

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532042

(P2004-532042A)

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004.10.21)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	4 B O 6 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
		4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 141 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-500259 (P2003-500259)	(71) 出願人	502140949
(86) (22) 出願日	平成14年5月30日 (2002.5.30)		ザ ウォルター アンド イライザ ホール インスティテュート オブ メディカル リサーチ
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月28日 (2003.11.28)		オーストラリア国、ビクトリア州 305 2、パークヴィル、ロイヤル パレード
(86) 国際出願番号	PCT/AU2002/000693	(74) 代理人	100107685
(87) 国際公開番号	W02002/097094		弁理士 高橋 健
(87) 国際公開日	平成14年12月5日 (2002.12.5)	(72) 発明者	ストラッサー, アンドレアス
(31) 優先権主張番号	PR 5351		オーストラリア国、ビクトリア 3032 、アスコット ヴェイル、ノース ストリート 46
(32) 優先日	平成13年5月30日 (2001.5.30)		
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B c l - 2 調節因子 (BMF) 配列及びアポトーシスの調節におけるそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は一般的に、とりわけ哺乳類細胞のアポトーシスを調節することができる新規な分子に関するものであり、そして該分子をコードする遺伝配列に関する。より具体的には、本発明は本明細書で「B m f」と呼ばれる、B c l - 2 ファミリーのタンパク質の新規な構成員、及びそれをコードする遺伝配列、及びB m fの発現を指示するプロモーター配列などの調節配列に関する。B m fは生存を促進するB c l - 2 ファミリー構成員との相互作用を促進しそれによりアポトーシスの引金を引くB H 3 ドメインを含む。従って、B m fはB H - 3 のみの分子とみなされる。本発明の分子は、例えば、治療、診断、抗体形成に有用であり、そして生理的な細胞の死又は生存を調節でき及び/又は細胞周期の開始を調節できる治療用物質をスクリーニングする手段として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：2 又は配列番号：4 又は配列番号：6 又は配列番号：8 のうちのひとつで実質的に記載されるアミノ酸配列又はその誘導体若しくは同族体、又は配列番号：2 又は配列番号：4 又は配列番号：6 又は配列番号：8 のうちのひとつ以上と少なくとも約 45% 以上の類似性を有する配列又はその誘導体若しくは同族体をコードするヌクレオチド配列又はコードする配列と相補的なヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項 2】

配列番号：2 で記載されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 の核酸分子。

10

【請求項 3】

配列番号：4 に記載されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む請求項 1 の核酸分子。

【請求項 4】

配列番号：6 に記載されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む請求項 1 の核酸分子。

【請求項 5】

配列番号：8 に記載されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む請求項 1 の核酸分子。

【請求項 6】

配列番号：1 に記載されるヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも約 45% の類似性を有するヌクレオチド配列、又は低ストリンジェンシー条件下で配列番号：1 又はその相補形とハイブリッド形成できるヌクレオチド配列を含む請求項 1 の核酸分子。

20

【請求項 7】

配列番号：3 に記載されるヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも約 45% の類似性を有するヌクレオチド配列、又は低ストリンジェンシー条件下で配列番号：3 又はその相補形とハイブリッド形成できるヌクレオチド配列を含む請求項 1 の核酸分子。

【請求項 8】

配列番号：5 に記載されるヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも約 45% の類似性を有するヌクレオチド配列、又は低ストリンジェンシー条件下で配列番号：5 又はその相補形とハイブリッド形成できるヌクレオチド配列を含む請求項 1 の核酸分子。

30

【請求項 9】

配列番号：7 に記載されるヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも約 45% の類似性を有するヌクレオチド配列、又は低ストリンジェンシー条件下で配列番号：7 又はその相補形とハイブリッド形成できるヌクレオチド配列を含む請求項 1 の核酸分子。

【請求項 10】

配列番号：1 に記載されるヌクレオチド配列を含む請求項 1 の核酸分子。

【請求項 11】

配列番号：3 に記載されるヌクレオチド配列を含む請求項 1 の核酸分子。

【請求項 12】

配列番号：5 に記載されるヌクレオチド配列を含む請求項 1 の核酸分子。

40

【請求項 13】

配列番号：7 に記載される核酸分子を含む請求項 1 の核酸分子。

【請求項 14】

配列番号：1 又は配列番号：3 又は配列番号：5 又は配列番号：7 に記載される核酸分子により、又は配列番号：1 又は配列番号：3 又は配列番号：5 又は配列番号：7 に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも約 45% の類似性を有するヌクレオチド配列により、又は低ストリンジェンシー条件下で配列番号：1 又は配列番号：3 又は配列番号：5 又は配列番号：7 又はその相補形とハイブリッド形成できるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含む、単離されたタンパク質。

50

【請求項 15】

配列番号：1に記載されるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含む、請求項14記載の単離されたタンパク質。

【請求項 16】

配列番号：3に記載されるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含む、請求項14記載の単離されたタンパク質。

【請求項 17】

配列番号：5に記載されるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含む、請求項14記載の単離されたタンパク質。

【請求項 18】

配列番号：7に記載されるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含む、請求項14記載の単離されたタンパク質。

10

【請求項 19】

配列番号：2に記載されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも45%の類似性を有するアミノ酸配列を含む、請求項14記載の単離されたタンパク質。

【請求項 20】

配列番号：4に記載されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも45%の類似性を有するアミノ酸配列を含む、請求項14の単離されたタンパク質。

【請求項 21】

配列番号：6に記載されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも45%の類似性を有するアミノ酸配列を含む、請求項14の単離されたタンパク質。

20

【請求項 22】

配列番号：8に記載されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも45%の類似性を有するアミノ酸配列を含む、請求項14の単離されたタンパク質。

【請求項 23】

配列番号：2に記載されるアミノ酸配列を有する請求項14記載の単離されたタンパク質。

【請求項 24】

配列番号：4に記載されるアミノ酸配列を有する請求項14記載の単離されたタンパク質。

30

【請求項 25】

配列番号：6に記載されるアミノ酸配列を有する請求項14記載の単離されたタンパク質。

【請求項 26】

配列番号：8に記載されるアミノ酸配列を有する請求項14記載の単離されたタンパク質。

【請求項 27】

単離された b m f 核酸分子の変異体であって、該変異体が該変異体にコードされるポリペプチドに少なくとも一つのアミノ酸の付加、置換及び/又は欠失をもたらす一つ以上のヌクレオチド突然変異を該核酸分子中に含み、該ポリペプチドが D L C 2 などのダイニン軽鎖と結合、共役、又他の方法で結び付くことができないものである変異体。

40

【請求項 28】

該突然変異がダイニン軽鎖と結合する領域においてアミノ酸配列の改変をもたらすものである、請求項28記載の変異体。

【請求項 29】

アミノ酸の付加、置換及び/又は欠失を少なくとも一つ含む単離された B m f ポリペプチドの変異体であって、該ポリペプチドがダイニン軽鎖と結合、共役、又他の方法で結び付くことができない変異体。

【請求項 30】

哺乳動物における B m f の活性を調節する方法であって、B m f 活性を増大または減少さ

50

せるのに十分な時間及び条件の下で効果的量の調節薬物を該哺乳動物に投与する工程を含む方法。

【請求項 3 1】

哺乳動物におけるアポトーシスを調節する方法であって、b m fをコードするヌクレオチド配列の発現を調節するのに十分な時間及び条件の下で効果的量の薬物を該哺乳動物に投与する工程を含む方法。

【請求項 3 2】

哺乳動物におけるアポトーシスを調節する方法であって、B m fの活性を調節するのに十分な時間及び条件の下で効果的量の薬物を該哺乳動物に投与する工程を含む方法。

【請求項 3 3】

哺乳動物を治療する方法であって、該方法がb m fの発現を調節するのに十分な時間及び条件の下で効果的量の薬物を該哺乳動物に投与する工程を含み、該調節がアポトーシスの調節を結果としてもたらすものである方法。

10

【請求項 3 4】

哺乳動物を治療する方法であって、該方法がB m fの活性を調節するのに十分な時間及び条件の下で効果的量の薬物を該哺乳動物に投与する工程を含み、該調節がアポトーシスの調節を結果としてもたらすものである方法。

【請求項 3 5】

哺乳動物がヒトである、請求項 3 0 又は請求項 3 1 又は請求項 3 2 又は請求項 3 3 又は請求項 3 4 に記載の方法。

20

【請求項 3 6】

薬学的に許容されうる担体及び/又は希釈剤一つ以上と共に、b m f、B m f又はその誘導体、又はb m f発現若しくはB m f活性を調節できる薬物を含む医薬組成物。b m f、B m f又は該薬物を活性成分と呼ぶ。

【請求項 3 7】

B m f又はb m f又はその誘導体に対し特異性を有するモノクローナル抗体。

【請求項 3 8】

試料中で、細胞により生産される目的のタンパク質に対して特異的な免疫相互作用分子を検出する方法であって、免疫相互作用分子が、もし試料内に存在すれば、目的の該タンパク質と相互作用するのに十分な時間及び条件の下で、目的のタンパク質を生産する細胞と目的のタンパク質を生産しない細胞を規定された割合で含む細胞集団とテストすべき試料とを接触させる工程、及び該免疫相互作用分子 - タンパク質の複合体を検出手段にかける工程を含む方法。

30

【請求項 3 9】

相互作用分子が抗体である請求項 3 8 記載の方法。

【請求項 4 0】

遺伝子改変動物であって、b m fの一つ又は両方の対立遺伝子が単独で又はB l k、B a d、B i k、H r k、B i d、B i m、N o x a及び/又はP u m aをコードする遺伝子など(これらに限定されない)の別のB c l - 2分子の対立遺伝子の一つ又は両方における別の突然変異と組み合わせられて突然変異した遺伝子改変動物。

40

【請求項 4 1】

該動物がマウスである、請求項 4 0 記載の遺伝子改変動物。

【請求項 4 2】

該動物がラットである、請求項 4 0 記載の遺伝子改変動物。

【請求項 4 3】

該動物がブタである、請求項 4 0 記載の遺伝子改変動物。

【請求項 4 4】

遺伝子改変された非ヒト動物を生産する方法であって、該方法が動物の胚性幹細胞中に 1 個又は複数のヌクレオチドの置換、付加及び/又は欠失又は逆位又は挿入を保持するb m fヌクレオチド配列を含む遺伝子構築物を導入する工程であり、該相同的組換えを選択す

50

る該胚性幹細胞のゲノム内部に b m f 遺伝子との相長的組換えを促進するのに十分な b m f ヌクレオチドが存在するものである工程、及び突然変異した b m f 遺伝子を保持する胚性幹細胞を選択する工程、及び次いで該胚性幹細胞から遺伝子改変された動物を形成させる工程を含む方法。

【請求項 45】

遺伝子改変動物がマウス又はラットである請求項 44 記載の方法。

【請求項 46】

ヒトにおける状態の治療のための医薬の製造における B m f の使用。

【請求項 47】

非ヒトにおける状態の治療のための医薬の製造における B m f の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般的に、哺乳動物細胞におけるアポトーシスを取りわけ調節できる新規な分子、及びこれらの分子をコードする遺伝子配列に関する。より具体的には、本発明は本明細書では「B m f」と称する、B c l - 2 ファミリーのタンパク質の新規なメンバー、及びそれらをコードする遺伝子配列、及び B m f の発現を指示するプロモーター配列などの調節配列に関する。B m f は生存を促進する B c l - 2 ファミリー構成員との相互作用を促進しそれによりアポトーシスの引金を引く B H 3 ドメインを含む。従って、B m f は B H 3 のみの分子であるとみなされる。本発明の分子は、例えば、治療、診断、抗体形成において、そして生理学的な細胞死又は細胞生存を調節でき、及びノ又は細胞周期開始を調節できる治療用物質のスクリーニング手段として有用である。本発明は更に、単独で又は B i m のような、ただしこれに限定しない別の B c l - 2 型分子の対立遺伝子の一方または両方における突然変異と組み合わせさせて、B m f 対立遺伝子の一方又は両方が突然変異し、又は部分的に若しくは全体的に欠失した遺伝的に改変された動物を意図する。この遺伝子改変動物は特に、アポトーシスでの欠陥により惹起される疾病の症状を緩和する物質や、標的細胞のアポトーシスを特異的に促進する物質のスクリーニングに有用である。

20

【背景技術】

【0002】

本明細書で参照する如何なる先行技術も、この先行技術がどの国でも共通な一般知識の一部を形成するものであるとの認識又は如何なる形の示唆でもなく、またそのように解されるべきではない。

30

【0003】

アポトーシス、即ち生理学的及び遺伝的に改変された細胞死の過程は、多細胞生物で組織をモデルし、ホメオスタシスを維持する上で中心的な重要性を有する（非特許文献 1、非特許文献 2 を参照）。この内在する自殺プログラムの根底にある生化学の理解への大きな進歩が行われているところである。細胞アポトーシス作用分子には、カスパーゼと呼ばれるシステインプロテイナーゼの集合が含まれ、この集合は重要な細胞基質を分解する（非特許文献 3 を参照）。カスパーゼの活性化を支配する調節機構はあまり解明されていない。しかしながら、B c l - 2 が原型分子である（そして B c l - 2 ファミリーのタンパク質と呼ばれる）タンパク質ファミリーは、中心的な役割を果たす（非特許文献 3、非特許文献 4、非特許文献 5、非特許文献 6、非特許文献 7 を参照）。

40

【0004】

B c l - 2 は最初に同定された細胞内アポトーシス調節遺伝子であり（非特許文献 8 を参照）、高レベルは多様な細胞障害条件の下で細胞生存性を高める。B c l - x_L（非特許文献 9 を参照）及び B c l - w（非特許文献 10 を参照）などの他の細胞同族体もまた、アデノウイルス E 1 B 19 K タンパク質（非特許文献 11 を参照）及びエプスタイン・バーウイルス B H R F - 1（非特許文献 12 を参照）などのより遠い関係にあるウイルス同族体がすると同様に、細胞生存性を高める。

【0005】

50

Bcl-2ファミリーのアポトーシスを促進するBH3 - のみの構成員は、マウスとC.エレガンス程度に遠い関係の種でのアポトーシスの開始に不可欠である(非特許文献13を参照)。これまで唯一認識されたC.エレガンスのBH3 - のみのタンパク質であるEGL-1は、この生物において進行するようにプログラムされている全ての細胞死にとって必要である。対照的に、幾つかのBH3 - のみのタンパク質である、Bik、Bad、Bik、Hrk、Bid、Bim、Noxa及びPumaが哺乳動物で既に同定されている。ノックアウトマウスでの実験では、異なるアポトーシス刺激はそれらの開始に異なるBH3 - のみのタンパク質を必要とすることが分かった(非特許文献13を参照)。例えば、Bimはサイトカインの除去や抗原受容体刺激によって誘発されるアポトーシスには不可欠であるが、糖質コルチコイドにより誘発される細胞死では不必要である(非特許文献14、非特許文献15を参照)。対照的に、BidはFas誘発性の肝細胞の死滅に参与する。(非特許文献16を参照)。更に、異なる細胞型は、その進行するようプログラムされた死に、異なるBH3 - のみのタンパク質を必要とする場合がある。この考えと一致して、Bimを欠いたマウスはリンパ系細胞及び骨髄系細胞を異常に蓄積するが、赤血球形成は正常のようである(非特許文献14を参照)。これらの結果は個々の哺乳動物のBH3 - のみのタンパク質が固有の機能を持つことを示している。

10

【0006】

BH3 - のみのタンパク質のアポトーシスを促進する活性は厳密な制御の下にある。C.エレガンスでは、EGL-1は産卵に必要な一群の神経細胞の転写抑制因子TRA-1Aにより調節される(非特許文献17を参照)。いくつかの哺乳動物のBH3 - のみのタンパク質もまた転写調節を受ける。例えば、Noxaはp53誘発性遺伝子として発見され、従ってDNA損傷により誘発されるアポトーシスを媒介するものとして第一候補である(非特許文献18を参照)。哺乳動物のBH3 - のみのタンパク質の幾つかはまた、翻訳後にも調節され得る(非特許文献13を参照)。成長因子により刺激された細胞では、Badはリン酸化され、14-3-3骨格タンパク質に結合することにより、生存を促進するBcl-2ファミリー構成員から隔離される(非特許文献19を参照)。健康な細胞では、Bimはダイニン軽鎖、DLC1/LC8(非特許文献20)に結合することにより微小管ダイニンモーター複合体(microtubular dynein motor complex)に隔離される。UV-照射やタキソールでの処置などの一定のアポトーシス性刺激は、Bim(まだDLC1に結合しているもの)を遊離させ、生存を促進するBcl-2ファミリー構成員にそれを転移させ、結合させそしてBcl-2ファミリー構成員を不活性化させる。このプロセスは細胞死執行者であるシステインプロテアーゼ(カスパーゼ)とは無関係に起こり、それ故アポトーシスでは上流の情報伝達事象を構成する(非特許文献20を参照)。対照的にBidのアポトーシス促進活性は、様々なカスパーゼ(例えば、カスパーゼ-8)又はセリンプロテアーゼ・グランザイムBによる切断で解放される(非特許文献21、非特許文献22を参照)。このことはそれがアポトーシスの開始因子ではなく増幅機構の一部として機能することを示す。これらの観察は、細胞の特定部位への隔離を通じて、異なるBH3 - のみのタンパク質が細胞内ストレスの異なる形に対するセンサーとして機能することを示す。

20

30

【非特許文献1】

カーラ、Br. J. Cancer 26: 239-257, 1972。

40

【非特許文献2】

ヤコブソンら、Cell 88: 347-354, 1997。

【非特許文献3】

ニコルソンら、Trends Biochem. Sci. 22: 299-306, 1997。

【非特許文献4】

ヤコブソン、Curr. Biol. 7: R277-R281, 1997。

【非特許文献5】

リード、Nature 387: 773-776, 1997。

【非特許文献6】

50

クレーマー、Nature Med. 3: 641-620, 1997。

【非特許文献 7】

アダムス及びコーリー、Science 281: 1322-1326, 1998。

【非特許文献 8】

ポーラ、Nature335: 440-442, 1988。

【非特許文献 9】

ボイシラ、Cell74: 597-608, 1993。

【非特許文献 10】

ギブソンら、Oncogene13: 665-675, 1996。

【非特許文献 11】

ホワイトら、Mol. Cell. Biol.12: 2570-2580, 1992。

【非特許文献 12】

ヘンダーソンら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA90: 8479-8483, 1993。

【非特許文献 13】

ファング及びストラッサー、Cell103: 839, 2000。

【非特許文献 14】

ブーイエットら、Science 286: 1735, 1999。

【非特許文献 15】

ブーイエットら、Nature415, 922, 2002。

【非特許文献 16】

インら、Nature400: 886, 1999。

【非特許文献 17】

コンラッド及びホルヴィッツ、Cell93: 519, 1998。

【非特許文献 18】

オダラ、Science 288: 1053, 2000。

【非特許文献 19】

ツァーラ、Cell87: 619, 1996。

【非特許文献 20】

ブサラカスら、Mol. Cell 3: 287, 1999。

【非特許文献 21】

リーら、Cell94: 491-501, 1998。

【非特許文献 22】

ルオら、Cell94: 481-490, 1998。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明に先立つ研究において、本発明者らは胚形成で一定の役割を果たす新規な B H 3 - のみのタンパク質を探求した。本発明に従って、本発明者らは M c l - 1 を餌にして、17日齢のマウスの胚ライブラリーの酵母菌 - 2 ハイブリッドスクリーニングにより同定された「B m f」(B c l - 2 変異因子) をクローニングした。B m f は細胞死を誘発し、生存促進 B c l - 2 ファミリーのあるメンバー又は全メンバーに対して「死亡リガンド」として作用すると提唱される。この新しい遺伝子の同定は、治療、診断、抗体形成に使用するための、そして生理学的な細胞死の変異に関わる一定の範囲の生産物の同定及び合理的設計を可能とする。これらの治療用分子は、B m f 機能の拮抗薬又は作用薬のいずれかとして作用する場合があります、癌、自己免疫性疾患又は変性疾患の治療に有用である。

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の概要

本明細書を通して、文脈が他の解釈を求めない限り、「含む (comprise)」及びその変化形である「comprises」又は「comprising」などは、記載された要素若しくは整数、又は

10

20

30

40

50

要素若しくは整数の群を含むことを意味すると解釈されるが、他の如何なる要素若しくは整数、又は要素若しくは整数の群を排除するものではないと理解すべきである。

【0009】

ヌクレオチド配列とアミノ酸配列は配列番号 (SEQ ID NO:) により参照される。配列番号: は数字により配列識別子 < 400 > 1 (配列番号: 1)、< 400 > 2 (配列番号: 2) などに対応する。配列表は請求項の後に掲載する。

【0010】

アミノ酸配列における特定の突然変異は本明細書では「 $X_1 n X_2$ 」で表す。この X_1 は突然変異前の元のアミノ酸残基であり、 n は残基の数であり、そして X_2 は突然変異したアミノ酸である。 X_n への参照は、 X がアミノ酸で n が残基の数である特定のアミノ酸への参照である。略字 X は、3文字又は1文字のアミノ酸コードの省略形である場合がある。

10

【0011】

本発明は、生存を促進する Bcl-2 ファミリーの新規なメンバーの同定に部分的に基づいている。このタンパク質は、本明細書では「Bcl-2 変異因子」又は「Bmf」と称する。このタンパク質は、Mcl-1 を餌として用いたマウス胚ライブラリーの酵母 2 ハイブリッドスクリーニングで同定した。Bmf はアポトーシスを誘発する BH3 - のみのタンパク質であり、アノイクス (anoikis) により活性化される。

【0012】

従って、本発明の一つの側面は、Bmf 又はその誘導体若しくは同族体を特定する特徴を一つ以上持つポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。

20

【0013】

本発明の別の一側面は、実質的に配列番号: 2 又は配列番号: 4 又は配列番号: 6 又は配列番号: 8 のうちの一つに実質的に記載されるアミノ酸配列又はその誘導体若しくは同族体、又は配列番号: 2 又は配列番号: 4 又は配列番号: 6 又は配列番号: 8 の一つ以上と少なくとも約 45% 又はそれ以上の類似性を有するアミノ酸配列又はその誘導体若しくは同族体をコードするヌクレオチド配列又はコードする配列に相補的なヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。

【0014】

本発明の更に別の一側面は、配列番号: 1 又は配列番号: 3 又は配列番号: 5 又は配列番号: 7 のうちの一つで実質的に記載されるヌクレオチド配列を含む核酸分子、又は配列番号: 1 又は配列番号: 3 又は配列番号: 5 又は配列番号: 7 のうちの一つと低ストリンジェンシー条件下でハイブリッドを形成でき、且つ配列番号: 2 又は配列番号: 4 又は配列番号: 6 又は配列番号: 8 のうちの一つに記載されるアミノ酸配列、又は配列番号: 2 又は配列番号: 4 又は配列番号: 6 又は 8 の一つ以上と少なくとも約 45% の類似性を有する配列に相当するアミノ酸配列をコードする、その誘導体若しくは同族体を含む核酸分子を意図する。

30

【0015】

本発明のさらに別の一側面は、配列番号: 1 又は配列番号: 3 又は配列番号: 5 又は配列番号: 7 で実質的に記載されるヌクレオチド配列を含む核酸分子を意図する。

【0016】

本発明のまた別の一側面は、bmf コードする単離された核酸分子又はその誘導体であって、外核酸分子が、

40

(i) 配列番号: 2 又は配列番号: 4 又は配列番号: 6 又は配列番号: 8 の一つに記載されるアミノ酸配列又はその誘導体若しくは同族体をコードし、又は配列番号: 2 又は配列番号: 4 又は配列番号: 6 又は配列番号: 8 の一つ以上と少なくとも約 45% の類似性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子、

(ii) 配列番号: 1 又は配列番号: 3 又は配列番号: 5 又は配列番号: 7 の一つで実質的に記載されるヌクレオチド配列又はその誘導体若しくは類似体を含む核酸分子、

(iii) 低ストリンジェンシー条件下で配列番号: 1 又は配列番号: 3 又は配列番号: 5 又は配列番号: 7 の一つで実質的に記載されるヌクレオチド配列、誘導体若しくは同族

