-869 (1992) ; 及びSawaiらの文献、*AJRI* 34 : 26-34 (1995) ; 及びBetterらの文献、*Science*, 240 : 1041-1043(1988)(前記参照は、これらの全体が引用により組み込まれる)に開示されたものなどの当該技術分野において公知の方法を使用して利用することができる。

【0149】

本発明のタンパク質アイソフォームに対する単鎖Fvs及び抗体を産生するために使用することができる適切な技術の例には、米国特許第4,946,778号及び第5,258,498号 ; Hustonらの文献、*Methods in Enzymology*, 203 : 46-88(1991) ; Shuらの文献、*PNAS* 90 : 7995-7999(1993) ; 及びSkerraらの文献、*Science*, 240 : 1038-1040(1988) ; に記述されたものを含む。

【0150】

本発明は、当該技術分野において公知の方法によって行うことができる二重特異性抗体の使用を更に提供する。完全長二重特異性抗体の従来のは、2つの鎖が異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づいている(Milsteinらの文献、1983、*Nature*, 305 : 537-539)。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のランダムな組合せのため、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10個の異なる抗体分子の潜在的混合物を生じ、そのうちの1つのみが正確に二重特異性構造を有する。通常アフィニティークロマトグラフィー工程によってなされる正確な分子の精製は、むしろ扱いにくく、産物収率は低い。同様の手法は、1993年5月13日に公開されたWO93/08829に、及びTrauneckerらの文献、1991、*EMBO J.* 10 : 3655-3659に開示されている。

【0151】

異なるアプローチ及びより好ましいアプローチに従って、所望の結合特異性をもつ抗体可変ドメイン(抗体-抗原結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合させる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ、CH2及びCH3領域の部分を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。融合物の少なくとも1つに存在する軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域(CH1)を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物、及び所望の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物に同時トランスフェクトする。これは、構築に使用した不均等な比率の3つのポリペプチド鎖が最適収量をもたらす実施態様において、3つのポリペプチド断片の相互の比率を調節する際に優れた柔軟性をもたらす。しかし、少なくとも2つのポリペプチド鎖の同等の比率の発現により高収率を生じるときか、又は比率が特に意味を持たないときは、2つ又は3つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を発現ベクターに挿入することができる。

10

【0152】

このアプローチの好ましい実施態様において、二重特異性抗体は、一方の腕の第1の結合特異性をもつハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方の腕のハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第2の結合特異性を提供する)とで構成される。二重特異性分子の半分のみ免疫グロブリン軽鎖が存在することは、容易な分離方法を提供するので、この非対称構造が所望の二重特異性化合物の望まれない免疫グロブリン鎖状結合からの分離を容易にすることが判明した。このアプローチは、1994年3月3日公開されたWO94/04690に開示されている。二重特異性抗体の産生に関する詳細については、例えば、Sureshらの文献、*Methods in Enzymology*, 1986 121:210を参照されたい。

20

【0153】

本発明は、抗タンパク質アイソフォーム免疫グロブリン分子の機能的に活性な断片、誘導体又は類似体を提供する。機能的に活性とは、断片、誘導体又は類似体が、断片、誘導体又は類似体が誘導される抗体によって認識される同じ抗原を認識する抗抗イデオタイプ抗体(すなわち、三次抗体)を誘発することができることを意味する。具体的には、好ましい実施態様において、免疫グロブリン分子のイデオタイプの抗原性をフレームワーク及びC末端であるCDR配列から抗原を特異的に認識するCDR配列までの欠失によって増強してもよい。どのCDR配列が抗原に結合するかを決定するために、CDR配列を含む合成ペプチドは、当該技術分野において公知の任意の適切な結合アッセイ法による抗原との結合アッセイ法に使用することができる。

30

【0154】

本発明は、限定されないが、F(ab')₂断片及びFab断片などの抗体断片を提供する。特異的エピトープを認識する抗体断片は、公知の技術によって産生してもよい。F(ab')₂断片は、可変領域、軽鎖定常領域及びCH1ドメインからなり、抗体分子のペプシン消化によって産生される。Fab断片は、F(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元させることによって産生される。また、本発明は、本発明の抗体の重鎖と軽鎖との二量体又はFvs若しくは単鎖抗体(SCA)などの任意のその最小断片(例えば、米国特許第4,946,778号; Birdの文献、1988、*Science*, 242:423-42; Hustonらの文献、1988、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883; 及びWardらの文献、1989、*Nature*, 334:544-54に記載されたとおり)又は本発明の抗体と同じ特異性をもつ任意のその他の分子を提供する。単鎖抗体は、アミノ酸ブリッジを介してFv領域の重鎖及び軽鎖断片を連結して一本鎖ポリペプチドを生ずることによって形成される。大腸菌(*E. coli*)における機能的Fv断片の集成的ための技術を使用して、Skerraらの文献、1988、*Science*, 242:1038-1041)。

40

【0155】

その他の実施態様において、本発明は、本発明の免疫グロブリンの融合タンパク質(又はその機能的に活性な断片)、例えば免疫グロブリンがN末端又はC末端にて共有結合(例えば、ペプチド結合)を介してその免疫グロブリンでない別のタンパク質のアミノ酸配列(又はその一部、好ましくはタンパク質の少なくとも10、20又は50アミノ酸部分)に融合され

50

ている融合タンパク質を提供する。好ましくは、免疫グロブリン又はその断片は、定常ドメインのN末端にて他のタンパク質に共有結合で連結されている。上記したように、このような融合タンパク質は、精製を容易にし、インビボでの半減期を増大し、及び免疫系に対する上皮関門を越えた抗原の送達を増強し得る。

【0156】

本発明の免疫グロブリンは、すなわち免疫特異性結合を障害しない程度のこのような共有結合の長さの分子の任意の型の共有結合のいずれかによって修飾されている類似体及び誘導体を含む。例えば、制限する目的ではないが、免疫グロブリンの誘導体及び類似体は、例えばグリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/プロテクトン基による誘導体化、タンパク分解性切断、細胞リガンド若しくはその他のタンパク質に対する結合などによって更に修飾されたものを含む。任意の多数の化学的修飾を、特異的化学開裂、アセチル化、ホルミル化などを含むが、これらに限定されない公知技術によって行ってもよい。加えて、類似体又は誘導体は、1つ以上の非古典的又は非天然のアミノ酸を含んでいてもよい。

前述の抗体は、本発明のタンパク質アイソフォームの局在化及び活性に関連した技術分野において公知の方法において、例えばこれらのタンパク質をイメージングするために、適切な生理学的試料におけるこれらのレベルを測定するために、診断法などに使用することができる。

【0157】

(5.8.2 タンパク質アイソフォームに対するアフィボディーの産生)

アフィボディー分子は、ブドウ球菌タンパク質AのIgG-結合ドメインのものに由来する58アミノ酸残基タンパク質ドメインに基づいた親和性タンパク質の新たな種類を表す。この3つのヘリックスバンドドメインはコンビナトリアルファージミドライブラリーの構築のための足場として使用されてきており、これからファージディスプレイ技術を使用して所望の分子を標的化するアフィボディー変異体を選択することができる(Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PAの文献, 『 α -ヘリカル細菌受容体ドメインのコンビナトリアルライブラリーから選択された結合タンパク質(Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain)』, Nat Biotechnol 1997; 15:772-7; Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PAの文献, 『ヒト免疫グロブリンA(IgA) - タンパク質Aのコンビナトリアル操作からの特異的リガンド(Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A)』, Eur J Biochem 2002; 269:2647-55)。これらの低分子量(6kDa)と組合せでのアフィボディー分子の単純な強い構造は、多種多様な適用、例えば検出試薬としての適用にそれらを適合化させ(Ronmark J, Hansson M, Nguyen Tらの文献, 『大腸菌で産生されたアフィボディー-Fcキメラの構築及び特徴づけ(Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in Escherichia coli)』, J Immunol Methods 2002; 261:199-211)、及び受容体相互作用を阻害する(Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PAの文献, 『コンビナトリアルタンパク質操作によって開発されたCD28結合アフィボディーによる、CD28-CD80共刺激の阻害(Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering)』, Protein Eng 2003; 16:691-7)。アフィボディーに関する詳細及びその産生方法は、その全体が本明細書に引用により組み込まれる米国特許第5831012号を参照することによって得られるであろう。

また、標識されたアフィボディーは、アイソフォームの存在量を決定するためのイメージング用途に有用であろう。

【0158】

(5.8.3 タンパク質アイソフォームに対するドメイン抗体の産生)

ドメイン抗体(dAb)は、ヒト抗体の重(VH)鎖又は軽(VL)鎖の可変領域に対応する抗体のうち最も小さな機能的結合単位である。ドメイン抗体は、およそ13kDaの分子量を有する。Domantisは、完全ヒトVH及びVL dAbの一連の大きく、かつ高度に機能的なライブラリ

ー(それぞれのライブラリーにおける10,000,000,000を超える異なる配列)を開発して、これらのライブラリーを治療標的に対して特異的なdAbを選択するために使用する。多くの普通抗体とは対照的に、ドメイン抗体は、細菌、酵母及び哺乳動物細胞系において十分に発現される。ドメイン抗体に関する更なる詳細及びその産生方法は、米国特許第6,291,158号；第6,582,915号；第6,593,081号；第6,172,197号；第6,696,245号；米国特許出願第2004/0110941号；欧州特許出願第1433846号、並びに欧州特許第0368684号及び第0616640号；WO05/035572、WO04/101790、WO04/081026、WO04/058821、WO04/003019及びWO03/002609(これらのそれぞれは、その全体が本明細書に引用により組み込まれる)を参照することによって得られるであろう。

【0159】

(5.9 親和性試薬の発現)

(5.9.1 抗体の発現)

本発明の抗体は、抗体の合成のための当該技術分野において公知の任意の適切な方法により、特に、化学合成によるか、又は組換え発現により産生することができ、好ましくは組換え発現技術によって産生される。

抗体又はその断片、誘導體若しくは類似体の組換え発現には、抗体をコードする核酸の構築が必要である。抗体のヌクレオチド配列が公知である場合、抗体をコードする核酸は、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから集成してもよく、(例えば、Kutmeierらの文献、1994、BioTechniques、17:242)に記載されているように)、これには、簡単には、抗体をコードする配列の部分を含む重複するオリゴヌクレオチドの合成、これらのオリゴヌクレオチドのアニーリング及びライゲーション、次いでPCRによる結合されたオリゴヌクレオチドの増幅を含む。

【0160】

或いは、抗体をコードする核酸は、抗体をクローニングすることによって得てもよい。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンが入手不可能であるが、抗体分子の配列が公知である場合、抗体をコードする核酸は、配列の3'及び5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するPCR増幅によって、又は特定の遺伝子配列に対して特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用してクローニングすることによって、適切な供与源(例えば、抗体cDNAライブラリー又は抗体を発現する任意の組織又は細胞から作製したcDNAライブラリー)から得てもよい。

【0161】

特定の抗原を特異的に認識する抗体分子(又は、このような抗体をコードする核酸をクローニングするためのcDNAライブラリーのための供与源)が入手不可能である場合、特定の抗原に特異的な種の抗体を、当該技術分野において公知の任意の方法によって、例えばウサギなどの動物を免疫して、ポリクローナル抗体を産生することによって、又はより好ましくはモノクローナル抗体を産生することによって産生してもよい。或いは、特異的抗原に結合するFab断片のクローンについてFab発現ライブラリーをスクリーニングすることによって(例えば、Huseらの文献、1989、Science、246:1275-1281に記載されたように)、又は抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって(例えば、Clacksonらの文献、1991、352:624 Nature；Haneらの文献、1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937；を参照されたい)、少なくとも抗体のFab部分をコードするクローンを得てもよい。

【0162】

一旦、少なくとも抗体分子の変域ドメインをコードする核酸が得られたら、これを抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むベクターに導入してもよい(例えば、PCT公開WO 86/05807、PCT公開WO 89/01036；及び米国特許第5,122,464号；を参照されたい)。完全な抗体分子の発現を可能にする核酸を同時発現するための完全な軽鎖又は重鎖を含むベクターも利用できる。次いで、抗体をコードする核酸を使用して、スルフヒドリル基を含まないアミノ酸残基との鎖内ジスルフィド結合に關与する1つ以上の可変領域システイン残基を置換する(又は欠失させる)ために必要なヌクレオチド置換(群)又は欠失(群)を導入することができる。このような修飾は、ヌクレオチド配列の特異的な突然変

10

20

30

40

50

異又は欠失の導入のための当該技術分野において公知の任意の方法、例えば化学的突然変異誘発、インビトロ部位特異的突然変異誘発(Hutchinsonらの文献、1978、J. Biol. Chem. 253:6551)、PCTに基づいた方法などによって行うことができるが、これらに限定されない。

【0163】

加えて、適切な抗原特異性の抗体分子のマウス由来遺伝子を適切な生物活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングすることにより、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術(Morrisonらの文献、1984、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neubergerらの文献、1984、Nature, 312:604-608の; Takedaらの文献、1985、Nature, 314:452-454)を使用することができる。上記したように、キメラ抗体は、マウスmAb及びヒト抗体定常領域に由来する可変領域を有する分子、例えばヒト化抗体などの異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。

【0164】

一旦、本発明の抗体分子をコードする核酸が得られたら、抗体分子の産生のためのベクターを、当該技術分野において周知の技術を使用する組換えDNA技術によって産生してもよい。従って、抗体分子配列を含む核酸を発現することにより本発明のタンパク質を調製するための方法が本明細書に記述される。当業者に周知の方法を使用して、抗体分子コード配列及び適切な転写及び翻訳調節シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えばインビトロ組換えDNA技術、合成技術及びインビボ遺伝子組換えを含む。例えば、Sambrookらの文献、(1990、『分子クローニング、実験室マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)』, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, コールドスプリングハーバー, NY)及びAusubelらの文献、(ED., 1998、『分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)』, John Wiley & Sons, NY)に記述された技術を参照されたい。

【0165】

発現ベクターを従来技術によって宿主細胞に移して、次いで該トランスフェクト細胞を従来技術によって培養して、本発明の抗体を産生する。

本発明の組換え抗体を発現するために使用される宿主細胞は、大腸菌(*Escherichia coli*)などの細菌細胞、又は好ましくは、特に組換え抗体分子全体の発現のためには真核細胞のいずれであってもよい。特に、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターと併用するチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)などの哺乳動物細胞は、抗体のための有効な発現系である(Foeckingらの文献、1986、45:101 Gene; Cockettらの文献、1990 Bio/Technology 8:2)。

【0166】

種々の宿主-発現ベクター系を、本発明の抗体分子を発現させるために利用してもよい。このような宿主-発現系は、関心対象のコード配列を産生し、その後に精製され得る媒体を表すだけでなく、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換されたか、又はトランスフェクトされたときに、本発明の抗体分子をインサイチューで発現し得る細胞も表してもよい。これらには、抗体コード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA若しくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌(例えば、大腸菌(*E. coli*)、枯草菌(*B. subtilis*))などの微生物; 抗体コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、サッカロミセス、ピチア(*Pichia*)); 抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞系; 組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV)を感染させたか、若しくは抗体コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系; 又は、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)、又は哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター(例えばアデノウイルス後期プロモーター; ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)を含む組換え発現構築物を収容する哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3細胞); を含むが、これらに限定されない。

【0167】

細菌系では、発現される抗体分子について意図される用途に応じて、多数の発現ベクターを都合よく選択してもよい。例えば、大量のこのようなタンパク質が産生されるときは、抗体分子を含む医薬組成物の産生のために、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を指揮するベクターが望ましいであろう。このようなベクターには、融合タンパク質が産生されるように抗体コード配列が個々にベクター内にlac Zコード領域とインフレームで結合され得る大腸菌発現ベクター-pUR278(Rutherらの文献、1983、EMBO J. 2 : 1791) ; pINベクター(Inouye及びInouyeの文献、1985、Nucleic Acids Res. 13 : 3101-3109 ; Van Heeke及びSchusterの文献、1989、J. Biol. Chem. 24 : 5503-5509) ; などを含むが、これらに限定されない。また、pGEXベクターを使用して、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させてもよい。一般に、このような融合タンパク質は、可溶性であり、マトリックスグルタチオン-アガロースビーズへの吸着及び結合、続く遊離グルタチオンの存在下における溶出により、溶解した細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターは、クローン化された標的遺伝子産物がGST部分から放出できるように、トロンピン又はXa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

10

【0168】

昆虫系では、外来遺伝子を発現するためにキンウワバ(*Autographa californica*)核多角体病ウイルス(AcNPV)をベクターとして使用する。このウイルスは、スポドプテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*)細胞内で成長する。抗体コード配列は、ウイルスの非必須領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子)に個々にクローニングしても、AcNPVプロモーター(例えばポリヘドリン・プロモーター)の制御下に置いてもよい。哺乳動物宿主細胞では、多数のウイルスに基づいた発現系(例えば、アデノウイルス発現系)を利用してもよい。

20

【0169】

上で議論したように、宿主細胞株は、挿入配列の発現を調節するか、又は所望の特異の様式で遺伝子産物修飾して、プロセッシングするという本記述に基づいて選択してもよい。タンパク質産物のこのような修飾(例えば、グリコシル化)及びプロセッシング(例えば、切断)は、タンパク質の機能に重要であろう。

組換え抗体の長期多収の産生のためには、安定な発現が好ましい。例えば、関心対象の抗体を安定に発現する株化細胞は、抗体のヌクレオチド配列と選択可能なマーカー(例えば、ネオマイシン又はハイグロマイシン)のヌクレオチド配列とを含む発現ベクター細胞にトランスフェクトし、選択可能なマーカーの発現について選択することによって産生することができる。このような操作された株化細胞は、特に抗体分子と直接又は間接的に相互作用する化合物のスクリーニング及び評価に有用であろう。

30

【0170】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増加することができる(総説については、Bebbington及びHentschelの文献、『DNAクローニングにおける哺乳動物細胞内のクローニングされた遺伝子の発現のための遺伝子増幅に基づくベクターの使用(The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning)』、第3巻(Academic Press ニューヨーク、1987)を参照されたい)。抗体を発現するベクター系のマーカーが増幅可能なときは、宿主細胞の培養に存在する阻害剤のレベルを高め、マーカー遺伝子のコピー数を増加させる。増幅された領域は抗体遺伝子と関連しているので、抗体の産生も増加する(Crouseらの文献、1983、Mol. Cell Biol. 3 : 257)。

40

【0171】

宿主細胞には、第1のベクターが重鎖由来ポリペプチドをコードし、第2のベクターが軽鎖由来ポリペプチドをコードする本発明の2つの発現ベクターを同時トランスフェクトしてもよい。2つのベクターは、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの同等の発現を可能にする同一の選択可能なマーカーを含んでいてもよい。或いは、両方の重鎖及び軽鎖ポリペプチドをコードする単一のベクターを使用してもよい。このような状況において、有毒な過剰の遊

50

離重鎖を避けるために、軽鎖を重鎖の前に置くべきである(Proudfootの文献、1986、Nature, 322:52; Kohlerの文献、1980、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:2197)。重鎖及び軽鎖のコード配列には、cDNA又はゲノムDNAを含んでいてもよい。

【0172】

一旦本発明の抗体分子が組換え発現されるたならば、これを、抗体分子の精製のための当該技術分野において公知の任意の方法によって、例えばクロマトグラフィー(例えば、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインA又は特異的抗原との親和性クロマトグラフィー及びサイズカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、差動的溶解度を含む標準的方法によって、又はタンパク質の精製のためのその他の任意の標準的技術によって精製してもよい。

10

【0173】

或いは、任意の融合タンパク質を、発現される融合タンパク質に対して特異的な抗体を利用することによって容易に精製してもよい。例えば、Janknechtらの文献によって記述される系により、ヒト株化細胞において発現された非変性融合タンパク質の容易な精製が可能になる(Janknechtらの文献、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897)。この系では、遺伝子のオープンリーディングフレームが6ヒスチジン残基からなるアミノ末端タグに対して翻訳可能的に融合されるように、関心対象の遺伝子をワクシニア組換えプラスミドにサブクローニングする。タグは、融合タンパク質に対するマトリックス結合ドメインとして役立つ。組換えワクシニアウイルスを感染させた細胞からの抽出物をNi²⁺ニトリロ酢酸-アガロースカラムに添加して、ヒスチジンにタグを付けたタンパク質を、イミダゾール含有緩衝液で選択的に溶出させる。

20

【0174】

次いで、これらの方法によって産生された抗体を、最初に関心対象の精製されたポリペプチドとの親和性及び特異性についてスクリーニングして、必要であれば、結合から除外されることが望まれるポリペプチドとの抗体の親和性及び特異性の結果と比較することによって選択してもよい。スクリーニング法には、マイクロタイタープレートの別々のウェルにおける精製ポリペプチドの固定化を含むことができる。次いで、可能性のある抗体又は抗体群を含む溶液をそれぞれのマイクロタイターのウェルに置き、約30分間~2時間インキュベートする。次いで、マイクロタイターのウェルを洗浄し、標識された二次抗体(例えば、生じた抗体がマウス抗体である場合、アルカリホスファターゼに抱合した抗マウス抗体)をウェルに添加し、約30分間インキュベートし、その後洗浄する。基質をウェルに添加すると、固定されたポリペプチド(群)に対する抗体が存在する場合、呈色反応が現れる。