50

体とハイブリッド形成でき、且つ配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8に記載されるアミノ酸配列、誘導体又は同族体、又は配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8の一つ以上と少なくとも約45%の類似性を有する配列に相当するアミノ酸配列をコードできる核酸分子、

(iv) 低ストリンジェンシー条件下で、項(i)又は(ii)又は(iii)の核酸分子とハイブリッド形成でき、且つ配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8の一つ以上と少なくとも約45%の類似性を持つアミノ酸配列をコードできる核酸分子、及び、

(v) 項(i)又は(ii)又は(iii)又は(iv)の核酸分子の誘導体又は哺乳動物同族体、

から成るリストから選択される核酸分子に向けられている。

10

【0017】

本発明の更なる側面は、

(i) 配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8の一つで実質的に記載されるアミノ酸配列又はその誘導体若しくは同族体、又は配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8の一つ以上と少なくとも約45%以上の類似性を有する配列を有するポリペプチド、

(ii) 配列番号：1又は配列番号：3又は配列番号：5又は配列番号：7の一つで実質的に記載されるヌクレオチド配列又はその誘導体若しくは同族体、又は配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8の一つ以上と少なくとも約45%の類似性を有するアミノ酸配列をコードする配列、によってコードされるポリペプチド、

20

(iii) 配列番号：1又は配列番号：3又は配列番号：5又は配列番号：7の一つに記載されるヌクレオチド配列又はその誘導体若しくは同族体と低ストリンジェンシー条件下でハイブリッド形成でき、且つ配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8に実質的に記載されるアミノ酸配列又はその誘導体若しくは同族体、又は配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8の一つ以上と少なくとも約45%の類似性を有するアミノ酸配列をコードする核酸分子によってコードされるポリペプチド、

(iv) 項(i)又は(ii)又は(iii)で定義されたホモ二量体型をしたポリペプチド、及び、

30

(v) 項(i)又は(ii)又は(iii)で定義されたヘテロ二量体型をしたポリペプチド、

から成るリストから選択される単離されたポリペプチドに向けられている。

【0018】

本発明のまた別の側面は、遺伝子改変された非ヒト動物を生産する方法であって、該方法が一つ又は複数のヌクレオチド置換、付加及び/又は欠失又は逆位又は挿入を保持する**b m f**ヌクレオチド配列を含む遺伝子構築物を動物の胚性幹細胞に導入する工程であり、相同組換えのために選択する該胚性幹細胞のゲノム内の**b m f**遺伝子との相同組換えを促進するのに十分な**b m f**ヌクレオチド配列が存在する工程、及び突然変異した**b m f**遺伝子を保持する胚性幹細胞を選択する工程、及び該胚性幹細胞から遺伝的に改変された動物を形成させる工程を含む方法を提供する。

40

【0019】

本明細書を通して使用する1文字及び3文字の省略形は下に定義するとおりである。

(外1)

アミノ酸の三文字略号及び一文字略号

アミノ酸	三文字略号	一文字略号	
アラニン	A l a	A	
アルギニン	A r g	R	
アスパラギン	A s n	N	10
アスパラギン酸	A s p	D	
システイン	C y s	C	
グルタミン	G l n	Q	
グルタミン酸	G l u	E	
グリシン	G l y	G	
ヒスチジン	H i s	H	
イソロイシン	I l e	I	20
ロイシン	L e u	L	
リシン	L y s	K	
メチオニン	M e t	M	
フェニルアラニン	P h e	F	
プロリン	P r o	P	
セリン	S e r	S	
スレオニン	T h e	T	
トリプトファン	T r p	W	30
チロシン	T y r	Y	
バリン	V a l	V	
任意の残基	X a a	X	

配列番号の表を下に挙げる。

(外 2)

配列番号の概要

配列番号：	説明	
1	マウス <u>b m f</u> のヌクレオチド配列	
2	マウス B m f のアミノ酸配列	
3	ヒト <u>b m f</u> のヌクレオチド配列	
4	ヒト B m f のアミノ酸配列	
5	マウス <u>b m f</u> の B H 3 領域のヌクレオチド配列	10
6	マウス B m f の B H 3 領域のアミノ酸配列	
7	ヒト <u>b m f</u> の B H 3 領域のヌクレオチド配列	
8	ヒト <u>b m f</u> の B H 3 領域のアミノ酸配列	
9	マウス <u>b m f</u> プロモーターのヌクレオチド配列	
10	ヒト <u>b m f</u> プロモーターのヌクレオチド配列	
11	5' センスプライマー	
12	3' アンチセンスプライマー	20
13	内部 <u>b m f</u> プライマー	
14	5' センスプライマー	
15	3' アンチセンスプライマー	
16	内部プライマー	
17	マウス B m f の予測アミノ酸配列	
18	ヒト B m f の予測アミノ酸配列	
19	B m f の部分的アミノ酸配列	30
20	B i m の部分的アミノ酸配列	
21	E G L - 1 の部分的アミノ酸配列	
22	B a k の部分的アミノ酸配列	
23	B a x の部分的アミノ酸配列	
24	B i d の部分的アミノ酸配列	
25	B i k の部分的アミノ酸配列	
26	H r k の部分的アミノ酸配列	40
27	B a d の部分的アミノ酸配列	

【 0 0 2 0 】

好ましい実施態様の詳細な説明

本発明は、部分的にはタンパク質の B c l - 2 ファミリーの新規なメンバーの同定に基づく。このタンパク質は「 B c l - 2 変更因子 (B c l - 2 modifying factor) 」に因んで「 B m f 」と呼ばれる。健康的な細胞では、ダイニンの軽鎖、特にダイニン軽鎖 2 (D L C 2) に結合することにより、 B m f はアクチンに基づくミオシン V モーター複合体に封鎖さ

れると提唱されている。更に、アノキスなどのある種のアポトーシス刺激は B m f をミオシン V モーター複合体から放出し、B c 1 - 2 へ移動させて結合させるということが提唱されている。従って、B m f は別の細胞骨格構造上のモーター複合体への封鎖により、細胞内損傷のセンサーとして機能する。

【0021】

従って、本発明の一つの側面は、配列番号：2 又は配列番号：4 又は配列番号：6 又は配列番号：8 のうちの一つで実質的に記載されるアミノ酸配列、又はその誘導体若しくは同族体、又は配列番号：2 又は配列番号：4 又は配列番号：6 又は配列番号：8 の一つ以上と少なくとも約 45% 以上の類似性を有するアミノ酸配列又はその誘導体若しくは同族体をコードするヌクレオチド配列又はコードする配列に相補的なヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。

10

【0022】

本明細書で使用する用語「類似性」は、比較される配列間のヌクレオチド又はアミノ酸レベルでの正確な同一性を含む。ヌクレオチドレベルで非同一性がある場合は、「類似性」は結果的には異なるが、それにもかかわらず構造的、機能的、生化学的及び/又はコンホメーションのレベルで互いに関連するアミノ酸を生ずる配列の間の相違を含む。アミノ酸レベルで相違が存在する場合は、「類似性」は、それにもかかわらず構造的、機能的、生化学的及び/又はコンホメーションのレベルで互いに関連するアミノ酸を含む。特に好ましい実施態様では、ヌクレオチド及び配列の比較は類似性ではなく同一性のレベルで行なう。

20

【0023】

二つ以上のポリヌクレオチド又はポリペプチド間の配列関係を記述するのに用いられる用語には、「参照配列」、「比較窓」、「配列類似性」、「配列同一性」、「配列類似性のパーセンテージ」、「配列同一性のパーセンテージ」、「実質的に類似する」及び「実質的な同一性」が含まれる。「参照配列」は、ヌクレオチド及びアミノ酸残基を含めて、少なくとも 12 モノマーであるがしばしば 15 モノマーから 18 モノマー、及びしばしば 30 モノマーなどの少なくとも 25 モノマー以上の長さである。二つのポリヌクレオチドはそれぞれ (1) 二つのポリヌクレオチド間で類似する配列 (即ち、完全なポリヌクレオチド配列の一部のみ) の場合、及び (2) 二つのポリヌクレオチド間で異なる配列を含む場合があるため、二つ (以上) のポリヌクレオチド間の配列比較は、配列類似性の局所的領域を同定し比較するために通常「比較窓」上で二つのポリヌクレオチドを配列比較することにより行われる。「比較窓」は、参照配列と比較される通常は 12 個の連続した残基の概念的セグメントを指す。この比較窓は、二つの配列を最適に整列させるために参照配列 (付加又は欠失を含まない) と比べて、約 20% 以下の付加又は欠失 (即ちギャップ) を含んでも良い。比較窓に整列させるための最適な配列整列は、アルゴリズムをコンピュータ実行 (ウィスコンシン・ジェネティクス・ソフトウェア・パッケージ・リリース 7.0 の G A P、B E S T F I T、F A S T A、及び T F A S T A、ジェネティクスコンピュータグループ、米国、ウィスコンシン、マディソン、サイエンスドライブ 575) によって、又は目視及び選択される様々な方法のいずれかにより得られる最良の整列 (即ち、比較窓上で最も高い相同性パーセンテージが得られた整列) によって行われてもよい。例えば、アルチュルら (Nucl. Acids Res. 25: 3389, 1997) により開示されたような B L A S T ファミリーのプログラムを参照してもよい。配列分析の詳細な議論はアウスベルらのユニット 19.3 (「分子生物学の最新プロトコル」、ジョンワイリーアンドサンズ インク、1994-1998、15章) で見られる。

30

40

【0024】

本明細書で使用する用語「配列類似性」及び「配列同一性」は、比較窓の上でヌクレオチド対ヌクレオチドごと又はアミノ酸対アミノ酸ごとに比較した場合に配列が同一である又は機能的又は構造的に類似していること�の程度を指す。従って、例えば「配列同一性のパーセンテージ」は、比較窓の上で最適に並べられた二つの配列を比較し、両方の配列で同一の核酸塩基 (例えば、A, T, C, G, I) 又は同一のアミノ酸残基 (例えば、A l a

50

, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys, 及び Met) が発生する位置の数を決定して適合する位置の数を求め、この適合位置の数を比較窓にある位置の総数(即ち、窓サイズ)で割り、その結果に100を乗じて配列同一性のパーセンテージを求めることにより計算する。本発明の目的では、「配列同一性」はDNA SIS コンピュータプログラム(ウィンドウズ(登録商標)用バージョン2.5、ヒタチソフトウェアエンジニアリングCo., Ltd., サウスサンフランシスコ、カリフォルニア、米国)でこのソフトウェアに添付のリファレンス・マニュアルで使用していた標準のデフォルト値を用いて計算される「適合パーセンテージ」を意味するものと解される。配列類似性についても同様である。

10

【0025】

本発明の別の側面は、配列番号：1又は配列番号：3又は配列番号：5又は配列番号：7のうち一つに実質的に記載されるヌクレオチド配列、又は低ストリンジェンシー条件下で配列番号：1又は配列番号：3又は配列番号：5又は配列番号：7のうち一つとハイブリッド形成でき、且つ配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8のうち一つに記載されるアミノ酸配列又は配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8の一つ以上と少なくとも約45%の類似性を有する配列をコードする、その誘導体若しくは同族体を含む核酸分子を意図する。

【0026】

より具体的には、本発明は配列番号：1又は配列番号：3又は配列番号：5又は配列番号：7で実質的に記載されるヌクレオチド配列を含む核酸分子を意図する。

20

【0027】

対象となる核酸分子は、Bmf又はその同族体若しくは機能的誘導体を含む誘導体を特定する特性を有するポリペプチドをコードすることが好ましい。

【0028】

本明細書で低ストリンジェンシーと言うときは、ハイブリッド形成における、少なくとも約0から少なくとも約15% v/vのホルムアミド及び、少なくとも約1Mから少なくとも約2Mの塩、及び洗浄条件における少なくとも約1Mから少なくとも約2Mの塩を含み包含する。一般的に、低ストリンジェンシーは約25~30 から約42 までである。この温度は変更されることがあり、ホルムアミドを置換するため及び/又は別のストリンジェンシー条件を与えるためにより高い温度を用いても良い。必要であれば、ハイブリッド形成における、少なくとも約16% v/vから少なくとも約30% v/vのホルムアミド及び少なくとも約0.5Mから少なくとも約0.9Mの塩、及び洗浄条件における、少なくとも約0.5Mから少なくとも約0.9Mの塩を含み包含する中ストリンジェンシー、又はハイブリッド形成における、少なくとも約31% v/vから少なくとも約50% v/vのホルムアミド及び少なくとも約0.01Mから少なくとも約0.15Mの塩、及び洗浄条件における、少なくとも約0.01Mから少なくとも約0.15Mの塩を含み包含する高ストリンジェンシーなどの別のストリンジェンシー条件を適用しても良い。一般的に、洗浄は $T_m = 69.3 + 0.41(G + C)\%$ で実施される。(マーマー及びドーター、J. Mol. Biol. 5: 109, 1962)。しかしながら、二本鎖DNAの T_m は適合しない塩基のペアの数が1%増えるごとに1 減少する(ボナー及びラスキー、Eur. J. Biochem. 46: 83, 1974)。ホルムアミドはこれらのハイブリッド形成条件では任意選択的である。従って、特に好ましいレベルのストリンジェンシーは次のように定義される：低ストリンジェンシーは、25~42 で6倍SSC緩衝液0.1% w/v SDS、中ストリンジェンシーは、20 から65 の範囲の温度で2倍SSC緩衝液、0.1% w/v SDS、高ストリンジェンシーは、少なくとも65 の温度で0.1倍SSC緩衝液、0.1% w/v SDSである。

30

40

【0029】

本発明のこの側面の核酸分子は本明細書の「bmf」に相当する。この遺伝子は、本発明に基づき、アポトーシスを誘発すると決定された。bmf遺伝子の産物は「Bmf」と表

50

され、本発明を如何なる方法でも制限しない。ヒトの b m f はヒトの染色体位置 15 q 14 に位置付けされた。B m f は、それを含む唯一の B c 1 - 2 ホモロジー領域が B H 3 であるため、「B H 3 のみ」タンパク質として知られる。従って B m f は、例えば B i k / N b k、B i d、B i m 及び H r k も含む B c 1 - 2 関連 B H 3 のみアポトーシス促進グループの新規なメンバーを形成する。

【0030】

b m f をコードする核酸分子は、c D N A 配列、m R N A 配列又はゲノム配列などのデオキシリボ核酸の配列であることが好ましい。ゲノム配列はまた、エキソン及びイントロンをも含んでも良い。ゲノム配列はまた、プロモーター領域又は他の調節領域を含んでも良い。b m f 遺伝子配列はスプライス変異体を含む。

10

【0031】

以後「B m f」及び「b m f」への言及は、例えば、b m f m R N A の別のスプライシングから生じるものとして特定されうる b m f のポリペプチド及び c D N A イソ型を含む、B m f 及び b m f それぞれの全ての形への言及であると解されるべきである。

【0032】

タンパク質及び/または遺伝子は、好ましくはヒト、霊長類、家畜動物（例えば、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ロバ）、実験動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット）、愛玩動物（例えば、イヌ、ネコ）、捕獲された野生動物（例えば、キツネ、カンガルー、コアラ、シカ）、鳥類（例えば、ニワトリ、ガチョウ、アヒル、エミュー、ダチョウ）、爬虫類又は魚類に由来する。

20

【0033】

誘導体には、融合タンパク質を含む天然、合成又は組換えによる資源由来の断片（ペプチドなど）、パーツ、部分、化学的等価物、突然変異体、同族体、又は模倣体が含まれる。誘導体は、アミノ酸の挿入、欠失又は置換から誘導される場合がある。アミノ酸挿入誘導体は、アミノ末端及び/又はカルボキシ末端融合並びに1個又は複数のアミノ酸の配列内挿入を含む。アミノ酸配列挿入変異体は一つ以上のアミノ酸残基がそのタンパク質の予め定められた位置に導入されたものであるが、得られる産物の適当なスクリーニングをするのであれば無差別挿入も可能である。欠失変異体は、該配列から一つ以上のアミノ酸の除去により特徴付けられる。アミノ酸の置換変異体は、配列の少なくとも一つの残基が除去され、且つその場所に異なる残基が挿入されたものである。アミノ酸配列への付加は他のペプチド、ポリペプチド又はタンパク質との融合を含む。突然変異体は本明細書に記載の特定の B m f 又は b m f 突然変異分子を含むがこれらに限定されないと解すべきである。誘導体は、例えば B H 3 領域から、ダイニン結合領域から又はリン酸化の部位から誘導されるペプチドを含む。ペプチドは、例えば本明細書に記載の B m f の少なくとも4個の連続したアミノ酸に相当する少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む分子を含む。本明細書で使用する用語「ポリペプチド」はペプチド、ポリペプチド及びタンパク質を包含すると解されるべきである。

30

【0034】

B m f の誘導体はペプチド、ポリペプチド又は他のタンパク質性分子又は非タンパク質性分子に融合した B m f 全タンパク質の特定のエピトープ又は部分を有する断片を含む。例えば、B m f 又はその誘導体は細胞へのその移行を促進するため、分子と融合する場合がある。本明細書で意図される B m f の類似体は、側鎖の改変、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の合成の間における非天然型アミノ酸及び/又はその誘導体の組み込み、架橋の使用、及びタンパク質性分子又はその類似体に立体構造上の制約を課す他の方法を含むが、これらに限定されない。核酸配列の誘導体は同様に、1個又は複数のヌクレオチドの置換、欠失及び/又は他の核酸分子との融合を含む付加から誘導される場合がある。本発明の核酸分子の誘導体は、オリゴヌクレオチド、P C R プライマー、アンチセンス分子、核酸分子の共抑制及び融合での使用に適した分子を含む。

40

【0035】

本発明により意図される側鎖改変の例には、アルデヒドとの反応に続く N a B H₄ での還

50

元による還元的アルキル化、メチルアセチミデートによるアミジン化、無水酢酸によるアシル化、シアン酸塩によるアミノ基のカルバモイル化、2, 4, 6 - トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) によるアミノ基のトリニトロベンジル化、無水コハク酸及び10テトラヒドロ無水フタル酸によるアミノ基のアシル化、及びピリドキサル - 5 - リン酸によるリジンのピリドキシル化とその後の NaBH_4 による還元などによるアミノ基の変更が含まれる。

【0036】

アルギニン残基のグアニジン基は、2, 3 - ブタンジオン、フェニルグリオキサール及びグリオキサールなどの試薬で複素環式縮合物を形成することにより改変される場合がある。

【0037】

カルボキシル基は、O - アシルイソ尿素形成を経るカルボジイミド活性とその後に続く例えば対応するアミドへの誘導化により改変される場合がある。

【0038】

スルフヒドリル基は、ヨード酢酸又はヨードアセトアミドによるカルボキシメチル化、システイン酸への過ギ酸酸化、他のチオール化合物による混合ジスルフィドの形成、マレイミド、無水マレイン酸又は他の置換されたマレイミドとの反応、4 - 塩化水銀安息香酸、4 - 塩化水銀フェニルスルホン酸、塩化フェニル水銀、2 - 塩化水銀 - 4 - ニトロフェノール及び他の水銀化合物を用いた水銀誘導体の形成、アルカリ性 pH でのシアン酸塩によるカルバモイル化などの方法により、改変される場合がある。

【0039】

トリプトファン残基は、例えば N - プロモスクシンイミドによる酸化又は 2 - ヒドロキシ - 5 - ニトロベンジルプロミド又はスルフェニルハライドによるインドール環のアルキル化により、改変される場合がある。他方、チロシン残基はテトラニトロメタンにより硝酸化することにより 3 - ニトロチロシン誘導体を生じうる。

【0040】

ヒスチジン残基のイミダゾール環の改変は、ヨード酢酸誘導体によるアルキル化又はピロ炭酸ジエチルによる N - カルベトキシル化により行われる場合がある。

【0041】

ペプチド合成の間における非天然型アミノ酸及び誘導体の組み込みの例は、ノルロイシン、4 - アミノブチル酸、4 - アミノ - 3 - ヒドロキシ - 5 - フェニルペンタン酸、6 - アミノヘキサン酸、 ϵ - ブチルグリシン、ノルバリン、フェニルグリシン、オルニチン、サルコシン、4 - アミノ - 3 - ヒドロキシ - 6 - メチルヘプタン酸、2 - チエニルアラニン及び/又はアミノ酸の D - 異性体の使用を含むが、これらに限定されない。本明細書で意図する非天然型アミノ酸のリストを表 1 に示す。

【0042】

【表 1 - 1】

10

20

30

非通常アミノ酸	コード	非通常アミノ酸	コード
α -アミノ酪酸	Abu	L-N-メチルアラニン	Nmala
α -アミノ- α -メチル酪酸塩	Mgabu	L-N-メチルアルギニン	Nmarg
アミノシクロプロパン	Cpro	L-N-メチルアスパラギン	Nmasn
カルボン酸塩		L-N-メチルアスパラギン酸	Nmasp
アミノイソ酪酸	Aib	L-N-メチルシステイン	Nmcys
アミノノルボルニル	Norb	L-N-メチルグルタミン	Nngln
カルボン酸塩		L-N-メチルグルタミン酸	Nnglu
シクロヘキシルアラニン	Chexa	L-N-メチルヒスチジン	Nmhis
シクロペンチルアラニン	Cpen	L-N-メチルイロイシ	Nmile
D-アラニン	Dal	L-N-メチルロイシン	Nmleu
D-アルギニン	Darg	L-N-メチルリジン	Nmlys
D-アスパラギン酸	Dasp	L-N-メチルメチオニン	Nmmet
D-システイン	Dcys	L-N-メチルルロイシ	Nmle
D-グルタミン	Dgln	L-N-メチルノルバリン	Nmnva
D-グルタミン酸	Dglu	L-N-メチルオルニチン	Nmorn
D-ヒスチジン	Dhis	L-N-メチルフェニルアラニン	Nmphe
D-イソロイシン	Dile	L-N-メチルプロリン	Nmpro
D-ロイシン	Dleu	L-N-メチルセリン	Nmser
D-リジン	Dlys	L-N-メチルスレオニン	Nmthr
D-メチオニン	Dmet	L-N-メチルトリプトファン	Nmtrp
D-オルニチン	Dorn	L-N-メチルチロシン	Nmtyr
D-フェニルアラニン	Dphe	L-N-メチルバリン	Nmval
D-プロリン	Dpro	L-N-メチルエチルグリシ	Nmetg
D-セリン	Dser	L-N-メチル- ϵ -アミノグリシ	Nmtbug
D-スレオニン	Dthr	L-ノルロイシン	Nle
D-トリプトファン	Dtrp	L-ノルバリン	Nva
D-チロシン	Dtyr	α -メチル- γ -アミノ酪酸塩	Maib
D-バリン	Dval	α -メチル- γ -アミノ酪酸塩	Mgabu

10

20

30

【 0 0 4 3 】

【 表 1 - 2 】

D- α -メチルアラニン	Dmala	α -メチルシクロヘキシルアラニン	Mchexa	
D- α -メチルアルギニン	Dmarg	α -メチルシクロペンチルアラニン	Mcpen	
D- α -メチルアスパラギン	Dmasn	α -メチル- α -ナフチルアラニン	Manap	
D- α -メチルアスパラギン酸塩	Dmasp	α -メチルペニシラミン	Mpen	
D- α -メチルシステイン	DmcyS	N-(4-アミノフェニル)グリシン	Nglu	
D- α -メチルグルタミン	Dmgln	N-(2-アミノエチル)グリシン	Naeg	
D- α -メチルヒスチジン	Dmhis	N-(3-アミノプロピル)グリシン	Norn	
D- α -メチルイソロイシン	Dmile	N-アミノ- α -メチル酪酸塩	Nmaabu	10
D- α -メチルロイシン	Dmleu	α -ナフチルアラニン	Anap	
D- α -メチルリジン	Dmlys	N-ベンジルグリシン	Nphe	
D- α -メチルメチオニン	Dnmet	N-(2-カルバミルエチル)グリシン	Ngln	
D- α -メチルオルニチン	Dmorn	N-(カルバミルメチル)グリシン	Nasn	
D- α -メチルフェニルアラニン	Dmphe	N-(2-カルボキシエチル)グリシン	Nglu	
D- α -メチルプロリン	Dmpro	N-(カルボキシメチル)グリシン	Nasp	
D- α -メチルセリン	Dmser	N-シクロブチルグリシン	Nebut	
D- α -メチルスレオニン	Dmthr	N-シクロヘプチルグリシン	Nchep	
D- α -メチルトリプトファン	Dmtrp	N-シクロヘキシルグリシン	Nchex	20
D- α -メチルチロシン	Dnty	N-シクロデシルグリシン	Nodec	
D- α -メチルバリン	Dnval	N-シクロドデシルグリシン	Nodod	
D-N-メチルアラニン	Dnmala	N-シクロオクチルグリシン	Ncoct	
D-N-メチルアルギニン	Dnmarg	N-シクロプロピルグリシン	Nepro	
D-N-メチルアスパラギン	Dnmasn	N-シクロウンデシルグリシン	Ncund	
D-N-メチルアスパラギン酸塩	Dnmasp	N-(2,2-ジフェニルエチル)グリシン	Nbhm	
D-N-メチルシステイン	Dnmcys	N-(3,3-ジフェニルプロピル)グリシン	Nbhe	
D-N-メチルグルタミン	Dnmgln	N-(3-ジアミノプロピル)グリシン	Narg	
D-N-メチルグルタミン酸塩	Dnmglu	N-(1-ヒドロキシエチル)グリシン	Nthr	30
D-N-メチルヒスチジン	Dnmhis	N-(ヒドロキシエチル)グリシン	Nser	
D-N-メチルイソロイシン	Dnmile	N-(イミダゾイルエチル)グリシン	Nhis	
D-N-メチルロイシン	Dnmleu	N-(3-インドリルエチル)グリシン	Nhtrp	
D-N-メチルリジン	Dnmlys	N-メチル- γ -アミノ酪酸塩	Nngabu	
N-メチルシクロヘキシルアラニン	Nmchexa	D-N-メチルメチオニン	Dnmet	
D-N-メチルオルニチン	Dnmorn	N-メチルシクロペンチルアラニン	Nmcpen	

【 0 0 4 4 】

【 表 1 - 3 】

40

N-メチルグリシン	Nala	D-N-メチルフェニルアラニン	Dnmphe	
N-メチルアミノ酢酸塩	Nmaib	D-N-メチルプロリン	Dnmpro	
N-(1-メチルピロリル) グリシン	Nile	D-N-メチルセリン	Dnmser	
N-(2-メチルピロリル) グリシン	Nleu	D-N-メチルスレオニン	Dnmthr	
D-N-メチルトリプトファン	Dnmtrp	N-(1-メチルエチル)グリシン	Nval	
D-N-メチルチロシン	Dnmtyr	N-メチル α-ナフトールアラニン	Nmanap	
D-N-メチルバリン	Dnmval	N-メチル ペニシラミン	Nmpen	
γ-アミノ酪酸	Gabu	N-(p-ヒドロキシフェニル) グリシン	Nhtyr	10
L-t-ブチルグリシン	Tbug	N-(チオメチル) グリシン	Ncys	
L-エチルグリシン	Etg	ペニシラミン	Pen	
L-ホモフェニルアラニン	Hphe	L-α-メチルアラニン	Mala	
L-α-メチルアルギニン	Marg	L-α-メチルアスパラギン	Masn	
L-α-メチルアスパラギン酸塩	Masp	L-α-メチル-t-ブチルグリシン	Mtbug	
L-α-メチルシステイン	Mcys	L-メチルエチルグリシン	Metg	
L-α-メチルグルタミン	Mgln	L-α-メチルグルタミン酸塩	Mglu	
L-α-メチルヒスチジン	Mhis	L-α-メチルホモフェニルアラニン	Mhphe	
L-α-メチルイロイシン	Mile	N-(2-メチルチオエチル)グリシン	Nmet	20
L-α-メチルロイシン	Mleu	L-α-メチルリジン	Mlys	
L-α-メチルメチオニン	Mmet	L-α-メチルノロイシン	Mnle	
L-α-メチルノルバリン	Mnva	L-α-メチルオルニチン	Morn	
L-α-メチルフェニルアラニン	Mphe	L-α-メチルプロリン	Mpro	
L-α-メチルセリン	Mser	L-α-メチルスレオニン	Mthr	
L-α-メチルトリプトファン	Mtrp	L-α-メチルチロシン	Mtyr	
L-α-メチルバリン	Mval	L-N-メチルホモフェニルアラニン	Nmhphe	
N-(N-2,2-ジフェニルエチル)	Nnbhm	N-(N-(3,3-ジフェニルプロピル)	Nnbhe	30
カルバミルメチルグリシン		カルバミルメチルグリシン		
1-カルボキシ-1-(2,2-ジフェニル-	Nmbc			
エチルアミノ)シクロプロパン				

【0045】

例えば3D立体構造を安定させるために架橋剤を用いることも可能で、 $n = 1$ から $n = 6$ の $(CH_2)_n$ スペース基を有する二官能性イミドエステル、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルなどのホモ二官能性架橋剤、及びN-ヒドロキシスクシンイミドなどのアミノ基反応性部分と、マレイミド又はジチオ部分(SH)若しくはカルボジイミド(COOH)などの別の基に特異的に反応する部分を通常含むヘテロ-二官能性試薬が用いられる。加えてペプチドは、例えばC 及びN メチルアミノ酸の組込み、アミノ酸のC 原子とC 原子の間に二重結合の導入、及びN末端とC末端間、二つの側鎖間、又は一つの側鎖とN末端若しくはC末端の間でアミド結合を形成するなどの共有結合の導入による、環状ペプチド又は類似体の形成によって、立体構造的に制約することができる。

【0046】

本発明の核酸分子は、単離された形であるか又は発現ベクターなどのようなベクターに連結されていることが好ましい。「単離された」とは、少なくとも一つの精製工程を経た核酸分子を意味しており、これは便宜的に、分子量、コード活性、ヌクレオチド配列、塩基

組成又は他の便利な手段で測定されたとき、例えば他の組成物との関連で少なくとも約 10% の核酸分子、好ましくは少なくとも約 20%、より好ましくは少なくとも約 30%、さらに好ましくは少なくとも約 40 ~ 50%、さらに好ましくは少なくとも約 60 ~ 70%、さらに好ましくは 80 ~ 90% 又はそれ以上の、対象となる核酸分子を含む組成物により定義される。本発明の核酸分子はまた、好ましい実施態様では、生物学的に純粋であるとみなされる場合がある。

【0047】

特に好ましい実施態様では、b m f に対応するヌクレオチド配列は、配列番号：1 又は配列番号：3 又は配列番号：5 又は配列番号：7 のうちのひとつに記載されるヌクレオチド配列を含む c D N A 配列であるか、又は配列番号：1 又は配列番号：3 又は配列番号：5 又は配列番号：7 のうちのひとつと類似性を有し且つ配列番号：2 又は配列番号：4 又は配列番号：6 又は配列番号：8 のうちのひとつに記載されるアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列又は配列番号：2 又は配列番号：4 又は配列番号：6 又は配列番号：8 の一つ以上と少なくとも約 45% の類似性を有する配列をコードするヌクレオチド配列を含む、その誘導体又は同族体である。

10

【0048】

本発明の核酸分子の誘導体はまた、低ストリンジェンシー条件下で、配列番号：1 又は配列番号：3 又は配列番号：5 又は配列番号：7 のうちのひとつに記載されるヌクレオチド配列とハイブリッド形成できる核酸分子をも含む。該低ストリンジェンシーは 42 であるのが好ましい。

20

【0049】

別の実施態様では、本発明は、b m f 又はその誘導体をコードする単離された核酸分子であって、該核酸分子が

(i) 配列番号：2 又は配列番号：4 又は配列番号：6 又は配列番号：8 のうちのひとつに記載されるアミノ酸配列、又は配列番号：2 又は配列番号：4 又は配列番号：6 又は配列番号：8 の一つ以上と少なくとも約 45% の類似性を有するその誘導体若しくは同族体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子、

(ii) 配列番号：1 又は配列番号：3 又は配列番号：5 又は配列番号：7 のうちのひとつで実質的に記載されるヌクレオチド配列又はその誘導体若しくは同族体を含む核酸分子、

(iii) 配列番号：1 又は配列番号：3 又は配列番号：5 又は配列番号：7 のうちのひとつで実質的に記載されるヌクレオチド配列又はその誘導体若しくは同族体と低ストリンジェンシー条件下でハイブリッド形成でき、且つ配列番号：2 又は配列番号：4 又は配列番号：6 又は配列番号：8 のうち一つに記載されるアミノ酸又はその誘導体若しくは同族体又は配列番号：2 又は配列番号：4 又は配列番号：6 又は配列番号：8 の一つ以上と少なくとも約 45% の類似性を有する配列に対応するアミノ酸配列をコードできる核酸分子、

30

(iv) 項 (i) 又は (ii) の核酸分子と低ストリンジェンシー条件下でハイブリッド形成でき、且つ配列番号：2 又は配列番号：4 又は配列番号：6 又は配列番号：8 の一つ以上と少なくとも約 45% の類似性を有するアミノ酸配列をコードできる核酸分子、及び、

(v) 項 (i) 又は (ii) 又は (iii) 又は (iv) の核酸分子の誘導体又は哺乳動物同族体、から成るリストから選択される核酸分子を対象とする。

40

【0050】

本明細書で特定の配列（例えば、配列番号：1 又は配列番号：3 又は配列番号：5 又は配列番号：7）とハイブリッド形成する能力と言う場合は、別の表現では、その相補形とハイブリッド形成する能力をも含む。言い換えれば、核酸分子は配列番号：1 又は配列番号：3 又は配列番号：5 又は配列番号：7 又はその相補形とハイブリッド形成するものを包含する。

【0051】

核酸分子は原核細胞（例えば大腸菌）又は真核細胞（例えば、酵母細胞、真菌細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞又は植物細胞）で発現できる発現ベクターに連結されうる。この核酸分子は、例えば、シグナルペプチド、サイトカイン又は B c 1 - 2 ファミリーの他のメンバ

50

ーなどの別の実態をコードする核酸分子に連結、融合、または他の方法で結合することがある。

【0052】

本発明は、ネズミ種又は他の哺乳動物種由来の b m f 用のプロモーターに及ぶ。ネズミ及びヒトの b m f プロモーターを含むヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号：9及び配列番号：10で示される。本発明はこれらのプロモーターの突然変異体及び誘導体、及び遺伝子構築物、遺伝子療法及び遺伝子改変動物の作成におけるこれらの使用に及ぶ。プロモーターの突然変異体又は誘導体は、配列番号：9又は10と少なくとも70%の類似性を有するか又は低ストリンジェンシー条件下で配列番号：9又は配列番号：10又はその相補形とハイブリッド形成できるヌクレオチド配列を含むものを含む。

10

【0053】

本発明は、以下に定義する核酸分子の発現産物に及ぶ。

【0054】

この発現産物は、配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8のうちの一つに記載されるアミノ酸配列を有する B m f、又は上で定義したその誘導体若しくは同族体、又は配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8のうちの一つに記載されるアミノ酸配列又はその誘導体若しくは同族体と少なくとも約45%の類似性を有するアミノ酸配列を有する哺乳動物同族体である。

【0055】

本発明の別の側面は、

20

(i) 配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8のうちの一つで実質的に記載されるアミノ酸配列又はその誘導体若しくは同族体又は配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8の一つ以上と少なくとも約45%の類似性を有する配列を有するポリペプチド、

(ii) 配列番号：1又は配列番号：3又は配列番号：5又は配列番号：7のうちの一つで実質的に記載されるヌクレオチド配列又はその誘導体若しくは同族体又は配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8の一つ以上と少なくとも約45%の類似性を有するアミノ酸をコードする配列によってコードされるポリペプチド、

(iii) 低ストリンジェンシー条件下で、配列番号：1又は配列番号：3又は配列番号：5又は配列番号：7のうちの一つに記載されるヌクレオチド配列又はその誘導体若しくは同族体とハイブリッド形成でき、且つ配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8に実質的に記載されるアミノ酸配列又はその誘導体若しくは同族体又は配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8の一つ以上と少なくとも約45%の類似性を有するアミノ酸配列をコードする核酸分子によりコードされるポリペプチド、

30

(iv) 項(i)又は(ii)又は(iii)で定義されたホモ二量体の形のポリペプチド、及び

(v) 項(i)又は(ii)又は(iii)で定義されたヘテロ二量体の形のポリペプチドから成るリストから選択される単離されたポリペプチドを対象とする。

【0056】

すでに定義したとおり、本発明は B m f のペプチド又はその誘導体に及ぶ。該ペプチドは配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8で定義されたポリペプチドの少なくとも5連続のアミノ酸を含むことが好ましい。本発明はまた、本発明のペプチドをコードする核酸分子にも及ぶ。

40

【0057】

本発明の別の側面は、B m f 又はその誘導体若しくは同族体を特定する特性を一つ以上有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。

【0058】

本明細書でいうところの B m f の「特定する特性」は、次の特徴を一つ以上含む：即ち、

(i) アポトーシスを誘発するポリペプチド、

50

- (ii) 配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8で実質的に記載されるアミノ酸配列又はその誘導体若しくは同族体を有するポリペプチド、
- (iii) 配列番号：2又は配列番号：4又は配列番号：6又は配列番号：8と少なくとも45%の類似性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (iv) アポトーシスを誘発する、項(ii)又は(iii)で定義されたポリペプチド、
- (v) 配列番号：1又は配列番号：3又は配列番号：5又は配列番号：7で実質的に記載される核酸配列又はその誘導体若しくは同族体によりコードされるポリペプチド、
- (vi) 低ストリンジェンシー条件下で、配列番号：1又は配列番号：3又は配列番号：5又は配列番号：7のうちの一つに記載されるヌクレオチド配列とハイブリッド形成できる核酸分子によりコードされるポリペプチド、
- (vii) アポトーシスを誘発する、項(v)又は(vi)で定義されたポリペプチド、及び、
- (viii) 項(i)から(vii)までに定義されたポリペプチドのアポトーシス誘発性でない誘導体、である。

10

【0059】

本発明は本発明のこの側面の核酸分子の発現産物に及ぶことを理解されたい。

【0060】

本発明をいずれか一つの理論又は作用様式に限定することを意図するものではないが、BH3領域はBmfの細胞障害作用の一部の原因となる。このBH3領域は、例えばBcl-x_Lなどの生存促進分子のBH1、BH2、BH3領域により形成される伸長した疎水性の窪みと相互作用する両親媒性 α -ヘリックスを形成する。Bmfのアポトーシス促進作用はBcl-2ファミリーの反アポトーシスメンバーに結合するその能力を反映する。

20

【0061】

やはり本発明をいずれか一つの理論又は作用様式に限定することなく、Bmfのアポトーシス促進活性は転写レベルと翻訳後のレベルの両方で調節されると考えられる。Bmfの非コード5'領域の配列分析は、APIなどの転写因子のための幾つかの推定上の結合部位を明らかにした。Bmfは、DLG2などのダイニン軽鎖を介して相互作用すると提唱されている。ダイニン軽鎖は、ミオシンVモーター複合体の構成成分である高度に保存されたタンパク質である。

【0062】

BmfのミオシンVモーター複合体との相互作用は、Bmfのアポトーシス促進活性を調節する。ダイニン軽鎖への結合を破壊するBmfにおける1個又は複数のアミノ酸の突然変異は本発明で包含される。

30

【0063】

従って、本発明の関連する一側面は、変異体によりコードされるポリペプチドへの少なくとも一つのアミノ酸の付加、置換及び/または欠失をもたらす該核酸分子における一つ以上のヌクレオチドの突然変異体を含む単離された**bmf**核酸分子の変異体であって、該ポリペプチドがDLG2などのダイニン軽鎖と結合、共役、又は他の方法で結合することができないものである変異体を対象とする。

【0064】

突然変異は、ダイニン軽鎖に結合する領域における改変したアミノ酸配列を結果として生ずることが好ましい。本発明は、これまでに定義した領域と機能的に等価な領域でアミノ酸の付加、置換及び/または欠失を生ずる突然変異を含むBmfの変異体に及ぶことを理解されたい。

40

【0065】

従って、本発明は殊に、ダイニン軽鎖に結合する変異体によりコードされるポリペプチドの領域で少なくとも一つのアミノ酸の付加、置換及び/または欠失をもたらす核酸分子における一つ以上のヌクレオチド突然変異を含む単離された**bmf**核酸分子であって、該ポリペプチドがダイニン軽鎖と結合、共役、又他の方法で結合できないものである核酸分子を対象とする。

【0066】

50

別の場所における一つ以上の突然変異と組み合わせられて発生する本発明で意図される突然変異体も、本発明で意図される。

【0067】

本発明は、本発明のこの側面に基づいて定義された核酸分子変異体の発現産物に及ぶ。

【0068】

従って、本発明は少なくとも1個のアミノ酸の付加、置換及び又は欠失を含む単離された B m f ポリペプチドの変異体であって、該ポリペプチドがダイニン軽鎖と結合、共役、又他の方法で結合できないものである変異体を対象とする。

【0069】

本発明は本発明のこの側面の核酸分子及びポリペプチドの誘導体に及ぶ。用語「誘導体」は上で定義したように解されるべきである。 10

【0070】

既に定義したように、「B m f」及び「b m f」と言う場合は、本発明のこの側面に従って定義された変異体分子への言及を含むものと解されるべきである。

【0071】

本発明の B m f は、二つ以上の分子が共に結合していることを意味する多量体形であっても良い。同じ B m f 分子が共に結合している場合、この複合体はホモ多量体である。ホモ多量体の一例はホモ二量体である。少なくとも一つの B m f が少なくとも一つの非 B m f 分子と結合している場合、この複合体はヘテロ二量体のようなヘテロ多量体である。ヘテロ多量体は、B c l - 2 ファミリーの別のメンバーの分子又はアポトーシスを調節できる他の分子を含んでも良い。更に本発明は、B m f と B i m のような他の分子との間の融合、又はハイブリッド、又はヘテロ二量体を意図する。 20

【0072】

従って本発明は、哺乳動物における b m f の発現を調節する方法であって、b m f の発現を高レベル調節又は低レベル調節又は別の方法で調節するのに十分な時間及び条件の下で調節に効果的な量の薬物を該哺乳動物に投与する工程を含む方法を意図する。例えば、オリゴヌクレオチドなどの b m f アンチセンス配列は、その細胞 (cc11) が生存する能力を向上させるために細胞に導入される場合がある。逆に、B m f 又はその誘導体をコードする核酸分子は、内因性 b m f 遺伝子を発現するいずれかの細胞の生存能力を減少するために導入される場合がある。b m f 発現の調節は、B m f R N A のスプライシングパターンなどの転写現象及び翻訳現象の調節に及ぶと解されるべきである。 30

【0073】

本発明の別の側面は、哺乳動物における B m f の活性を調節する方法であって、B m f 活性を増加又は減少させるのに十分な時間及び条件の下で調節に効果的な量の薬物を該哺乳動物に投与する工程を含む方法を意図する。

【0074】

哺乳動物への薬物投与による該活性の調節は、

- (i) b m f の発現を調節し、
- (ii) B m f の拮抗薬として機能し、及び
- (iii) B i m の作用薬として機能する

40

タンパク質性又は非タンパク質性の分子を該哺乳動物に導入する工程を含むがこれに限定されない幾つかの技術の一つにより達成できる。

【0075】

該タンパク質性分子は融合タンパク質又は次の例えば天然物スクリーニングを含む天然供給源又は組換え供給源から誘導しても良い。該非タンパク質性分子は、例えば核酸分子であっても良く、又は例えば天然物スクリーニングなどの天然供給源から誘導してもよく、又は化学的に合成しても良い。本発明は、B m f の拮抗薬または作用薬として作用できる B m f の化学的類似体を意図する。化学的作用薬は必ずしも B m f から誘導されなくても良いが、特定の立体構造的類似性を共有することがある。また化学的作用薬は、B m f の物理化学的な特性を模倣するように特別に設計される場合がある。拮抗薬は、B m f がそ 50

の正常な又は病理学的な生物機能を実行するのを遮断、阻害、又はその他の方法で阻止することができる何らかの化合物でありうる。拮抗薬は、B m f の部分又はそのペプチド、B m f 又は B m f の部分に特異的なモノクローナル抗体、及び哺乳動物細胞の b m f 遺伝子又は m R N A の転写又は翻訳を阻止するアンチセンス核酸又はオリゴヌクレオチドを含むが、これらに限定されない。B m f 及び b m f の作用薬は、例えば、B c l - 2 などの反アポトーシス分子と相互作用してそれらの機能的活性を阻止し、それによりアポトーシスを促進する既に定義した誘導体又は変異体分子又はペプチドを含む。作用薬はまた、B m f のダイニン軽鎖への結合又はダイニン軽鎖とダイニン中間鎖との相互作用を破壊又は阻止することができる分子を含んでも良い。

【0076】

10

該タンパク質性又は非タンパク質性分子は、b m f の発現又は B m f の活性を調節するため直接的又は間接的のいずれかで作用して良い。該分子は、b m f の発現又は B m f の活性を調節するため B m f 又は B m f と結合する場合には、直接的に作用する。該分子は、他の分子が b m f の発現又は B m f の活性を直接的又は間接的のいずれかで調節する b m f 及び B m f 以外の分子と結合する場合には、間接的に作用する。

【0077】

従って、本発明の方法は、b m f の発現又は B m f の活性を調節する調節工程のカスケードの誘発を介する、b m f 又は B m f の発現又は活性の調節を包含する。

【0078】

b m f 発現又は B m f 活性の増加は、例えば、癌及び自己免疫疾患における自己反応性リンパ球の減少などの状態における治療又は予防に役立つ。b m f の発現又は B m f の活性の減少は、例えば線照射や化学療法の間、又は H I V / A I D S 又は他のウイルス性感染症、虚血、又は心筋梗塞の間の細胞障害状態下などでの細胞死又は細胞の変性の阻害又は阻止を調節するのに役立つ。B m f は生殖細胞内で発現するため、b m f 発現又は B m f 活性の調節は、例えば生殖能力のある精子の生成を阻止することにより、避妊薬又は避妊法として有用である。

20

【0079】

本発明の別の側面は、哺乳動物でアポトーシスを調節する方法であって、b m f をコードするヌクレオチド配列の発現を調節するのに十分な時間及び条件の下で、効果的量の薬物を該哺乳動物に投与する工程を含む方法を意図する。

30

【0080】

本発明のまた別の側面は、哺乳動物におけるアポトーシスを調節する方法であって、B m f の活性を調節するのに十分な時間及び条件の下で、効果的量の薬物を該哺乳動物に投与する工程を含む方法を意図する。

【0081】

本発明のまた別の側面は、哺乳動物におけるアポトーシスを調節する方法であって、効果的量の B m f 又は b m f 又はその誘導体を該哺乳動物に投与する工程を含む方法を意図する。

【0082】

用いられる B m f、b m f 又はその誘導体または薬物はまた、B m f、b m f 又は薬物を標的細胞に特異的に送達するモノクローナル抗体などの標的化手段に連結されてもよい。

40

【0083】

本発明の好ましい実施態様では、この方法で使用される B m f、b m f 又は薬物は、これらの細胞に特異的に送達することを可能にするために、該標的細胞に特異的な抗体に連結される。

【0084】

B m f 又は b m f の調節は、他の分子又は b i m 又は B i m などの遺伝子、これらに限定されないが、の調節と同時に又は逐次的に行なっても良い。