30

【0175】

次いで、こうして同定された抗体を、選択したアッセイデザインでの親和性及び特異性について更に解析してもよい。標的タンパク質に関する免疫アッセイ法の開発では、精製した標的タンパク質は、選択された抗体を使用する免疫アッセイ法の感受性及び特異性を判断するための標準としての役割を果たす。種々の抗体の結合親和性は異なっているであろうため、ある特定の抗体対(例えば、サンドイッチアッセイ法において)は、互いに例えば立体的に干渉する可能性があり、抗体のアッセイ性能は、抗体の絶対的な親和性及び特異性よりも重要な尺度となるであろう。

40

【0176】

当業者であれば、多くのアプローチを抗体又は結合断片を産生し、並びに種々のポリペプチドに対する親和性及び特異性についてスクリーニング及び選択する際に採用することができるが、これらのアプローチは、本発明の範囲を変更しないことができることを認識するであろう。

治療的用途に関して、抗体(特に、モノクローナル抗体)は、適切には、ヒト抗体又はヒト化された動物(例えば、マウス)抗体であってもよい。動物抗体は、免疫原としてヒトタンパク質(例えば、タンパク質アイソフォーム)を使用して動物において生じさせてもよい。ヒト化は、典型的にはヒトフレームワーク領域内に、これにより同定されるCDRを移植

50

することを含む。通常、鎖の高次構造を最適化するためにいくつかのその後のレトロ突然変異が必要とされる。このような方法は、当業者に公知である。

【0177】

(5.9.2 アフィポディーの発現)

アフィポディーの構築は、他に記述されており(Ronmark J, Gronlund H, Uhle ´ n, M., Nygren P.Aの文献, 『ヒト免疫グロブリンA(IgA) - タンパク質Aのコンビナトリアル操作からの特異的リガンド(Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A)』, 2002, Eur. J. Biochem. 269, 2647-2655.)、アフィポディーファージディスプレイライブラリーの構築を含む(Nord, K., Nilsson, J., Nilsson, B., Uhle ´ n, M. & Nygren, P.Aの文献, 『a-ヘリカル細菌受容体ドメインのコンビナトリアルライブラリー(A combinatorial library of an a-helical bacterial receptor domain)』, 1995, Protein Eng. 8, 601-608. Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhle ´ n, M. & Nygren, P.Aの文献, 『a-ヘリカル細菌受容体ドメインのコンビナトリアルライブラリーから選択された結合タンパク質(Binding proteins selected from combinatorial libraries of an a-helical bacterial receptor domain)』, 1997, Nat. Biotechnol.15, 772-777.)。 10

【0178】

また、バイオセンサ結合研究を使用する最適なアフィポディー変異体を調査するためのバイオセンサ解析も、他に記述されている(Ronmark J, Gronlund H, Uhle ´ n, M., Nygren P.A, 『ヒト免疫グロブリンA(IgA) - タンパク質Aのコンビナトリアル操作からの特異的リガンド(Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A)』, 2002, Eur. J. Biochem. 269, 2647-2655.)。 20

【0179】

(5.10 抱合された抗体又は他の親和性試薬)

好ましい実施態様において、抗タンパク質アイソフォーム抗体又はそれらの断片は、診断的又は治療的部分に抱合される。抗体は、例えば診断のために、又は所与の治療計画の有効性を決定するために使用することができる。検出は、検出可能な物質に対する抗体を結合することによって容易にすることができる。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光材料、生物発光材料、放射性核種、ポジトロン放射金属(ポジトロン放出断層撮影での使用)及び非放射性常磁性金属イオンを含む。一般に、本発明に従った診断法として使用するために抗体に抱合することができる金属イオンについての米国特許第4,741,900号を参照されたい。適切な酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ又はアセチルコリンエステラーゼを含み；適切な補欠分子族には、ストレプトアビジン、アビジン及びビオチンを含み；適切な蛍光物質には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド及びフィコエリトリンを含み；適切な発光材料には、ルミノールを含み；適切な生物発光の材料には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン及びエクオリンを含み；及び適切な放射性核種には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 及び ^{99}Tc を含む。また、 ^{68}Ga も使用され得る。 30

【0180】

抗タンパク質アイソフォーム抗体又はその断片は、所与の生物反応を修飾するために治療薬又は薬物部分に抱合させることができる。治療薬部分又は薬物部分は、古典的な化学治療薬に限定されるものとして解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物活性を有するタンパク質又はポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質には、例えば、アブリン、リシンA、ブソイドモナス外毒素若しくはジフテリア毒素などの毒素；腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲンアクチベータ、血栓薬又は抗血管新生薬剤、例えばアンジオスタチン若しくはエンドスタチンなどのタンパク質；又はリンホカイン、インターロイキン1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン6(IL-6)、顆粒球マクrophageコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、神経成長因子(NGF)若しくは 40

10

20

30

40

50

その他の成長因子などの生体応答調節剤を含んでいてもよい。

【0181】

このような治療的部分を抗体に抱合するための技術は周知であり、例えばArnonらの文献、『モノクローナル抗体及び癌治療(Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy)』における『癌治療における薬物の免疫ターゲティングのためのモノクローナル抗体(Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)』、Reisfeldらの文献、(編)、pp. 243-56(Alan R. Liss社、1985)；Hellstromらの文献、『制御放出性薬物送達(Controlled Drug Delivery)』における『薬物送達のための抗体(Antibodies For Drug Delivery)』(第2版)、Robinsonらの文献、(編)、pp. 623-53(Marcel Dekker社 1987)；Thorpe、『モノクローナル抗体'84:生物学的及び臨床的適用(Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications)』における『癌療法における細胞障害薬の抗体担体：総説(Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review)』、Pincheraらの文献、(編)、pp. 475-506(1985)；『癌検出及び療法のためのモノクローナル抗体(Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy)』における『癌療法における放射標識された抗体の治療的使用の解析、結果及び将来の期待(Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)』、Baldwinらの文献、(編)、pp. 303-16(Academic Press 1985)；及び、Thorpeらの文献、『抗体-毒素抱合体の調製及び細胞障害特性(The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates)』、Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982)を参照されたい。これらの文献は、その全体が本明細書に組み込まれている。

10

20

【0182】

或いは、Segalによって米国特許第4,676,980号に開示されたように、抗体を第二の抗体に抱合させて、抗体ヘテロ結合を形態することもできる。

抗体は、これに抱合された治療的部分の有無にかかわらず、単独で、又は細胞障害性因子(類)及び/若しくはサイトカイン(類)と組合せて投与される治療薬として使用することができる。

【0183】

(5.11 神経疾患の診断)

本発明に従って、例えば神経疾患を有することが疑われるか、又はそれが既知の被験体から得られたCSFなどの適切な試験試料を診断のために使用することができる。一つの実施態様において、対照試料(神経疾患がない被験体又は被験体群由来)又は前もって決定された基準範囲に相対的な試験試料における1つ以上のタンパク質アイソフォームの存在量の変化は、神経疾患の存在を示し；この目的のために適したタンパク質アイソフォームは、上記の詳細に記載したように、表Iにおいて同定される。別の実施態様において、対照試料又は前もって決定された基準範囲と比較した試験試料における1つ以上のタンパク質アイソフォームの相対的存在量は、神経疾患のサブタイプ(例えば、神経疾患の家族性又は散发性変異体)を示す。更に別の実施態様において、対照試料又は前もって決定された基準範囲に相対的な試験試料における1つ以上のタンパク質アイソフォーム(又はそのいずれかの組合せ)の相対的存在量は、神経疾患の程度又は重症度を示す。任意の上述した方法において、本明細書に記述した1つ以上のタンパク質アイソフォームの検出は、アポリポタンパク質E(ApoE)、アミロイド β -ペプチド(A β)、及び神経スレッドタンパク質(NT P)、等電点電気泳動によって示されるCSFにおけるオリゴクローナル免疫グロブリンバンド(Reiber Hらの文献,(1998)Mult Scler, 3: 111-7)を含むが、これらに限定されない神経疾患に関する1つ以上の更なる生物マーカーの検出と任意に組合せてよい。本明細書に記述した好ましい技術、キナーゼアッセイ法、タンパク質アイソフォームを検出及び/又は視覚化する免疫アッセイ法(例えば、ウエスタンブロット法、免疫沈降に続くドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動、免疫細胞化学、その他)を含むが、これらに限定されない任意の当技術分野における適切な方法を使用してタンパク質アイソフォームのレベルを測定することができる。タンパク質アイソフォームが公知の機能を有する場合、その機能に関するアッセイ法を使用して、タンパク質アイソフォーム発現を測定

30

40

50

してよい。更なる実施態様において、対照試料又は前もって決定された基準範囲に相対的な試験試料における表Iで同定された1つ以上のタンパク質アイソフォーム(又はその任意の組合せ)をコードするmRNAの存在量の変化は、神経疾患の存在を示す。任意の適切なハイブリダイゼーションアッセイ法を使用して、タンパク質アイソフォームをコードするmRNAを検出及び/又は視覚化することによってタンパク質アイソフォーム発現を検出する(例えば、ノーザンブロットアッセイ法、ドットブロット法、インサイチューハイブリダイゼーション法、その他)ことができる。

【0184】

別の本発明の実施態様において、タンパク質アイソフォームに特異的に結合する標識抗体(又はアフィボディなどの他の親和性試薬)、その誘導体及び類似体は、診断目的のために、例えば神経疾患を検出、診断、又はモニターするために使用することができる。好ましくは、神経疾患は、動物において、より好ましくは哺乳類において、及び最も好ましくはヒトにおいて検出される。

10

【0185】

(5.12 スクリーニングアッセイ法)

本発明は、タンパク質アイソフォームと結合するか、又はタンパク質アイソフォームの発現又は活性に対する刺激作用若しくは阻害作用を有する薬剤(例えば、化学物質、タンパク質又はペプチド)を同定するための方法を提供する。また、本発明は、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド若しくはタンパク質アイソフォーム融合タンパク質と結合するか、又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド若しくはタンパク質アイソフォーム融合タンパク質の発現又は活性に対する刺激作用若しくは阻害作用を有する薬剤、候補化合物又は試験化合物を同定する方法を提供する。薬剤、候補化合物又は試験化合物の例には、核酸(例えば、DNA及びRNA)、炭水化物、脂質、タンパク質、ペプチド、ペプチド擬態、小分子及び他の薬物を含むが、これらに限定されない。薬剤は：生物学的ライブラリー；空間的にアドレス指定可能な並列固相又は溶液相ライブラリー；逆重畳を必要とする合成ライブラリー法；「1ピース1化合物」ライブラリー法；及びアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法；を含む、任意の当該技術分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数の適切なアプローチを使用することができる。生物学的ライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限定されるが、一方その他の4つのアプローチは、ペプチドライブラリー、非ペプチドオリゴマーライブラリー又は化合物の小分子ライブラリーに適用できる(Lamの文献,1997,Anticancer Drug Des., 12:145；米国特許第5,738,996号；及び米国特許第5,807,683号、それぞれ、その全体が引用により本明細書に組み込まれる)。

20

30

【0186】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該技術分野において、例えば：DeWittらの文献、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6909；Erbらの文献、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:11422；Zuckermannらの文献、1994、J. Med. Chem. 37:2678；Choらの文献、1993、Science, 261:1303；Carrellらの文献、1994、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059；Carellらの文献、1994、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061；及びGallopらの文献、1994、J. Med. Chem., 37:1233；において見いだすことができ、それぞれ、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

40

【0187】

化合物のライブラリーは、例えば溶液中で(例えば、Houghtenの文献、1992、Bio/Techniques, 13:412-421)、又はピース(Lamの文献、1991、Nature 354:82-84)、チップ(Fodorの文献、1993、Nature, 364:555-556)、細菌(米国特許第5,223,409号)、胞子(特許番号5,571,698号；第5,403,484号；及び第5,223,409号)、プラスミド(Cullらの文献、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1865-1869)若しくはファージ(Scot及びSmithの文献、1990 Science, 249:386-390；Devlin, 1990, Science, 249:404-406；Ceirilaらの文献、1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382；及びFeliciの文献、1991, J. Mol. Biol. 222:301-310)に示されており、それぞれ、その全体が引用により本明細書に組

50

み込まれる。

【0188】

一つの実施態様において、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片(例えば、機能的に活性な断片)、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質と相互作用する(すなわち、結合する)薬剤は、細胞に基づいたアッセイ系で同定される。この実施態様によれば、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームの断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質を発現する細胞を候補化合物又は対照化合物と接触させて、候補化合物がタンパク質アイソフォームと相互作用する能力を決定する。所望の場合、このアッセイ法を使用して、複数の候補化合物(例えば、ライブラリー)をスクリーニングしてもよい。細胞は、例えば原核生物起源(例えば、大腸菌(*E. coli*))又は真核生物起源(例えば、酵母又は哺乳動物)であることができる。更に、細胞は、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームの断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片若しくはタンパク質アイソフォーム融合タンパク質を内因的に発現することができ、又はタンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームの断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片若しくはタンパク質アイソフォーム融合タンパク質を発現するように遺伝子操作することができる。一部の実施態様において、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質の断片若しくは候補化合物を、例えばタンパク質アイソフォームと候補化合物との間の相互作用の検出を可能にするための放射標識(^{32}P 、 ^{35}S 又は ^{125}I など)又は蛍光標識(フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルアルデヒド又はフルオレサミンなど)で標識する。候補化合物がタンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームの断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質と直接又は間接的に相互作用する能力は、当業者に公知の方法によって決定することができる。例えば、候補化合物とタンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームの断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質との間の相互作用は、フローサイトメトリー、シンチレーションアッセイ法、免疫沈降法又はウエスタンブロット分析法によって決定することができる。

10

20

30

【0189】

別の実施態様において、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片(例えば、機能的に活性な断片)、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質と相互作用する(すなわち、結合する)薬剤は、無細胞アッセイ系で同定される。この実施態様に従って、未変性若しくは組換えのタンパク質アイソフォーム又はその断片、又は未変性若しくは組換えのタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド又はその断片、又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質又はその断片を候補化合物又は対照化合物と接触させて、候補化合物がタンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質と相互作用する能力を決定する。所望の場合、このアッセイ法を使用して、複数の候補化合物(例えば、ライブラリー)をスクリーニングしてもよい。好ましくは、最初に、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片若しくはタンパク質アイソフォーム融合タンパク質を、例えばそれを特異的に認識して結合する固定された抗体(又はアフィボディなどの他の親和性試薬)と接触させることにより、又はタンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフ

40

50

フォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片若しくはタンパク質アイソフォーム融合タンパク質の精製された調製物をタンパク質に結合するようにデザインされた表面と接触させることにより、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質を固定させる。タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質は、部分的若しくは完全に精製されていてもよく(例えば、部分的又は完全にその他のポリペプチドを含まない)、又は細胞可溶化物の一部であってもよい。更に、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片は、タンパク質アイソフォーム若しくはその生物学的に活性な部分を含む融合タンパク質又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド及びグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどのドメインであってもよい。或いは、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質は、当業者に周知の技術を使用してビオチン化することができる(例えば、ビオチン標識キット、Pierce Chemical社;ロックフォード, IL)。候補化合物がタンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質と相互作用する能力は、当業者に公知の方法によって決定することができる。

10

20

30

40

50

【0190】

別の実施態様において、細胞に基づいたアッセイ系を使用して、タンパク質アイソフォームの産生若しくは分解の役割を担うか、又はタンパク質アイソフォームの翻訳後修飾の役割を担う酵素などのタンパク質若しくはその生物学的に活性な部分に結合するか、又はその活性を調節する薬剤を同定する。一次選別では、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームアイソフォーム、タンパク質アイソフォーム相同体、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム融合タンパク質若しくは断片の産生、分解又は翻訳後修飾を調節する化合物を同定するために、複数の化合物(例えば、ライブラリー)を：(i)タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームのアイソフォーム、タンパク質アイソフォーム相同体、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム融合タンパク質又は前述のいずれかの生物学的に活性な断片；及び(ii)タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームアイソフォーム、タンパク質アイソフォーム相同体、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム融合タンパク質又は断片のプロセッシングの役割を担うタンパク質：を、天然又は組換えで発現する細胞と接触させる。所望の場合、一次選別において同定された化合物を、次いで関心対象の特異的タンパク質アイソフォームを天然又は組換えで発現する細胞に対して二次選別でアッセイすることができる。候補化合物がタンパク質アイソフォーム、アイソフォーム、相同体、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質の産生、分解又は翻訳後修飾を調節する能力は、フローサイトメトリー、シンチレーションアッセイ法、免疫沈降法及びウエスタンブロット分析法を含むが限定されない当業者に公知の方法によって決定することができる。

【0191】

別の実施態様において、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質と競合的に相互作用する(すなわち、結合する)薬剤は、競合結合アッセイ法で同定される。この実施態様によれば、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソ

フォーム融合タンパク質を発現する細胞を、候補化合物及びタンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質と相互作用することが公知の化合物と接触させ；次いで、候補化合物がタンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質と競合的に相互作用する能力を決定する。或いは、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片と競合的に相互作用する(すなわち、結合する)薬剤は、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質を、候補化合物、及びタンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質と相互作用することが公知の化合物とを接触させることによって、無細胞アッセイ系で同定される。上記したように、候補化合物がタンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質と相互作用する能力は、当業者に公知の方法によって決定することができる。細胞に基づくか、又は無細胞のいずれかで、これらのアッセイを使用して、複数の候補化合物(例えば、ライブラリー)をスクリーニングすることができる。

10

20

【0192】

別の実施態様において、タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの発現を調節する(すなわち、アップレギュレートするか、又はダウンレギュレートする)薬剤は、タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドを発現する細胞(例えば、原核生物起源又は真核生物起源の細胞)を候補化合物又は対照化合物(例えば、リン酸緩衝食塩水(PBS))と接触させること、及びタンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド又はタンパク質アイソフォーム融合タンパク質、タンパク質アイソフォームをコードするmRNA又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードするmRNAの発現を決定することによって同定される。候補化合物の存在下における選択したタンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォームをコードするmRNA又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードするmRNAの発現レベルを、候補化合物の非存在下における(例えば、対照化合物の存在下における)タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、タンパク質アイソフォームをコードするmRNA又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードするmRNAの発現レベルと比較する。次いで、この比較に基づいて、タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの発現のモジュレーターとして候補化合物を同定することができる。例えば、タンパク質アイソフォーム又はmRNAの発現が、候補化合物の存在下において、その非存在におけるよりも有意に高いときに、候補化合物は、タンパク質アイソフォーム又はmRNAの発現の刺激剤として同定される。或いは、タンパク質アイソフォーム又はmRNAの発現が、候補化合物の存在下において、その非存在におけるよりも有意に少ないときに、候補化合物は、タンパク質アイソフォーム又はmRNAの発現の阻害剤として同定される。タンパク質アイソフォーム又はそれをコードするmRNAの発現レベルは、本記述に基づいて当業者に公知の方法によって決定することができる。例えば、mRNA発現は、ノーザンブロット解析又はRT-PCRによって評価することができ、タンパク質レベルは、ウエスタンブロット分析によって評価することができる。

30

40

【0193】

別の実施態様において、タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの活性を調節する薬剤は、タンパク質アイソフォーム若しくはタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドを含む調製物又はタンパク質アイソフォーム若しくはタン

50

パク質アイソフォーム関連ポリペプチドを発現する細胞(例えば、原核細胞又は真核細胞)を、試験化合物又は対照化合物と接触させること、並びに試験化合物がタンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの活性を調節する(例えば、刺激又は阻害する)能力を決定することによって同定される。タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの活性は、タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの細胞情報伝達経路(例えば、細胞内Ca²⁺、ジアシルグリセロール、IP₃、その他)の誘導を検出すること、適切な基質に対する標的の触媒活性又は酵素活性を検出すること、リポーター遺伝子(例えば、タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドに応答し、かつ検出可能なマーカー、例えばルシフェラーゼをコードする核酸に機能的に連結されている調節エレメント)の誘導を検出すること、又は細胞の反応、例えば細胞分化若しくは細胞増殖を検出することによって評価することができ、この場合も同様に、本記述に基づいて、当業者に公知の技術を使用してこれらの活性を測定することができる(例えば、米国特許第5,401,639号が参照され、これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる)。次いで、候補化合物の効果を対照化合物と比較することにより、候補薬剤をタンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの活性のモジュレーターとして同定することができる。適切な対照化合物には、リン酸緩衝食塩水(PBS)及び通常の生理食塩水(NS)を含む。

10

【0194】

別の実施態様において、タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの発現、活性又は発現及び活性の両方を調節する(すなわち、アップレギュレートするか、又はダウンレギュレートする)薬剤は、動物モデルにおいて同定される。適切な動物の例には、マウス、ラット、ウサギ、サル、モルモット、イヌ及びネコを含むが、これらに限定されない。好ましくは、使用される動物は、神経疾患のモデルを表す(例えば、鬱病については、多数の動物モデルが、新たな治療を探索する際、及びメカニズムの研究の際に重要な価値を有した)。最も注目すべきは、鬱病のボルソルト強制水泳試験モデルが、両状況において頻繁に使用されることである(Kirby 及び Luckiの文献, 1997; Rossetti らの文献, 1993)。双極性障害(鬱病及び躁病)において観察される2つの主要な臨床状態もうまくモデル化されている(Cappelliez及び Mooreの文献, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1990 14, 347-58)。精神刺激薬治療も、機能亢進、感覚認識の増強及び警戒を含む躁病におけるものと類似の行動の範囲を生じ得るために、(ある程度の)表面的妥当性、構成概念的妥当性及び予測妥当性を示す躁病のための非常に有用なモデルとなった。双極性疾患の発症のために利用された別のモデルは、行動的増感現象である。このモデルでは、多くの精神刺激薬の繰り返し投与により、薬物で誘導される行動の段階的増大又は増感を引き起こし; また、このモデルでは、躁病に関してかなりの構成概念的妥当性及び表面的妥当性を有する(Koobらの文献, *Pharmacol Biochem Behav* 1997 57, 513-21)。この実施態様によれば、試験化合物又は対照化合物を適切な動物に投与して(例えば、経口的、経直腸的、又は腹腔内若しくは静脈内などの非経口的)、タンパク質アイソフォームの発現、活性、又は発現と活性の両方に対する効果を決定する。アルツハイマー病については、例えばヒト家族性アルツハイマー病(FAD) -アミロイド前駆体(APP)を発現する動物、ヒト野生型APPを過剰発現する動物、 -アミロイド1-42()を過剰発現する動物、FADプレセリニン-1(PS-1)を発現する動物。例えば、Higgins、LS、1999、*Molecular Medicine Today*, 5: 274-276を参照されたい。多発性硬化症については、例えば実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)(Steinmanの文献,(1999), *Neuron*, 24: 511-514))。パーキンソン病については、手術により誘発された黒質線条体病巣を伴い、これにより脳内の主要なドパミン経路が閉塞した齧歯類に加え、6-ヒドロキシドパミン(6-OHDA)又はMPTP(1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジジン)により黒質のドパミン性神経の化学的病変を生じたラット、マウス又は非-ヒト霊長類(例えば、半パーキンソン病ラット)(Pierceらの文献, 1995, *Movement Disorders*; 10, no.6, 731-740; Ekesboらの文献, *Neuroreport*, 8:2567-2570)を、例えば動物モデルとして使用することができる。

20

30

40

50

この実施態様によれば、試験化合物又は対照化合物を適切な動物に投与して(例えば、経口的、経直腸的、又は腹腔内若しくは静脈内などの非経口的)、タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの発現、活性、又は発現と活性の両方に対する効果を決定する。タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの発現の変化は、本記述に基づいて、上記の任意の適切な方法によって評価することができる。

【0195】

更に別の実施態様において、タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドは、タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドに結合するか、又は相互作用するその他のタンパク質を同定するために、ツーハイブリッドアッセイ法又はスリーハイブリッドアッセイ法の「ベイトタンパク質」として使用される(例えば、米国特許第5,283,317号; Zervosらの文献,(1993)Cell 72: 223-232; Maduraらの文献,(1993)J. Biol. Chem. 268: 12046-12054; Bartelらの文献(1993)Bio/Tchniques14: 920-924; Iwabuchiらの文献(1993)Oncogene 8: 1693-1696; 及びPCT公開番号WO94/10300を参照されたい)。当業者に公知であるように、このような結合タンパク質は、また、例えば本発明のタンパク質アイソフォームを含むシグナル伝達経路の上流又は下流のエLEMENTとして本発明のタンパク質アイソフォームによるシグナル伝播に關与する可能性もある。

本発明は、上記スクリーニングアッセイ法によって同定される新規薬剤及び本明細書に記述したような治療のためのその使用を更に提供する。

【0196】

(5.13 タンパク質アイソフォームの治療的使用)

本発明は、治療薬の投与による種々の疾患及び障害の治療又は予防を提供する。このような薬剤には：タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム類似体、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド及びその誘導體(断片を含む); 前述のものに対する抗体(又はアフィポディーなどの他の親和性試薬); タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム類似体、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド及びその断片をコードする核酸; タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードする遺伝子に対するアンチセンス核酸; 並びに、タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードする遺伝子のモジュレーター(例えば、アゴニスト及びアンタゴニスト); を含むが、これらに限定されない。本発明の重要な特徴は、神経疾患に關与するタンパク質アイソフォームをコードする遺伝子の同定である。神経疾患は、神経疾患を有する被験体のCSFにおいて減少した1つ以上のタンパク質アイソフォームの機能若しくは発現を促進する治療的化合物の投与によって、又は神経疾患を有する被験体のCSFにおいて増大した1つ以上のタンパク質アイソフォームの機能又は発現を減少させる治療的化合物の投与によって、治療すること(例えば、症候を改善させること、又は発病若しくは進行を遅延させること)又は予防することができる。

【0197】

一つの実施態様において、タンパク質アイソフォームに対してそれぞれ特異的に結合する1つ以上の抗体(又はアフィポディーなどの他の親和性試薬)は、単独で、又は1つ以上の更なる治療的化合物又は治療と組合せて投与される。このような治療的化合物又は治療の例には、気分安定剤：リチウム、ジバルプロエクス、カルバマゼピン、ラモトリジン; 抗鬱薬：三環系抗鬱薬(例えば、デシプラミン、クロルイミプラミン、ノルトリプチリン)、選択的セロトニン再取込み阻害薬(フルオキセチン(プロザック)、セルトラリン(ゾロフト)、パロキセチン(パキシル)、フルボキサミン(ルボックス)及びシタロプラム(セレクサ)を含むSSRI)、MAOI、ブプロピオン(ウェルプトリン)、ベンラファキシン(エフェクサー)及びミルタザピン(レメロン); 並びに、非定型抗精神病薬：クロザピン、オランザピン、リスペリドン; を含むが、これらに限定されない。P31から-セルチンドール、ハロペリドール、ピレンゼピン、ペラジン、リスパダール、ファモチジン、クロザリル、メソリダジン、クエチアピン、リスペリドン、ジプレクサ(オランザピン)及びクロザピンの非典型抗

精神病薬；並びに、その他の任意のジベンゾチアゼピン。セルチンドール、ハロペリドール、ピレンゼピン、ペラジン、リスパダール、ファモチジン、クロザリル、メソリダジン、クエチアピン；リスペリドン、ジプレクサ(オランザピン)及びクロザピンの非典型抗精神病薬、並びに、その他の任意のジベンゾチアゼピン；ダナパロイド、ナドロパリン及びチンザパリンなどの抗血栓療法；プロ-ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子及びウロキナーゼなどの血栓溶解薬並びに脱線維素薬；アスピリン、パフロメジル(Buflomedil)(Cucinottaらの文献, J Int Med Res (1992) 20:136-49)などの抗血小板剤；プロペントフィリン(Rotherらの文献, Ann N Y Acad Sci. (1996) 777:404-9, Mielkeらの文献, Alzheimer Dis Assoc Disord (1998) 12 Suppl 2:S29-35, Rotherらの文献, Dement Geriatr Cogn Disord, (1998) 9 Suppl 1:36-43)などの神経保護薬；リバスチグミン、ガランタミン(Kumarらの文献, Neurology, (1999) 52 Suppl 2:A395)などのコリンエステラーゼ阻害剤、並びにカルシウム拮抗薬ニモジピン及びニカジピン(Nicadipine)などの現在臨床評価中のその他の細胞保護剤；セルホテル、デキストロファン、セレストアット(Cerestat)、エリプロディル、ラモトリジン、GABAアゴニスト、選択的オピオイドアンタゴニスト、ルペルゾール、遊離ラジカルスカベンジャー、抗ICAM抗体及びGM-1ガングリオシドなどのNMDAアンタゴニスト；アボキナーゼ(登録商標)、アクティブーゼ(登録商標)、アグレノックス(登録商標)、抗ICAM-1抗体、抗 α -2-インテグリン抗体、アービン(Arvin)(登録商標)、アタカンド(登録商標)、セルアクソン(CerAxon)(登録商標)、セレピックス(登録商標)、セレシン(登録商標)、セレストアット(Cerestat)(登録商標)、セルベン(Cervene)(登録商標)、クマジン(登録商標)、フィブラスト(登録商標)、フラキシパリン(登録商標)、フリードクス(Freedox)(登録商標)、インノヘブ(Innohep)(登録商標)、カビキナーゼ(Kabikinase)(登録商標)、クラベル(Klerval)(登録商標)、レウクアレスト(LeukArrest)(登録商標)、リピトール(登録商標)、ロベノックス(登録商標)、ニューロガード(Neurogard)(登録商標)、ニモトップ(登録商標)、オルガラン(登録商標)、ペルサンチン(登録商標)、プラピックス(登録商標)、プロライズ(Prolyse)(登録商標)、プロシナプ(Prosynap)(登録商標)、レオプロ(登録商標)、セルフォテール(登録商標)、シベリウム(登録商標)、ストレプターゼ(登録商標)、ストレプトキナーゼ、サイジェン(Sygen)(登録商標)、チクリド(登録商標)、トレンタール(登録商標)、ビプリネクス(Viprinex)(登録商標)、ワーファリン、ゼナフレックス(Zanaflex)(登録商標)、ゼンドラ(Zendra)(登録商標)、タクリン、ドネペジル、 α -トコフェロール、セレジリン(selegeline)、NSAID、エストロゲン補充療法、フィゾスチグミン、リバスチグミン、ヘバスチグミン(hepastigmine)、メトリホネート、ENA-713、イチョウ葉エキス抽出物、フィゾスチグミン、アムリジン(amridin)、タランピシリン、ジフロシロン、エプタスチグミン、メタンシルホニルクロリド、ネフィラセタム、ALCAR、タルサチジン(talsachidine)、キサノメリン、ガランタミン、及びプロペントフィリン、インターフェロン-1b(ベータセロン(登録商標)、ベータフェロン(登録商標))、インターフェロン-1a(アボネックス(登録商標)、レビフ(登録商標))、グラチラマーアセテート(コパキソン(登録商標))、静脈免疫グロブリン、及び副腎皮質ステロイドを用いる急性再発療法のためのもの(Noseworthyの文献, (1999) Nature 399: suppl. A40-A47)。

【0198】

好ましくは、抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)などの生物学的製剤は、それが投与される被験体に対して同種間である。好ましい実施態様において、ヒトタンパク質アイソフォーム若しくはヒトタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド、ヒトタンパク質アイソフォーム若しくはヒトタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、又はヒトタンパク質アイソフォーム若しくはヒトタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドに対する抗体は、療法(例えば症候を改善させるか、又は発病若しくは進行を遅延させること)又は予防のためにヒト被験者に投与される。

【0199】

(5.13.1 神経障害の治療及び予防)

神経障害は、神経疾患を有する疑いがあるか、又は神経疾患を有する、若しくは神経疾

患を発病するリスクがあることが既知である被験体に対して、神経疾患を有する被験体のCSF又は脳組織において、その神経疾患がない被験体のCSF又は脳組織と比較して差動的に存在する1つ以上のタンパク質アイソフォームレベル又は活性(すなわち、機能)を調節する(すなわち、増大又は減少させる)薬剤を投与することによって治療又は予防することができる。更に、そのような薬剤は、神経疾患を治療するための医薬品の製造において使用しても良い。一つの実施態様において、神経疾患は、特定の神経疾患を有する疑いがあるか、又は特定の神経疾患を有する、若しくは特定の神経疾患を発病するリスクがあることが既知である被験体に対して、上記神経疾患を有する被験体のCSF又は脳組織において減少された1つ以上のタンパク質アイソフォームレベル又は活性(すなわち、機能)をアップレギュレートする(すなわち、増大させる)薬剤を投与することによって治療することができる。別の実施態様において、特定の神経疾患を有する被験体のCSFにおいて増大された1つ以上のタンパク質アイソフォームのレベル又は活性(すなわち機能)をダウンレギュレートする薬剤が投与される。このような化合物の例には：タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片及びタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド；タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォーム断片及びタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドをコードする核酸(例えば、遺伝子療法に使用するため)；並びに、酵素活性を有するタンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドに関する、その酵素活性を調節することがわかっている化合物又は分子を含むが、これらに限定されない。使用することができるその他の化合物、例えばタンパク質アイソフォームアゴニストは、先に、若しくはさらに以前に定義し、又は記述したようなインビトロでのアッセイ法を使用して同定することができる。

【0200】

また、神経疾患は、神経疾患を有する疑いがあるか、又はそれを有する、若しくは神経疾患を発病するリスクがあることが既知である被験体に対して、神経疾患を有する被験体のCSF又は脳組織において増大された1つ以上のタンパク質アイソフォームのレベル又は活性をダウンレギュレートする化合物の投与によって治療又は予防される。別の実施態様において、神経疾患を有する被験体のCSF又は脳組織において減少された1つ以上のタンパク質アイソフォームのレベル又は活性をアップレギュレートする化合物が投与される。このような化合物の例には、タンパク質アイソフォームアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、siRNA、タンパク質アイソフォームに向けられた抗体(又はアフィポディーなどの他の親和性試薬)及びタンパク質アイソフォームの酵素活性を阻害する化合物を含むが、これらに限定されない。その他の有用な化合物、例えばタンパク質アイソフォームアンタゴニスト及び小分子タンパク質アイソフォームアンタゴニストは、インビトロアッセイ法を使用して同定することができる。

【0201】

好ましい実施態様において、療法又は予防法は、個々の被験体の必要に合わせられる。従って、具体的実施態様において、1つ以上のタンパク質アイソフォームのレベル又は機能を促進する化合物は、神経疾患を有する疑いがあるか、又はそれを有することが公知であり、前記1つ以上のタンパク質アイソフォームのレベル又は機能を欠くか、又は対照又は正常基準範囲に対して相対的に減少している被験体に、治療的又は予防的に投与される。更なる実施態様において、1つ以上のタンパク質アイソフォームのレベル又は機能を促進する化合物は、神経疾患を有する疑いがあるか、又はそれを有することが公知であり、前記1つ以上のタンパク質アイソフォームのレベル又は機能が対照又は基準範囲に対して相対的に増大している被験体に、治療的又は予防的に投与される。更なる実施態様において、1つ以上のタンパク質アイソフォームのレベル又は機能を減少させる化合物は、神経疾患を有する疑いがあるか、又はそれを有することが公知であり、前記1つ以上のタンパク質アイソフォーム

のレベル又は機能が対照又は基準範囲に対して相対的に減少している被験体に、治療的又は予防的に投与される。このような化合物の投与によるタンパク質アイソフォームの機能又はレベルの変化は、例えば試料(例えば、CSF、血液若しくは尿の試料又は脳生検組織などの組織試料)を得ること、及び前記タンパク質アイソフォームのレベル若しくは活性若しくは前記タンパク質アイソフォームをコードするmRNAのレベル又は前述の任意の組み合わせをインビトロでアッセイすることによって容易に検出することができる。このようなアッセイ法は、本明細書に記述したように、化合物の投与の前後に行うことができる。

【0202】

本発明の化合物は、神経疾患タンパク質アイソフォームプロフィールを正常の方向へ回復させる任意の化合物、例えば小有機分子、タンパク質、ペプチド、抗体(又はアフィボディーなどのその他の親和性試薬)、核酸など含むが、これらに限定されず、ただしこのような化合物には、リチウム、ジバルプロエクス、カルバマゼピン、ラモトリジン；抗鬱薬：三環系抗鬱薬(例えば、デシプラミン、クロルイミプラミン、ノルトリプチリン)、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(フルオキセチン(プロザック)、セルトラリン(sertraline)(ゾロフト)、パロキセチン(パキシル)、フルボキサミン(ルボックス)及びシタロプラム(セレкса)を含むSSRI)、MAOI、ブプロピオン(ウェルプトリン)、ベンラファキシン(エフェクサー)、及びミルタザピン(レメロン)；及び非定型抗精神病薬：クロザピン、オランザピン、リスペリドン、ハロペリドール、ピレンゼピン、ペラジン、リスパダール、ファモチジン、クロザリル、メソリダジン、クエチアピン；リスペリドン、ジプレクサ(オランザピン)及びクロザピンの非定型抗精神病薬、並びにその他の任意のジベンゾチアゼピンを含むが、これらに限定されない化合物；を含まないことを条件とする。ダナパロイド、ナドロパリン及びチンザパリン；プロ-ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子及びウロキナーゼなどの血栓溶解薬並びに脱線維素薬；アスピリン、パフロメジル(Buflomedil)(Cucinottaらの文献, J Int Med Res (1992) 20:136-49)などの抗血小板剤；プロペントフィリン(Rotherらの文献, Ann N Y Acad Sci (1996) 777:404-9, Mielkeらの文献, Alzheimer Dis Assoc Disord (1998) 12 Suppl 2:S29-35, Rotherらの文献, Dement Geriatr Cogn Disord, (1998) 9 Suppl 1:36-43)などの神経保護薬；リバスチグミン、ガランタミン(Kumarらの文献, Neurology, (1999) 52 Suppl 2:A395)などのコリンエステラーゼ阻害剤、並びにカルシウム拮抗薬ニモジピン及びニカジピン(Nicadipine)などの現在臨床評価中のその他の細胞保護剤；セルフオテル(Selfotel)、デキストロファン、セレストアット(Cerestat)、エリプロディル、ラモルチジン、GABAアゴニスト、選択的オピオイドアンタゴニスト、ルペルゾール、遊離ラジカルスカベンジャー、抗ICAM抗体及びGM-1ガングリオシドなどのNMDAアンタゴニスト；アボキナーゼ(登録商標)、アクティパーゼ(登録商標)、アグレノックス(登録商標)、抗ICAM-1抗体、抗-2-インテグリン抗体、アービン(Arvin)(登録商標)、アタカンド(登録商標)、セルアクソン(CerAxon)(登録商標)、セレピックス(登録商標)、セレシン(登録商標)、セレストアット(Cerestat)(登録商標)、セルベン(Cervene)(登録商標)、クマジン(登録商標)、フィブラスト(登録商標)、フラキシパリン(登録商標)、フリードクス(Freedox)(登録商標)、インノヘブ(Innohep)(登録商標)、カビキナーゼ(Kabikinase)(登録商標)、クラベル(Klerval)(登録商標)、ロイクアレスト(LeukArrest)(登録商標)、リピトール(登録商標)、ロベノックス(登録商標)、ニューロガード(Neurogard)(登録商標)、ニモトップ(登録商標)、オルガラン(登録商標)、ペルサンチン(登録商標)、プラビックス(登録商標)、プロライズ(Prolyse)(登録商標)、プロシナブ(Prosynap)(登録商標)、レオプロ(登録商標)、セルフオテル(登録商標)、シベリウム(登録商標)、ストレプターゼ(登録商標)、ストレプトキナーゼ、サイジェン(Sygen)(登録商標)、チクリド(登録商標)、トレンタール(登録商標)、ビプリネクス(Viprinex)(登録商標)、ワーファリン、ゼナフレックス(Zanaflex)(登録商標)、ゼンドラ(Zendra)(登録商標)、タクリン、ドネペジル、リバスチグミン、ヘバスチグミン(hepastigmine)、メトリゴネート(Metrigonate)、フィソスティグミン(physostigmine)、アムリジン(Amridin)、タルサクリジン(Talsaclidine)、KA-672、フペルジン(Huperzine)、P-11012、P-11149、ジフロシロン(Zifrosilone)、エプタスティグミン(Eptastigmine)、メ

タンスルホニルクロリド、及びS-9977) ; アセチルコリン受容体アゴニスト(例えば、ネフィラセタム(Nefiracetam)、LU-25109、及びNS2330)、ムスカリン受容体アゴニスト(例えば、SB-20206、タルサチジン(Talsachidine)、 ADF-1025B、及びSR-46559A)、ニコチン性コリン作動性受容体アゴニスト(例えば、ABT-418)、アセチルコリンモジュレータ(例えば、FKS-508及びガラントミン(galantamine))又はプロペントフィリン(propentofylline)、インターフェロン-1b(ベータセロン(登録商標)、ベータフェロン(登録商標))、インターフェロン-1a(アボネックス(登録商標)、レビフ(登録商標))、グラチラマーアセテート(コパキソン(登録商標))、静脈免疫グロブリン、及び副腎皮質ステロイドを用いる急性再発療法(Noseworthyの文献,(1999) Nature, 399: suppl. A40-A47)のためのもの。

【0203】

(5.13.2 遺伝子療法)

別の実施態様において、タンパク質アイソフォーム、タンパク質アイソフォームの断片、タンパク質アイソフォーム関連ポリペプチド又はタンパク質アイソフォーム関連ポリペプチドの断片をコードする配列を含む核酸は、遺伝子療法によってタンパク質アイソフォーム機能を促進するために投与される。遺伝子療法は、被験体への、発現されるか又は発現可能な核酸の投与をいう。この実施態様では、核酸がそのコードされたポリペプチドを産生して、ポリペプチドがタンパク質アイソフォーム機能を促進することによって治療効果を媒介する。

当該技術分野において利用可能な遺伝子療法のための任意の適切な方法を本発明に従って使用することができる。

【0204】

遺伝子療法の方法の一般的総説については、Goldspielらの文献、1993, *Clinical Pharmacology*, 12:488-505 ; Wu及びWuの文献、1991, *Biotherapy*, 3:87-95 ; Tolstoshevの文献、1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 ; Mulliganの文献、1993, *Science*, 260:926-932 ; 並びにMorgan及びAndersonの文献、1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 ; Mayの文献、1993, *TIBTECH* 11(5): 155-215を参照されたい。本発明に使用することができる組換えDNA技術の技術分野において一般に知られる方法は、Ausubelら(編)1993、『分子生物学の最新のプロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)』, John Wiley & Sons, NY ; 及びKriegler、1990、『遺伝子の導入及び発現：実験室マニュアル(Gene Transfer and Expression :A Laboratory Manual)』、ストックトン出版(Stockton Press)、NY)に記述されている。