【0085】

医薬組成物の形での B m f、b m f 又は薬物の投与は、任意の便利な手段により行っても

50

良い。医薬組成物の B m f、b m f 又は薬物は、個々の場合によって決まる量で投与される場合に治療活性を示すことを意図する。このバリエーションは、例えばヒト又は動物、及び B m f、b m f 又は選択される薬物によって決まる。広範囲の投与量が適用できるであろう。例えば患者を考慮して、体重 1 キログラム当たり 1 日に約 0.01 mg から約 10 mg の B m f 又は薬物が投与されることがある。投薬計画は、最適な治療反応が得られるように調節して良い。例えば、数回の分割投与は、毎日、毎週、毎月又は他の適切な時間間隔で投与される場合もあれば、状況の緊急性に応じて比例して減少される場合もある。B m f 又は薬物は、経口、静脈内（水溶性の場合）、鼻腔内、腹腔内、筋肉内、皮下、皮内又は座薬又は移植（例えば、徐放性分子を用いて）によるなどの便宜的な方法で投与して良い。特に B m f 又は薬物に関して、これらのペプチドは酸付加塩又は例えば亜鉛、鉄などとの金属錯塩など（これらは本出願の目的では、塩とみなされる）の、薬学的に許容されうる無害の塩の形で投与して良い。このような酸付加塩の例としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩、マレイン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、安息香酸塩、コハク酸塩、リンゴ酸塩、アスコルビン酸塩、酒石酸塩などがある。もし活性成分が錠剤の形で投与されるのであれば、この錠剤はトラガカントゴム、コーンスターチ又はゼラチンなどの結合剤、アルギン酸などの崩壊剤、及びマグネシウムステアリン酸塩などの潤滑剤を含んでも良い。

10

【0086】

本発明の更なる側面は、哺乳動物の疾病状態における本発明の使用に関する。例えば、本発明は特に、癌、変性疾患、自己免疫疾患、ウイルス感染に対する治療又は予防における使用、又は生殖細胞調節への使用に適用できるが、これらに限定されない。

20

【0087】

従って、本発明の別の側面は、哺乳動物を治療する方法であって、該方法が b m f の発現を調節するのに十分な時間及び条件の下で効果的量の薬物を該哺乳動物に投与する工程を含み、該調節が結果としてアポトーシスの調節をもたらすものである方法に関する。

【0088】

また別の側面では、本発明は哺乳動物を治療する方法であって、該方法が B m f の活性を調節するのに十分な時間及び条件の下で効果的量の薬物を該哺乳動物に投与する工程を含み、該調節が結果としてアポトーシスの調節をもたらすものである方法に関する。

【0089】

別の側面では、本発明は哺乳動物を治療する方法であって、アポトーシスを調節するのに十分な時間及び条件の下で効果的量の B m f 又はその誘導体を哺乳動物に投与する工程を含む方法に関する。

30

【0090】

本発明のまた別の側面は哺乳動物を治療する方法であって、アポトーシスを調節するのに十分な時間及び条件の下で効果的量の b m f 又はその誘導体を該哺乳動物に投与する工程を含む方法に関する。

【0091】

また別の側面では、本発明はアポトーシス調節のための医薬の製造における、b m f 又はその誘導体の発現を調節できる薬物の使用に関する。

40

【0092】

本発明の別の側面は、アポトーシス調節のための医薬の製造における、B m f 又はその誘導体の発現を調節できる薬物の使用に関する。

【0093】

本発明の更なる側面は、アポトーシス調節のための医薬の製造における、B m f 又は b m f 又はその誘導体の使用に関する。

【0094】

本発明のまた別の側面は、b m f 発現の調節に用いられる薬物であって、該 b m f 発現の調節がアポトーシスを調節するものである薬物に関する。

【0095】

50

本発明の更に別の側面は、B m f 発現の調節に用いられる薬物であって、該 B m f 発現の調節がアポトーシスを調節するものである薬物に関する。

【0096】

本発明の別の側面はアポトーシス調節に用いられる B m f 又は b m f 又はその誘導体に関する。

【0097】

本発明の関連する側面では、治療を受ける哺乳動物は治療上又は予防上の処置が必要なヒト又は動物であって良い。

【0098】

更にまた別の側面では、本発明は一つ以上の薬学的に許容されうる担体及び / 又は希釈剤と組み合わせて b m f 発現又は B m f 活性の調節が可能な b m f、B m f 又はその誘導体又は薬物を含む医薬組成物を意図する。 10

【0099】

注射可能な用途に適した医薬剤形は、無菌水溶液（水溶性の場合）及び無菌の注射可能溶液を即時調製するための無菌の粉末を含む。この医薬剤形は製造及び保存の条件において安定していなければならない。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコールなど）、その適切な混合物及び植物油を含む溶剤又は希釈剤であり得る。適切な流動性が、例えば界面活性剤の使用により維持できる。微生物作用の防止は、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル（thimerosal）などの様々な抗細菌性及び抗真菌性薬物により、もたらすことができる。多くの場合には、例えば糖又は塩化ナトリウムなどの等張性薬物を含むのが好ましい。注射可能組成物の持続的吸収は、組成物に例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどの吸収を遅らせる薬物を用いることで得ることができる。 20

【0100】

無菌の注射可能溶液は、必要量の活性な化合物を、活性成分及び必要であれば任意選択的に他の活性成分と共に適当な溶剤中で混合し、その後濾過滅菌又は他の適当な手段で滅菌して調製する。無菌の注射可能溶液の調製用の無菌粉末の場合は、適切な調製法には、真空乾燥技術及び凍結乾燥技術が含まれ、これにより活性成分プラス付加的に所望される任意の成分の粉末が得られる。 30

【0101】

b m f、B m f 及び / 又は B m f の調節因子が適切に保護されている場合には、これらは例えば不活性な希釈剤で又は同化される食用担体と共に経口投与しても良く、又は硬殻ゼラチンカプセル若しくは軟殻ゼラチンカプセルに封入しても良く、又は圧縮して錠剤にしても良く、又は直接食事の食物に混合するか母乳を介して投与しても良い。経口治療投与のために、活性成分は賦形剤と混合し、摂取可能な錠剤、パッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、オブラートなどの形で用いて良い。このような組成物及び製剤は少なくとも 1 重量%の活性化合物を含むべきである。組成物及び製剤のパーセンテージは当然変化し、単位重量の約 5 から約 80 % の間にあるのが便利である。このような治療に有用な組成物の活性化合物の量は、適切な用量が得られる量である。本発明の組成物及び製剤は、経口投薬単位剤形が活性化合物をを約 0.1 μ g から 200 mg までの間で含むように調製されることが好ましい。別の投薬量としては、約 1 μ g から約 1000 mg まで及び約 10 μ g から約 500 mg までが含まれる。これらの投薬量は個人ごと又は体重 Kg ごとであって良い。投与は時間ごと、日ごと、週ごと、月ごと、又は年ごとであって良い。 40

【0102】

錠剤、トローチ、丸薬、カプセル、クリームなどはまた、以下に掲げるような成分を含んでも良い。ゴム、アカシア、コーンスターチ又はゼラチンなどの結合剤、リン酸二カルシウムなどの賦形剤、コーンスターチ、片栗粉、アルギン酸などの崩壊剤、ステアリン酸マ 50

グネシウムなどの潤滑剤、及びサッカロース、ラクトース、サッカリンなどの甘味料、又はペパーミント、冬緑油若しくはチェリー香料などの香味料を添加しても良い。投薬単位剤形がカプセルの場合、上の種類の材料に加え、液体担体を含めても良い。他の様々な材料が被覆剤として、またその他の方法で投薬単位の物理的形狀を修飾するために存在する。例えば、錠剤、丸薬又はカプセルはシセラック、糖又は両方で被覆しても良い。シロップ又はエリキシル剤は、活性化合物、甘味料としてサッカロース、保存剤としてメチルパラベン及びプロピルパラベン、色素、及びチェリー香料やオレンジ香料などの香味料を含んでも良い。もちろん、如何なる投薬単位剤形を調製する際に使用する如何なる材料も使用量で薬学的に純粋で実質的に無毒性でなければならない。加えて、活性化合物（単数又は複数）は徐放性の製剤及び処方に組み込んでも良い。

10

【0103】

薬学的に許容されうる担体及び/または希釈剤は、溶剤、分散媒、被覆剤、抗細菌剤及び抗菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などのいずれか及び全てを含む。薬学的に活性な物質にこのような媒体及び薬物を使用することは、当分野では良く知られており、従来の媒体又は薬物のいずれかが活性成分と使用禁忌である場合を除き、治療用組成物におけるこれらの使用が意図される。補充的な活性成分も、該組成物に混合できる。

【0104】

投薬の容易性及び投薬量の均一性のために、非経口組成物を投薬単位剤形に処方することは特に有利である。本明細書で使用する投薬単位剤形とは、処置の対象となる哺乳動物に対する均質な投与に適した物理的に分離した単位を指し、それぞれの単位が必要な薬学的担体と一緒に、所望の治療効果を生むよう計算された予じめ定めた量の活性成分を含む。本発明の新規な投薬単位剤形の仕様は、(a) 活性物質の特有の特性及び達成すべき特定の治療効果、及び(b) 本明細書で詳細に開示するように身体的な健康が損なわれた疾病状態を有する生体被験体における疾病の治療用の活性成分を混合する技術に固有の限界、に基づいており、直接依存する。

20

【0105】

主要な活性成分は、便利で且つ効果的な投与のために、適切な薬学的に許容されうる担体と共に、効果的な量で、上で開示したような投与単位剤形に配合される。投与単位剤形は、例えば、主要な活性成分を $0.5 \mu\text{g}$ から約 2000 mg までの範囲の量で含むことができる。割合で表すと、活性成分は一般的に ml の担体中に約 $0.5 \mu\text{g}$ から約 2000

30

【0106】

薬学的組成物はまた、標的細胞をトランスフェクトできるベクターなどの遺伝子分子であって、該ベクターが b m f の発現又は B m f の活性を調節できる核酸分子を保持するものである遺伝子分子を含んでも良い。該ベクターは、例えば、ウイルス性ベクターであることがある。

【0107】

生理学的な細胞死の調節を必要とする条件には、例えば神経変性疾患、心筋梗塞、筋肉退化症、低酸素症、虚血、HIV感染を伴う患者においてアンチセンス配列を利用する細胞の生存を向上させること、又は疾病の治療のために移植される細胞の生存を延長するための条件が含まれる。また、本発明の分子は、例えば腫瘍細胞又は自己反応性リンパ球の生存能力を減少させるのに役立つ。このアンチセンス配列はまた、細胞のインピトロの挙動を調節するために、例えば未確認の成長因子が必要な細胞型から新規な系統を開発するプロトコルの一部として、以下に述べるようなモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞の単離を容易にするため、及び遺伝的に改変されている一次移植片由来の細胞の生存を強化するために、用いられることがある。

40

【0108】

本発明の又別の側面は、B m f 又は b m f 又はそれらの誘導体に対して特異性を有する抗原結合性の部分を含む免疫相互作用分子を対象とする。

50

【0109】

「免疫相互作用分子」とは、抗原結合性部分を含む任意の分子又は該分子の誘導体を指すものと理解すべきである。本発明のこの側面が意図する分子の例には、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体（合成抗体、ハイブリッド抗体、ヒト化交代、触媒性抗体を含む）及びT細胞抗原受容体結合分子が含まれるが、これらに限定されない。該免疫相互作用分子はモノクローナル抗体であることが好ましい。

【0110】

この好ましい実施態様に基づき、B m f 又は b m f 又はこれらの誘導体に対して特異性を有するモノクローナル抗体を提供する。

【0111】

「B m f 又は b m f に対して特異性を有する」分子とは、B m f 又は b m f の一つ以上のエピトープのいずれかに対して特異性を有するモノクローナル抗体などの分子を指すと解すべきである。これらのエピトープは、天然のB m f か b m f 分子か又はその変性された分子のいずれかの立体構造的エピトープ、線状エピトープ、又は立体構造エピトープ及び線状エピトープの組み合わせであって良い。

【0112】

より好ましくは、B m f に特異性を有するモノクローナル抗体が提供される。

【0113】

本発明の免疫相互作用分子は自然に発生しても良く、合成又は組換えで生産しても良い。例えば、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体は、B m f 又は b m f に対する自然発生する抗体から選択しても良く、又はB m f 又は b m f に対して特異的に生産させても良い。後者の場合、B m f 又は b m f はまず担体分子と混合する必要がある場合がある。本発明の抗体及び/または組換えB m f は、治療薬又は診断薬として特に有用である。代わりにF a b 断片のような抗体の断片を用いても良い。更に、本発明は組換え抗体及び合成抗体、抗体ハイブリッド、及び非B m f 抗原に対して生産されるがいずれか一つ以上のB m f エピトープと交差反応する抗体に及ぶ。「合成抗体」は、本明細書では抗体の断片及び抗体ハイブリッドを含むものとみなす。本発明のこの側面の抗体は免疫療法に特に有用であり、アポトーシスを評価したり又は治療計画のプログラムを監視したりするための診断手段として用いても良い。

【0114】

例えば、B m f 及び b m f は、それぞれB m f 及び b m f に対する自然発生抗体をスクリーニングするために用いることができる。これらは、例えば、ある種の変性疾患で発生することがある。

【0115】

例えば、特異的抗体はB m f タンパク質をスクリーニングするのに使用できる。後者は、細胞抽出物又は他の生体液におけるB m f のレベルをスクリーニングする手段として、又は培養上清から組換え手段で作られたB m f を精製する手段として、重要であろう。本明細書で意図する検定技術は当分野で知られており、例えば、サンドイッチ検定法、E L I S A 及びフローサイトメトリーを含む。

【0116】

上で議論した最初に述べた抗体に向けた任意の第二抗体（モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体又は抗体の断片）を含めることは、本発明の範囲内である。第一抗体及び第二抗体の両方を検出検定で用いても良く、又は第一抗体を市販の抗免疫グロブリン抗体と共に用いても良い。本明細書で意図する抗体には、B m f のいずれかの領域に特異的でない抗体も含まれる。

【0117】

ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は共に、タンパク質誘導体又はペプチド誘導体で免疫化することによって得られ、どちらのタイプも免疫検定に利用できる。両方のタイプの血清を得る方法は当分野で良く知られている。ポリクローナル血清はあまり好ましくないが、適当な実験動物に効果的量のB m f、又はその抗原性部分を注射し、動物から

10

20

30

40

50

血清を回収し、既知の免疫吸着技術のいずれかで特定の血清を単離することにより比較的簡単に調製される。この方法で生産された抗体は事実上どのタイプの免疫検定にも利用できるが、これはその生産物の不均一性の可能性があるため、一般的にはあまり好まれない。

【0118】

免疫検定におけるモノクローナル抗体の使用は、大量に生産できることと生産物の均一性のため特に好ましい。不死の細胞株と免疫原性調製物に感作されたリンパ球を融合することにより誘導したモノクローナル抗体産物用のハイブリドーマ細胞株の調製は、当業者らに良く知られている技術により行うことができる。(例えば、ドイラード及びホフマン、ハイブリドーマに関する基本事実、免疫学概要Vol.1、シュヴァルツ編、1981、コーラー及びミルスタイン、Nature 256: 495-499, 1975、コーラー及びミルスタイン、European Journal of Immunology 6: 511-519, 1976 参照)。

10

【0119】

免疫相互作用分子のスクリーニングは、時間がかかり労働集約的作業である。しかしながら、本発明者らは、限定はしないが Bmf のような低レベルの細胞質タンパク質に対する免疫相互作用分子、特に抗体を同定するための迅速且つ効率的なフローサイトメトリースクリーニング方法を開発した。

【0120】

本発明のこの側面に基づく方法は、これらの細胞をレポーター分子と一緒に又は別々に対象の抗体と共に培養した後の細胞集団の分析に基づくものである。この細胞集団は、目的のタンパク質を発現する細胞と目的のタンパク質を発現しない細胞の両方を含むものである。この分析はフローサイトメトリー分析であることが好ましく、目的のタンパク質を発現する細胞は目的のタンパク質をコードする核酸分子でトランスフェクトされそれにより該タンパク質を高レベルで発現するものであることが好ましい。タンパク質が細胞質タンパク質である場合、このタンパク質は目的の抗体と培養する前に透過してしまう。目的のタンパク質を発現しない細胞と発現する細胞の両方を含む細胞集団をスクリーニングすることにより、対象の抗体が目的のタンパク質に対するものである場合には二重の蛍光ピークが観察されるので、どの抗体が目的のタンパク質と結合するかの決定は単純になる。低い方の強度のピークはバックグラウンド染色を表し、一方高い方の蛍光強度のピークは特定染色の結果である。この方法でスクリーニングされた抗体が目的のタンパク質に対するものでない場合、低い蛍光強度のピークが1本観察される。目的のタンパク質に特異的でないが両方の細胞集団に存在する未知のエピトープの幾つかと結合する抗体は、高い蛍光強度のピークを1本生じる。この技術は低レベルの細胞質内分子に対する免疫相互作用分子をスクリーニングする迅速且つ正確な方法を提供する(オーライリー、1998、上記)。

20

30

【0121】

従って、本発明の別の一側面は、細胞によって生産される目的タンパク質に特異的な、試料内の、免疫相互作用分子を検出する方法であって、該方法が、免疫相互作用分子が該試料内に存在する場合には、それが該目的のタンパク質と相互作用するのに十分な時間及び条件の下で、目的のタンパク質を生産する細胞と目的のタンパク質を生産しない細胞を定義された比率で含む細胞細胞集団とテスト対象の試料とを接触させる工程、及び該免疫相互作用分子-タンパク質複合体を検出手段にかける工程を含む方法を提供する。

40

【0122】

該免疫相互作用分子は抗体であることが好ましい。

【0123】

該検出手段は、検出可能なシグナルを与えることができるレポーター分子で標識化された抗免疫グロブリン抗体を含むことが更に好ましい。該レポーター分子が蛍光色素であればさらに好ましい。

【0124】

「試料」とは、抗体などの免疫相互作用分子を潜在的に含む任意の試料を指すものと解すべきである。該免疫相互作用分子は天然、組換え又は合成手段によって生産されうる。

50

【0125】

本発明の方法は、本発明の試料と共にインキュベートされた細胞をフローサイトメトリー分析にかけて蛍光性シグナルを発生させる工程であって、蛍光性シグナルの差異が該細胞により発現される標的タンパク質と抗体との結合の指標となる工程に基づいている。

【0126】

本明細書で例示する方法は、Bmfのエピトープに対する抗原結合部位を含む免疫相互作用分子をスクリーニングする方法に関するが、これに限定しない。前骨髄単球細胞株であるFDC-P1を、Bcl-2発現構築物及びEE(Glu-Glu)エピトープで標識されたBmf構築物でトランスフェクトする。Bcl-2でトランスフェクトした細胞対Bmfでトランスフェクトした細胞の比率を1:1に固定し、これを透過処理し、ハイブリドーマ上清などの目的の免疫相互作用分子と接触させる。抗体と結合した細胞内分子を可視化することは、例えば蛍光標識したレポーター分子の使用を含む当業者らに知られた幾つかの技術により達成できる。目的の抗体がBmfに対して産生された場合、二本の蛍光のピークが観察され、強度の低い方のピークはBcl-2でトランスフェクトされた負の対照細胞のバックグラウンド染色を表す。

10

【0127】

本発明の別の側面では、本発明の分子はまた、Bmfによって調節される障害の診断などの適用に使用するためのスクリーニングの標的として役に立つ。例えば、癌、変性疾患又は不妊症の素因又は進行の指標としての組織内のBmf又は**bmf**のレベルのスクリーニングなど。本発明のこの側面のスクリーニングはまた、Bmf又は**bmf**における突然変異の検出に向けられる場合がある。

20

【0128】

従って、本発明の別の側面は、被験体から得た生体試料中のBmfを検出する方法であって、免疫相互作用分子-Bmf複合体が形成するのに十分な時間及び条件の下で、該生体試料を既に定義したBmf又はその誘導体に特異的な免疫相互作用分子と接触させる工程、次いで該複合体を検出する工程を含む方法を意図する。

【0129】

該免疫相互作用分子は抗体であることが好ましい。該抗体はモノクローナル抗体であればさらに好ましい。

【0130】

本発明のこの側面の生体試料とは、被験体から得た組織を含む任意の試料を指すと解されるべきであって、該「組織」は生体液、生検試料、又はDNA若しくはRNA特性などの、それらに由来する組織または流体または抽出物の何らかの形のものを含む最も広い意味に解釈されるべきである。

30

【0131】

本発明のさらに別の側面は、被験体から得た生体試料中の**bmf**を検出する方法であって、免疫相互作用分子-**bmf**複合体が形成するのに十分な時間及び条件の下で、該生体試料を既に定義した**bmf**又はその誘導体に特異的な免疫相互作用分子と接触させる工程、ついで該複合体を検出する工程を含む方法を意図する。

【0132】

「免疫相互作用」分子とは、**bmf**又はBmfまたはその誘導体と共役し、結合し又は他の方法で結合する任意の分子を指すものと理解されるべきである。例えば、該相互作用分子は、核酸分子又は抗核抗体であっても良い。

40

【0133】

Bmfの存在は、ウェスタンブロット法、ELISA又はフローサイトメトリー法などの幾つかの方法で測定して良い。BmfmRNA若しくはBmfDNAは、例えば正常所在位置でのハイブリッド形成又はノーザンブロット法、又はサザンブロット法により検出されうる。これらは当然、伝統的な競争タイプの結合検定法だけでなく、1部位及び2部位の両方、又は非競争タイプの「サンドイッチ」検定法を含む。これらの検定法には、標的に対する標識化抗体の直接結合法も含まれる。

50

【0134】

サンドイッチ検定法は、数ある中でも最も有用で、一般的に用いられる検定法であり、本発明での使用にも好適である。サンドイッチ検定技術の幾つかの変法が存在し、それらのいずれも本発明に包含されるつもりである。簡単に言えば、典型的なフォワード検定では、無標識抗体を固体基体上に固定化し、テストの対象となる試料を結合した分子と接触させる。次いで、適当なインキュベーション期間、即ち抗体-抗原複合体を形成させるのに十分な時間の後、検出可能なシグナルを発することができるレポーター分子で標識化され且つ抗原に特異的な第二抗体を付加して、第二の抗体-抗原-標識化抗体の複合体を形成するのに十分な時間インキュベートする。無反応な物質はすべて洗い流し、抗原の存在をレポーター分子が発するシグナルを観察することにより測定する。その結果は、可視シグナルの単純な観察による定性的なものでも、既知量のハプテンを含む対照試料との比較による定量的なものでも良い。フォワード検定の変法は、試料と標識抗体の両方が同時に結合抗体に付加される同時検定を含む。これらの技術は、容易に明らかになると思われる僅かな変法をも含め、当業者らに良く知られている。本発明によれば、試料は細胞抽出物、組織生検、又はおそらく血清、唾液、粘膜分泌物、リンパ液、組織液、及び呼吸液を含む、Bmfを含むと思われる試料である。従って、この試料は一般的には生体液を含む生体試料であるが、発酵液や細胞培養液などから得られる上清にも及ぶ。

10

【0135】

典型的なフォワードサンドイッチ検定法では、Bmfまたはその抗原部分に対して特異性を有する第一抗体を、共有結合的又は受動的のいずれかで固体表面に結合する。この固体表面は典型的にはガラス又は重合体で、最も一般的に使用される重合体は、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、塩化ポリビニル又はポリプロピレンである。この固体支持体は管、ビーズ、マイクロプレートのディスク、又は免疫検定を行うのに適した他の任意の表面の形態であって良い。結合工程は当分野で良く知られており、一般的に架橋的共有結合又は物理的吸着から成り、重合体-抗体複合体はテスト試料のために調製時に洗浄する。次にこの固相の複合体にテスト対象の試料の一部を添加し、この抗体に存在するサブユニットのいずれかと結合させるのに十分な時間（例えば2～40分、又はより都合がよければ一晩）及び適切な条件の下（例えば25℃など、室温から約40℃まで）でインキュベートする。このインキュベーション期間の後、抗体サブユニット固相を洗浄して乾燥し、このハプテンの一部に特異的な第二抗体と共にインキュベートする。この第二抗体は、第二抗体のハプテンへの結合を示すために用いられるレポーター分子と連結されている。

20

30

【0136】

代わりの方法は、生体試料内の標的分子を固定する工程、次いでこの固定された標的を、レポーター分子で標識化された又はされていない特異的な抗体と接触させる工程を含む。標的の量及びレポーター分子のシグナルの強度に応じて、結合した標的は抗体での直接標識化により検出可能となりうる。また、第一抗体に特異的な標識化された第二抗体は、標的-第一抗体複合体に曝され、標的-第一抗体-第二抗体の三重複合体を形成する。この複合体は、レポーター分子が発するシグナルにより検出される。