【0205】

特定の態様において、化合物には、タンパク質アイソフォーム又はその断片若しくはキメラタンパク質をコードする核酸であって、タンパク質アイソフォーム又はその断片若しくはキメラタンパク質を適切な宿主内において発現する発現ベクターの一部である前記核酸を含む。特に、このような核酸は、タンパク質アイソフォームコード領域に機能的に連結されたプロモーターであって、誘導性又は構成的(及び任意に、組織特異的)である前記プロモーターを有する。別の詳細な実施態様において、タンパク質アイソフォームコード配列その他の所望の配列がゲノムの所望の部位での相同組換えを促進する領域に隣接しており、それゆえタンパク質アイソフォーム核酸の染色体内発現をもたらす核酸分子が使用される(Koller及びSmithiesの文献、1989、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 : 8932-8935 ; Zijlstraらの文献、1989、*Nature*, 342 : 435-438)。

【0206】

被験体への核酸の送達は、直接でもよく、この場合、被験体が核酸又は核酸を有するベクターに直接曝露され ; このアプローチは、インビボ遺伝子療法として公知である。或いは、被験体への核酸の送達は、間接的であってもよく、この場合、細胞をインビトロにおいて核酸で形質転換し、次いで被験体に移植し、「エクスピボ遺伝子療法」として公知である。

【0207】

別の実施態様において、核酸は、インビボにおいて直接投与され、そこで発現されて、

10

20

30

40

50

コードされた産物を産生する。これは、当該技術分野において公知の多数の方法によって、例えばこれを適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、これが細胞内に入るようにこれを投与することによって、例えば欠損したか、若しくは減弱されたレトロウイルス若しくはその他のウイルスのベクターを使用する感染によって(米国特許第4,980,286号を参照されたい)；裸のDNAの直接注射によって；微小粒子照射の使用によって(例えば、遺伝子銃；Biolistic, Dupont社)；脂質、細胞表面受容体又はトランスフェクト薬でのコーティングによって；リボソーム、微小粒子若しくはマイクロカプセル内へのカプセル化によって；核に入ることが公知であるペプチドに結合してそれを投与することによって；又は、受容体を特異的に発現する標的細胞型に使用することができる、受容体依存性エンドサイトーシスを受けるリガンドに結合してそれを投与することによって(例えば、Wu及びWuの文献、1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432を参照されたい)、達成することができる。別の実施態様において、リガンドがエンドソームを崩壊して核酸のリソソーム分解を回避することができる融合ウイルスペプチドを含む、核酸-リガンド複合体を形成することができる。更に別の実施態様において、核酸は、特異的受容体を標的化することにより、インビボにおける細胞特異的取込み及び発現のための標的とすることができる(例えば、1992年4月16日付けのPCT公報WO92/06180(Wuらの文献)；1992年12月23日付けのWO 92/22635(Wilsonら)；1992年11月26日付けのWO92/20316(Findeisら)；1993年7月22日付けのWO93/14188(Clarkeら)、1993年10月14日付けのWO 93/20221(Young)を参照されたい)。或いは、核酸は、相同組換えにより、細胞内に導入して、発現のために宿主細胞DNA内に組み込むことができる(Koller 及び Smithiesの文献、1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935；Zijlstraらの文献、1989, Nature 342:435-438)。

【0208】

更なる実施態様において、タンパク質アイソフォームをコードする核酸を含むウイルスのベクター、例えばレトロウイルスのベクターを使用することができる(Millerらの文献、1993, Meth. Enzymol. 217:581-599を参照されたい)。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムのパッケージング及び宿主細胞DNAへのその組み込みに必要ではないレトロウイルス配列を欠失するように修飾されている。遺伝子療法に使用されるタンパク質アイソフォームをコードする核酸をベクター内にクローニングすると、被験体への遺伝子の送達が容易になる。レトロウイルスベクターについてのより詳細は、幹細胞を化学療法に対してより耐性にするために造血幹細胞にmdr1遺伝子を送達するためのレトロウイルスベクターの使用を記述するBoesenらの文献、1994、Biotherapy, 6: 291-302において見いだすことができる。遺伝子療法におけるレトロウイルスベクターの使用を例証するその他の参照は：Clowesらの文献、1994、J. Clin. Invest. 93: 644-651；Kiemらの文献、1994、Blood, 83: 1467-1473の；Salmons及びGunzbergの文献、1993、Human Gene Therapy, 4: 129-141；並びにGrossman及びWilsonの文献、1993、Curr. Opin. in Genetics and Development, 3: 110-114である。

【0209】

アデノウイルスは、遺伝子療法に使用することができるその他のウイルスのベクターである。アデノウイルスは、特に呼吸器上皮に遺伝子を送達するための魅力的な媒体である。アデノウイルスは、自然に呼吸器上皮に感染して、そこでこれらが軽度の疾患を生じさせる。アデノウイルスに基づいた送達系のためのその他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞及び筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染することができるという利点を有する。Kozarsky及びWilsonの文献、1993、Current Opinion in Genetics and Development, 3: 499-503は、アデノウイルスに基づいた遺伝子療法の総説を示す。Boutらの文献、1994、Human Gene Therapy, 5: 3-10は、アカゲザルの呼吸器上皮に遺伝子導入するためのアデノウイルスベクターの使用を示した。遺伝子療法におけるアデノウイルスの使用のその他の例は、Rosenfeldらの文献、1991、Science, 252: 431-434；Rosenfeldらの文献、1992、Cell, 68: 143-155；Mastrangeliらの文献、1993、J. Clin. Invest. 91: 225-234；PCT公報WO94/12649；及びWangらの文献、1995、Gene Therapy, 2: 775-783に見いだすことができる。

また、アデノ随伴ウイルス(AAV)も、遺伝子療法における使用に提唱されている(Walshの文献, 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300; 米国特許第5,436,146号)。

【0210】

遺伝子療法に対する別の適切なアプローチは、電気穿孔法、リポフェクション法、リン酸カルシウムを媒介したトランスフェクション、又はウイルス感染などの方法によって組織培養において細胞に遺伝子を導入することを含む。通常、導入方法には、選別可能なマーカーを細胞に導入することを含む。次いで、細胞を選択下に置いて、導入遺伝子を取り込んで発現している細胞を単離する。次いで、これらの細胞を被験体に送達する。

【0211】

この実施態様では、生じる組換え細胞のインビボでの投与の前に、核酸を細胞に導入する。このような導入は、トランスフェクション法、電気穿孔法、微量注入法、核酸配列を含むウイルス又はバクテリオファージベクターでの感染、細胞融合、染色体を媒介した遺伝子移入、微小核体を媒介した遺伝子導入、スフェロプラスト融合などを含むが限定されない、当該技術分野において公知の任意の方法によって実施することができる。細胞への外来遺伝子の導入に関しては、多くの技術が当該技術分野において公知であり(例えば、Loeffler及びBehrの文献, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohenらの文献, 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; Clineの文献, 1985, Pharmac. Ther. 29:69-92を参照されたい)、必要な発生上の及び生理学的な受容細胞の機能を乱さないことを条件として、本発明に従って使用してもよい。本技術は、細胞への核酸の安定な導入をもたらすはずであり、その結果、核酸は、細胞によって発現可能であり、好ましくはその細胞子孫によって遺伝性かつ発現可能である。

10

20

【0212】

結果的に生じる組換え細胞は、当該技術分野において公知の種々の方法によって、被験体に送達することができる。好ましい実施態様において、上皮細胞は、例えば皮下に注射される。別の実施態様において、組換え皮膚細胞は、被験体に対する皮膚移植として適用してもよく;組換え血液細胞(例えば、造血幹細胞又は前駆細胞)は、好ましくは静脈内に投与される。使用に関して想定される細胞の量は、所望の効果、被験体の状態などに依存し、当業者が決定することができる。

【0213】

遺伝子療法のために核酸を導入することができる細胞には、任意の所望の利用できる細胞タイプを包含し、神経細胞、グリア細胞(例えば、オリゴデンドロサイト又はアストロサイト)、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋細胞、肝細胞; Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球などの血液細胞; 種々の幹細胞又は前駆細胞、特に造血幹細胞又は前駆細胞、例えば骨髄、臍帯血、末梢血又は胎児肝臓から得られるもの; を含むが、これらに限定されない。

30

好ましい実施態様において、遺伝子療法のために使用される細胞は、治療される被験体に対して自己由来である。

【0214】

組換え細胞を遺伝子療法に使用する実施態様において、タンパク質アイソフォームをコードする核酸を、それが細胞又はその子孫によって発現可能であるように細胞に導入し、次いで治療効果のために組換え細胞をインビボにおいて投与する。具体的実施態様において、幹細胞又は前駆細胞が使用される。インビトロにおいて単離することができ、維持することができる任意の幹細胞又は前駆細胞を、本発明のこの実施態様に従って使用することができる(例えば、1994年4月28日付のPCT公報WO94/08598; Stampel及びAndersonの文献, 1992, Cell, 71:973-985; Rheinwaldの文献, 1980 Meth. Cell Bio. 21A:229; 並びにPittelkow及びScottの文献, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771; を参照されたい)。

40

別の実施態様において、遺伝子療法のために導入される核酸は、核酸の発現が適切な転写誘導因子の有無を制御することによって制御可能であるように、コード領域に機能的に連結された誘導性プロモーターを含んでいてもよい。

50

【0215】

また、タンパク質アイソフォームをコードするDNAの直接注射を、例えば米国特許第5,589,466号に記述された技術に従って行ってもよい。これらの技術は、「裸のDNA」、すなわち適切な担体の他にリポソーム、細胞又はその他のいかなる物質も存在しない単離されたDNA分子の注射を含む。タンパク質をコードし、かつ適切なプロモーターに機能的に連結されたDNAの注射により、注射部位の近くの細胞においてタンパク質を産生し、注射されたDNAによってコードされるタンパク質に対する被験体の免疫応答の誘発を生じる。好ましい実施態様において、タンパク質アイソフォームに対する免疫応答を誘起するために、(a)タンパク質アイソフォームをコードするDNA及び(b)プロモーターを含む裸のDNAを被験体に注射する。

10

【0216】

(5.13.3 神経疾患を治療するためのタンパク質アイソフォームの阻害)

本発明の一つの実施態様において、神経疾患は、神経疾患を有する被験体のCSFにおいて、上記神経疾患がない被験体のCSFと比較して上昇している1つ以上のタンパク質アイソフォームのレベル(群)及び/又は機能(群)をアンタゴナイズする(阻害する)化合物の投与によって治療又は予防される。この目的のために有用な化合物には、抗タンパク質アイソフォーム抗体(並びにその結合領域を含む断片及び誘導體並びにアフィボディーなどの他の親和性試薬)、タンパク質アイソフォームアンチセンス又はリボザイム核酸、siRNA、及び相同組換えによって内因性タンパク質アイソフォーム機能を「ロックアウトする」ために使用される機能異常タンパク質アイソフォームをコードする核酸(例えば、Capecchiの文献, 1989, Science, 244: 1288-1292を参照されたい)を含むが、限定されない。タンパク質アイソフォーム機能を阻害するその他の化合物は、公知のインビトロでのアッセイ法、例えば試験化合物がタンパク質アイソフォームの別のタンパク質又は結合パートナーに対する結合を阻害するか、又は公知のタンパク質アイソフォーム機能を阻害する能力についてのアッセイ法を使用することによって同定することができる。好ましくは、このような阻害は、インビトロにおいて、又は細胞培養においてアッセイされるが、遺伝的アッセイ法を使用してもよい。また、好ましい技術を使用して、化合物の投与の前後のタンパク質アイソフォームのレベルを検出することができる。好ましくは、以下に詳細を記述したように、適切なインビトロでの又はインビボでのアッセイ法を利用して、特異的化合物の効果及びその投与が患部組織の治療の適応であるかどうかを決定する。

20

30

【0217】

特定の実施態様において、タンパク質アイソフォーム機能を阻害する化合物は、神経疾患がない被験体のCSF又は予め定められた基準範囲と比較して、タンパク質アイソフォームのCSFレベル又は機能的活性の増大(例えば、正常レベル又は所望のレベルよりも高い)が検出される被験体に対して治療的又は予防的に投与される。当該技術分野の標準の方法を使用して、上に概説したように、タンパク質アイソフォームレベル又は機能の増大を測定することができる。好ましいタンパク質アイソフォーム阻害剤組成物は、小分子、すなわち1000ダルトン以下の分子を含む。このような小分子は、本明細書に記述したスクリーニング法によって同定することができる。

【0218】

(5.13.4 タンパク質アイソフォームのアンチセンス制御)

更なる実施態様において、タンパク質アイソフォーム発現は、タンパク質アイソフォームアンチセンス核酸を使用することによって阻害される。本発明は、タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子又はcDNA又はそれらの一部にアンチセンスである少なくとも6ヌクレオチドを含む核酸又はその一部の治療的又は予防的使用を提供する。本明細書に使用されるタンパク質アイソフォーム「アンチセンス」核酸は、タンパク質アイソフォームをコードするRNA(好ましくはmRNA)の一部に対して相補的ないくつかの配列がハイブリダイズすることが可能である核酸をいう。アンチセンス核酸は、タンパク質アイソフォームをコードするmRNAのコード領域及び/又は非コード領域に対して相補的であってもよい。このようなアンチセンス核酸は、タンパク質アイソフォーム発現を阻害する化合物として

40

50

の有用性を有し、神経疾患の治療又は予防に使用することができる。

【0219】

本発明のアンチセンス核酸は、二本鎖若しくは一本鎖オリゴヌクレオチド、RNA若しくはDNA又はその修飾若しくは誘導体であり、細胞に直接投与することができ、又は外来性の導入された配列の転写によって細胞内で産生される。

本発明は、タンパク質アイソフォームアンチセンス核酸の治療的有効量と医薬として許容し得る担体、媒体又は希釈剤とを含む医薬組成物を更に提供する。

別の実施態様において、本発明は、本発明のタンパク質アイソフォームアンチセンス核酸を含む組成物の有効量を細胞に提供することを含む、原核細胞又は真核細胞においてタンパク質アイソフォーム核酸配列の発現を阻害するための方法を提供する。

タンパク質アイソフォームアンチセンス核酸及びその使用は、以下に詳細に記述してある。

【0220】

(5.13.5 タンパク質アイソフォームアンチセンス核酸)

タンパク質アイソフォームアンチセンス核酸は、少なくとも6ヌクレオチドであり、好ましくは6~約50オリゴヌクレオチドの範囲のオリゴヌクレオチドである。具体的態様において、このオリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド又は少なくとも200ヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、DNA若しくはRNA又はキメラ混合物又はその誘導体若しくは修飾バージョンであることができ、一本鎖又は二本鎖であることができる。オリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖残基又はリン酸骨格にて修飾することができる。オリゴヌクレオチドは、ペプチド；細胞膜を越えた輸送を容易にする薬剤(例えば、Letsingerらの文献, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556; Lemaitreらの文献, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652; 1988年12月15日に公開されたPCT公開番号WO88/09810を参照されたい)又は血液

脳関門を越えた輸送を容易にする薬剤(例えば、1988年4月25日に公開されたPCT公開番号WO 89/10134を参照されたい); ハイブリダイゼーションでトリガーされる切断剤(例えば、Krolらの文献, 1988, BioTechniques, 6:958-976を参照されたい)、又はインターカレート剤(例えば、Zon, 1988, Pharm. Res. 5: 539-549を参照されたい)などのその他の付加された基を含んでもよい。

【0221】

本発明の特定の態様において、好ましくは一本鎖DNAのタンパク質アイソフォームアンチセンスオリゴヌクレオチドが提供される。オリゴヌクレオチドは、当該技術分野において一般に公知の置換基で、その構造上の任意の位置にて修飾されていてもよい。

タンパク質アイソフォームアンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下の修飾塩基部分、例えば5-フルオロウラシル、5-ブロムモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、^{-D}-ガラクトシルキユエオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、^{-D}-マンノシルキユエオシン、5-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン(wybutoxosine)、シュードウラシル、キユエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、2,6-ジアミノプリン、及びその他の塩基類似体の任意の適切なものを含んでもよい。

【0222】

別の実施態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾された糖残基、

例えば以下の糖残基：アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシロース、及び六炭糖のうちの1つを含む。

更に別の実施態様において、オリゴヌクレオチドは、以下の修飾されたリン酸骨格：ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホルアミドチオアート、ホスホロアミダート、ホスホルジアミダート、メチルホスホナート、アルキルリン酸トリエステル、ギ酸アセタール、又はギ酸アセタールの類似体を含む。

【0223】

更に別の実施態様において、オリゴヌクレオチドは、 α -アノマーオリゴヌクレオチドである。 β -アノマーオリゴヌクレオチドは、通常の単位とは反対に鎖が互いに平行に伸びている相補RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する(Gautierらの文献, 1987, N ucl. Acids Res. 15: 6625-6641)。

オリゴヌクレオチドは、別の分子、例えばペプチド、ハイブリダイゼーションでトリガーされる架橋剤、輸送剤、又はハイブリダイゼーション-誘発型の切断薬に抱合させてもよい。

【0224】

本発明のオリゴヌクレオチドは、当該技術分野において公知の標準的方法、例えば自動DNA合成装置(Biosearch、Applied Biosystemsなどから市販されているものなど)を使用することによって合成してもよい。例として、ホスホロチオアートオリゴヌクレオチドは、Steinら(1988、Nucl. Acids Res. 16: 3209)の方法によって合成してもよく、メチルホスホナートオリゴヌクレオチドは、制御された細孔ガラス高分子支持体を使用することによって調製することができる(Sarinらの文献, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7448-7451)。

【0225】

別の実施態様において、本発明のタンパク質アイソフォームアンチセンス核酸は、外来配列からの転写によって細胞内で産生される。例えば、ベクターは、それが細胞に摂取され、その細胞内でベクター又はその一部を転写して本発明のアンチセンス核酸(RNA)を産生するように、インピボに導入することができる。このようなベクターには、タンパク質アイソフォームアンチセンス核酸をコードする配列を含むであろう。このようなベクターは、それが転写されて所望のアンチセンスRNAを産生することができる限り、エピソーム性のままであることができ、又は染色体に組み込まれることができる。このようなベクターは、当該技術分野において標準的な組換えDNA技術によって構築することができる。ベクターは、哺乳動物細胞における複製及び発現のために使用されるプラスミド、ウイルス又は当該技術分野において公知であるその他のものことができる。タンパク質アイソフォームアンチセンスRNAをコードする配列の発現は、哺乳動物、好ましくはヒト細胞において作用することが当該技術分野において公知の任意のプロモーターによることができる。このようなプロモーターは、誘導性又は構成的であることができる。このようなプロモーターの例は、先に概説してある。

【0226】

本発明のアンチセンス核酸は、タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子、好ましくはタンパク質アイソフォームをコードするヒト遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部に相補的な配列を含み、しかし絶対的な相補性は好ましくはあるが、必要ではない。本明細書において言及されている「RNAの少なくとも一部に相補的な」配列は、ストリンジエントな条件(例えば、68℃にて7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1mM EDTAにおけるハイブリダイゼーション、かつ68℃にて0.1×SSC/0.1%SDSにおける洗浄を含む高度にストリンジエントな条件、又は42℃にて0.2×SSC/0.1%SDSにおける洗浄を含む適度にストリンジエントな条件)下でRNAとハイブリダイズすることができる十分な相補性を有し、安定な二重鎖を形成する配列を意味し；従って、二本鎖タンパク質アイソフォームアンチセンス核酸の場合、二重鎖DNAの一本鎖を試験してもよく、又は三重鎖の形成をアッセイしてもよい。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度及びアンチセンス核酸の長さに依存する。一般に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、それは、タンパク質アイソフォームをコー

ドするRNAとミスマッチの塩基をより多く含んでいてもよく、なおも安定な二重鎖(又は場合によっては三重鎖)を形成する。当業者であれば、標準的方法を使用してハイブリダイズされた複合体の融点を決定することにより、許容できるミスマッチの程度を確認することができる。

【0227】

(5.13.6 タンパク質アイソフォームアンチセンス核酸の治療的使用)

標的タンパク質アイソフォームが神経疾患を有することが疑われるか、又は罹患している被験体のCSFにおいて過剰発現している場合、タンパク質アイソフォームアンチセンス核酸を使用して、神経疾患を治療又は予防することができる。好ましい実施態様において、一本鎖DNAアンチセンスタンパク質アイソフォームオリゴヌクレオチドが使用される。

タンパク質アイソフォームをコードするRNAを発現するか、又は過剰発現する細胞タイプは、当該技術分野において公知の種々の方法によって同定することができる。このような細胞タイプには、白血球(例えば、好中球、マクロファージ、単球)及び常在性細胞(例えば、アストロサイト、グリア細胞、神経細胞及び上皮細胞)を含むが、これらに限定されない。このような方法には、タンパク質アイソフォーム特異的核酸とのハイブリダイゼーション(例えば、ノーザンブロット法、ドットブロットハイブリダイゼーション、インサイチュハイブリダイゼーションによる)、インビトロにおいてタンパク質アイソフォームに翻訳される、細胞タイプ由来のRNAの能力を観察すること、免疫アッセイ法などを含むが、これらに限定されない。好ましい態様において、被験体由来の一次組織は、例えば免疫細胞化学又はインサイチュハイブリダイゼーションにより、治療前にタンパク質アイソフォーム発現についてアッセイすることができる。

【0228】

医薬として許容し得る担体、媒体又は希釈剤中にタンパク質アイソフォームアンチセンス核酸の有効量を含む本発明の医薬組成物は、神経疾患を有する被験体に投与することができる。

神経疾患の治療に有効であると考えられるタンパク質アイソフォームアンチセンス核酸の量は、標準的な臨床技術によって決定することができる。

具体的実施態様において、1つ以上のタンパク質アイソフォームアンチセンス核酸を含む医薬組成物は、リボソーム、微小粒子又はマイクロカプセルを介して投与される。本発明の種々の実施態様において、このような組成物を使用してタンパク質アイソフォームアンチセンス核酸の制御放出性を達成してもよい。

【0229】

(5.13.7 阻害性リボザイム及び三重ヘリックスアプローチ)

別の実施態様において、神経疾患の症候は、タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子配列を、タンパク質アイソフォームの遺伝子発現を減少させることが周知の遺伝子「ノックアウト」、リボザイム又は三重ヘリックス法と組合せて使用することにより、タンパク質アイソフォーム又はタンパク質アイソフォーム活性のレベルを減少させることによって改善させてもよい。このアプローチでは、リボザイム又は三重ヘリックス分子を使用して、タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子の活性、発現又は合成を調節し、こうして神経疾患の症候を改善させる。このような分子は、突然変異体又は非突然変異体標的遺伝子の発現を減少、又は阻害するようにデザインしてもよい。このような分子の産生及び使用のための技術は、当業者に周知である。

【0230】

タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子mRNA転写物を触媒的に切断するようにデザインされたリボザイム分子は、標的遺伝子mRNAの翻訳及び従って、その遺伝子産物の発現を妨げるために使用することができる(例えば、1990年10月4日に公開されたPCT国際公報WO90/11364; Sarverらの文献, 1990, Science, 247: 1222-1225を参照されたい)。

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒することができる酵素的RNA分子である(総説については、Rossi, 1994, Current Biology, 4, 469-471を参照されたい)。リボザイム作用メカニズムは、相補標的RNAに対するリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーシ

ョン、続くヌクレオチド鎖切断イベントを含む。リボザイム分子の組成は、標的遺伝子mRNAに対して相補的な1つ以上の配列を含まなければならず、かつmRNA切断の役割を担う周知の触媒配列を含まなければならない。この配列については、例えば米国特許第5,093,246号を参照されたく、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0231】

部位特異的な認識配列にてmRNAを切断するリボザイムを使用して、タンパク質アイソフォームをコードするmRNAを破壊することができるが、ハンマーヘッドリボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッドリボザイムは、標的mRNAと相補的な塩基対を形成するフランキング領域によって指示された位置でmRNAを切断する。唯一必要なことは、標的mRNAが以下の2塩基の配列：5'-UG-3'を有することである。ハンマーヘッドリボザイムの構築及び産生は、当技術分野において周知であり、Myersの文献、1995、『分子生物学及び生物工学：総合机上参考書(Molecular Biology and Biotechnology：A Comprehensive Desk Reference)』、VCH出版(VCH Publishers)、ニューヨーク(NY)(特に、図4(833ページ)を参照されたい)、及びHaseloff及びGerlachの文献、1988、Nature, 334、585-591により十分に記述されており、それぞれ、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

10

【0232】

好ましくは、リボザイムは、切断認識部位がタンパク質アイソフォームをコードするmRNAの5'末端の近くに位置するように、すなわち効率を上昇させて、機能しないmRNA転写物の細胞内蓄積を最小化するように操作される。

また、本発明のリボザイムは、テトラヒメナ(*Tetrahymena thermophila*)に天然に存在するもの(IVS又はL-19 IVS RNAとしても公知)、並びにThomas Cech及び協力者によって広範囲に記述されたもの(Zaugらの文献、1984、Science, 224、574-578；Zaug及びCechの文献、1986、Science, 231、470-475；Zaugらの文献、1986、Nature, 324、429-433；大学特許社によって公開された国際特許出願番号WO88/04300；Been及びCechの文献、1986、Cell, 47、207-216)などの、RNAエンドリボヌクレアーゼ(以後「Cech型リボザイム」)を含む。Cech型リボザイムは、標的RNA配列にハイブリダイズし、その後に標的RNAの切断を引き起こす8塩基対活性部位を有する。本発明は、タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子に存在する8塩基対活性部位配列を標的化するこれらのCech型リボザイムを包含する。

20

【0233】

アンチセンスアプローチと同様に、リボザイムは、修飾されたオリゴヌクレオチドで構成することができ(例えば、安定性の改善、ターゲティングなどのために)、タンパク質アイソフォームをインビボで発現するように細胞に送達されるべきである。好ましい送達方法は、トランスフェクトされた細胞がタンパク質アイソフォームをコードする内因性mRNAを破壊し、及び翻訳を阻害するために十分な量のリボザイムを産生するように、強力な構成的pol III又はpol IIプロモーターの制御下にリボザイムを「コードする」DNA構築物を使用することを含む。リボザイムは、アンチセンス分子とは異なり、触媒であるので、効率のために、低い細胞内濃度が必要とされる。

30

【0234】

また、内因性タンパク質アイソフォーム発現は、標的化された相同組換えを使用して、タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子又はこのような遺伝子のプロモーターを不活性化又は「ロックアウト」することによって減少させることができる(例えば、Smithiesらの文献、1985、Nature, 317:230；Thomas及びCapecchiの文献、1987、Cell, 51:503；Thompsonらの文献、1989、Cell, 5:313；並びにZijlstraらの文献、1989、Nature, 342:435を参照されたく、それぞれは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる)。例えば、内因性遺伝子に相同なDNA(タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子のコード領域又は制御領域のいずれか)に隣接した機能しないタンパク質アイソフォーム(又は完全に無関係なDNA配列)をコードする突然変異遺伝子を使用して、選択可能なマーカー及び/又はネガティブ選択可能なマーカーの有無にかかわらず、インビボにて標的遺伝子を発現する細胞をトランスフェクトすることができる。標的化された相同組換えを介したDNA構築

40

50

物の挿入により、標的遺伝子の不活性化を生じる。このようなアプローチは、特に農業分野に適しており、ES(胚性幹)細胞に対する修飾を使用して不活性標的遺伝子をもつ動物子孫を発生させることができる(例えば、Thomas及びCapecchiの文献、1987、並びにThompsonの文献、1989、上記を参照されたい)。しかし、このアプローチは、組換えDNA構築物は、適切なウイルスベクターを使用してインビボにて必要とされる部位に直接投与されるか、又は標的化されるならば、ヒトに使用するために適応させることができる。

【0235】

或いは、タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子の内因性発現は、遺伝子の制御領域(すなわち、遺伝子プロモーター及び/又はエンハンサー)に相補的なデオキシリボヌクレオチド配列を標的化して、体内の標的細胞においてタンパク質アイソフォームをコードする遺伝子の転写を妨げる三重ヘリックス構造を形成することによって減少させることができる(一般に、Heleneの文献、1991、Anticancer Drug Des., 6(6), 569-584; Heleneらの文献、1992、Ann. N.Y. Acad. Sci., 660, 27-36; 並びに、Maherの文献、1992、Bioassays, 14(12), 807-815を参照されたい)。

【0236】

本発明において転写阻害のための三重ヘリックス形成に使用される核酸分子は、一本鎖であり、かつデオキシヌクレオチドで構成されるべきである。これらのオリゴヌクレオチドの塩基組成は、フーグスティーン(Hoogsteen)型塩基対規則を介して三重ヘリックス形成を促進するようにデザインされなければならない。一般に二重鎖の一方の鎖に存在するプリン又はピリミジンのいずれかの大きなストレッチを必要とする。ヌクレオチド配列は、ピリミジンベースであってもよく、これにより、生じる三重ヘリックスの3つの会合した鎖全体にTAT及びCGC+三重鎖を生じるであろう。ピリミジンリッチ分子は、二重鎖の一本鎖のプリンリッチな領域に対して、その鎖と平行な向きに塩基相補性を提供する。加えて、核酸分子は、プリンリッチであるもの、例えばG残基のストレッチを含むものを選択してもよい。これらの分子は、GC対がリッチなDNA二重螺旋と三重ヘリックスを形成し、大部分のプリン残基が標的化された二重鎖の一本鎖に位置して、三重鎖の3つの鎖全体にGGC三重鎖を生じる。

【0237】

或いは、三重ヘリックス形成のために標的化することができる可能性のある配列は、いわゆる「スイッチバック」核酸分子を作製することによって増加してもよい。スイッチバック分子は、交互に5'-3、3'-5様式で合成され、その結果、これらは、最初に二重鎖の一本鎖と、次いで他方と塩基対を形成し、二重鎖の一方の鎖に存在するプリン又はピリミジンのいずれかの大きなストレッチの必要がなくなる。

【0238】

一つの実施態様において、本明細書に記述したアンチセンス、リボザイム又は三重ヘリックス分子を利用して突然変異遺伝子発現を阻害する場合、本技術により、タンパク質アイソフォームの正常な遺伝子対立遺伝子によって産生されるmRNAの転写(三重ヘリックス)又は翻訳(アンチセンス、リボザイム)を非常に効率的に減少、又は阻害して、存在するタンパク質アイソフォームの濃度が正常な表現型に必要なよりも低くなるであろう状況を生じることが可能である。そのような場合、タンパク質アイソフォームをコードする遺伝子の活性の実質的に正常なレベルが維持されることを保証するために、遺伝子療法を使用して、正常な遺伝子活性を示し、かつ利用されるアンチセンス、リボザイム又は三重ヘリックス治療のいずれかに対して影響を及ぼす配列を含まないタンパク質アイソフォームをコードし及び発現する核酸分子を細胞に導入してもよい。或いは、遺伝子が細胞外タンパク質をコードする例では、必要なタンパク質アイソフォーム活性のレベルを維持するために、正常なタンパク質アイソフォームを同時投与することができる。

【0239】

本発明のアンチセンスRNA及びDNA、リボザイム及び三重ヘリックス分子は、先に議論したように、DNA及びRNA分子の合成のための技術分野において公知の任意の方法によって調製してもよい。これらには、例えば固相ホスホラミダイト化学合成などの当該技術分野に

において周知のオリゴデオキシリボヌクレオチド及びオリゴリボヌクレオチドを化学的に合成するための技術を含む。或いは、RNA分子は、アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列のインビトロ及びインビボでの転写によって産生してもよい。このようなDNA配列は、T7又はSP6ポリメラーゼプロモーターなどの適切なRNAポリメラーゼプロモーターを組み込む多種多様なベクターに組み込んでもよい。或いは、使用するプロモーターに応じて、構成的又は誘導的にアンチセンスRNAを合成するアンチセンスcDNA構築物を、株化細胞内に安定に導入することができる。

【0240】

(5.13.8 siRNAアプローチ)

別の実施態様において、神経疾患の症状は、「ノックダウン」低分子干渉RNA(siRNA)配列を使用して、タンパク質アイソフォームのレベル又はタンパク質アイソフォーム活性を減少することにより改善されてもよい。このアプローチにおいて、siRNAを使用し、タンパク質アイソフォームをコードしている遺伝子の活性、発現又は合成を調節し、その結果神経疾患の症状を改善する。このような分子は、突然変異又は非突然変異標的遺伝子の発現を減少又は阻害するようにデザインされてよい。

【0241】

RNA干渉(RNAi)は、標的mRNA切断に導くために有効な分子としてsiRNAを利用する、翻訳後遺伝子サイレンシングメカニズムである。siRNAは、2本鎖RNAの短い(いわゆる20-25ヌクレオチド長)ストレッチであり、通常特徴的2ヌクレオチド長の3'側突出を伴う。これらは、そのまま使用されるか、又は細胞内でsiRNAへプロセシングされるヘアピンRNAを転写するベクターによりインサイチュで産生されてよい。

【0242】

siRNAは、そのsiRNA二重鎖がほどけるのを媒介するRNAiサイレンシング複合体(RISC)との複合体を形成すると考えられる。次にRISCと会合された一本鎖は、配列特異的に標的mRNAに結合する。RISCは、標的mRNAをsiRNA一本鎖と形成された二重鎖の領域のほぼ中央で切断するヌクレアーゼを含む。次に切断された標的mRNAは、細胞内の他の酵素により破壊される。

【0243】

siRNAの総説は、『ネーチャーレビュー・創薬(Nature Reviews Drug Discovery)』(2004) 3, 318-329、『ネーチャーレビュー・遺伝学(Nature Reviews Genetics)』(2004) 5, 355-365、及び『ネーチャーレビュー・分子細胞生物学(Nature Reviews Molecular Cell Biology)』(2005) 6, 413-422に含まれる。

好適なsiRNA分子及びそれらのインビボ産生が可能なベクターは、タンパク質アイソフォームの標的mRNA配列を参照し調製することができる。

【0244】

(5.14 治療的又は予防的化合物のアッセイ法)

また、本発明は、神経疾患の治療又は予防に対する化合物の有効性を同定又は検証するための医薬品の発見に使用するためのアッセイ法を提供する。薬剤は、これらが神経疾患を有する被験体におけるタンパク質アイソフォームレベルを神経疾患がない被験体において見いだされるレベルへ回復させる能力又は神経疾患の実験動物モデルにおいて同様の变化を生じさせる能力についてアッセイすることができる。神経疾患を有する被験体におけるタンパク質アイソフォームレベルを、神経疾患がない被験体において見いだされるレベルへ回復させるか、又は神経疾患の実験動物モデルにおいて同様の变化を生じさせることができる化合物は、更に創薬のためのリード化合物として使用することができるか、又は治療に使用することができる。タンパク質アイソフォーム発現は、好ましい技術、免疫アッセイ法、ゲル電気泳動に続く可視化、タンパク質アイソフォーム活性の検出、又は本明細書において教示したか、若しくは当業者に公知のその他の任意の方法によってアッセイすることができる。臨床モニタリングにおいて、又は薬物開発において、候補薬物をスクリーニングするためにこのようなアッセイ法を使用することができ、タンパク質アイソフォームの存在量を、臨床疾患のための代用マーカーとして役立てることができる。

種々の実施態様において、インビトロアッセイ法を被験体の障害に關与する細胞タイプにおいて代表的な細胞で実施して、化合物がこのような細胞タイプに対して所望の効果を有するかどうかを確認することができる。

【0245】

療法に使用するための化合物は、ヒトでの試験前に、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなど含むが、これらに限定されない適切な動物モデル系で試験することができる。インビボ試験については、ヒトに対する投与の前に、当該技術分野において公知の任意の動物モデル系を使用してもよい。神経疾患の動物モデルの例には：鬱病の動物モデル、例えばヒト家族性BAD遺伝子を発現する動物モデルを含むが、これに限定されず、鬱病のポルソルト強制水泳試験モデルは、これらの両状況において頻繁に使用される(Kirby及びLuckiの文献、1997；Rossettiらの文献、1993)。また、双極性障害(鬱病及び躁病)において観察される2つの主要な臨床状態も、うまくモデル化されている(Cappelliez及びMooreの文献、Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 1990 14, 347-58)。精神刺激薬治療は、機能亢進、感覚認識の増強及び警戒を含む躁病におけるものと類似の行動の範囲を生じ得るために、(ある程度の)表面的妥当性、構成概念的妥当性及び予測妥当性を示す躁病のための非常に有用なモデルとなった。双極性疾患の発症のために利用された別のモデルは、行動的増感現象である。このモデルでは、多くの精神刺激薬の繰り返し投与によりは、薬物で誘導される行動の段階的増大又は感作を引き起こし；また、このモデルでは、躁病に関してかなりの構成概念的妥当性及び表面的妥当性を有する(Koobらの文献、Pharmacol Biochem Behav 1997 57, 513-21)。パーキンソン病について、手術により黒質線条体病巣を誘導し、これにより脳内の主要ドパミン経路を閉塞した齧歯類に加え、6-ヒドロキシドパミン(6-OHDA)又はMPTP(1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン)による黒質線条体中のドパミン性神経細胞に化学的病変を生じるラット、マウス又は非ヒト霊長類(例えば、半パーキンソンラット)(Pierceらの文献、1995, Movement Disorders ; 10, no.6, 731-740；Ekesboらの文献、Neuroreport, 8:2567-2570)を、例えば動物モデルとして使用することができる。アルツハイマー病の動物モデル：ヒト家族性アルツハイマー病(FAD) -アミロイド前駆体(APP)を発現する動物、ヒト野生型APPを過剰発現する動物、 -アミロイド1-42(BA)を過剰発現する動物、FAD プレセリニン-1(PS-1)を発現する動物(例えば、Higgins, LS, 1999, Molecular Medicine Today, 5 : 274-276を参照されたい)。更に、ダウン症候群である個体によって示される神経病理学がアルツハイマー病のものと同様であったので、ダウン症候群のための動物モデル(例えば、TgSOD1、TgPKL、TgS100、TgAPP、TgEts2、TgHMG14、TgMNB、Ts65Dn及びTs1Cje(例えば、Kolaらの文献、1999, Molecular Medicine Today, 5:276-277を参照されたい))を利用して、タンパク質アイソフォームレベルを調節する化合物を試験することができる。多発性硬化症の動物モデル：実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)(Steinmanの文献(1999), Neuron, 24 : 511-514)。また、本開示に基づいて、1つ以上のタンパク質アイソフォームをコードする遺伝子又は遺伝子群の「ノックアウト」突然変異をもつトランスジェニック動物を産生することができることが当業者には明らかであろう。遺伝子の「ノックアウト」突然変異は、変異された遺伝子が発現させなくするか、又は異常型か、若しくは低レベルで発現させる突然変異であり、その結果、遺伝子産物と関連した活性がほとんど、又は完全になくなる。好ましくは、トランスジェニック動物は、哺乳類であり、より好ましくは、トランスジェニック動物は、マウスである。

【0246】

一つの実施態様において、タンパク質アイソフォームの発現を調節する試験化合物は、タンパク質アイソフォームを発現するヒト以外の動物(例えば、マウス、ラット、サル、ウサギ及びモルモット)、好ましくは神経疾患のための非ヒト動物モデル)において同定される。この実施態様によれば、試験化合物又は対照化合物を動物に投与して、1つ以上のタンパク質アイソフォームの発現に対する試験化合物の効果を決定する。タンパク質アイソフォーム(又は複数のタンパク質アイソフォーム)の発現を変化させる試験化合物は、試験化合物で処理した動物又は動物の群における選択されたタンパク質アイソフォーム又は

10

20

30

40

50

タンパク質アイソフォーム(又はこれをコードするmRNA)のレベルを、対照化合物で処理した動物又は動物の群におけるタンパク質アイソフォーム又はmRNAのレベルと比較することによって同定することができる。mRNA及びタンパク質レベルを決定するために、当業者に公知の技術、例えばインサイチュ-ハイブリダイゼーション法を使用することができる。動物は、試験化合物の効果をアッセイするために殺しても、又は殺されなくてもよい。

【0247】

別の実施態様において、タンパク質アイソフォームの活性又はその生物学的に活性な部分を調節する試験化合物は、タンパク質アイソフォームを発現するヒト以外の動物(例えば、マウス、ラット、サル、ウサギ及びモルモット)、好ましくは神経疾患のための非ヒト動物モデルで同定される。この実施態様によれば、試験化合物又は対照化合物を動物に投与して、タンパク質アイソフォームの活性に対する試験化合物の効果を決定する。タンパク質アイソフォーム(又は複数のタンパク質アイソフォーム)の活性を変化させる試験化合物は、対照化合物で処理した動物及び試験化合物で処理した動物をアッセイすることによって同定することができる。タンパク質アイソフォームの活性は、タンパク質アイソフォームの細胞の二次メッセンジャー(例えば、細胞内Ca²⁺、ジアシルグリセロール、IP₃など)の誘導を検出すること、タンパク質アイソフォーム又はその結合パートナーの触媒活性又は酵素活性を検出すること、リポーター遺伝子(例えば、ルシフェラーゼ又は緑色蛍光タンパク質などの検出可能なマーカーをコードする核酸に機能的に連結された本発明のタンパク質アイソフォームに応答する調節エレメント)の誘導を検出すること、又は細胞の反応(例えば、細胞の分化又は細胞増殖)を検出すること、によって評価することができる。当業者に公知の技術を利用してタンパク質アイソフォームの活性の変化を検出することができる(例えば、米国特許第5,401,639号を参照され、その全体が引用により本明細書に組み込まれる)。タンパク質アイソフォームの活性のモジュレーターは、タンパク質アイソフォーム、又はそのタンパク質又はそれらが相互作用するタンパク質又は他の物質の天然の機能のアゴニスト(例えば完全又は部分的アゴニスト)又はアンタゴニストであってよい。例えばモジュレーターは、神経細胞ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)の機能、例えばそれらのイオンチャネルとしての機能のアゴニスト(例えば完全又は部分的アゴニスト)又はアンタゴニストであってよい。

10

20

【0248】

更に別の実施態様において、タンパク質アイソフォーム(又はタンパク質アイソフォームの複数)のレベル又は発現を調節する試験化合物は、神経疾患を有するヒト被験者、最も好ましくは重篤な神経疾患を有する被験者において同定される。この実施態様によれば、試験化合物又は対照化合物をヒト被験者に投与して、タンパク質アイソフォーム発現に対する試験化合物の効果を、生体試料(例えば、CSF、血清、血漿又は尿)におけるタンパク質アイソフォーム又はこれをコードするmRNAの発現を解析することによって決定する。タンパク質アイソフォームの発現を変化させる試験化合物は、対照化合物で処理した被験体又は被験体の群におけるタンパク質アイソフォーム又はこれをコードするmRNAのレベルを、試験化合物で処理した被験体又は被験体の群のものと比較することによって同定することができる。或いは、タンパク質アイソフォームの発現の変化は、試験化合物の投与の前後での被験体又は被験体の群におけるタンパク質アイソフォーム又はこれをコードするmRNAのレベルを比較することによって同定することができる。当業者に公知の任意の適切な技術を使用して、生体試料を得て、mRNA又はタンパク質発現を解析することができる。例えば、本明細書に記述した好ましい技術をタンパク質アイソフォームのレベルの変化を評価するために使用することができる。