【0137】

本発明で用いる「レポーター分子」は、その分子の化学的性質により抗原結合抗体の検出を可能とする分析的に同定可能なシグナルを発する分子を意味する。検出は定性的又は定量的のいずれであっても良い。この種の検定で普通に用いられるレポーター分子は、酵素、蛍光団又は放射性核種含有分子（即ち、放射性同位体）及び化学発光性分子のいずれかである。

40

【0138】

酵素免疫測定法の場合、酵素は一般的にはグルタルアルデヒド又は過ヨウ素酸を用いて第二抗体に結合される。しかしながら、容易に分かるように、多種多様の異なる結合技術が存在し、これらは容易に熟練技術者らに利用可能である。通常使用される酵素には、中でもホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、 α -ガラクトシダー

50

ゼ及びアルカリホスファターゼが含まれる。特定の酵素と共に用いられる基質は、一般的には対応する酵素による加水分解により検出可能な色の変化を引き起こすことで選ばれる。適当な酵素の例には、アルカリフォスファターゼ及びペルオキシダーゼが含まれる。上で述べた色素生産性基質ではなく蛍光性産物を生ずる、蛍光発生的基質を採用することも可能である。どの場合においても、酵素標識化された抗体を第一抗体ハプテン複合体に添加し、結合させ、次いで過剰な試薬を洗い流す。適切な基質を含む溶液を次に抗体-抗原-抗体の複合体に添加する。この基質は第二抗体に連結された酵素と反応して定性的な可視性シグナルを生じ、これは更に通常分光光学的に定量化されて試料中に存在するハプテンの量を示すことになる。「レポーター分子」はまた、ラテックスビーズ上の赤血球などの細胞凝集又は凝集阻止の使用にも及ぶ。

10

【0139】

また、フルオレセイン及びローダミンなどの蛍光化合物は、その結合能力を変えることなく抗体に化学的に結合しうる。特殊な波長の光を照射することで活性化された場合、この蛍光色素で標識化された抗体はその光エネルギーを吸収し、分子内で励起状態を誘発し、その後光学顕微鏡で可視的に検知できる特有の色を放射する。EIAの場合のように、蛍光で標識化された抗体を第一抗体-ハプテン複合体に結合させる。結合しなかった試薬を洗い落とした後、残った三重複合体を次に適切な波長の光に曝す、観察された蛍光は目的のハプテンの存在を示す。免疫蛍光技術及びEIA技術は共に当分野で極めて良く確立されており、特に本方法には好ましい。

【0140】

しかしながら、放射性同位元素、化学発光分子又は生物発光分子などの他のレポーター分子もまた、採用される場合がある。

20

【0141】

本発明はまた、b m f又はその誘導体を検出するためのPCR分析などを含む遺伝子検定法をも意図する。

【0142】

本発明は更に、b m fの一方又は両方の対立遺伝子が、単独で、又はB l k、B a d、B i k、H r k、B i d、B i m、N o x a、b l x 3及びノ又はP u m aをコードする遺伝子など(これらに限定されない)の別のB c l - 2分子の一方又は両方の対立遺伝子における別の突然変異と組み合わせさせて、突然変異している遺伝子改変動物を提供する。これらの動物はまた、他の遺伝子又は遺伝子の対立遺伝子でも突然変異を有しうる。この遺伝子改変動物は、ネズミ種(例えば、マウス、ラット)、ウサギ、モルモット又はハムスターなどの実験動物、ヒツジ、ブタ、ウマ又はウシなどの家畜動物、又は霊長類などの非ヒト哺乳動物であることが好ましい。遺伝子改変動物はマウス又はラットなどのネズミ種であるのが便利であり好ましい。

30

【0143】

遺伝子改変は、一般的には1個又は複数のヌクレオチドの置換、欠失及びノ又は付加又は逆位又は挿入などの突然変異の形である。一般的に、このような遺伝子改変動物は「ノックアウト」動物と呼ばれる。

【0144】

一般的に改変動物及び特にノックアウトネズミ科動物は、かなりの数の手段で調製しうる。一つの方法では、相同的組換えさせるのに十分な程、b m f又はb i mなどの標的配列と相同的なヌクレオチド配列を含む標的に向かう(targeting)DNA構築物を調製する。b m f又はb i mを標的とする配列は標的B m f又はB i m配列に対して相同遺伝子(isogenic)又は非同源遺伝子でありうる。標的に向かうDNA構築物は、一般的に相同的組み換えにより、該標的b m f又はb i m遺伝子が挿入突然変異によって破壊されるように、標的に向かう配列内に選択可能マーカを含む。この標的に向かうDNA構築物は一般的に胚性幹細胞又は胚性幹細胞株に導入される。適当な標的に向かうベクターの一つを図5Aに示す。

40

【0145】

50

選択可能マーカーを用いる別のものとして、後に選択又は検知され得る表現形の変化を誘発する突然変異が導入される場合がある。

【0146】

従って、本発明の別の側面は、遺伝子的に改変された非ヒト動物を生産する方法であって、該方法が1個又は複数のヌクレオチドの置換、付加及び/または欠失又は逆位又は挿入を保持する b m f ヌクレオチド配列を含む遺伝子構築物を動物の胚性幹細胞中に導入する工程であり、相同組換えを選択する該胚性幹細胞のゲノム内に、b m f 遺伝子との相同組換えを促進するのに十分な b m f ヌクレオチド配列が存在するものである工程、及び突然変異した b m f 遺伝子を保持する胚性幹細胞を選択する工程、及び次いで該胚性幹細胞から遺伝子改変動物を作成する工程、を含む方法を提供する。

10

【0147】

この遺伝子改変動物は、マウスやラットなどのネズミ種であることが好ましい。

【0148】

B m f ヌクレオチド配列は、該胚性幹細胞内の b m f 遺伝子に対して相同遺伝子的であっても非相同遺伝子的であっても良い。

【0149】

用語「相同遺伝子的」とは、構築物中の b m f ヌクレオチド配列が胚性幹細胞が誘導されたのと同じ動物系統から誘導されることを意味する。

【0150】

本発明は、非相同的に媒介された標的 DNA 配列の組み込みを更に意図する。

20

【0151】

様々な選択可能マーカーが採用され、一般的方法論については、米国特許第 5,789,215 を参照しうる。

【0152】

上の方法は、b m f に加え、他の B c l - 2 遺伝子（例えば、B i m、B l k、B a d、B i d、H r k、N o x a 又は P u m a）及び/又は他の構造遺伝子又は調節遺伝子などの異なる遺伝子中に複数の突然変異を導入するためにも、同様に適用して良い。

【0153】

育種プロトコルもまた、B m f 中に突然変異又は他の遺伝子改変を導入するために適用して良い。ひとつのアプローチでは、E M S 又は他の突然変異を誘発したマウスを、G 1 世代を作成するため非突然誘発性マウスと交雑する。この G 1 世代は次に指標系統と交雑して G I F I 家系を作成する、これは次に b m f における突然変異を表現形的にスクリーニングしうる。b m f での突然変異は優性でも劣性であっても良く、突然変異は b m f について直接、又はその別の遺伝子に対するその効果により、又はその別の遺伝子に対する最初の突然変異の効果緩和する際におけるその効果で検出してもよい。

30

【0154】

b m f 対立遺伝子の一方又は両方において単独で又は他の B c l - 2 ファミリー遺伝子などの他の遺伝子における突然変異と組み合わせられて突然変異を保持するノックアウトマウスを含む遺伝子改変動物は全て、本発明に包含される。

【0155】

本発明は、以下の限定的でない実施例を用いて更に説明する。

40

【実施例 1】

【0156】

B m f の同定及びクローニング

本発明者らは、胚形成である役割を果たした新規な B H 3 のみタンパク質を探索した。M c l - 1 欠乏マウスは、生存促進 B c l - 2 ファミリーメンバーを欠いたノックアウトマウス全てのうちで最も深刻な発生的欠陥を有するので、M c l - 1 を餌として用いた。B m f (Bcl-2 modifying factor (bcl-2 変更因子)) は、M c l - 1 を餌として用いた 17 日のマウス胚ライブラリーの酵母 2 ハイブリッドスクリーニングにより同定した。

【0157】

50

17日のマウス胚からの又は胚期9日から分娩後1日までのマウスの胚からのcDNAライブラリーをpAD-GAL4-2.1 (HybriZAP-2.1キット、ストラタジーン)で調製した。ベイトベクターは、その疎水性C末端をコードする配列を欠いたマウス**mcl-1**をpGBT-9 (クローンテック)中にクローニングして作成した。酵母形質転換及びプラスミドレスキューは既に記載したとおり実行した(ブサラカスら、1999、上掲)。7 × 10⁵クローンをスクリーニングし、一つの陽性クローンを得た。Mcl-1と新規なタンパク質の間の相互作用はガラクトシダーゼ染色法(ブサラカスら、1999、上掲)で確認した。配列分析から、このクローンが5'末端を欠いた部分的なものであることが明らかになった。この部分的なクローンをプローブとして用いて、p53^{+/+}KO 52DA20胸腺種細胞株から誘導されたcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより(ストラッサーら、Cell 79: 329, 1994)、全長クローンを単離した。ヒト**bmf**はマウス**bmf**をプローブとして用いてヒト活性化T細胞cDNAライブラリーをスクリーニングして単離した。Bmf相互作用タンパク質をスクリーニングするために、選択マーカーとしてクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼの遺伝子を保持するpGBT-9誘导体中にマウス**bmf**をサブクローニングした。5 × 10⁶個のスクリーニングしたクローンのうち、60個の陽性クローンが最初に選択され、そのうち6個が後に誤った陽性であると分かった。

10

【0158】

詳細な配列分析(クローら、1994、上掲)から、BmfがBim、Bik及びEGL-1で見出されたものに最も類似するBH3ドメインを保持することが明らかになった(図1A及びB)。酵母2ハイブリッドシステムでは、BmfはMcl-1及び他の生存促進Bcl-2タンパク質(Bcl-2、Bcl-x_L及びBcl-w)とは相互作用したが、テストしたアポトーシス促進ファミリーメンバー(Bax、Bid及びBad)とは相互作用しなかった。293T細胞で一時的に過剰発現した場合、Bmfは生存促進Bcl-2ファミリーメンバーであるBcl-2及びBcl-w、並びにBcl-x_L及びMcl-1と免疫共沈降できた(図1C)が、アポトーシス促進Bax又はBH3のみタンパク質Bimに結合しなかった。BmfとBcl-2又はBcl-wとの相互作用は、そのBH3ドメイン内の不変性ロイシン(L138A)を突然変異させることにより、大きく減少した(図1C)。更に、Bcl-2のBH1(G145E)ドメイン又はBH2(W188A)ドメイン内で保存された残基の突然変異は、そのBim(オコーナーら、EMBO J 17: 384, 1998)又はBax(インら、Nature369: 321, 1994)への結合を破壊するものであるが、これはまたそのBmfへの結合をも破壊する。内因性Bmfが、界面活性剤で溶解されたMCF-7ヒト乳癌細胞(図1D)由来の内因性Bcl-2と免疫共沈降できたことは重要である。これは、これらのタンパク質が過剰発現した場合にのみ結合するという可能性を排除する。

20

30

【0159】

Bmfの生物学的活性は、それをジャーカットヒトTリンパ腫細胞中で、並びに安定にトランスフェクトされたL929マウス線維芽細胞中で(図1E)、又はIL-3依存性FDC-P1マウス前骨髄球細胞中で(図2C)、一時的に過剰発現させて調べた。Bmfの発現は24時間以内に約80%のジャーカット細胞でアポトーシスを誘発し、L929線維芽細胞コロニーの形成を約65%減少させた(図1E)。Bmfに誘発されたジャーカット細胞のアポトーシスは、カスパーゼ阻害因子バキュロウイルスp35によって、又はBcl-2又はその同族体(Bcl-x_L、Bcl-w、Mcl-1)の共発現によって遮断されたが、Bcl-2のBH1(G145E)ドメイン又はBH2(W188A)ドメインによっては遮断されなかった。そのアポトーシス促進活性と一致して、Bcl-2(またはその同族体の一つ)も発現した場合にのみ、FDC-P1細胞内で高レベルのBmfが安定して発現できた。このようなBmf/Bcl-2を共発現するFDC-P1細胞は、サイトカイン除去、 γ -照射、又はエトポシドによる治療にตอบสนองしてBcl-2発現細胞よりも急速に死滅した(図2C)。実施された全ての細胞死検定において、BH3ドメインを欠いたBmf突然変異体又はその中にL138A突然変異を有するBmf突

40

50

然変異体は不活性であった(図1E及び2C)。これらの結果は、Bmfが生存促進Bcl-2ファミリーメンバーに結合してアポトーシスを開始するBH3のみタンパク質であることを立証する。

【実施例2】

【0160】

Bmfの発現パターン

Bmfの発現パターンを、ノーザンブロット法、RT-PCR、及びウェスタンブロット法で研究した。Bリンパ系及びTリンパ系、骨髄質系又は繊維芽細胞質系起源の細胞株の多くで、及びE9から誕生までの全ての発生過程におけるマウス胚で、bmfmRNAが見つかった(図1F)。アフィニティ精製されたウサギのポリクローナル抗体又はラットのモノクローナル抗体(後述)を用いた細胞溶解物のウェスタンブロット法は、多くの器官でBmfに相当する単一バンドを検出し、脾臓、肝臓、腎臓及び造血組織で突出したレベルを示した(図1G)。従って、Bmfは胚形成の間、多くの成熟組織で発現される。

【0161】

ダイニン軽鎖及びBmfに対するモノクローナルラット抗体は、既発表のプロトコル(オーライリら、1998、上掲)を用いて作成した。簡単に言えば、ウイスターラットを精製した組換えマウスDLc1/Lc8又はマウスのBmfで免疫化した。免疫化したラットの脾臓細胞をSp2/0骨髄腫細胞と融合した。その結果得られたハイブリドーマクローンを、特定の抗体の生産について、免疫蛍光染色分析及びフローサイトメトリー分析でスクリーニングした。ハイブリドーマは2回クローニングし、抗体はタンパク質-Gカラム(アマシャムファーマシア)上で又はMAR18.5(モノクローナルマウス抗ラットIgk)抗体と結合したセファロースカラム上のいずれかで精製した。モノクローナル抗体11F7(ラットIgG2a/)はマウス及びヒトDLc1/Lc8及びDLc2を認識したが、一方10D6(ラットμ/)はマウス及びヒトDLc1/Lc8を検出するがDLc2は検出しない。モノクローナル抗体9G10及び12E10(共にラット2a/)はウェスタンブロット法及び免疫沈降法で内因性のマウス及びヒトのBmfを検出する。ポリクローナル抗Bmf抗体を作成するため、ニュージーランドホワイト種ウサギを500μgの組換えマウスBmfで免疫化した。3週間の間隔で増幅免疫を与えた。12日後に血清を採取し、組換えマウスBmfタンパク質と結合したセファロースカラム上で精製した。

【実施例3】

【0162】

アポトーシスの構造

bmf発現がアポトーシス刺激により誘発されるのかどうかを検討するため、サイトカイン欠乏、照射又はデキサメタゾンによる処置又はイオノマイシンを含む様々な形のストレスに曝した胸腺細胞由来のmRNAについてRT-PCR分析を実施した(後述)。これらの刺激はどれもbmf発現に何の影響も与えず(図2A)、Bmfが翻訳後に恐らくは他のタンパク質との相互作用により調節される可能性について研究させるように本発明者らを駆り立てた。Bmfを餌として用いたマウス胚cDNAライブラリの酵母2ハイブリッドスクリーニングは14の独立のMc1-1クローンと、驚くべきことに、ダイニン軽鎖(DLC)をコードする40を超えるクローンを単離した。先に行ったスクリーニングでは、Bimは専らDLc1/Lc8を単離した(プサラカスら、1999、上掲)。対照的に、Bmfと相互作用するダイニン軽鎖のほとんどは密接な関係にあるタンパク質DLc2をコードしていた(ネスピッツら、J. Neurosci.20: 4524, 2000)。一時的にトランスフェクトされた293T細胞での共免疫沈降実験は、BmfとDLc2との相互作用を確認した(図2B)。配列比較では、BmfがBH3ドメインに加え、DLc1/Lc8とのその結合を媒介するBim(aa51-DKSTQTSP)内の領域と良く類似する短い領域(aa67-DKATQTLSP)を有することが明らかになった(図1A)。これはBmfのDLc結合モチーフであり、その内部での突然変異(A69P又はD67K68A69>AAA、以後AAA突然変異と呼ぶ)が酵母細胞及び哺乳動物細胞にお

いてBmfとDLC2との相互作用を排除するためである(図2B)。さらに、IL-3欠乏又は照射において、Bcl-2及びBmfの非DLC2結合突然変異体を共発現するFDC-P1細胞は、Bcl-2及び野生型Bmfを共発現するFDC-P1細胞よりも急速に死滅した(図2C)。これらのBmf突然変異体、野生型Bmfよりも強力にL929繊維芽細胞コロニーの形成をも抑制した。従って、DLC2との相互作用はBmfのアポトーシス促進活性を負の方向で調節する。

【0163】

bmfmRNA発現のRT-PCR分析は次のプライマーを用いて実施した：5' (センス)プライマー 5' CCGGATGGATCACCCAGGAATG3' [配列番号：11]、3' (アンチセンス)プライマー 5' CAGAGCTGACAAAGGCCACA G3' [配列番号：12]。サザンプロット上でのPCR産物の検出は、内部bmfプライマー5' CCACTTCCTGGAGAACAATCA3' [配列番号：13]を用いて実施した。GAPDH発現の分析用に、次のプライマーを使用した：5' (センス)プライマー 5' TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG3' [配列番号：14]、3' (アンチセンス)プライマー 5' TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT3' [配列番号：15]及び内部プライマー 5' CCCGGCATCGAAGGTGGAAGAG3' [配列番号：16]。

【実施例4】

【0164】

機能モデル

本発明者が考察した問題は、何故Bmfは高度に関係のあるパートナー、DLC-1又はDLC-2と結合することにより調節されるのかということである。Bmfは別々のストレス刺激を感知するために細胞内の部位(複数)に隔離されると提唱する。繊維状アクチンとパクリタキセル(タキソール)重合可能微小管分画への細胞タンパク質の分離は、以前の結果(プサラカスら、1999、上記)と一致して、Bimとダイニン中間鎖(IC74)は大部分が微小管成分(P2)と共移動し、一方Bmfとミオシンは繊維状アクチンを含むP1分画に限定されたことを明らかにした(図3A)。更に、サイトカラシンD又はC.ジフィキリ(*difcilli*)毒素Bなどのアクチン脱重合物質で細胞を処理すると、繊維状アクチンを含むP1画分からBmfが解放され、一方Bimの分画化は影響されなかった(図3B)。

【0165】

細胞下分画のため、 5×10^6 のMCF-7細胞を1%のトリトン-X-100を含む抽出緩衝液50 μ Lに溶解した。細胞破砕物及び細胞核を2000gで遠心分離機にかけ除去した。次いで上清を37 $^{\circ}$ で13分間100 μ Mのパクリタキセル(タキソール)及び5単位のアピラーゼ(シグマ)と共にインキュベートした。この混合物を次いで7.5%のショ糖(抽出緩衝液内で生成)のクッション0.5mLの上に載せ、30 $^{\circ}$ で140,000gで30分間、遠心分離した。このペレットを微小細管P2画分として、及びその上清をS画分として保存した。アクチンが豊富なP1画分を微小細管構成成分の混入なしに得るために、MCF-7細胞を2時間、2 μ g/mLのコルヒチン及び1 μ g/mLのノコダゾール(nocodazole)の存在下で、溶解に先立って培養した。これらの溶解物は次いで細胞破砕物及び核(上述)を除去し、その後、4 $^{\circ}$ で60分間、140,000gで遠心分離してペレット(P1)画分を得た。ショ糖勾配上での抽出物の分画のため、 10^7 の細胞を500 μ L抽出緩衝液中に溶解した。細胞破砕物及び核を除去した後、その上清を100 μ Mのパクリタキセル(タキソール)プラス5単位のアピラーゼで処理し、37 $^{\circ}$ で13分インキュベートした後、5~20%のショ糖勾配(1%のトリトンX-100で調整)上に載せ、15 $^{\circ}$ で18時間、140,000gで遠心分離した。

【0166】

BmfとBimが別々に局在することは、それらの好ましいダイニン軽鎖パートナーによりほとんど決定される。先の報告(ベナシユスキーら、J. Biol. Chem.272: 20929, 1997)とは反対に、DLC1/LC8のみ又はDLC1/LC8とDLC2の両方のいずれか

を識別するモノクローナル抗体を用いて(図3C)、本発明者らはDLC2を含むがDLC1/LC8を含まない精製したミオシンVモーター複合体を示した(図3D)。この観察は、Bmfが、優先的にDLC2と結合することにより、ダイニンモーター複合体の一部を形成するのではなく、繊維状アクチン上のミオシンVと複合体を形成するかもしれないことを示唆する。この考えに一致し、マウスの脾臓細胞からの抽出物を組換えBmf及びBimとインキュベートすると、BmfのみがミオシンVと結合することが確認された(図3E)。更に、Bmf及びBimは、ショ糖勾配上でMCF-7細胞の溶解物の細胞下分画の後に、別々の移動パターンを示した(図3F)。DLC1/LC8はホモ二量体を形成する傾向が強いため、そしてそれはBimとIC74と同じ領域を介して結合する(ローら、*J. Biol. Chem.* 276: 14059, 2001)ので、DLC1/LC8ホモ二量体の一方のパートナーは恐らくIC74と相互作用し、他方のパートナーはBimと結合し、それにより微小細管ダイニンモーター複合体にそれを隔離する。DLC2ホモ二量体は一方の腕でBmfと結合し他方の腕でミオシンVと結合することにより、Bmfを繊維状アクチンに隔離する可能性がある。

10

【0167】

本発明者らは次に、Bmf及びBimが、両方のタンパク質を内因的に発現する細胞を用いて、別個のアポトーシス刺激により活性化されるかどうかを調べた。われわれの先の結果(ブサラカスら、1999、上記)と一致して、MCF-7細胞のUV照射はダイニンモーター複合体が存在するベレット画分からBimを放出した。健康な又は損傷を受けたMCF-7細胞の溶解液をショ糖勾配遠心分離で比較すると、BmfはUV照射に反応して密度の高い画分から低い画分へ転座することも明らかになった(図4A)。微小細管を重合させることで知られる化学療法薬物、パクリタキセル(タキソール)による処置はBimを放出したがBmfは放出しなかった(図4A)。アポトーシスへのこの経路におけるBimの重要な役割と一致して、Bimを欠いた胸腺細胞はパクリタキセルの細胞障害効果に異常に抵抗する(フリッシュ及びルオスサーティ、*Science* 286(5445): 1735-1738、1999)。一方、アノイクス(細胞接着及びインテグリン発信の非存在)、即ちアクチン細胞骨格に影響を与えるアポトーシス刺激(フリッシュ及びルオスサーティ、1997、上記)はBimではなくBmfの選択的放出をもたらす(図4A)。これらの実験は、カスパーゼの活性化を阻害するのに十分な濃度(50 µM)の広域スペクトル性のカスパーゼ阻害剤zVAD-fmkの存在下で行ったため、Bmf及び/又はBimの放出はアポトーシス変化の結果ではなく、アポトーシスシグナル発信における開始事象を表すようである。重要なことに、本発明者らはアノイクスの間に放出された内因性Bmf(DLC2と共に)はミトコンドリアから単離された内因性Bcl-2と共免疫沈降できることを示した(図4B)。対照的に、健康な細胞のミトコンドリアから単離されたBcl-2と複合体を形成することが見出されたBmfは殆どなかった。

20

30

【0168】

集約すると、本発明者らのデータは、Bmf及びBimが細胞ストレスの別の形により惹起される別の死亡シグナルを形質導入する二つのアポトーシス促進性BH3のみタンパク質を表すことを証明する。これらは細胞の健康を監視するために主要な細胞骨格に搭載された見張り役を表すようである。例えば、パクリタキセルによる微小細管の障害はBimを活性化するがBmfは活性化せず、一方アクチン細胞骨格に影響を与えるアノイクスは、Bmfを活性化するがBimは活性化しない。抗アポトーシスBcl-2の脱調節による発現は腫瘍形成を促進できるため(ストラッサーら、*Nature* 348: 331、1990)、アポトーシス促進性のBH3のみタンパク質における異常はガンをも引き起こすことができる可能性がある。ヒト**bmf**の遺伝子は染色体15q14に位置し、多くの転移性ではあるが主要ではない癌腫で失われた候補となる腫瘍抑制遺伝子の部位として同定された(ウィックら、*Oncogene* 12: 973、1996)。アノイクスは転移性腫瘍増殖に対する障壁として意味づけられてきた(ルオスサーティ及びリード、*Cell* 77: 477、1994)。15q14突然変異を保持する転移性腫瘍は、従って、Bmfの発現又は機能に異常を有する場合がある。

40

50

【実施例 5】

【0169】

B m f ノックアウトマウスの形成

マウスは C 5 7 B L / 6 へ戻し交配される C 5 7 B L / 6 背景で選択する。子孫は野生型又は突然変異型の b m f 遺伝子に特異的なプライマーを用いた P C R を使用して遺伝子形を決定する。

【0170】

b m f を標的にするベクターは図 5 A に示すように作成する。ネオマイシン又はハイグロマイシンの配列を選択可能マーカーとして用いる。その構築物を胚性幹細胞中に導入し、ネオマイシン又はハイグロマイシンを用いて形質転換された細胞を選択する。次いでこの形質転換された胚性幹細胞を遺伝子改変マウスを形成させるために用いる。

10

【実施例 6】

【0171】

B m f のゲノム機構とプロモーター領域の同定

ネズミ b m f 遺伝子のゲノム機構を図 5 A に示す。この領域の上流は配列番号：9 で略記したようにプロモーター領域を含む。ヒト b m f 遺伝子からの対応するプロモーターは配列番号：10 に略記する。

【0172】

当業者らは本明細書に記載された発明は具体的に記載されたもの以外に変化及び修正しやすいことを認めるであろう。本発明がこのような変化及び修正を全て含むものと理解すべきである。本発明はまた、本明細書で個別に又は集合的に言及したまたは示した全ての工程、特性、組成物及び化合物、及び、該工程又は特性のいずれか二つ以上の組み合わせのいずれか及び全てを含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0173】

【図 1】図 1 は、B m f、即ち新規な哺乳動物の B H 3 のみタンパク質を表したものである。(A) マウス及びヒトの B m f のアミノ酸配列の予測。B i m のダイニン軽鎖結合モチーフと共に保存されている 9 個のアミノ酸を、アスタリスク 1 つ (*) を付けた四角で表す。隠れたマルコフモデル (クローラ、J. Mol. Biol. 235: 1501, 1994) で同定された短い B H 3 領域は、アスタリスク 2 つ (**) を付けた四角で表す。(B) B m f の B H 3 領域を他のアポトーシス促進性 B c l - 2 ファミリーメンバーと整列したもの。黒い四角は同一のアミノ酸を示し、灰色の四角は類似する残基を示す。(C) 野生型 B m f は生存促進 B c l - 2 及び B C l - w と結合するが、B H 3 突然変異体は結合しない。共免疫沈降実験は前に記載したとおり (プサラカスら、1999、上掲) に実施した。簡単に言えば、293T 細胞を一時的に F L A G で標識した B c l - 2 (又は B c l - w) 及び E E (G l u - G l u) で標識した B m f 又は L 1 3 8 A 突然変異 B m f の発現構築物と共トランスフェクトした。トランスフェクションの 24 時間後に細胞を代謝的に ³⁵S - メチオニンで標識し、一晚培養した後に収穫した。等価のトリクロロ酢酸 (T C A) - 沈殿性 ³⁵S カウントを含む大量の細胞溶解液を F L A G 又は E E エピトープ標識に対する m A b s との免疫沈降に用いた。(D) M C F - 7 細胞における B c l - 2 と内因性 B m f との相互作用。1% v / v のトリトン X - 100 を含む溶解緩衝液内で調製した 10⁷ の M C F - 7 細胞からの溶解物を、セファロースに結合した B c l - 2 - 100 (抗 - ヒト B c l - 2) m A b 又は同位体に適合した対照 m A b のいずれかと免疫共沈降した。結合したタンパク質をレムリ緩衝液中 (非還元性) 中で煮沸してビーズから溶出し、S D S - P A G E 上でサイズ分画し、ニトロセルロースフィルターへ転移した。ラットの抗 B m f ・ m A B (9 G 10) を用いてウェスタンブロット法を実施した。アスタリスク (*) は免疫共沈降に使用した m A B の軽鎖を示す。(E) 野生型 B m f は、L 9 2 9 繊維芽細胞を死滅させたが B H 3 突然変異体は死滅させなかった。L 9 2 9 繊維芽細胞を、空のベクター即ちハイグロマイシン耐性のみを発現構築物、又は野生型 B m f、B m f の B H 3 突然変異体 (L 1 3 8 A) 又はその B H 3 領域を欠いた B m f でトランスフェクトした。トランス

30

40

50

フェクトした細胞をハイグロマイシンを含む培地内で培養し、その結果得られた薬物耐性コロニーを10～14日後に数えた。値は3回の独立した実験の平均値(+/-SD)である。(F及びG)細胞株及び組織におけるBmfの発現。ノーザンブロット分析(F)のため、様々な細胞株又はマウス胚(胚期9日から生後1日)由来の4µgのポリA⁺RNAを電気泳動し、ブロットし、マウス**b m f** cDNAプローブで精査した。g a p d h c DNAクローンによる精査を負荷対照として用いた。ウェスタンブロット分析(G)のため、種々のマウスの組織からの50µgの総タンパク質をSDS-PAGEでサイズ分画し、ニトロセルロースフィルター上へ電気ブロットし、Bmfに対するアフィニティ精製したウサギのポリクローナル抗体で精査した。負荷対象としてHSP70に対するモノクローナル抗体による精査を用いた。

10

【図2】図2はBmfがDL C 2との相互作用により調節されることを示す図である。(A)様々はアポトーシス刺激で処理した胸腺細胞における**b m f** mRNAの発現。総RNAは、胸腺細胞(新鮮な状態で単離された)から、又はサイトカインの非存在又はデキサメサゾン(1µg)、照射(10Gy)若しくはイオノマイシン(1µg/mL)での処理の状態での培養後の表示時点で単離した。これらの条件はすべて、実質的なアポトーシスを誘発し、従ってどのRNAも処置後7時間後には収穫できなかった。次に2µgのRNAをAMV逆転写酵素を用いて逆転写した。cDNAの5倍の希釈液をbmfに特異的なプライマーを用いてPCR分析にかけた。PCR産物の移転後、ニトロセルロース濾紙を³²Pで標識した内部**b m f**オリゴヌクレオチドプローブを用いて精査した。(B)Bmfはそのダイニン軽鎖結合領域を介してDL C 2に結合する。共免疫沈降実験は図1Cの説明で記載したとおり、FLAGで標識されたDL C 2及びEEで標識されたwt Bmf、BmfのBH3突然変異体(L138A)又はBmf(A69P又はAAA)、Bid又はBaxのDL C結合領域突然変異体を一時的に発現する293T細胞の溶解物から実施した。アスタリスク(*)は免疫沈降化に用いたmAbの軽鎖を示す。(C)DL C 2との相互作用はBmfのアポトーシス促進効力を調節する。Bcl-2プラスEEで標識されたwt Bmf、BmfのBH3突然変異体(L138A)又はBmfのDL C結合領域突然変異体(A69P又はAAA)を安定に発現するFDC-P1細胞を、1～6日間IL-3欠乏状態とする。細胞可視性はヨウ化プロピジウム染色及びフローサイトメトリ分析により評価する。値はそれぞれの遺伝子系の4個の独立したクローンで実施した3回の独立した実験の平均値(+/-SD)である。

20

30

【図3】図3はBmfがDL C 2を介してアクチンに基づくミオシンVモーター複合体と結合することを示す写真である。(A)10⁷のMCF-7細胞からの溶解物をP1、P2及びS画分中に分けた。次に、それぞれの画分からのタンパク質をSDS-PAGEでサイズ分画し、ニトロセルロース上へ移転させ、Bmf、BimL(オーライリーら、Bio techniques 25: 824, 1998)、ミオシンV(エスプレフィコら、J. Cell Biol. 119: 1541, 1992)又はダイニン中間鎖IC74(シグマ)に特異的なmAbsを用いて精査した。(B)MCF-7細胞を、サイトカラシンD(10µg)又はトキシンB(10ng/mL)のいずれかで3時間処理し、次いで(A)で記載したように分画し処理した。(C)DL C 1/LC 8及びDL C 2の両方、又はDL C 1/LC 8のみを認識する新規なmAbsの特性決定。FLAGで標識されたDL C 1又はDL C 2を一時的に発現する293T細胞からの抽出物をSDS-PAGEゲル上で流し、ニトロセルロースの膜上へ電気ブロットし、ラットモノクローナル抗体11F7(DL C 1及びDL C 2の両方を認識する)又は10D6(DL C 1のみを認識する)で精査した。矢印で記す分子量が低い方がすかなバンドは内因性DL C 1を示す。(D)ミオシンVはたいていDL C 2と結合し、一方ダイニンはDL C 1/LC 8と優勢に結合する。細胞質のダイニンはMCF-7細胞(パスカルら、Methods Enzymol. 196: 181, 1991)から濃縮され、ミオシンVはマウスの脾臓(m)又はニワトリの脳(c)から精製した(ケニー、Methods Enzymol. 298: 3, 1998)。これらの濃縮された画分を、ラットmAbs 11F7(DL C 1/LC 8及びDL C 2を認識する)又は10D6(DL C 1/LC 8のみを認識する)を用いてウェスタンブロット法で分析した。ニトロセルロース膜を、ミオシン及びダイニンモーター分

40

50

画の純度を立証するため、ミオシンV又はIC74(シグマ)に対する抗体で精査した。(E)マウスの脾臓細胞からの抽出物(200 μ グラムのタンパク質)を組換えGST又はGSTで標識したFADDと4で3時間インキュベートし、Bmfタンパク質又はBim_Lタンパク質、及び結合タンパク質をグルタチオンセファロースビーズ上で回収した。結合タンパク質をレムリ緩衝液(非還元性)中で煮沸してビーズから溶出し、SDS-PAGEでサイズ分画し、ニトロセルロース膜上へ電気ブロットし、ミオシンVに対する抗体で精査した(エスプレフィコら、1992、上掲)。このニトロセルロース膜をアミドブラック(ボトムパネル)で染色し、匹敵する量のタンパク質がプルダウン実験で用いられたことを記録した。(F)10⁷のMCF-7細胞からの溶解物を5~20%w/vのシヨ糖勾配を通して分画した。そのペレットと可溶性画分を、Bmf、Bim、DLC1/LC8又はDLC2の存在についてウェスタンブロット法で分析した。

【図4】図4は、Bmf及びBimがその隔離部位から別々のアポトーシス刺激に反応して放出されることを示す写真である。(A)MCF-7細胞を広域スペクトルのカスパーゼ抑制剤zVAD-fmk(50 μ M)の存在下で培養した。対照(未処理)細胞からの溶解物を、アノキス(ポリ-ヘムでコーティングしたペトリ皿上で懸濁して24時間細胞を培養)、UV照射(100J/m²)、パクリタキセル(タキソール 1 μ M)を含む様々なアポトーシス刺激に曝した細胞からの溶解物と比較した。10⁷細胞の溶解物をシヨ糖勾配により分画した。そのペレットと可溶性画分を回収し、Bmf及びBimについて特異的なモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロット法により分析した。(B)アノキスの間、Bmfはミトコンドリアに転座し、Bcl-2と結合する。ミトコンドリアは前に記載したように2 \times 10⁸の健康なMCF-7細胞か又はアノキスに付された細胞から精製した。ミトコンドリアのタンパク質を1%v/vのトリトンX-100(ブサラカスら、1999、上掲)を含む溶解緩衝液中で抽出した。免疫沈降はセファロースビーズと結合した抗ヒトBcl-2mAb(Bcl2-100)を用いて実施した。結合タンパク質をレムリ緩衝液(非還元性)中でビーズを煮沸して溶出し、SDS-PAGEでサイズ分画し、ニトロセルロース膜に電気ブロットし、Bcl-2、Bmf又はダイニン軽鎖に対するmAbsで精査した。

10

20

30

【図5A】図5Aはマウスの**bmf**遺伝子座のゲノム機構を示す図式である。

【図5B】図5Bはノックアウトマウスを作成するのに用いられるNEB193neo又はNEB193hygroにおけるbmfを標的とする構築物のグラフ図式である。

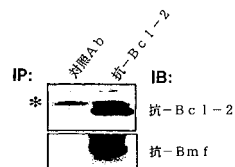
【 図 1 A 】

MEFNSQGYEEL EDDYFQSEDEGRITOPGSLLSADLFAQSILDCPLSRLQLFPLTHCCGPGLRPMISQEDKATQYLSLSP ヒト
 MEFPPQGYEEL EDDYFQSEDEGRITOPGSLLSADLFAQSILDCPLSRLQLFPLTHCCGPGLRPMISQEDKATQYLSLSP マウス

ASPSQGWMLPGGVTEEPQRLPYGNAGYRLLPLPASFPANVPLMIGEOPPEGQWVQHWAEVQIARKLQCIADQDFHRL ヒト
 ASPSQGWMLPGGVTEEPQRLPYGNAGYRLLPLPASFPAGSPLGEOPPEGQFLQHPAEVQIARKLQCIADQDFHRL マウス

HEKQCHQCNQNFQVWVQIQLFLRILALNREGENRAGSGPFB ヒト
 HTCCGHCQNRDRANWQVFLFLQILALNRQENREGVGPWV マウス

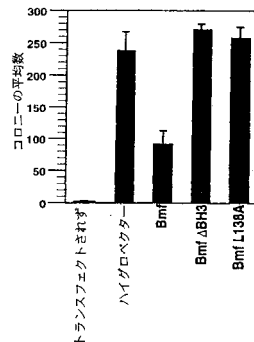
【 図 1 D 】



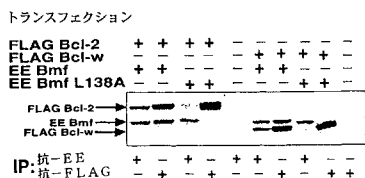
【 図 1 B 】

I	A	R	K	L	Q	C	I	A	D	O	F	H	R	L	Bmf	
I	A	Q	E	L	R	R	I	G	D	F	N	A	Y	Bim		
I	G	S	K	L	A	A	C	D	F	D	A	Q	E	G	L	-1
V	G	R	Q	L	A	I	G	D	F	N	R	Bak				
S	E	C	L	K	R	I	G	D	F	D	S	N	Bax			
A	L	L	A	C	I	G	D	F	D	V	S	Bid				
A	L	L	A	C	I	G	D	F	D	V	S	Bik				
T	A	R	L	K	A	G	D	F	H	Q	R	Hrk				
Y	G	R	E	L	R	R	M	S	D	E	F	V	D	S	Bad	

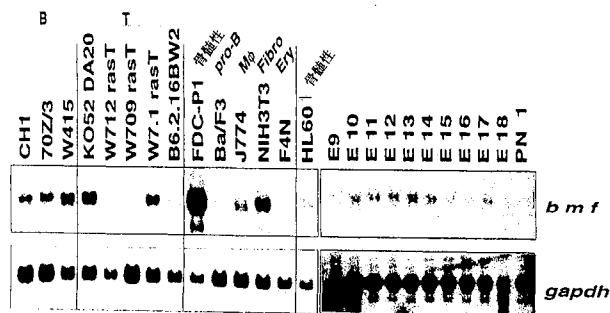
【 図 1 E 】



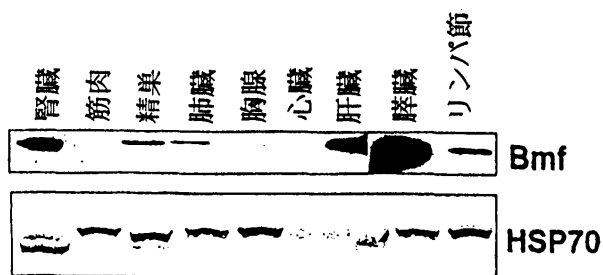
【 図 1 C 】



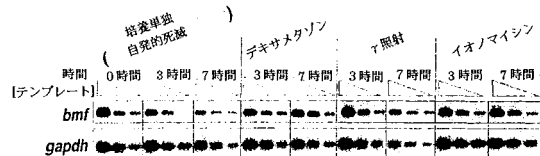
【 図 1 F 】



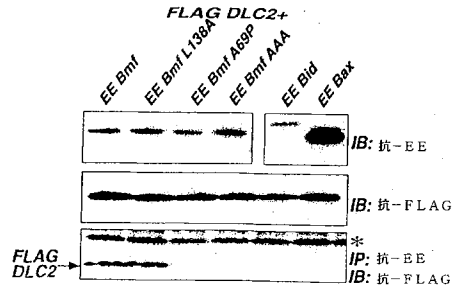
【 図 1 G 】



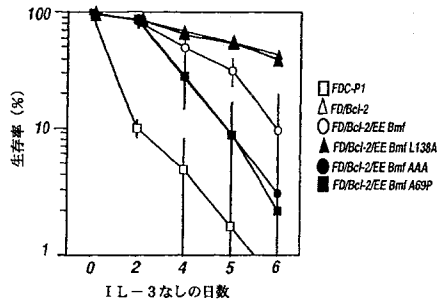
【 図 2 A 】



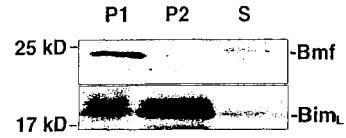
【 図 2 B 】



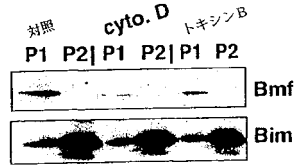
【 図 2 C 】



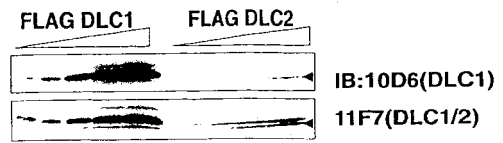
【 図 3 A 】



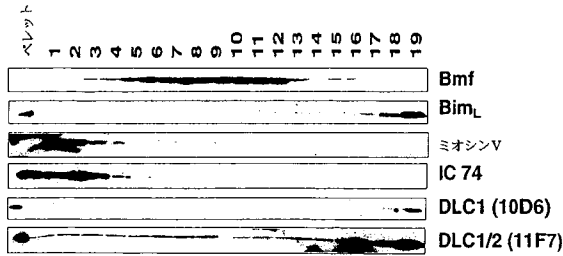
【 図 3 B 】



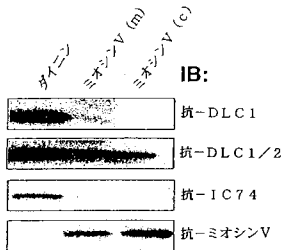
【 図 3 C 】



【 図 3 D 】



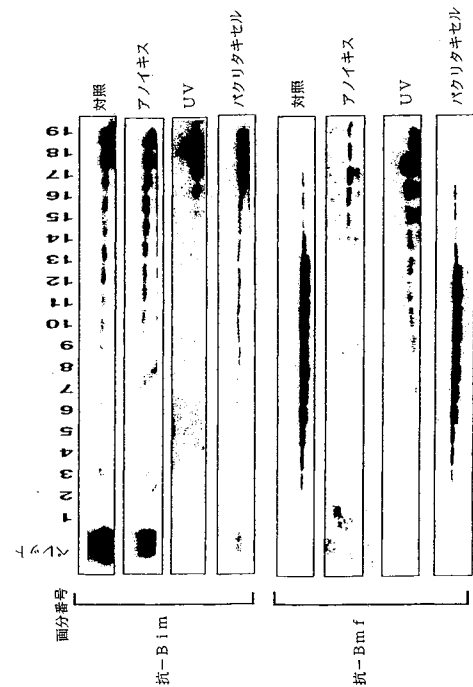
【 図 3 E 】



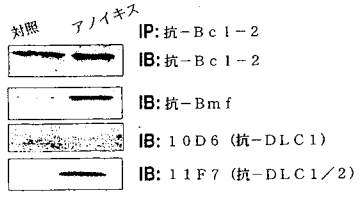
【 図 3 F 】



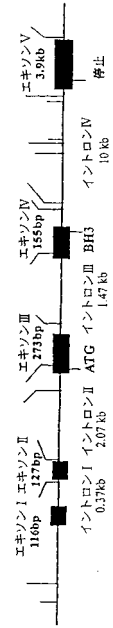
【 図 4 A 】



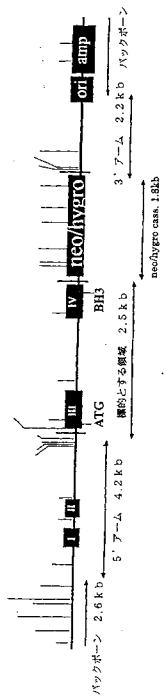
【 図 4 B 】



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
5 December 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/097094 A1

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/435, 16/18, A61K 38/17, 39/395, 48/00
Cheltenham, Victoria 3192 (AU). HUANG, David, Ching, Siang [MY/AU]; 468 Rae Street, North Fitzroy, Victoria 3068 (AU).
- (21) International Application Number: PCT/AU02/00693
(74) Agents: HUGHES, E, John, L et al.; DAVIES COLLISON CAVILL, Level 3, 303 Coronation Drive, Milton, QLD 4064 (AU).
- (22) International Filing Date: 30 May 2002 (30.05.2002)
- (25) Filing Language: English
(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) Publication Language: English
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BE, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) Priority Data: PR 5351 30 May 2001 (30.05.2001) AU
(71) Applicant (for all designated States except US): THE WALTER AND ELIZA HALL INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH [AU/AU]; Royal Parade, Parkville, Victoria 3052 (AU).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): STRASSER, Andreas [AU/AU]; 46 North Street, Ascot Vale, Victoria 3032 (AU). PITHALAKATH, Hansa [AU/AU]; 20 Heatherley Crescent, Keilor East, Victoria 3033 (AU). VILLUNGER, Andreas [AU/AU]; 18 Gellibrand Street, Williamstown, Victoria 3016 (AU). COULTAS, Leigh [AU/AU]; 5/1-3 Canning Street, Brunswick East, Victoria 3087 (AU). BEAUMONT, Jennifer [AU/AU]; 64A Valentine Avenue, Dianella, Western Australia 6059 (AU). O'REILLY, Lorraine, Ann [GB/AU]; 20 Moonda Grove,
- Published:
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



(54) Title: BCL-2-MODIFYING FACTOR (BMF) SEQUENCES AND THEIR USE IN MODULATING APOPTOSIS

(57) Abstract: The present invention relates generally to novel molecules capable of, *inter alia*, modulating apoptosis in mammalian cells and to genetic sequences encoding same. More particularly, the present invention relates to a novel member of the Bcl-2 family of proteins, referred to herein as "Bmf", and to genetic sequences encoding same and to regulatory sequences, such as a promoter sequence directing expression of Bmf. Bmf comprises a BH3 domain which facilitates interaction to pro-survival Bcl-2 family members thereby triggering apoptosis. Bmf is regarded, therefore, as a BH3-only molecule. The molecules of the present invention are useful, for example, in therapy, diagnosis, antibody generation and as a screening tool for therapeutic agents capable of modulating physiological cell death or survival and/or modulating cell cycle entry. The present invention further contemplates genetically modified animals in which one or both alleles of Bmf are mutated or partially or wholly deleted alone or in combination with a mutation in one or both alleles of another Bcl-2-type molecule such as but not limited to Bim. The genetically modified animals are useful *inter alia* in screening for agents which ameliorate the symptoms of diseases caused by defects in apoptosis or which specifically promote apoptosis of target cells.