30

40

【0249】

別の実施態様において、タンパク質アイソフォーム(又は複数のタンパク質アイソフォーム)の活性を調節する試験化合物は、神経疾患を有するヒト被験者、最も好ましくは重篤な神経疾患である被験者において同定される。この実施態様では、試験化合物又は対照化合物をヒト被験者に投与して、タンパク質アイソフォームの活性に対する試験化合物の効果を決定する。タンパク質アイソフォームの活性を変化させる試験化合物は、対照化合

50

物で処理した被験体由来の試料を試験化合物で処理した被験体由来の生体試料と比較することによって同定することができる。或いは、タンパク質アイソフォームの活性の変化は、試験化合物の投与の前後での被験体又は被験体の群におけるタンパク質アイソフォームの活性を比較することによって同定することができる。タンパク質アイソフォームの活性は、タンパク質アイソフォームの細胞情報伝達経路(例えば、細胞内Ca²⁺、ジアシルグリセロール、IP₃など)の誘導、タンパク質アイソフォーム若しくはその結合パートナーの触媒活性若しくは酵素活性、又は細胞の反応、例えば細胞の分化又は細胞増殖を、生体試料(例えば、CSF、血清、血漿又は尿)において検出することによって評価することができる。当業者に公知の技術を使用して、タンパク質アイソフォームの二次メッセンジャーの誘導の変化又は細胞の反応の変化を検出することができる。例えば、RT-PCRを使用して、細胞二次メッセンジャーの誘導の変化を検出することができる。

10

【0250】

特定の実施態様において、タンパク質アイソフォームのレベル又は発現を対照被検者(例えば、神経疾患がないヒト)において検出されるレベルへ変化させる薬剤を、更なる試験又は治療的使用のために選択する。別の好ましい実施態様において、タンパク質アイソフォームの活性を対照被検者(例えば、神経疾患がないヒト)において見いだされる活性へ変化させる試験化合物を、更なる試験又は治療的使用のために選択する。

【0251】

別の実施態様において、神経疾患と関連した1つ以上症候の重症度を減少させる試験化合物は、神経疾患を有するヒト被験者、最も好ましくは重篤な神経疾患をもつ被験体において同定される。この実施態様によれば、試験化合物又は対照化合物を被験体に投与して、神経疾患の1つ以上症候に対する試験化合物の効果を決定する。1つ以上の症候を減少させる試験化合物は、対照化合物で処理した被験体を試験化合物で処理した被験体と比較することによって同定することができる。神経疾患に精通した医師に公知の技術を使用して、試験化合物が神経疾患と関連した1つ以上症候を減少させるかどうか決定することができる。例えば、アルツハイマー病を有する被験体における認知能力を改善する試験化合物は、これらの神経疾患を有する被験体を治療するために有益である。

20

好ましい実施態様において、このような神経疾患を有するヒトにおける神経疾患と関連した1つ以上症候の重症度を減少させる薬剤を、更なる試験又は治療的使用のために選択する。

30

【0252】

(5.15 治療的組成物及び予防的組成物、並びにその使用)

本発明は、本発明の薬剤の有効量を被験体に投与することを含む治療方法を提供する。好ましい態様において、化合物は、実質的に精製されている(例えば、実質的にその効果を限定するか、又は望ましくない副作用を生じる物質がない)。被験体は、好ましくはウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物含むが、これらに限定されない動物であり、好ましくは哺乳類、及び最も好ましくは、ヒトである。具体的実施態様において、非ヒト哺乳類が被験体である。

化合物が核酸を含むときに使用することができる製剤及び投与法は、先に記述してあり；更なる適切な製剤及び投与経路を以下に記述してある。

40

【0253】

種々の送達系、例えばリポソーム内のカプセル化、微小粒子、マイクロカプセル、本化合物を発現することができる組換え細胞、受容体依存性エンドサイトーシス(Wu及びWuの文献, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照されたい)、レトロウイルス又はその他のベクターの一部としての核酸の構築などが公知であり、本発明の化合物を投与するために使用することができる。導入の方法は、経腸的又は非経口的であることができ、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外及び経口経路を含むが、これらに限定されない。化合物は、任意の便利な経路によって、例えば注入又は大量瞬時投与によって、上皮性又は粘膜皮膚の裏打ち(例えば、口腔粘膜、直腸及び腸管粘膜など)を介した吸収によって投与してもよく、その他の生物活性物質と共に投与してもよい。投与は、全身的

50

又は局部的であることができる。加えて、脳室内及び髄腔内注射を含む任意の適切な経路によって本発明の医薬組成物を中枢神経系に導入することが望ましいかもしれず；例えば、脳室内注入は、オマヤレザバー(Ommaya reservoir)などの貯蔵部に取り付けられた脳室内カテーテルによって容易にしてもよい。また、吸入器又は噴霧器の使用、及びエアロゾル化薬との処方により肺投与も利用することができる。

【0254】

具体的実施態様において、治療を必要とする領域に局所的に本発明の医薬組成物を投与することが望ましいであろうし；これは、例えば、限定するものではないが、外科手術の間の局所的な注入、例えば注射による、カテーテルによる、又はインプラントによる局所適用によって達成してもよく、前記インプラントは、サイラスティック膜などの膜又は線維を含む多孔性、非多孔性又はゲル状材料である。一つの実施態様において、投与は、CSF内へ、又は神経変性部位(又は前方部位)に、又はCNS組織への直接注射によることができる。

10

【0255】

別の実施態様において、化合物は、小胞、特にリポソームにおいて送達することができる(Langerの文献, 1990, Science, 249:1527-1533; Treatらの文献, 『感染症及びガンの治療法におけるリポソーム(Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer)』、Lopez及びFidler(編), Liss, ニューヨーク, pp. 353-365 (1989); Lopez同書, 317-327頁を参照されたい; 同書を一般に参照されたい)。

【0256】

更に別の実施態様において、化合物は、制御放出系において送達することができる。一つの実施態様において、ポンプを使用してもよい(Langer, 上記; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwaldらの文献, 1980, Surgery 88:507; Saudekらの文献, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照されたい)。別の実施態様において、高分子物質を使用することができる(『制御放出の医学的適用(Medical Applications of Controlled Release)』, Langer及びWise(編), CRC Pres., ボカラトン, FL (1974); 『制御型薬物の生体利用性、薬剤設計、及び効力(Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance)』, Smolen及びBall(編), Wiley, ニューヨーク (1984); Ranger及びPeppas, J.の文献, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; また、Levyらの文献, 1985, Science 228:190; Durinらの文献, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howardらの文献, 1989, J. Neurosurg. 71:105; も参照されたい)。更に別の実施態様において、制御放出系は、治療標的、すなわち脳の近傍に、従って必要な全身用量のわずかに一部を配置することができる(例えば、Goodsonの文献, 『制御放出の医学的適用(Medical Applications of Controlled Release)』中, 上記, vol. 2, pp. 115(1984)を参照されたい)。

20

30

その他の適切な制御放出系は、Langerによる総説で論議されている(1990, Science 249:1527-1533)。

【0257】

別の実施態様において、本発明の化合物がタンパク質をコードする核酸である場合、核酸は、それを適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、及びそれが細胞内にはいるように投与することによって、例えばレトロウイルスベクター(米国特許第4,980,286号参照されたい)を使用することによって、又は直接注射によって、微小粒子照射(例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont)又は脂質若しくは細胞表面受容体若しくはトランスフェクト薬でのコーティングの使用によって、又は核に入ることが公知であるホメオボックス様ペプチドに結合させてそれを投与すること(例えば、Joliotらの文献, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868を参照されたい)などによって、インピボにて投与して、そのコードされたタンパク質の発現を促進することができる。或いは、核酸は、細胞内に導入して、相同組換えによって、発現のために宿主細胞DNA内に組み込むことができる。

40

【0258】

また、本発明は、医薬組成物を提供する。このような組成物は、薬剤の治療的有効量の

50

医薬として許容し得る担体とを含む。特定の実施態様において、「医薬として許容し得る」という用語は、連邦政府若しくは州政府の規制機関によって承認されたか、又は動物に、及び特にヒトに使用するための米国薬局方又はその他の一般に認識された薬局方に収載されたことを意味する。「担体」という用語は、希釈剤、アジュバント、賦形剤又は治療薬と共に投与される媒体をいう。このような薬学的担体は、水及びピーナッツ油、大豆油、鉱油、ごま油等の石油、動物、植物又は合成起源のものを含む油等の滅菌液であることができる。水は、医薬組成物を静脈内に投与するときの好ましい担体である。特に注射用溶液については、食塩水並びに水性デキストロス溶液及びグリセロール溶液も液体担体として使用することができる。適切な薬学的賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、胡粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアリン酸、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどを含む。また、組成物には、所望の場合、微量の湿潤剤若しくは乳化剤又はpH緩衝剤を含むことができる。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、制御放出性製剤などの形をとることができる。組成物は、トリグリセリドなどの従来結合剤及び担体と共に坐薬として処方することができる。経口製剤には、医薬品等級のマニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム、その他のなどの標準的担体を含むことができる。適切な薬学的担体の例は、E.W Martinによって「レミントンの医薬品科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」に記述されている。このような組成物には、化合物の治療的有効量を、好ましくは精製した形態で、被験体への投与に適した形態を提供するのに適切な量の担体と共に含む。製剤は、投与様式に合わせるべきである。

10

20

30

40

50

【0259】

好ましい実施態様において、組成物は、ヒトへの静脈内投与のために適した医薬組成物としてルーチンの手順に従って製剤化される。典型的には、静脈内投与のための組成物は、無菌の等張性の水性緩衝液中の溶液である。必要な場合、組成物は、溶解剤及び注射部位における疼痛を緩和するリドカインなどの局所麻酔薬も含んでいてもよい。一般に、成分は、別々に又は単位剤形に混合されて、例えば活性薬剤の量を示すアンプル又はサッシェなどの、密封して封止された容器内に乾燥凍結乾燥粉末又は水を含まない濃縮物として供給される。組成物を輸液により投与する場合は、無菌医薬品等級の水又は食塩水を含有する輸液ボトルと共に供給される。組成物が注射によって投与される場合、成分が投与前に混合され得るように、注射用滅菌水又は塩類溶液のアンプルを提供することができる。

【0260】

本発明の化合物は、中性又は塩形態として製剤化することができる。医薬として許容し得る塩は、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するものなどの遊離アミノ基と形成されたもの、及びナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの遊離カルボキシル基と形成されたものを含む。

【0261】

神経疾患の治療に有効であろう本発明の化合物の量は、本記述に基づいて標準的な臨床技術によって決定することができる。加えて、最適な用量範囲を同定するのを補助するために、インビトロアッセイ法を任意に使用してもよい。また、製剤に使用される正確な用量は、投与経路及び疾患又は障害の重症度に依存し、開業医及びそれぞれの被験体の環境の判断に従って決定されるべきである。しかし、静脈内投与のための適切な用量範囲は、一般に体重1キログラムあたり約20~500マイクログラムの活性化化合物である。鼻腔内投与のために適した用量範囲は、一般に約0.01pg/kg体重~1mg/kg体重である。有効用量は、インビトロ又は動物モデル試験系に由来する用量反応曲線から推定してもよい。

坐薬は、一般に重量の0.5%~10%の範囲の活性成分を含み；経口製剤は、好ましくは10%~95%の活性成分を含む。

【0262】

また、本発明は、本発明の医薬組成物の成分の一種又は複数種を詰め込んだ1つ以上の容器から構成される医薬パック又はキットを提供する。任意にこのような容器には、医薬品又は生物学的製剤の製造、使用又は販売を規制する政府機関によって定められた形態の通知を付随することができ、この通知は、(a)ヒト投与のための製造、使用又は販売の機関による承認、(b)使用のための指示、又は両方を反映する。

【0263】

(5.16 イメージング技術によるタンパク質アイソフォームの存在量の決定)

イメージング技術によってタンパク質アイソフォームの存在量を決定することの利点は、このような方法が非侵襲的であり(試薬投与を不要にする)及び被験体から試料を抽出する必要がないことである。

適切なイメージング技術には、ポジトロン放出断層撮影(PET)及びシングルフォトンエミッションCT(SPECT)を含む。このような技術を使用するタンパク質アイソフォームの可視化には、適切なラベル、例えば¹⁸F、¹¹C又は¹²³Iなどの放射性トレーサの取込み又は結合が必要である(例えば、本技術の更なる詳細について、NeuroRx-Journal of American Society for Experimental Neuro Therapeutics (2005) 2(2), 348-360及び同上のページ361-371を参照されたい)。放射性トレーサは、適切に標識された特異的リガンドの被験体に対する投与によって(例えば、注射によって)タンパク質アイソフォームに組み込んでよい。或いは、これらは、被験体に(例えば、注射によって)投与してもよいタンパク質アイソフォームに特異的な結合抗体(又はアフィボディーなどの親和性試薬)に組み込んでよい。イメージングのためのアフィボディーの使用の考察については、例えばOrlova A、Magnusson M、Eriksson TL、Nilsson M、Larsson B、Hoiden-Guthenberg I、Widstrom C、Carlsson J、Tolmachev V、Stahl S、Nilsson FY、『ピコモル親和性HER2結合アフィボディー分子を使用する腫瘍イメージング(Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding affibody molecule)、Cancer Res.2006年4月15日;66(8):4339-48を参照されたい)。

【実施例】

【0264】

(6. 実施例：神経疾患患者のCSFに差動的に発現されるタンパク質の同定)

以下の例示的及び非限定的な手順を使用して、種々の神経疾患を有する被験体及び対照被験体由来のCSF試料中のタンパク質を等電点電気泳動し、それに続くSDS-PAGEにより分離して、解析した。下記に記載した手順のパート6.1.1~6.1.19(含む)をここで「参照プロトコール」と命名する。

【0265】

(6.1 材料及び方法)

(6.1.1 試料調製)

それぞれのCSF試料について受け取り次第、タンパク質濃度アッセイ(Pierce BCA Cat# 23225)を行った。タンパク質分離の前に、関心対象のタンパク質の解析を妨げる、又は限定するかもしれないタンパク質を除去することによってタンパク質の分離の質を高め単純化し、解析を容易にするために、それぞれの試料には、一定のタンパク質の選択的除去のための処理を行った。1999年6月1日に出願された国際特許出願第PCT/GB99/01742を参照されたく、その全体は、特に3及び6ページに関して、引用により組み込まれる。

【0266】

CSFからのアルブミン、ハプトグロビン、トランスフェリン及びイムノグロブリンG(IgG)の除去(「CSF除去」)をアフィニティークロマトグラフィー精製工程によって行い、試料をアルブミン、ハプトグロビン、及びトランスフェリンの選択的除去のための固定化した抗体、並びに免疫グロブリンGの選択的除去のためのプロテインGを含む、一連のHi-Trapカラムに通した。直列型に組み立てた2本のアフィニティークラムは、抗体をHi-Trapカラムに含まれるプロテインG-セファロースに結合させることによって調製した(プロテインG-セファロースHi-Trapカラム(1ml)Pharmacia Cat. No. 17-0404-01)。これは、カラムに以下の溶液を続けて循環させることにより行った：(1)ダルベッコリン酸緩衝食塩水(Gibc

o BRL Cat. No. 14190-094) ; (2)濃縮抗体溶液 ; (3)200mM炭酸ナトリウム緩衝液、pH8.35 ; (4)架橋溶液(200mM炭酸ナトリウム緩衝液、pH8.35、20mMジメチルピメリミダート) ; 及び、(5)500mMエタノールアミン、500mM NaCl。次いで、第3の(誘導体化していない)プロテインG Hi-Trapカラムを直列型に組み立てたカラムの下端に取り付けた。

【 0 2 6 7 】

該クロマトグラフィーの手順は、7回までの一連の実行を続けて行うことができるように、Akta Fast Protein Liquid Chromatography(FPLC)システムを使用して自動化した。試料を、一連の3本のHi-Trapカラムを通し、そこで、アフィニティークロマトグラフィー媒体が選択的に上記タンパク質に結合し、これにより試料から除去される。カラムへの添加や洗浄段階の間にカラムを通して溶出した非吸着物質の画分(「素通り画分」)及びImmunopure Gentle Ag/Ab Elution Buffer(Pierce Cat. No. 21013)での段階溶出により溶出した結合タンパク質の画分(吸着 / 溶出画分)(典型的には1チューブあたり3ml)を回収した。非吸着物質を含む溶出液を画分で回収し、これをプールし、遠心限外濾過により脱塩 / 濃縮し、2D PAGEによる更なる解析まで貯蔵した。

10

【 0 2 6 8 】

およそ300 µgの総タンパク質を含む、減量したCSF量を分注し、等量の10% (w/v)SDS(Fluka 71729)、2.3% (w/v)ジチオスレイトール(BDH 443852A)を添加した。試料を95 °Cで5分間加熱し、次いで20 °Cまで冷却した。次いで、125 µlの以下の緩衝液を試料に添加した :

8M尿素(BDH 452043w)

4% CHAPS(Sigma C3023)

65mM ジチオスレイトール(DTT)

2% (v/v)レゾライト(Resolytes) 3.5-10(BDH 44338 2x)

20

この混合物を激しく攪拌し、13,000rpmで5分間15 °Cにて遠心分離し、上清を後述するように等電点電気泳動によって分離した。

【 0 2 6 9 】

(6.1.2 等電点電気泳動)

等電点電気泳動(IEF)は、製造元の説明書に記述される手順に従ってイモビライン7 Dry Strip Kit(Pharmacia BioTech社)を使用して行った。イモビライン7 ドライストリップキット、Pharmacia社、# 18-1038-63、エディションABを参照されたい(その全体が、引用により本明細書に組み込まれる)。固定化pH勾配(IPG)ストリップ(18cm、直線勾配でないpH3-10ストリップ ; Pharmacia Cat. # 17-1235-01)を、イモビラインドライストリップユーザーズマニュアルに記載されているように8M尿素、2% (w/v)CHAPS、10mM DTT、2% (v/v)レゾライト3.5-10の溶液中で20 °Cにて一晚再水和させた。IEFについては、50 µlの上清(上記のように調製した)をストリップの塩基側末端に置かれたカップ充填ユニットでストリップに充填した。次いで、充填したゲルを鉱油(Pharmacia 17-3335-01)で覆い、すぐに電圧を、Pharmacia EPS3500XL電力供給装置(Cat 19-3500-01)を使用して、以下のプロファイルに従ってストリップにかけた :

30

初期電圧=300V、2時間

3時間にわたって300Vから3500Vまでの直線傾斜

3500Vにて19時間保持

40

この過程の全段階について、電流の上限を12本のゲルで10mAに設定し、ワット数の上限を5Wとした。温度は、操作の全体において20 °Cに保った。

【 0 2 7 0 】

(6.1.3 ゲル平衡化及びSDS-PAGE)

最終的な19時間の工程の後、ストリップをすぐに取り出し、以下の組成の第1の溶液 : 6M尿素 ; 2% (w/v)DTT ; 2% (w/v)SDS ; 30% (v/v)グリセロール(Fluka 49767) ; 0.05M Tris/HCl、pH6.8(Sigma Cat T-1503) ; 中に20 °Cにて10分間浸漬した。ストリップを第1の溶液から取り出して、以下の組成の第2の溶液 : 6M尿素 ; 2% (w/v)ヨードアセトアミド(Sigma I-6125) ; 2% (w/v)SDS ; 30% (v/v)グリセロール ; 0.05M Tris/HCl、pH6.8 ; 中に20 °Cにて10分間浸漬した。第2の溶液からの除去の後、ストリップを以下に明記したような修飾を

50

伴うHochstrasserらの1988年、分析生化学(*Analytical Biochemistry*)173:412-423に従って、SDS-PAGEの支持ゲル上に添加した(その全体が、引用により本明細書に組み込まれる)。

【0271】

(6.1.4 支持ゲルの調製)

ゲルは、以下の寸法の2つのガラス板の間で成形した：幅23cm×長さ24cm(裏板)；幅23cm×長さ24cmで中央19cmに深さ2cmの切れ込みを持つ(前板)。SDS-PAGEゲルの共有結合を促進するために、裏板を -メタクリル-オキシプロピルトリメトキシシラン(BindSilaneJ；Pharmacia Cat. #17-1330-01)の0.4%エタノール溶液で処理した。前板を(RepelSilaneJ Pharmacia Cat. #17-1332-01)で処理してゲルの接着を減少させた。過剰な試薬を水で洗浄することによって除去し、プレートを乾燥させた。この段階で、ゲルの識別として、及びプレートのコートした表面を同定するためのマーカーとして、接着性のバーコードをゲルマトリックスと接触しないような位置の裏板に貼った。

10

【0272】

乾燥プレートを、13個のゲルサンドイッチを収納できる成形箱で組み立てた。それぞれのサンドイッチの前板及び裏板は、厚さ1mm、幅2.5cmのスペーサーによって間隔を空けた。サンドイッチには、ゲル重合後のサンドイッチの分離を容易にするために、アセテートシートを挟んだ。次いで、Hochstrasserら、前掲の方法に従って成形を行った。

【0273】

9~16%の直線的ポリアクリルアミド勾配は、アンジェリケ勾配成形システム(Large Scale Biology)を使用して、前板の切れ込みレベルの2cm下の点に及ぶように成形した。保存液は、以下の通りであった。アクリルアミド(40%の水溶液)は、Serva社からのものであった(Cat. #10677)。架橋剤は、PDA(BioRad 161-0202)であり、最初の総モノマー含量の2.6%(w/w)の濃度であった。ゲル緩衝液は、0.375M Tris/HCl、pH8.8であった。重合触媒は、0.05%(v/v)TEMED(BioRad 161-0801)であり、開始剤は、0.1%(w/v)APS(BioRad 161-0700)であった。SDSは、ゲルには含まず、濃縮用ゲルを使用しなかった。成形ゲルを、一晩20℃にて重合させ、次いで、それぞれ6mlのゲル緩衝液と共に密封したポリエチレンバッグ中で4℃にて貯蔵し、4週以内に使用した。

20

【0274】

(6.1.5 SDS-PAGE)

0.5%(w/v)アガロース(Fluka Cat 05075)の溶液を泳動用緩衝液(0.025M Tris、0.198M グリシン(Fluka 50050)、1%(w/v)SDS、微量のプロムフェノールブルーを補った)で調製した。アガロース懸濁液を攪拌しながら70℃まで、アガロースが溶解するまで加熱した。支持された二次元目のゲルの上部をアガロース溶液で満たし、平衡化したストリップをアガロース中に置き、ゲルが二次元目のゲルと密接に接触するまで、パレットナイフで穏やかにたたいた。ゲルを、Amessらの文献、1995、*Electrophoresis*, 16:1255-1267(その全体が引用により本明細書に組み込まれる)によって記述されているように、二次元目の泳動用タンクに置いた。タンクを、緩衝液のレベルがポリアクリルアミドを含んだ二次元目ゲルの領域の上部より高くなるまで(上記の)泳動用緩衝液で満たし、そうすることにより、活性なゲル領域の効率的な冷却を行った。泳動用緩衝液を、ゲルで形成された上部緩衝液コンパートメントに添加し、次いで、Consort E-833電力供給装置を使用して直ちに電圧をゲルにかけた。一時間、ゲルを20mA/ゲルにて泳動した。ワット数の上限を150Wに設定し、6枚のゲルを含むタンクの場合、電圧の上限を600Vに設定した。1時間後、次いでゲルを40mA/ゲルにて、以前と同じボルト及びワット数の上限で、プロムフェノールブルーの線がゲルの下端から0.5cmのところまで泳動した。緩衝液の温度は、操作の間中16℃に保った。ゲルは、複製して泳動しなかった。

30

40

【0275】

(6.1.6 染色)

電気泳動操作が完了したら、ゲルを固定のためにタンクから直ちに取り出した。ゲルカセットの上部プレートを慎重に除去し、ゲルを床板に結合したままにした。次いで、その

50

ゲルが付着したままの床板を12枚のゲルを収容することができる染色装置内に置いた。ゲルを40% (v/v) エタノール (BDH 28719)、10% (v/v) 酢酸 (BDH 100016X)、50% (v/v) 水 (MilliQ-Millipore社) の固定液に完全に浸漬し、これをゲル全体にわたって連続的に循環させた。一晚保温の後、固定液をタンクから排出し、ゲルを7.5% (v/v) 酢酸、0.05% (w/v) SDS、92.5% (v/v) 水中での30分間の液浸によってプライムした。次いで、プライミング溶液を排出し、ゲルを4時間Sypro Red (Molecular Probes社, ユージーン, OR) の染色液に完全に液浸することによって染色した。この目的のために使用することができる代替の色素は、1999年10月5日に出願の米国特許出願第09/412168号に記述されており、その全体は引用により本明細書に組み込まれる。

【0276】

10

(6.1.7 ゲルのイメージング)

コンピューター可読出力を、先の5.1節に記述したApollo 2スキャナー (Oxford Glycosciences社、オックスフォード、UK) で蛍光染色したゲルをイメージングすることにより作製した。このスキャナーは4つの複合蛍光マーカー (M1、M2、M3、M4と命名されている) をもつゲルキャリアを有し、該マーカーはイメージの外形を補正するのに使用され、かつ走査が正確に行われたことを保証する品質管理特徴である。

走査のためには、ゲルを染色から取り出し、水ですすぎ、簡単に空気乾燥させ、Apollo 2でイメージングした。イメージングの後、ゲルを、少量の染色液を含むポリエチレンバッグに密閉し、次いで4 で保存した。

【0277】

20

(6.1.8 データのデジタル解析)

データは、より詳細に以下に記載したとおり、米国特許第6,064,654号 (国際公開第98/23950として公開した) の5.4節及び5.5節 (引用により本明細書に組み込まれる) に記載されているように処理した。

スキャナーからの出力は、最初にMELANIE 7 II 2D PAGE解析プログラム (リリース2.2、1997、BioRad Laboratory社、Hercules、California、Cat. #170-7566) で処理して、位置決め点M1、M2、M3及びM4を自動検出し；イメージを自動トリミングし (すなわち、ゲルの境界の外側に存在する走査イメージの領域、例えば参照フレームから生じるシグナルを除去)；粉塵による人為的結果をフィルターで除き；特徴を検出及び定量化し；及びGIF形式のイメージファイルを作製する。特徴は、以下のパラメーターを使用して検出した：

30

平滑度 = 2

ラプシアン閾値 50

部分閾値 1

彩度 = 100

とがり度 = 0

最小周囲長 = 10

【0278】

(6.1.9 等電点及び分子量値の割り当て)

ランドマーク同定を使用してイメージで検出された特徴の等電点及び分子量を決定した。CSFL1からCSFL16までの命名した16個のランドマーク特徴を、標準的なCSFイメージにおいて同定した。これらのランドマーク特徴に、表IIにおいて同定された等電点及び/又は分子量値を割り当てた。

40

【0279】

【表 2】

表II：本試験において使用したランドマーク特徴

ランドマーク名	pI	Mw
CSFL-1	-	185225
CSFL-2	5.39	141699
CSFL-3	6.29	100728
CSFL-4	5.06	71271
CSFL-5	7.68	68368
CSFL-6	5.67	48092
CSFL-7	4.78	41342
CSFL-8	9.2	39998
CSFL-9	5.5	31894
CSFL-10	6.94	27439
CSFL-11	5.9	23992
CSFL-12	4.28	21372
CSFL-13	8.92	16019
CSFL-14	4.66	14570
CSFL-15	6.43	10961
CSFL-16	4.22	-

10

20

【0280】

可能な限り多くのこれらのランドマークを、それぞれのゲルイメージデータセットにおいて同定した。次いで、試験ゲルのそれぞれの特徴には、2つの最も近いランドマークに一次補間又は補外(MELANIE 7-IIソフトウェアを使用する)することにより等電点値を割り当て、2つの最も近いランドマークに一次補間又は補外(MELANIE 7-IIソフトウェアを使用する)することにより分子量値を割り当てた。

【0281】

(6.1.10 主要マスターイメージとのマッチング)

イメージを、粉塵などの著しい人為的結果を除去するために、タンパク質特徴が不鮮明になるなどの著しい異常のあるイメージ、又は試料の添加量が少なすぎて、若しくは全体のイメージ強度が小さすぎて最も強い特徴以外を同定できないようなイメージ又は解像度が不十分すぎて特徴の正確な検出ができないようなイメージを排除するために編集した。次いで、イメージを全部の試料セットからの一つの共通のイメージと対にすることによって比較した。この共通のイメージである「主要マスターイメージ」を、タンパク質添加量(最大特徴検出と一致する最大添加量)、十分に分離されたミオグロビン領域(ミオグロビンを内部標準として使用した)及び一般的な画質に基づいて選択した。加えて、主要マスターイメージを、解析に含まれる全てのイメージの一般的な代表と思われるイメージであるように選択した。(主要マスターゲルを、試験ゲルの代表であると判断することによるこの過程は、以下に記述した方法で再チェックされ、主要マスターゲルが代表的ではないと見なされた場合には、これを排除して、代表的な主要マスターゲルが見いだされるまで本過程を繰り返した。)

30

40

後述するように、残りの試験ゲルのそれぞれを、主要マスターイメージと個々にマッチさせ、共通のタンパク質の特徴を主要マスターイメージと個々の試験対象ゲルイメージとの間で対にした。

【0282】

(6.1.11 試料間のクロスマッチング)

差動的に発現される特徴を同定する目的で多数の試料の統計解析を容易にするために、それぞれの試験ゲルの形状を以下のようにタンパク質の特徴のパターンと主要マスターのパターンとの間で最大にマッチするように調整した。それぞれの試験ゲルのイメージを、

50

多分解能ワーピング法を使用して主要マスターイメージの形状に個々に変形した。この手順では、試料間の電気泳動分離過程の物理的パラメーターの小さな変化によってもたらされる歪みについてイメージ形状を修正する。観察される変化は、見いだされた歪みが単に形状の歪みではなく、むしろ平滑な流れであるが、局所的及び全体的規模で変化があるようなものである。

【0283】

多分解能モデリングの基本的原理は、平滑なシグナルが、「スケールスペース」を介した進化としてモデル化され得ることであり、連続的でより微細なスケールでの詳細が低分解近似値に付加して高分解能シグナルが得られる。このタイプのモデルは、(参照イメージ上のそれぞれの画素位置にて定義される)ベクターの流動領域に適用され、任意の滑らかさの流動を、比較的自由度をもたせずにモデル化することができる。それぞれのイメージを初期イメージに由来するスタック又はピラミッドのイメージにまで減少させるが、あらゆるレベルでそれぞれの方向の2つの要素(ガウシアンピラミッド)によって分解能を平滑化させて減少させ、対応する異なったイメージも同じレベルで計算して、平滑化イメージとその先祖との間の相違(ラブラシアンピラミッド)を表す。従って、ラブラシアンイメージは、異なるスケールでイメージの詳細を表す。

10

【0284】

任意の2つの所与のイメージ間の歪みを見積もるために、ピラミッドにおいてレベル7で(すなわち、7回の連続した分解能の減少後に)計算を行った。ラブラシアンイメージを、両方向の隣接するグリッド位置間で50%重複して16×16ピクセルの格子に分割し、参照及び試験イメージについて対応する格子正方形間の交差相関を計算した。次いで、相関マトリックスの最大の位置まで歪み変位を与えた。全ての変位が特定のレベルにて算出された後で、これらをピラミッドの次のレベルに組み込んで、試験イメージに適用し、次いで該変位に対する更なる補正を次のスケールで算出した。

20

【0285】

ワーピング処理により、主要マスターイメージとその他の試料のイメージとの間における共通の特徴に優れた整列をもたらした。MELANIE7 II 2D PAGE解析プログラムを使用して、主要マスターとその他のイメージのそれぞれとの間で、およそ500~700のマッチした特徴対を算出して記録した。このプログラム精度は、上記の様式でイメージを整列することによって有意に増強された。なお更に精度を改善するために、全ての対を、最終的にMe IView相互作用編集プログラムにおいて目で試験し、残った識別できるほどに誤った対を除去した。このような識別できるほどに誤った対の数が、好ましい技術の全体の再現性を上回った場合(同じ生体試料の繰り返し解析によって測定される)、主要マスターゲルであると選択されたゲルは、主要マスターゲルとして使用するための試験ゲルの代表には不十分と判断した。その場合、主要マスターゲルとして選ばれたゲルを却下して、異なるゲルを主要マスターゲルとして選択し、この過程を繰り返した。

30

次いで、全てのイメージは、一緒に加算して複合マスターイメージを作製し、全ての成分イメージの全てのゲルの特徴の位置及び形状を後述するようにこの複合マスターに重ね合わせた。

40

【0286】

一旦全ての初期対が計算され、修正され、保存されると、二番目の工程が行われ、それにより、元の(歪んでいない)イメージを主要マスターの形状に二度目に変形して、この時には、対となったゲル特徴の重心によって定義される多数の連結点の平滑な補間によって計算される流れ場を使用した。従って、複合マスターイメージは、主要マスターイメージをその特徴の記述子で初期化することによって作製した。それぞれのイメージを主要マスター形状に変形させたので、これをデジタル的に一画素ずつ複合マスターイメージにたし合わせて、上で概説した手順で対にならなかった特徴を同様に複合マスターイメージの記述に加算し、これらの重心を、流れ場補正を使用してマスター形状に合わせた。

【0287】

処理の最終段階を複合マスターイメージ及びその特徴の記述子に適用すると、これは、

50

この時点で共通の形状に変形された研究の全てのイメージの全ての特徴を表す。特徴をこれらの間の重複の程度に従って、関連したセット又は「クラスター」と一緒にグループ化した。次いで、それぞれのクラスターには、特有に同定できるインデックスである分子クラスターインデックス(MCI)を与えた。

MCIは、異なるイメージ上のマッチした特徴のセットを同定する。従って、MCIは、異なる試料における2D分離で同等の位置で溶出するタンパク質又はタンパク質群を表す。

【0288】

(6.1.12 プロファイルの構築)

最終複合マスターイメージに対する試験の全ての成分ゲルのマッチングの後に、それぞれの特徴の強度を測定して、保存した。この解析の最終結末は、それぞれの同定された特徴について：1)複合マスターイメージ(MCI)の中の対応する特徴に関連した特有の識別コード、2)ゲル内の特徴のx、y座標、3)タンパク質アイソフォームの等電点(pI)、4)タンパク質アイソフォームの見かけの分子量(MW)、5)シグナルの値、6)それぞれの前述の測定についての標準偏差、及び7)この特徴がマッチしたマスターゲルに対してそれぞれの特徴のMCIを関連づける方法、を含むデジタルプロファイルを作り出した。実験室情報管理システム(LIMS)により、このMCIプロファイルによってこれを作製した実際の保存されたゲルを突き止めることができ、その結果、ゲルプロファイルデータベースのコンピューター解析によって同定されるタンパク質を検索することができる。また、LIMSにより、プロファイルを元の試料又は患者にまでさかのぼることも可能となった。

【0289】

(6.1.13 プロファイルの統計解析)

列記されているマスター群の中のMCIからタンパク質アイソフォームを同定するために、下記に明記した統計ストラテジーを使用した。

a)存在する特徴の割合を、可能性のあるタンパク質アイソフォームである各MCIについて対照試料及びCSF試料で全体に算出した。MCIは、神経疾患由来の試料の少なくとも20%に存在するか、又は年齢がマッチした対照群由来の試料の少なくとも20%に存在することを必要とした。次いで、これらの基準を満たしたMCIを更なる解析に供した。

【0290】

b)次いで、それぞれの残りのMCIについての特徴の存在の割合を更に試験して、MCIは3群-神経疾患試料群において少なくとも20%の特徴存在を有するが、対照群の全ての試料において存在しなかったもの(4+と命名)、対照試料群において少なくとも20%の特徴存在を有するが、神経疾患試料群の全ての試料において存在しなかったもの(4-と命名)及び疾患と対照試料群との両方に存在するMCIに分けた。両方の試薬群において存在するMCIを、更なる解析に供した。

【0291】

c)(b)で残ったMCIのための第2の選択ストラテジーは、倍数変化に基づいた。MCI内のタンパク質アイソフォームの規準化されたタンパク質の平均存在量の比を表す倍数変化は、それぞれの神経疾患試料とその年齢がマッチした一連の対照との間のそれぞれのMCIについて算出した。1.5の最小閾値を有意であるとみなされる倍数変化に設定した。1.5未満の倍数変化を有する試料を「1」と表し、1.5よりも大きな倍位数変化を有する試料を、更なる解析に供した。

【0292】

d)最終的な選択ストラテジーのためには、ウィルコクソン順位和検定を使用した。この検定を1.5よりも大きい倍数変化を有するそれぞれのMCIについて、対照試料と神経疾患試料との間で行った。0.05以下のp値を記録したMCIを95%の選択性で統計学的に有意なタンパク質アイソフォームとして選択した。統計学的に有意な変化($p < 0.05$)を有するMCIを「3」と表し、統計的有意性に到達しなかったMCIを「2」と表した。後の2つの群については、それぞれ倍数増加又は倍数減少を示すために「+」又は「-」を使用した。

【0293】

これらの4つの解析ストラテジーの適用により：(a)対照被検者又は神経疾患患者の試料

10

20

30

40

50

の少なくとも20%の特徴存在、(b)選ばれた選択性での定性的相違、(c)選ばれた選択性での閾値以上に有意な倍数変化又は、(d)ウィルコクソン順位和検定で測定される統計学的に優位な変化に基づいて、タンパク質アイソフォームを選択することができた。

【0294】

(6.1.14 選択したタンパク質の回収及び解析)

タンパク質アイソフォームを、ロボットを使用して切り出して、処理し、トリプシン分解ペプチドを産生した。トリプシン処理ペプチドを、PerSeptive Biosystems Voyager-DETM STRマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析計を使用する質量分析によって解析し、選択されたトリプシン処理ペプチドを、ナノフロー(登録商標)エレクトロスプレー Zスプレー源を装備した4重極飛行時間型(Q-TOF)質量分析計(MicroMass社、Altrincham、U.K.)を使用するタンデム型質量分析(MS/MS)によって解析した。タンパク質アイソフォームの部分的アミノ酸配列及び同定のためには、トリプシン処理ペプチドの解釈されてないタンデム質量スペクトルをバージョンv.C.1のSEQUEST検索プログラム(Engらの文献、1994、J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5:976-989)を使用して検索した。データベースによる同定のための基準には：トリプシンの切断特異性；データベースから返されたペプチドにおける、a、b及びyイオンセットの検出、並びにカルバミドメチル化を考慮した全てのシステイン残基での質量の増加を含んだ。検索したデータベースは、国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)によって保持される重複のないデータベースのタンパク質の登録で構築されるデータベースであり、これは<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>でアクセス可能である。SEQUESTプログラムを使用するスペクトル-スペクトル相関を介したタンパク質の同定に続いて、MALDI-TOF質量スペクトルにおいて検出された質量を同定されたタンパク質内にあるトリプシン分解ペプチドに割り当てた。SEQUESTプログラムを使用するトリプシン分解ペプチドの未解釈のMS/MSスペクトルでの検索を介してもアミノ酸配列が同定できない場合には、ペプチドのタンデム質量スペクトルを当該技術分野において公知の方法を使用して手動で解釈した(ペプチドイオンの低エネルギーによる断片化の質量スペクトルを解釈する場合には、Gaskellらの文献、1992、Rapid Commun Mass Spectrom. 6:658-662を参照されたい)。

【0295】

(6.1.15 神経疾患関連タンパク質の識別)

タンパク質アイソフォームを同定する方法では、上記の質量分析によって実験的に得られた天然に存在するヒトタンパク質のペプチド配列を使用して、公開されたヒトゲノム配列においてコードされたエキソンを同定し組織化する。

【0296】

ヒトゲノムの化学配列を明らかにすることにおける最近の劇的な進歩により、この莫大な課題が完成間近になった(Venter, J.C.らの文献,(2001)『ヒトゲノムの配列(The sequence of the human genome.)』Science, 16:1304-51; International Human Genome Sequencing Consortium.の文献(2001)『ヒトゲノムの一次塩基配列決定及び解析(Initial sequencing and analysis of the human genome.)』Nature 409:860-921)。この配列情報は、我々が、分子進化、比較ゲノム科学、病理メカニズム及び分子医薬を含む多くの生物学的過程を理解する上で、実質的な衝撃を有することにはほぼ疑いがない。ヒトゲノムの配列に固有の完全な医学的価値が実現されるためには、ゲノムが「組織化」され、注釈付けされる必要がある。これは、少なくとも以下の3つのことを意味する。(i)ゲノムの個々の部分の配列を、それぞれの染色体の明瞭で連続的な配列に構築すること。(ii)遺伝子を含むそれぞれの染色体の領域の明白な同定。(iii)遺伝子の微細構造及びそのmRNAとタンパク質産物の特性の決定。「遺伝子」の定義は、ますます複雑な問題である一方で(H Pearsonの文献：『遺伝子とは何か(What is a gene?)』Nature, (2006)24:399-401)、創薬及び薬物開発の現在の関心事は、機能的な発現タンパク質をコードするこれらの遺伝子の目録である。これらの遺伝子のサブセットは、全てとまではいかないがほとんどの病態の分子基盤に関与している。従って、医薬品産業にとって重要な現在の目標は、ヒトゲノムにおいて全てのこのような遺伝子を同定し、これらの微細構造を記述することである。

【0297】

OGAP(登録商標)データベースを形成するための、ペプチド質量、ペプチドの特徴、EST及び公共ドメインゲノム配列データの処理及び組み込み

別々の遺伝学的単位(エキソン、転写物及び遺伝子)を以下の一連の工程を使用して同定した。

1. Ensembl及び種々の遺伝子予測プログラムから利用できる遺伝子同定を組合せることにより、ヒトゲノムに位置づけるトリプシン処理ペプチドを含む「仮想トランスクリプトーム」を作製する。また、これには、遺伝子同定におけるSNPデータ(dbSNPから)及び全ての選択的スプライシングを組み込む。また、公知の混入物を仮想トランスクリプトームに付加する。