WO 02/097094 A1

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

NOVEL THERAPEUTIC MOLECULES**FIELD OF THE INVENTION**

5 The present invention relates generally to novel molecules capable of, *inter alia*,
modulating apoptosis in mammalian cells and to genetic sequences encoding same. More
particularly, the present invention relates to a novel member of the Bcl-2 family of
proteins, referred to herein as "Bmf", and to genetic sequences encoding same and to
regulatory sequences such as a promoter sequence directing expression of Bmf. Bmf
10 comprises a BH3 domain which facilitates interaction to pro-survival Bcl-2 family
members thereby triggering apoptosis. Bmf is regarded, therefore, as a BH3-only
molecule. The molecules of the present invention are useful, for example, in therapy,
diagnosis, antibody generation and as a screening tool for therapeutic agents capable of
modulating physiological cell death or survival and/or modulating cell cycle entry. The
15 present invention further contemplates genetically modified animals in which one or both
alleles of Bmf are mutated or partially or wholly deleted alone or in combination with a
mutation in one or both alleles of another Bcl-2-type molecule such as but not limited to
Bim. The genetically modified animals are useful *inter alia* in screening for agents which
ameliorate the symptoms of diseases caused by defects in apoptosis or which specifically
20 promote apoptosis of target cells.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Reference to any prior art in this specification is not, and should not be taken as, an
25 acknowledgment or any form of suggestion that this prior art forms part of the common
general knowledge in any country.

Apoptosis, the physiologic and genetically modulated process of cell death, is of central
importance for modelling tissues and maintaining homeostasis in multicellular organisms
30 (Kerr *et al.*, *Br. J. Cancer* 26: 239-257, 1972; Jacobson *et al.*, *Cell* 88: 347-354, 1997).
Great progress is being made towards understanding the biochemistry underlying this

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 2 -

- intrinsic suicide program. The cellular apoptotic effector molecules include a set of cysteine proteinases, termed caspases, that degrade critical cellular substrates (Nicholson *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* 22: 299-306, 1997). The regulatory machinery that governs the activation of the caspases is less well understood. However, a family of proteins of which
- 5 Bcl-2 is the prototypic molecule (and is referred to as the Bcl-2 family of proteins) plays a central role (Jacobson, *Curr. Biol.* 7: R277-R281, 1997; Reed, *Nature* 387: 773-776, 1997; Kroemer, *Nature Med.* 3: 614-620, 1997; Adams and Cory, *Science* 281: 1322-1326, 1998).
- 10 Bcl-2 was the first intracellular regulator of apoptosis to be identified (Vaux *et al.*, *Nature* 335: 440-442, 1988) and high levels enhance cell survival under diverse cytotoxic conditions. Other cellular homologs, such as Bcl-x_L (Boise *et al.*, *Cell* 74: 597-608, 1993) and Bcl-w (Gibson *et al.*, *Oncogene* 13: 665-675, 1996), also enhance cell survival, as do more distantly related viral homologs, such as the adenovirus E1B 19K protein (White *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 12: 2570-2580, 1992) and Epstein-Barr virus BHRF-1 (Henderson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8479-8483, 1993).
- Pro-apoptotic BH3-only members of the Bcl-2 family are essential for initiation of apoptosis in species as distantly related as mice and *C. elegans* (Huang and Strasser, *Cell* 103: 839,
- 20 2000). EGL-1, the so far only recognized BH3-only protein in *C. elegans*, is required for all developmentally programmed cell deaths in this organism. In contrast, a number of BH3-only proteins have already been identified in mammals: Blk, Bad, Bik, Hrk, Bid, Bim, Noxa and Puma. Experiments with knock-out mice have shown that different apoptotic stimuli require distinct BH3-only proteins for their initiation. (Huang and Strasser, 2000, *supra*).
- 25 For example, Bim is essential for apoptosis induced by cytokine withdrawal or antigen receptor stimulation, but is dispensable for cell death induced by glucocorticoids (Bouillet *et al.*, *Science* 286: 1735, 1999; Bouillet *et al.*, *Nature* 415, 922, 2002). In contrast, Bid is involved in Fas-induced killing of hepatocytes (Yin *et al.*, *Nature* 400: 886, 1999). Moreover, different cell types may require distinct BH3-only proteins for their
- 30 developmentally programmed death. Consistent with this idea, Bim-deficient mice have an abnormal accumulation of lymphoid and myeloid cells but erythropoiesis appears normal

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 3 -

(Bouillet *et al.*, 1999, *supra*). These results indicate that individual mammalian BH3-only proteins have specific functions.

The pro-apoptotic activity of BH3-only proteins is subject to stringent control. In *C. elegans*, EGL-1 is regulated by the transcriptional repressor TRA-1A in a group of neurons that is required for egg-laying (Conradt and Horvitz, *Cell* 93: 519, 1998). Some mammalian BH3-only proteins are also subject to transcriptional regulation. For example, Noxa was discovered as a p53-inducible gene and is therefore a prime candidate for mediating DNA damage-induced apoptosis (Oda *et al.*, *Science* 288: 1053, 2000). Several mammalian BH3-only proteins can also be regulated post-translationally (Huang and Strasser, 2000, *supra*). In growth factor-stimulated cells, Bad is phosphorylated and sequestered away from pro-survival Bcl-2 family members by binding to 14-3-3 scaffold proteins (Zha *et al.*, *Cell* 87: 619, 1996). In healthy cells, Bim is sequestered to the microtubular dynein motor complex by binding to dynein light chain, DLC1/LC8 (Puthalakath *et al.*, *Mol. Cell* 3: 287, 1999). Certain apoptotic stimuli, such as UV-radiation or treatment with taxol, free Bim (still bound to DLC1) and allow it to translocate to, bind and inactivate pro-survival Bcl-2 family members. This process occurs independently of the cell death executioner cysteine proteases (caspases) and therefore constitutes an upstream signalling event in apoptosis (Puthalakath *et al.*, 1999, *supra*). In contrast, the pro-apoptotic activity of Bid is unleashed upon cleavage by a variety of caspases (e.g. caspase-8) or by the serine protease granzyme B (Li *et al.*, *Cell* 94: 491-501, 1998; Luo *et al.*, *Cell* 94: 481-490, 1998), indicating that it functions as part of an amplification mechanism rather than as an initiator of apoptosis. These observations demonstrate that through sequestration to specific sites in the cell, different BH3-only proteins function as sensors for distinct forms of intra-cellular stress.

In work leading to the present invention, the inventors sought novel BH3-only proteins which played a role in embryogenesis. In accordance with the present invention, the inventors cloned "Bmf" (Bcl-2 modifying factor) which was identified through yeast 2-hybrid screening of a day 17 mouse embryonic library using Mcl-1 as bait. Bmf is proposed to induce cell death and act as a "death-ligand" for certain or all members of the pro-survival Bcl-2 family. The identification of this new gene permits the identification

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 4 -

and rational design of a range of products for use in therapy, diagnosis, antibody generation and involving modulation of physiological cell death. These therapeutic molecules may act as either antagonists or agonists of Bmf's function and will be useful in cancer, autoimmune or degenerative disease therapy.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 5 -

SUMMARY OF THE INVENTION

Throughout this specification, unless the context requires otherwise, the word "comprise", or variations such as "comprises" or "comprising", will be understood to imply the
5 inclusion of a stated element or integer or group of elements or integers but not the exclusion of any other element or integer or group of elements or integers.

Nucleotide and amino acid sequences are referred to by a sequence identifier number (SEQ ID NO:). The SEQ ID NOs: correspond numerically to the sequence identifiers <400>1
10 (SEQ ID NO:1), <400>2 (SEQ ID NO:2), etc. A sequence listing is provided after the claims.

Specific mutations in an amino acid sequence are represented herein as " X_1nX_2 " where X_1 is the original amino acid residue before mutation, n is the residue number and X_2 is the
15 mutant amino acid. Reference to X_n is a reference to a particular amino acid in an amino acid sequence where X is the amino acid and n is the residue number. The abbreviation X may be to the three letter or single letter amino acid code.

The present invention is predicated in part on the identification of a novel member of the
20 pro-survival Bcl-2 family. This protein is referred to herein as "Bcl-2 modifying factor" or "Bmf". The protein was identified by yeast 2-hybrid screening of a mouse embryonic library using Mcl-1 as bait. Bmf is an apoptosis-inducing BH3-only protein and is activated by anoikis.

25 Accordingly, one aspect of the present invention provides a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding a polypeptide having one or more of the identifying characteristics of Bmf or a derivative or homolog thereof.

Another aspect of the present invention provides a nucleic acid molecule comprising a
30 nucleotide sequence encoding or complementary to a sequence encoding an amino acid sequence substantially as set forth in one of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 6 -

NO:6 or SEQ ID NO:8 or a derivative or homolog thereof or having at least about 45% or greater similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or a derivative or homolog thereof.

5 Yet another aspect of the present invention contemplates a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence substantially as set forth in one of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 or a derivative or homolog thereof capable of hybridising to one of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 under low stringency conditions and which encodes an amino acid sequence corresponding
10 to an amino acid sequence set forth in one of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or a sequence having at least about 45% similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or 8.

Still yet another aspect of the present invention contemplates a nucleic acid molecule
15 comprising a sequence of nucleotides substantially as set forth in SEQ ID NOS:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7.

Still another aspect of the present invention is directed to an isolated nucleic acid molecule encoding *bmf* or a derivative thereof, said nucleic acid molecule selected from the list
20 consisting of:-

(i) a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding the amino acid sequence set forth in one of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or a derivative or homolog thereof or having at least about 45%
25 similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8;

(ii) a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence substantially as set forth in one of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 or a
30 derivative or homolog thereof;

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 7 -

- 5 (iii) a nucleic acid molecule capable of hybridizing under low stringency conditions to the nucleotide sequence substantially as set forth in one of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 a derivative or homolog and encoding an amino acid sequence corresponding to an amino acid sequence as set forth in one of SEQ ID NO:SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 a derivative or homolog or a sequence having at least about 45% similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8;
- 10 (iv) a nucleic acid molecule capable of hybridizing to the nucleic acid molecule of paragraphs (i) or (ii) or (iii) under low stringency conditions and encoding an amino acid sequence having at least about 45% similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8; and
- 15 (v) a derivative or mammalian homolog of the nucleic acid molecule of paragraphs (i) or (ii) or (iii) or (iv).

A further aspect of the present invention is directed to an isolated polypeptide selected from the list consisting of:-

- 20 (i) a polypeptide having an amino acid sequence substantially as set forth in one of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or derivative or homolog thereof or a sequence having at least about 45% similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8;
- 25 (ii) a polypeptide encoded by a nucleotide sequence substantially as set forth in one of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 or derivative or homolog thereof or a sequence encoding an amino acid sequence having at least about 45% similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8;
- 30

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 8 -

- (iii) a polypeptide encoded by a nucleic acid molecule capable of hybridizing to the nucleotide sequence as set forth in one of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 or derivative or homolog thereof under low stringency conditions and which encodes an amino acid sequence substantially as set forth in
5 SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or derivative or homolog thereof or an amino acid sequence having at least about 45% similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8;
- (iv) a polypeptide as defined in paragraphs (i) or (ii) or (iii) in homodimeric form; and
10
- (v) a polypeptide as defined in paragraphs (i) or (ii) or (iii) in heterodimeric form.

Yet another aspect of the present invention provides a method of producing a genetically modified non-human animal, said method comprising introducing into embryonic stem
15 cells of an animal a genetic construct comprising a *bmf* nucleotide sequence carrying a single or multiple nucleotide substitution, addition and/or deletion or inversion or insertion wherein there is sufficient *bmf* nucleotide sequences to promote homologous recombination with a *bmf* gene within the genome of said embryonic stem cells selecting for said homologous recombination and selecting embryonic stem cells which carry a
20 mutated *bmf* gene and then generating a genetically modified animal from said embryonic stem cell.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 9 -

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURE

Figure 1 is a representation showing Bmf, a novel mammalian BH3-only protein. **(A)** Predicted amino acid sequence of mouse and human Bmf. The nine amino acids that are conserved with the dynein light chain-binding motif of Bim are indicated by a box marked with a single asterisk (*). The short BH3 region, identified by hidden Markov modeling (Krogh *et al.*, *J. Mol. Biol.* 235: 1501, 1994), is indicated by a box marked with two asterisks (**). **(B)** Alignment of the BH3 region of Bmf with other pro-apoptotic Bcl-2 family members. Black boxes indicate identical amino acids and grey boxes indicate similar residues. **(C)** Wild-type Bmf, but not a BH3 mutant, binds pro-survival Bcl-2 and Bcl-w. Co-immunoprecipitation experiments were carried out as previously described (Puthalakath *et al.*, 1999, *supra*). Briefly, 293T cells were transiently co-transfected with expression constructs for FLAG-tagged Bcl-2 (or Bcl-w) and EE(Glu-Glu)-tagged Bmf or L138A mutant Bmf. Cells were metabolically labeled with ³⁵S-methionine 24 hours after transfection and harvested after overnight culture. Volumes of cell lysates with equivalent trichloroacetic acid (TCA)-precipitable ³⁵S counts were used for immunoprecipitations with mAbs to the FLAG or EE epitope tags. **(D)** Interaction of endogenous Bmf with Bcl-2 in MCF-7 cells. Lysates from 10⁷ MCF-7 cells, prepared in lysis buffer containing 1% v/v Triton X-100, were immunoprecipitated either with Bcl-2-100 (anti-human Bcl-2) mAb or an isotype matched control mAb coupled to sepharose. Bound proteins were eluted from the beads by boiling in Laemmli buffer (non reducing), size fractionated on SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose filters. Western blotting was performed with a rat anti-Bmf mAb (9G10). The asterisk (*) indicates the light chain of the mAb used for immunoprecipitation. **(E)** Wild-type Bmf, but not a BH3 mutant, kills L929 fibroblasts. L929 fibroblasts were transfected with empty vector, expression constructs for hygromycin resistance alone, or with wild-type Bmf, a BH3 mutant (L138A) of Bmf or Bmf lacking its BH3 domain. Transfected cells were plated in medium containing hygromycin and resulting drug-resistant colonies counted after 10-14 days. Values are means (+/-SD) of three independent experiments. **(F and G)** Expression of Bmf in cell lines and tissues. For Northern blot analysis (F), 4 µg of poly A⁺ RNA from various cell lines or from mouse embryos (embryonic day 9 to 1-day after birth) were electrophoresed, blotted and probed

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 10 -

with a mouse *bmf* cDNA probe. Probing with a *gapdh* cDNA clone was used as the loading control. For Western blot analysis (G), 50 µg of total protein from various mouse tissues was size-fractionated by SDS-PAGE, electroblotted onto nitrocellulose filters and probed with affinity-purified rabbit polyclonal antibodies to Bmf. Probing with a monoclonal antibody to HSP70 served as the loading control.

Figure 2 is a representation showing Bmf is regulated by interaction with DLC2. **(A)** Expression of *bmf* mRNA in thymocytes treated with various apoptotic stimuli. Total RNA was isolated from thymocytes (freshly isolated) or at the indicated time points after culture in the absence of cytokines or treatment with dexamethasone (1 µM), γ-radiation (10 Gy) or ionomycin (1 µg/mL). These conditions all induce substantial apoptosis and, hence, no RNA could be harvested after 7 hours of treatment. Then 2 µg RNA was reverse transcribed using AMV reverse transcriptase. Five fold dilutions of the cDNA were subjected to PCR analysis using *bmf* specific primers. After transfer of the PCR products, nitrocellulose filters were probed with a ³²P-labeled internal *bmf* oligonucleotide probe. **(B)** Bmf binds to DLC2 through its dynein light chain binding region. Co-immunoprecipitation experiments were performed as described in the legend to Figure 1C, from lysates of 293T cells transiently expressing FLAG-tagged DLC2 and EE-tagged wt Bmf, a BH3 mutant (L138A) of Bmf or DLC binding region mutants of Bmf (A69P or AAA), Bid or Bax. The asterisk (*) indicates the light chain of the mAb used for immunoprecipitation. **(C)** Interaction with DLC2 regulates the pro-apoptotic potency of Bmf. FDC-P1 cells stably expressing Bcl-2 plus EE-tagged wt Bmf, a BH3 mutant (L138A) of Bmf or DLC binding region mutants of Bmf (A69P or AAA) were deprived of IL-3 for 1-6 days. Cell viability was assessed by propidium iodide staining and flow cytometric analysis. Values are means (+/-SD) of three independent experiments done with four independent clones of each genotype.

Figure 3 is a photographic representation showing that Bmf associates with the actin-based myosin V motor complex through DLC2. **(A)** Lysates from 10⁷ MCF-7 cells were separated into P1, P2 and S fractions. Proteins from each fraction were then size-fractionated by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose and probed with mAbs specific to Bmf, Bim1 (O'Reilly *et al.*, *Biotechniques* 25: 824, 1998), myosin V (Espreafico *et al.*, *J. Cell Biol.*

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 11 -

119: 1541, 1992) or dynein intermediate chain IC74 (Sigma). (B) MCF-7 cells were treated for 3 hours with either cytochalasin D (10 μ M) or toxin B (10 ng/mL), then fractionated and processed as described under (A). (C) Characterization of novel mAbs that recognize both DLC1/LC8 and DLC2, or just DLC1/LC8. Extracts from 293T cells transiently expressing

5 FLAG-tagged DLC1 or DLC2 were run on SDS-PAGE gels, electroblotted onto nitrocellulose membranes and probed with rat monoclonal antibodies 11F7 (which recognizes both DLC1 and DLC2) or 10D6 (which recognizes only DLC1). The faint bands of lower molecular weight marked by arrows indicate endogenous DLC1. (D) Myosin V is associated mostly with DLC2 whereas dynein predominantly associates with DLC1/LC8.

10 Cytoplasmic dynein was enriched from MCF-7 cells (Paschal *et al.*, *Methods Enzymol.* 196: 181, 1991) and myosin V was purified from mouse spleen (m) or chicken brain (c) (Cheney, *Methods Enzymol.* 298: 3, 1998). These enriched fractions were analyzed by Western blotting using rat mAbs 11F7 (recognizes DLC1/LC8 and DLC2) or 10D6 (recognizes only DLC1/LC8). Nitrocellulose membranes were probed with antibodies to myosin V or IC74

15 (Sigma) to demonstrate purity of the myosin and dynein motor fractions. (E) Extracts from mouse spleen cells (200 μ g protein) were incubated for 3 hours at 4°C with recombinant GST or GST-tagged FADD, Bmf or Bim_L proteins, and the bound proteins recovered on glutathione sepharose beads. Bound proteins were eluted from the beads by boiling in Laemmli buffer (non-reducing), size-fractionated by SDS-PAGE and electro-blotted onto

20 nitrocellulose membranes, which were probed with an antibody to myosin V (Espreafico *et al.*, 1992, *supra*). The nitrocellulose membrane was stained with amido black (bottom panel) to document that comparable amounts of proteins were used in the pull down experiments. (F) Lysates from 10⁷ MCF-7 cells were fractionated through a 5-20% w/v sucrose gradient. The pellet and soluble fractions were analyzed by Western blotting for the presence of Bmf,

25 Bim, DLC1/LC8 or DLC2.

Figure 4 is a photographic representation showing that Bmf and Bim are released from their sequestration sites in response to distinct apoptotic stimuli. (A) MCF-7 cells were cultured in the presence of the broad-spectrum caspase inhibitor zVAD-fmk (50 μ M).

30 Lysates from control (untreated) cells were compared with those from cells subjected to various apoptotic stimuli, including anoikis (culturing cells for 24 hours in suspension on

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 12 -

poly-hema coated bacterial Petri dishes), UV-irradiation (100 J/m^2), paclitaxel (taxol $1 \mu\text{M}$). Lysates of 10^7 cells were fractionated through sucrose gradients. The pellet and soluble fractions were collected and analyzed by Western blotting for Bmf and Bim using specific monoclonal antibodies. **(B)** During anoikis, Bmf translocates to mitochondria and binds to Bcl-2. Mitochondria were purified as previously described from 2×10^8 healthy MCF-7 cells or cells subjected to anoikis. Mitochondrial proteins were extracted in lysis buffer containing 1% v/v Triton X-100 (Puthalakath *et al.*, 1999, *supra*). Immunoprecipitations were performed with anti-human Bcl-2 mAb (Bcl 2-100) bound to sepharose beads. Bound proteins were eluted by boiling the beads in Laemmli buffer (non-reducing), size-fractionated by SDS-PAGE, electroblotted onto nitrocellulose membranes and probed with mAbs to Bcl-2, Bmf or dynein light chains.

Figure 5A is a diagrammatic representation showing the genomic organization of the *bmf* gene locus of the mouse.

15

Figure 5B is a diagrammatic representation of a *bmf* targeting construct in NEB193neo or NEB193hygro for use in generating knock-out mice.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 13 -

Single and three letter abbreviations used throughout the specification are defined below.

SINGLE AND THREE LETTER AMINO ACID ABBREVIATIONS

AMINO ACID	THREE-LETTER ABBREVIATION	ONE-LETTER SYMBOL
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic acid	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic acid	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V
Any residue	Xaa	X

5

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 14 -

A summary of sequence identifiers is provided below:-

SUMMARY OF SEQUENCE IDENTIFIERS

SEQ ID NO:	DESCRIPTION
1	Nucleotide sequence of mouse <i>bmf</i>
2	Amino acid sequence of mouse Bmf
3	Nucleotide sequence of human <i>bmf</i>
4	Amino acid sequence of human Bmf
5	Nucleotide sequence of BH3 domain of mouse <i>bmf</i>
6	Amino acid sequence of BH3 domain of mouse Bmf
7	Nucleotide sequence of BH3 domain of human <i>bmf</i>
8	Amino acid sequence of BH3 domain of human <i>bmf</i>
9	Nucleotide sequence of mouse <i>bmf</i> promoter
10	Nucleotide sequence of human <i>bmf</i> promoter
11	5' sense primer
12	3' antisense primer
13	internal <i>bmf</i> primer
14	5' sense primer
15	3' antisense primer
16	internal primer
17	predicted amino acid sequence of mouse Bmf
18	predicted amino acid sequence of human Bmf
19	partial amino acid sequence of Bmf
20	partial amino acid sequence of Bim
21	partial amino acid sequence of EGL-1
22	partial amino acid sequence of Bak
23	partial amino acid sequence of Bax
24	partial amino acid sequence of Bid
25	partial amino acid sequence of Bik
26	partial amino acid sequence of Hrk
27	partial amino acid sequence of Bad

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 15 -

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention is predicated in part on the identification of a novel member of the Bcl-2 family of proteins. The protein is called "Bmf" for "Bcl-2 modifying factor". It is
5 proposed that in healthy cells, Bmf is sequestered to the actin-based myosin V motor complex by binding to a dynein light chain and in particular dynein light chain 2 (DLC2). It is further proposed that certain apoptotic stimuli, such as anoikis, release Bmf from the myosin V motor complex allowing it to translocate and bind to Bcl-2. Consequently, Bmf functions as a sensor of intracellular damage by sequestration to motor complexes on
10 distinct cytoskeletal structures.

Accordingly, one aspect of the present invention provides a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding or complementary to a sequence encoding an amino acid sequence substantially as set forth in one of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or
15 SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or a derivative or homolog thereof or having at least about 45% or greater similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or a derivative or homolog thereof.

The term "similarity" as used herein includes exact identity between compared sequences
20 at the nucleotide or amino acid level. Where there is non-identity at the nucleotide level, "similarity" includes differences between sequences which result in different amino acids that are nevertheless related to each other at the structural, functional, biochemical and/or conformational levels. Where there is non-identity at the amino acid level, "similarity" includes amino acids that are nevertheless related to each other at the structural, functional,
25 biochemical and/or conformational levels. In a particularly preferred embodiment, nucleotide and sequence comparisons are made at the level of identity rather than similarity.