【0298】

2. OGeS質量分析データベースの全てのタンデムスペクトルを、仮想トランスクリプトームの1つに対して位置づけることができるペプチドを産生するように解釈する。一連の自動化されたスペクトル解釈アルゴリズムを使用してペプチド同定を行う。

3. 典型的には20ppmという質量分析計の質量精度に基づいた寛容性を使用して、タンデムペプチドによってヒットした転写物由来の全てのペプチドを検索することにより、OGeS質量分析データベースの全ての質量がマッチしたペプチドのセットを作製する。

【0299】

4. 全てのタンデムペプチド及び質量がマッチしたペプチドを、「タンパク質クラスター」の形態で組合せる。これは、共通のペプチドヒット数に基づいて配列をクラスターにグループ化する再帰的過程を使用してなされる。生物学的配列は、それらが1つ以上のタンデムペプチド又は質量がマッチしたペプチドを共有する場合に、同じクラスターに属するとみなされる。

5. 誤って同定したペプチドを除外するための初期のフィルタリング後に次いで、生じたクラスターをヒトゲノムに対して位置づける。

【0300】

6. 次いで、タンパク質クラスターを、その近接度及びタンパク質クラスター内のそれぞれのペプチドの同時観察を使用して、予備的遺伝子境界線を定義する領域に集約させる。近接度は、同じ染色体の同じ鎖上の80,000ヌクレオチド内に存在するペプチドとして定義される。クラスター観察スコアリング及びゲノムに対する複数マッピングに基づいた種々の排除則を使用して出力結果を洗練する。生じる「確認された遺伝子」が、それぞれのクラスターにおける質量分析によって観察されるペプチド及び質量を最もよく説明するものである。また、遺伝子の公称座標がこの段階の出力結果である。

【0301】

7. それぞれの確認された遺伝子の転写物の最もよいセットを、タンパク質クラスター、ペプチド、EST、候補エキソン及び元のタンパク質スポットの分子量から作製する。

8. それぞれの同定された転写物を、観察されたペプチドを提供する試料と関連させる。

9. データを考察し、マイニングするためのアプリケーションの使用。工程1~8の結果は、それぞれが多数のエキソン及び1つ又は複数の転写物からなる遺伝子を含むデータベースである。適用は、この組み込まれたゲノム/プロテオームデータを表示し、及び検索するためのアプリケーションを書いた。Ensemblと同じGolden経路座標系に位置づけられた任意の特徴(OMIM疾患座、InterProその他)を、位置及び微細構造の一致によって、これらの遺伝子に相互参照することができるであろう。

【0302】

結果

本方法を使用して、およそ1,000,000個のペプチド配列を作製して、タンパク質をコードする遺伝子及びそれらのエキソンを同定し、結果としてアルツハイマー病で2306遺伝子、多発性硬化症で173遺伝子、鬱病で260遺伝子を含む、67の異なる組織及び57の疾患にわたる18083個の遺伝子のタンパク質配列を同定した。実験的に決定された配列とOGAP(登録

10

20

30

40

50

商標)データベースの配列とを比較後、これらのタンパク質アイソフォームは、神経疾患に対して高度に特異的であり、予後及び診断性質を示すことが示された。

【0303】

(6.2 結果)

これらの2Dゲルによる初期実験により、3個のタンパク質アイソフォームが同定され、これらは正常なものと比較して双極性II型鬱病、多発性硬化症及びパーキンソン病において(本発明の好ましいタンパク質アイソフォームについては図2に図示されている)、更には正常なものと比較してアルツハイマー病において(本発明の好ましいタンパク質アイソフォームについては図3に図示されているように)変化していた。これらの3種のタンパク質アイソフォームの詳細は、表Iに示されている。

10

【0304】

(7. 実施例：神経疾患患者の側頭葉由来の脳組織の細胞質ゾル画分において差動的に発現されたタンパク質の同定)

(7.1 試料調製)

AD組織の試料を、プロテアーゼインヒビターを添加した50mMトリスHCl、250mMショ糖、1mM EDTA pH7.4中での最初のホモジネーションにより分画し、引き続き60%ショ糖クッション上で分画する。38,000gで30分間遠心後、上清を取り出し(細胞質ゾル画分)、タンパク質をクロロホルム/メタノールにより沈殿させる。

これらのタンパク質を、1D試料緩衝液(63mMトリスHCl pH7.4、10%グリセロール、2% SDS、2%メルカプトエタノール、0.0025%プロモフェノールブルー)中で、95℃で3分間加熱することにより、可溶化する。

20

【0305】

(7.2 ゲル泳動)

次にこの試料を10%ポリアクリルアミドゲル(スタッキングゲル-Protean 2, BioRad)上に添加し、0.025Mトリス、0.192Mグリシン、0.1%SDS泳動緩衝液を用い、200V(定電圧)で未染色の分子量マーカーと、染色前端がゲルの底に到達するまで、同時泳動する。

次にこのゲルを、カセットから慎重に取り出し、10%酢酸、40%エタノール、50%水の溶液で、一晚一定に穏やかに振盪し固定する。次にゲルを、7.5%酢酸、0.05%(w/w)SDSの溶液中に30分間浸漬する。これに続き、ゲルを、7.5%酢酸、0.06%(v/v)0geSインハウス色素を含有する染色液中に3時間保温する。

30

蛍光染色したゲルのデジタルイメージを、Fuji FLA5000レーザーキャナー(励起488nm、520nmロングパス発光フィルター)を用い、ピクセル解像度200µmで得る。分子量マーカーを用い、試料バンドの見かけの分子量を補間する。

【0306】

(7.3 タンパク質励起及びID)

試料ゲルレーンを、ゲルからメスで切り出し、1mmの水平な断片に切断する。各断片を、垂直に3個の小片に切り、その後0.5mlエッペンドルフチューブに入れる。次にこれらの試料を、100mM炭酸水素アンモニウム(Fluka)で洗浄する。これを10分後に除去し、次にアセトニトリル(HPLC等級, BDH)を添加する。更に10分後、アセトニトリルを除去し、各小片を遠心蒸発器を用いて10分間乾燥する。その後この手順を繰り返す。

40

【0307】

乾燥したゲル小片に、133ng/µlトリプシン(Sequencing Grade Modified, Promega)5µlを、各試料チューブへと添加した。これを、室温で5分間静置する。更に66.5ng/µlトリプシンの5µlを、各試料チューブに添加し、容積を10µlとする。次にこれらの試料を、40℃の炉で2時間保温する。

インキュベーション後、試料を冷却し、次にペプチドを含有する個々のトリプシン溶液を、第二の試料チューブに移した。1.5µlの一定分量を各チューブから採取し、MALDI上で分析する。残りのペプチド試料をLC-QToF上を流す。

【0308】

(7.4 結果)

50

1DゲルによるCNS組織の分析は、3種のタンパク質アイソフォームを同定し、これらはアルツハイマー病のCNS組織に独特に存在し、正常CNS組織には存在しなかった。これら3種のタンパク質アイソフォームの詳細を、表Iに示す。

【0309】

(8 実施例：本発明のエキスピタンパク質アイソフォームのグリコシル化部位の同定)

上で述べたように、異なるアイソフォームでは、それらの一次配列の長さが異なり、またこれらが有する翻訳後修飾も異なる。下記に詳述したプロトコールにより、所与のタンパク質アイソフォームに存在するグリコシル化部位の正確な特性付けが可能となる。

【0310】

(8.1 グリコキャプチャー-LC-MS)

試料を、終濃度15mM過ヨウ素酸ナトリウムに平衡化して1時間室温で保温したEcono-Pac 10DG脱塩カラム(Bio-Rad社、Hercules CA)を使用して、カップリング緩衝液(100mM酢酸ナトリウム、pH5.5及び150mM NaCl)に交換する。同じEcono-Pac10DG脱塩カラムを使用して、過ヨウ素酸ナトリウムを試料から除去し、カップリング緩衝液で平衡化したヒドラジド樹脂を試料に添加する(1mlゲル/5mgタンパク質)。室温にて10~24時間の一晚の保温後、樹脂を1000×gにて10分間の遠心分離によって収集し、非糖タンパク質を、等量の尿素溶液(8M尿素/0.4M NH₄HCO₃、pH8.3)で3回樹脂を洗浄することによって除去する。

【0311】

樹脂上のタンパク質を55℃にて30分間尿素溶液中で変性させ、その後に尿素溶液で3回洗浄する。最後の洗浄後、尿素溶液を除去し、樹脂を3倍容量の水で希釈する。トリプシンを1mgトリプシン/200mgタンパク質の濃度で添加し、37℃で一晩消化する。ペプチドを室温にて30分間、8mM TCEP(Pierce社、Rockford、IL)を添加することによって還元し、室温にて30分間、10mMヨードアセトアミドを添加することによってアルキル化する。トリプシンにより放出されたペプチドを、1.5M NaCl、80%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)、100%メタノールの3倍容量で3回、及び0.1M NH₄HCO₃で6回樹脂を洗浄することによって除去する。N結合型糖ペプチドを、一晚のN-グリコシダーゼF(1mlのN-グリコシダーゼF/40mgのタンパク質の濃度にて)の添加によって樹脂から放出させる。次いで、樹脂を沈殿させ、上清を保存する。樹脂を80%アセトニトリル/0.1% TFAで2回洗浄し、上清を合わせた。放出されたペプチドを乾燥させ、LC-MS/MS解析のために0.4%酢酸に再懸濁する。

【0312】

トリプシン処理後にビーズ上に残っている糖ペプチドをメタノールで3回、次いで15%アンモニア水溶液(pH>11)で2回洗浄する。メチルイソ尿素を1Mにてアミン基の100倍過剰モルで15%アンモニア水溶液(水酸化アンモニウム/水 = 15/85 v/v)に添加して55℃にて10分間保温した後、ビーズを水で2回、DMF/ピリジン/水 = 50/10/40(v/v/v)で2回洗浄し、DMF/ピリジン/水 = 50/10/40(v/v/v)に再懸濁する。無水コハク酸溶液を2 mg/mlの終濃度に添加し、試料を1時間室温で保温し、続いてDMFで3回、水で3回、0.1M NH₄HCO₃で6回洗浄する。ペプチドを上記に記述したように、N-グリコシダーゼFを使用してビーズから放出させる。

【0313】

d0及びd4型の無水コハク酸でそれぞれ標識したペプチドをμLCで分離し、MALDI試料プレート上で分画し、TOF TOF質量分析計(ABI社)によって解析する。それぞれの試料スポットからの質量スペクトルを質量分析計によって自動的に収集する。次いで、定量的ソフトウェアアルゴリズムにより、MSスペクトルを解析し、対のペプチドピークを同定し、これらの対のペプチドの存在比を算出する。また、アルゴリズムにより、それぞれのスポット番号についてペプチド質量の一覧を作製し、これを自動化されたMS/MS解析のための質量分析計にフィードバックさせた。

【0314】

(8.2 iTRAQ)

4種類のiTRAQ標識が存在しており、従って、4種までの試料を平行して解析することが

10

20

30

40

50

できる。試料を20 μ lの溶解緩衝液中にとり、1 μ lの変性剤を添加する。次いで、2 μ lの還元剤を試料に添加し、次いで、これらを60 で1時間保温する。保温後、1 μ lのシステム遮断薬をそれぞれの試料に添加し、続いて室温で10分間保温する。

トリプシンのバイアルを25 μ lの水で再構成する。それぞれのチューブに10 μ lのトリプシン溶液を添加する。次いで、チューブを37 で一晩保温する。

【0315】

iTRAQ試薬のそれぞれのバイアルを70 μ lエタノールに再構成する(バイアルが室温に到達した後)。1つのチューブの内容物を1つの試料バイアルに移す。これをそれぞれの試料について繰り返す。次いで、チューブを1時間室温で保温する。全てのチューブの内容物を1本のチューブ内で合わせる。

LC-MS解析の前に、試料を陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製すべきである。陽イオン交換用緩衝液-添加用の少なくとも10倍容量を添加することによって、試料を酸性化する(pH2.5~3.3の間)。1mlの陽イオン交換用緩衝液-清浄用、続いて2mlの陽イオン交換用緩衝液-添加用を注入することにより陽イオン交換カートリッジを調整する。

【0316】

試料をカラムにゆっくり添加し、透過物を収集する。更に1mlの陽イオン交換用緩衝液-添加用を注入してカートリッジ由来の全ての過剰な試薬を洗浄する。

ペプチドを500 μ lの陽イオン交換用緩衝液-溶出用の注入によって溶出する。溶出液を新しい試料チューブに収集する。

カートリッジを1mlの陽イオン交換用緩衝液-清浄用で洗浄することによって再生する。ペプチドは、ここでLC-MS解析のための準備ができています。

【0317】

(8.3 順序づけ(ordered)ペプチドアレイ)

安定同位体標識したペプチドをMALDI-MS及びLC-QTOFでの解析によって特徴づける。次いで、これらの参照ペプチドストックをアミノ酸分析によって定量化する。

解析する試料をタンパク質分解により消化し、任意に分画する(例えば、グリコキャプチャーによる)。次いで、正確な既知量の参照ペプチドプールを試料に添加し、次いでこれをLC分画に供して、その画分をMALDIターゲットプレート上に直接スポットする。詳細な方法は、Zhangらの文献、Nature Biotechnology, 2003年6月、21巻、6号、660-666ページにより別に記述されている。参照ペプチドピーク及びマッチした試料ピークの強度を比較することによって定量化を行う。単一のペプチドがいくつかの隣接するスポットに広がっているかもしれないことを説明するために、アルゴリズムを使用する。

【0318】

(同等物)

本発明は、この出願において記述された詳細な実施態様に関して限定されるわけではなく、これらは、本発明の個々の態様の1つの例証として意図される。本明細書に列挙したものに加えて、本発明の範囲内の機能的に同等な方法及び装置も、前述の明細書及び添付の図面から当業者には明らかであろう。このような修正変更は、添付の特許請求の範囲の範囲内に入ることが意図される。

【0319】

(「含むこと(comprising)」)

明細書及び特許請求の範囲の全体にわたって、状況が他に必要としない限り、語「含む(comprise)」並びに「含む(comprises)」及び「含むこと(comprising)」などのバリエーションは、明示された整数、工程、整数群又は工程の群を意味し、任意のその他の整数、工程、整数の群又は工程群を除外しないことが理解されるであろう。

(参照の組み込み)

本出願を通じて引用された全ての参照(文献、刊行された特許、公開された特許出願、及び同時係属出願を含む)の内容は、明確にその全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【 0 3 2 0 】

【 図 1 】 本発明の新たなタンパク質アイソフォームが由来する前駆体タンパク質のアミノ酸配列を図示する。両方とも予想されるシグナル配列及びC-terプロペプチドには、下線を引いてある。

【 図 2 】 正常対照及び8種の異なる神経疾患を有する患者8群におけるCSFにおける本発明の好ましいタンパク質アイソフォームの相対的存在量を図示する。

【 図 3 】 正常対照及びAD患者のCSFにおける、本発明の好ましいタンパク質アイソフォームの相対的存在量を図示する。

【 図 1 】

図1

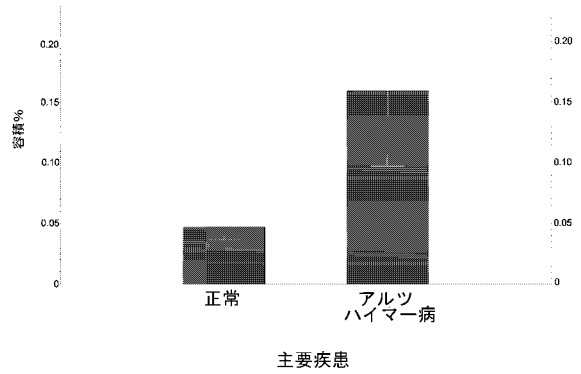
配列番号:1

MTPLLLTLILVVLMLGLPLAQALDCHVCAAYNGDNCFNPMRCPAMVAYCMTRTYTPTRMKV

SKSCVPRCFETVYDGYSKHASTTSCCQYDLCNGTGLATPATLALAPILLATLWGLL

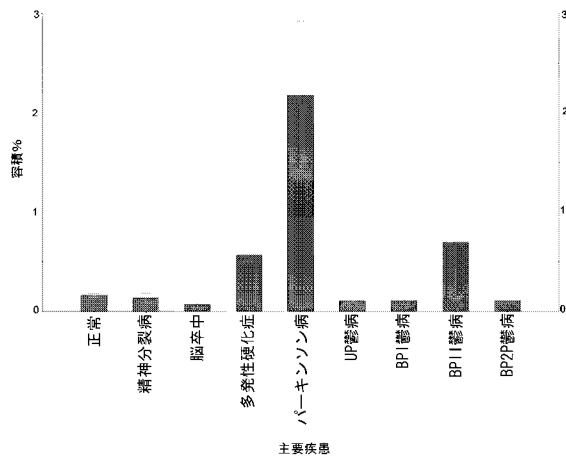
【 図 3 】

図3



【 図 2 】

図2



【配列表】

2009515183000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成20年7月15日(2008.7.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2009515183000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2006/050375

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/18 A61K39/395 C12Q1/68 A61P25/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K G01N A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/17356 A2 (UNIV ROCKEFELLER [US]) 30 March 2000 (2000-03-30) pages 13-15 pages 41-43 pages 52-53 examples 2, 3	1-58,60, 61
Y	IBANEZ-TALLON INES ET AL: "Novel modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by association with the endogenous prototoxin lynx1" NEURON, vol. 33, no. 6, 14 March 2002 (2002-03-14), pages 893-903, XP002426956 ISSN: 0896-6273 the whole document	1-58,60, 61
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the International filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 March 2007		Date of mailing of the International search report 10/04/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Domingues, Helena

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2006/050375

C(Continuation), DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	MIWA JULIE M ET AL: "The prototoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival in vivo" NEURON, vol. 51, no. 5, September 2006 (2006-09), pages 587-600, XP002426957 ISSN: 0896-6273 page 597, right-hand column, line ND	1-58,60, 61
Y,P	WO 2006/042137 A (MCLEAN HOSPITAL CORP [US]; ISACSON OLE [US]) 20 April 2006 (2006-04-20) page 45; table 4	1-58,60, 61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2006/050375

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0017356	A2 30-03-2000	AU 6394399 A CA 2343320 A1 EP 1114153 A2	10-04-2000 30-03-2000 11-07-2001
WO 2006042137	A 20-04-2006	US 2006078890 A1	13-04-2006

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00 1 0 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/24 (2006.01)	A 6 1 P 25/24	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/577 B	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 27/26 3 0 1 A	
	C 1 2 N 15/00 A	
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 2G045 AA40 BA13 BB04 BB10 BB50 BB51 CB01 DA13 DA14 DA36
 FB02 FB03 FB05
 4B024 AA01 AA11 BA41 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 GA11 HA01
 HA11
 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35
 QR55 QR59 QR62 QS25 QS32 QS38 QX01
 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13
 4C084 AA02 AA13 BA44 ZA022 ZA122 ZA162
 4C085 AA14 CC23
 4C086 AA01 EA16 ZA02 ZA12 ZA16
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

【要約の続き】

験試料中の該タンパク質アイソフォーム(群)の増加した存在量により示す、前記方法。

【選択図】 図1

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2009515183A5	公开(公告)日	2009-12-24
申请号	JP2008539508	申请日	2006-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	好吧倍基因组女献赛斯英国埃尔茶迪伊		
申请(专利权)人(译)	Okuforudo基因组Sushiensesu (UK) 萨尔瓦多三通迪伊		
[标]发明人	クフリスチアンロフルフフ		
发明人	クフリスチアン ロフルフフ		
IPC分类号	G01N27/447 C07K16/18 C12Q1/68 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61K31/7088 A61P25/00 A61P25/28 A61P25/16 A61P25/24 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/15 G01N33/50 C12N15/09 C12P21/08		
CPC分类号	A61P25/00 A61P25/16 A61P25/24 A61P25/28 G01N33/6893 G01N2500/00 G01N2800/28		
FI分类号	G01N27/26.315.H C07K16/18.ZNA C12Q1/68.A A61K37/02 A61K39/395.N A61K48/00 A61K31/7088 A61P25/00.101 A61P25/28 A61P25/16 A61P25/24 G01N33/53.D G01N33/577.B G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N27/26.301.A C12N15/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB04 2G045/BB10 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QS38 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA44 4C084/ZA022 4C084/ZA122 4C084/ZA162 4C085/AA14 4C085/CC23 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/ZA02 4C086/ZA12 4C086/ZA16 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	石川彻		
优先权	2005022667 2005-11-08 GB 60/734799 2005-11-09 US		
其他公开文献	JP2009515183A		

摘要(译)

用于诊断或预防受试者中神经疾病的筛选方法，确定受试者中此类神经疾病的阶段或严重性的方法，用于识别有发生此类神经疾病风险的受试者的方法或一种监测对患有这种神经系统疾病的受试者进行的治疗效果的方法，该方法包括 (a) 至少一种选自表1中所列的蛋白同工型1-6的蛋白同工型。分析来自受试者的体液或组织的测试样品；以及 (b) 确定测试样品中蛋白质同工型的丰度，该蛋白同工型来自一个或多个没有神经系统疾病的人的测试样品中的蛋白质。在没有神经系统疾病的受试者中比较同种型或其蛋白同种型的丰度与预定参考范围，诊断出神经病的更高级状态，或筛查或预后的阳性结果，来自一个或多个没有神经病的人的测试样品中蛋白质同种型 (组) 的丰度或没有神经病的测试与先前确定的体内蛋白质同工型的参考范围相比，测试样品中蛋白质同工型的丰度高表明了该方法。 [选型图]图1