Terms used to describe sequence relationships between two or more polynucleotides or
30 polypeptides include "reference sequence", "comparison window", "sequence similarity", "sequence identity", "percentage of sequence similarity", "percentage of sequence

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 16 -

identity", "substantially similar" and "substantial identity". A "reference sequence" is at least 12 but frequently 15 to 18 and often at least 25 or above, such as 30 monomer units, inclusive of nucleotides and amino acid residues, in length. Because two polynucleotides may each comprise (1) a sequence (i.e. only a portion of the complete polynucleotide
5 sequence) that is similar between the two polynucleotides, and (2) a sequence that is divergent between the two polynucleotides, sequence comparisons between two (or more) polynucleotides are typically performed by comparing sequences of the two polynucleotides over a "comparison window" to identify and compare local regions of sequence similarity. A "comparison window" refers to a conceptual segment of typically
10 12 contiguous residues that is compared to a reference sequence. The comparison window may comprise additions or deletions (i.e. gaps) of about 20% or less as compared to the reference sequence (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences. Optimal alignment of sequences for aligning a comparison window may be conducted by computerised implementations of algorithms (GAP, BESTFIT,
15 FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA) or by inspection and the best alignment (i.e. resulting in the highest percentage homology over the comparison window) generated by any of the various methods selected. Reference also may be made to the BLAST family of programs as, for example, disclosed by Altschul *et al.* (*Nucl. Acids. Res.*
20 25: 3389, 1997). A detailed discussion of sequence analysis can be found in Unit 19.3 of Ausubel *et al.* ("Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc., 1994-1998, Chapter 15).

The terms "sequence similarity" and "sequence identity" as used herein refers to the extent
25 that sequences are identical or functionally or structurally similar on a nucleotide-by-nucleotide basis or an amino acid-by-amino acid basis over a window of comparison. Thus, a "percentage of sequence identity", for example, is calculated by comparing two optimally aligned sequences over the window of comparison, determining the number of positions at which the identical nucleic acid base (e.g. A, T, C, G, I) or the identical amino
30 acid residue (e.g. Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys and Met) occurs in both sequences to yield the number of matched

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 17 -

positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the window of comparison (i.e., the window size), and multiplying the result by 100 to yield the percentage of sequence identity. For the purposes of the present invention, "sequence identity" will be understood to mean the "match percentage" calculated by the DNASIS
5 computer program (Version 2.5 for windows; available from Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, USA) using standard defaults as used in the reference manual accompanying the software. Similar comments apply in relation to sequence similarity.

10 Another aspect of the present invention contemplates a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence substantially as set forth in one of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 or a derivative or homolog thereof capable of hybridizing to one of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 under low
15 stringency conditions and which encodes an amino acid sequence corresponding to an amino acid sequence set forth in one of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or a sequence having at least about 45% similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8.

More particularly, the present invention contemplates a nucleic acid molecule comprising a
20 sequence of nucleotides substantially as set forth in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7.

Preferably, the subject nucleic acid molecules encode a polypeptide having the identifying characteristics of Bmf or its homologs or derivatives including functional derivatives.
25

Reference herein to a low stringency includes and encompasses from at least about 0 to at least about 15% v/v formamide and from at least about 1 M to at least about 2 M salt for hybridization, and at least about 1 M to at least about 2 M salt for washing conditions. Generally, low stringency is at from about 25-30°C to about 42°C. The temperature may
30 be altered and higher temperatures used to replace formamide and/or to give alternative stringency conditions. Alternative stringency conditions may be applied where necessary,

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 18 -

such as medium stringency, which includes and encompasses from at least about 16% v/v to at least about 30% v/v formamide and from at least about 0.5 M to at least about 0.9 M salt for hybridization, and at least about 0.5 M to at least about 0.9 M salt for washing conditions, or high stringency, which includes and encompasses from at least about 31% v/v to at least about 50% v/v formamide and from at least about 0.01 M to at least about 0.15 M salt for hybridization, and at least about 0.01 M to at least about 0.15 M salt for washing conditions. In general, washing is carried out $T_m = 69.3 + 0.41 (G+C)\%$ (Marmur and Doty, *J. Mol. Biol.* 5: 109, 1962). However, the T_m of a duplex DNA decreases by 1°C with every increase of 1% in the number of mismatch base pairs (Bonner and Lasky, *Eur. J. Biochem.* 46: 83, 1974). Formamide is optional in these hybridization conditions. Accordingly, particularly preferred levels of stringency are defined as follows: low stringency is 6 x SSC buffer, 0.1% w/v SDS at 25-42°C; a moderate stringency is 2 x SSC buffer, 0.1% w/v SDS at a temperature in the range 20°C to 65°C; high stringency is 0.1 x SSC buffer, 0.1% w/v SDS at a temperature of at least 65°C.

15 The nucleic acid molecule according to this aspect of the present invention corresponds herein to "*bmf*". This gene has been determined in accordance with the present invention to induce apoptosis. The product of the *bmf* gene is referred to herein as "Bmf" without limiting this invention in any way, human *bmf* has been mapped to human chromosome 20 location 15q14. Bmf is known as a "BH3-only" protein since the only Bcl-2 homology region which it contains is BH3. It thereby forms a novel member of a Bcl-2 related BH3-only pro-apoptotic group which also comprises, for example, Bik/Nbk, Bid, Bim and Hrk.

25 The nucleic acid molecule encoding *bmf* is preferably a sequence of deoxyribonucleic acids such as cDNA sequence, an mRNA sequence or a genomic sequence. A genomic sequence may also comprise exons and introns. A genomic sequence may also include a promoter region or other regulatory region. The *bmf* genetic sequence includes splice variants.

30 Reference hereinafter to "Bmf" and "*bmf*" should be understood as a reference to all forms of Bmf and *bmf*, respectively, including, by way of example, polypeptide and cDNA

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 19 -

isoforms of *bmf* which may be identified as arising from alternative splicing of *bmf* mRNA. Reference hereinafter to *Bmf* and *bmf* in the absence of a reference to its derivatives should be understood to include reference to its derivatives thereof including any splice variants.

5

The protein and/or gene is preferably from a human, primate, livestock animal (e.g. sheep, pig, cow, horse, donkey) laboratory test animal (e.g. mouse, rat, rabbit, guinea pig) companion animal (e.g. dog, cat), captive wild animal (e.g. fox, kangaroo, koala, deer), aves (e.g. chicken, geese, duck, emu, ostrich), reptile or fish.

10

Derivatives include fragments (such as peptides), parts, portions, chemical equivalents, mutants, homologs or mimetics from natural, synthetic or recombinant sources including fusion proteins. Derivatives may be derived from insertion, deletion or substitution of amino acids. Amino acid insertional derivatives include amino and/or carboxylic terminal fusions as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acids. Insertional amino acid sequence variants are those in which one or more amino acid residues are introduced into a predetermined site in the protein although random insertion is also possible with suitable screening of the resulting product. Deletional variants are characterized by the removal of one or more amino acids from the sequence. Substitutional amino acid variants are those in which at least one residue in the sequence has been removed and a different residue inserted in its place. Additions to amino acid sequences including fusions with other peptides, polypeptides or proteins. Mutants should be understood to include, but is not limited to, the specific *Bmf* or *bmf* mutant molecules described herein. Derivatives include, for example, peptides derived from the BIF3 region, from the dynein binding region or from a site of phosphorylation. Peptides include, for example, molecules comprising at least 4 contiguous amino acids corresponding to at least 4 contiguous amino acids of *Bmf* as herein defined. Use of the term "polypeptides" herein should be understood to encompass peptides, polypeptides and proteins.

20
25
30

The derivatives of *Bmf* include fragments having particular epitopes or parts of the entire *Bmf* protein fused to peptides, polypeptides or other proteinaceous or non-proteinaceous molecules. For example, *Bmf* or derivative thereof may be fused to a molecule to facilitate its entry into a cell. Analogues of *Bmf* contemplated herein include, but are not limited to,

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 20 -

modification to side chains, incorporating of unnatural amino acids and/or their derivatives during peptide, polypeptide or protein synthesis and the use of crosslinkers and other methods which impose conformational constraints on the proteinaceous molecules or their analogues. Derivatives of nucleic acid sequences may similarly be derived from single or multiple nucleotide substitutions, deletions and/or additions including fusion with other nucleic acid molecules. The derivatives of the nucleic acid molecules of the present invention include oligonucleotides, PCR primers, antisense molecules, molecules suitable for use in co-suppression and fusion of nucleic acid molecules.

- 10 Examples of side chain modifications contemplated by the present invention include modifications of amino groups such as by reductive alkylation by reaction with an aldehyde followed by reduction with NaBH_4 ; amidination with methylacetimidate; acylation with acetic anhydride; carbamylation of amino groups with cyanate; trinitrobenzylation of amino groups with 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS);
- 15 acylation of amino groups with succinic anhydride and tetrahydrophthalic anhydride; and pyridoxylation of lysine with pyridoxal-5-phosphate followed by reduction with NaBH_4 .

The guanidine group of arginine residues may be modified by the formation of heterocyclic condensation products with reagents such as 2,3-butanedione, phenylglyoxal and glyoxal.

The carboxyl group may be modified by carbodiimide activation *via* O-acylisourea formation followed by subsequent derivitisation, for example, to a corresponding amide.

- 25 Sulphydryl groups may be modified by methods such as carboxymethylation with iodoacetic acid or iodoacetamide; performic acid oxidation to cysteic acid; formation of a mixed disulphides with other thiol compounds; reaction with maleimide, maleic anhydride or other substituted maleimide; formation of mercurial derivatives using 4-chloromercuribenzoate, 4-chloromercuriphenylsulphonic acid, phenylmercury chloride, 2-chloromercuri-4-nitrophenol and other mercurials; carbamylation with cyanate at alkaline
- 30 pH.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 21 -

Tryptophan residues may be modified by, for example, oxidation with N-bromosuccinimide or alkylation of the indole ring with 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide or sulphenyl halides. Tyrosine residues on the other hand, may be altered by nitration with tetranitromethane to form a 3-nitrotyrosine derivative.

5

Modification of the imidazole ring of a histidine residue may be accomplished by alkylation with iodoacetic acid derivatives or N-carbethoxylation with diethylpyrocarbonate.

- 10 Examples of incorporating unnatural amino acids and derivatives during peptide synthesis include, but are not limited to, use of norleucine, 4-amino butyric acid, 4-amino-3-hydroxy-5-phenylpentanoic acid, 6-aminohexanoic acid, t-butylglycine, norvaline, phenylglycine, ornithine, sarcosine, 4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid, 2-thienyl alanine and/or D-isomers of amino acids. A list of unnatural amino acid, contemplated
- 15 herein is shown in Table 1.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 22 -

TABLE 1

	Non-conventional amino acid	Code	Non-conventional amino acid	Code
5	α -aminobutyric acid	Abu	L-N-methylalanine	Nmala
	α -amino- α -methylbutyrate	Mgab	L-N-methylarginine	Nmarg
	aminocyclopropane-carboxylate	Cpro	L-N-methylasparagine	Nmasn
			L-N-methylaspartic acid	Nmasp
10	aminoisobutyric acid	Aib	L-N-methylcysteine	Nmcys
	aminonorbornyl-carboxylate	Norb	L-N-methylglutamine	Nmgln
			L-N-methylglutamic acid	Nmglu
	cyclohexylalanine	Chexa	L-N-methylhistidine	Nmbis
	cyclopentylalanine	Cpen	L-N-methylisoleucine	Nmile
15	D-alanine	Dal	L-N-methylleucine	Nmleu
	D-arginine	Darg	L-N-methyllysine	Nmlys
	D-aspartic acid	Dasp	L-N-methylmethionine	Nmmet
	D-cysteine	Dcys	L-N-methylnorleucine	Nmle
	D-glutamine	Dgln	L-N-methylnorvaline	Nmnva
20	D-glutamic acid	Dglu	L-N-methylornithine	Nmorn
	D-histidine	Dhis	L-N-methylphenylalanine	Nmphe
	D-isoleucine	Dile	L-N-methylproline	Nmpro
	D-leucine	Dleu	L-N-methylserine	Nmser
	D-lysine	Dlys	L-N-methylthreonine	Nmthr
25	D-methionine	Dmet	L-N-methyltryptophan	Nmtrp
	D-ornithine	Dorn	L-N-methyltyrosine	Nmtyr
	D-phenylalanine	Dphe	L-N-methylvaline	Nmval
	D-proline	Dpro	L-N-methylethylglycine	Nmetg
	D-serine	Dser	L-N-methyl-t-butylglycine	Nmtbug
30	D-threonine	Dthr	L-norleucine	Nle
	D-tryptophan	Dtrp	L-norvaline	Nva

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 23 -

	D-tyrosine	Dtyr	α -methyl-aminoisobutyrate	Maib
	D-valine	Dval	α -methyl- γ -aminobutyrate	Mgabv
	D- α -methylalanine	Dmala	α -methylcyclohexylalanine	Mchexa
	D- α -methylarginine	Dmarg	α -methylcyclopentylalanine	Mcpen
5	D- α -methylasparagine	Dmasn	α -methyl- α -naphthylalanine	Manap
	D- α -methylaspartate	Dmasp	α -methylpenicillamine	Mpen
	D- α -methylcysteine	Dmcys	N-(4-aminobutyl)glycine	Nglu
	D- α -methylglutamine	Dmglu	N-(2-aminoethyl)glycine	Naeg
	D- α -methylhistidine	Dmhis	N-(3-aminopropyl)glycine	Norn
10	D- α -methylisoleucine	Dmile	N-amino- α -methylbutyrate	Nmaabu
	D- α -methylleucine	Dmleu	α -naphthylalanine	Anap
	D- α -methyllysine	Dmlys	N-benzylglycine	Nphe
	D- α -methylmethionine	Dmmet	N-(2-carbamylethyl)glycine	Nglu
	D- α -methylornithine	Dmorn	N-(carbamylmethyl)glycine	Nasn
15	D- α -methylphenylalanine	Dmphe	N-(2-carboxyethyl)glycine	Nglu
	D- α -methylproline	Dmpro	N-(carboxymethyl)glycine	Nasp
	D- α -methylserine	Dmser	N-cyclobutylglycine	Ncbut
	D- α -methylthreonine	Dmthr	N-cycloheptylglycine	Nchep
	D- α -methyltryptophan	Dmtrp	N-cyclohexylglycine	Nchex
20	D- α -methyltyrosine	Dmty	N-cyclodecylglycine	Ncdec
	D- α -methylvaline	Dmval	N-cyclododecylglycine	Ncdod
	D-N-methylalanine	Dnmala	N-cyclooctylglycine	Ncoct
	D-N-methylarginine	Dnmarg	N-cyclopropylglycine	Ncpro
	D-N-methylasparagine	Dnmasn	N-cycloundecylglycine	Ncund
25	D-N-methylaspartate	Dnmasp	N-(2,2-diphenylethyl)glycine	Nbhm
	D-N-methylcysteine	Dnmcys	N-(3,3-diphenylpropyl)glycine	Nbhe
	D-N-methylglutamine	Dnmglu	N-(3-guanidinopropyl)glycine	Narg
	D-N-methylglutamate	Dnmglu	N-(1-hydroxyethyl)glycine	Nthr
	D-N-methylhistidine	Dnmhis	N-(hydroxyethyl)glycine	Nser
30	D-N-methylisoleucine	Dnmile	N-(imidazolylethyl)glycine	Nhis

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 24 -

	D-N-methylleucine	Dnmleu	N-(3-indolylyethyl)glycine	Nhtrp
	D-N-methyllysine	Dnmlys	N-methyl- γ -aminobutyrate	Nmgabu
	N-methylcyclohexylalanine	Nmchexa	D-N-methylmethionine	Dnmmet
	D-N-methylornithine	Dnmorn	N-methylcyclopentylalanine	Nmopen
5	N-methylglycine	Nala	D-N-methylphenylalanine	Dnmphe
	N-methylaminoisobutyrate	Nmaib	D-N-methylproline	Dnmpro
	N-(1-methylpropyl)glycine	Nile	D-N-methylserine	Dnmser
	N-(2-methylpropyl)glycine	Nleu	D-N-methylthreonine	Dnmthr
	D-N-methyltryptophan	Dnmtrp	N-(1-methylethyl)glycine	Nval
10	D-N-methyltyrosine	Dnmtyr	N-methyl- <i>n</i> -naphthylalanine	Nmanap
	D-N-methylvaline	Dnmval	N-methylpenicillamine	Nmpen
	γ -aminobutyric acid	Gabu	N-(<i>p</i> -hydroxyphenyl)glycine	Nhtyr
	L- <i>t</i> -butylglycine	Tbug	N-(thiomethyl)glycine	Ncys
	L-ethylglycine	Etg	penicillamine	Pen
15	L-homophenylalanine	Hphe	L- α -methylalanine	Mala
	L- α -methylarginine	Marg	L- α -methylasparagine	Masn
	L- α -methylaspartate	Masp	L- α -methyl- <i>t</i> -butylglycine	Mtbug
	L- α -methylcysteine	Mcys	L-methylethylglycine	Metg
	L- α -methylglutamine	Mgln	L- α -methylglutamate	Mglu
20	L- α -methylhistidine	Mhis	L- α -methylhomophenylalanine	Mhphe
	L- α -methylisoleucine	Mile	N-(2-methylthioethyl)glycine	Nimet
	L- α -methylleucine	Mleu	L- α -methyllysine	Mlys
	L- α -methylmethionine	Mmet	L- α -methylnorleucine	Mnle
	L- α -methylnorvaline	Mnva	L- α -methylornithine	Morn
25	L- α -methylphenylalanine	Mphe	L- α -methylproline	Mpro
	L- α -methylserine	Mser	L- α -methylthreonine	Mthr
	L- α -methyltryptophan	Mtrp	L- α -methyltyrosine	Mtyr
	L- α -methylvaline	Mval	L-N-methylhomophenylalanine	Nmbphe
30	N-(N-(2,2-diphenylethyl) carbamylmethyl)glycine	Nnbhm	N-(N-(3,3-diphenylpropyl) carbamylmethyl)glycine	Nnbhe

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 25 -

1-carboxy-1-(2,2-diphenyl-*N*-methylamino)cyclopropane

5 Crosslinkers can be used, for example, to stabilize 3D conformations, using homo-bifunctional crosslinkers such as the bifunctional imido esters having (CH₂)_n spacer groups with n=1 to n=6, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimide esters and hetero-bifunctional reagents which usually contain an amino-reactive moiety such as N-hydroxysuccinimide and another group specific-reactive moiety such as maleimido or dithio moiety (SH) or
10 carbodiimide (COOH). In addition, peptides can be conformationally constrained by, for example, incorporation of C_α and N_α-methylamino acids, introduction of double bonds between C_α and C_β atoms of amino acids and the formation of cyclic peptides or analogues by introducing covalent bonds such as forming an amide bond between the N and C termini, between two side chains or between a side chain and the N or C terminus.

15 The nucleic acid molecule of the present invention is preferably in isolated form or ligated to a vector, such as an expression vector. By "isolated" is meant a nucleic acid molecule having undergone at least one purification step and this is conveniently defined, for example, by a composition comprising at least about 10% subject nucleic acid
20 molecule, preferably at least about 20%, more preferably at least about 30%, still more preferably at least about 40-50%, even still more preferably at least about 60-70%, yet even still more preferably 80-90% or greater of subject nucleic acid molecule relative to other components as determined by molecular weight, encoding activity, nucleotide sequence, base composition or other convenient means. The nucleic acid molecule of the
25 present invention may also be considered, in a preferred embodiment, to be biologically pure.

In a particularly preferred embodiment, the nucleotide sequence corresponding to *bmf* is a cDNA sequence comprising a sequence of nucleotides as set forth in one of SEQ ID NO:1
30 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 or is a derivative or homolog thereof including a nucleotide sequence having similarity to one of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 and which encodes an amino acid sequence

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 26 -

corresponding to an amino acid sequence as set forth in one of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or a sequence having at least about 45% similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8.

- 5 A derivative of the nucleic acid molecule of the present invention also includes nucleic acid molecules capable of hybridizing to the nucleotide sequences as set forth in one of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 under low stringency conditions. Preferably, said low stringency is at 42°C.
- 10 In another embodiment, the present invention is directed to an isolated nucleic acid molecule encoding *bmf* or a derivative thereof, said nucleic acid molecule selected from the list consisting of:-
- 15 (i) a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding the amino acid sequence set forth in one of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or a derivative or homolog thereof or having at least about 45% similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8;
- 20 (ii) a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence substantially as set forth in one of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 or a derivative or homolog thereof;
- 25 (iii) a nucleic acid molecule capable of hybridizing under low stringency conditions to the nucleotide sequence substantially as set forth in one of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 a derivative or homolog and encoding an amino acid sequence corresponding to an amino acid sequence as set forth in one of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or a derivative or homolog or a sequence having at least about 45% similarity to one or
- 30 more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8;

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 27 -

(iv) a nucleic acid molecule capable of hybridizing to the nucleic acid molecule of paragraphs (i) or (iii) under low stringency conditions and encoding an amino acid sequence having at least about 45% similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8; and

5

(v) a derivative or mammalian homolog of the nucleic acid molecule of paragraphs (i) or (ii) or (iii) or (iv).

Reference here to an ability to hybridize to a particular sequence (e.g. SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7) also includes, in the alternative, an ability to hybridize to its complementary form. In other words, nucleic acid molecules are encompassed which hybridize to SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 or their complementary forms.

15 The nucleic acid molecule may be ligated to an expression vector capable of expression in a prokaryotic cell (e.g. *E.coli*) or a eukaryotic cell (e.g. yeast cells, fungal cells, insect cells, mammalian cells or plant cells). The nucleic acid molecule may be ligated or fused or otherwise associated with a nucleic acid molecule encoding another entity such as, for example, a signal peptide, a cytokine or other member of the Bcl-2 family.

20

The present invention extends to the promoter for *bmf* from murine or other mammalian species. Nucleotide sequences comprising the murine and human *bmf* promoters are shown in SEQ ID NO:9 and SEQ ID NO:10, respectively. The present invention extends to mutants and derivatives of these promoters and their use in genetic constructs, gene therapy and in generating genetically modified animals. A mutant or derivative of a promoter includes one which comprises a nucleotide sequence having at least 70% similarity to SEQ ID NOS:9 or 10 or which is capable of hybridizing to SEQ ID NO:9 or SEQ ID NO:10 or their complementary forms under low stringency conditions.

30 The present invention extends to the expression product of the nucleic acid molecule hereinbefore defined.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 28 -

The expression product is Bmf having an amino acid sequence set forth in one of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or is a derivative or homolog thereof as defined above or is a mammalian homolog having an amino acid sequence of at least about 45% similarity to the amino acid sequence set forth in one of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or derivative or homolog thereof.

Another aspect of the present invention is directed to an isolated polypeptide selected from the list consisting of:-

10

(i) a polypeptide having an amino acid sequence substantially as set forth in one of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or derivative or homolog thereof or a sequence having at least about 45% similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8;

15

(ii) a polypeptide encoded by a nucleotide sequence substantially as set forth in one of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 or derivative or homolog thereof or a sequence encoding an amino acid sequence having at least about 45% similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8;

20

(iii) a polypeptide encoded by a nucleic acid molecule capable of hybridizing to the nucleotide sequence as set forth in one of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 or derivative or homolog thereof under low stringency conditions and which encodes an amino acid sequence substantially as set forth in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or derivative or homolog thereof or an amino acid sequence having at least about 45% similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8;

25

30 (iv) a polypeptide as defined in paragraphs (i) or (ii) or (iii) in homodimeric form; and

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 29 -

(v) a polypeptide as defined in paragraphs (i) or (ii) or (iii) in heterodimeric form.

As defined earlier, the present invention extends to peptides or derivatives thereof of Bmf. Preferably, said peptide comprises at least 5 contiguous amino acids of the polypeptide defined in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8. The present invention also extends to nucleic acid molecules encoding the peptides of the present invention.

Another aspect of the present invention provides a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding a polypeptide having one or more of the identifying characteristics of Bmf or a derivative or homolog thereof.

Reference herein to "identifying characteristics" of Bmf includes one or more of the following features:-

15

(i) a polypeptide which induces apoptosis;

(ii) a polypeptide having an amino acid sequence substantially as set forth in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or a derivative or homolog thereof;

20

(iii) a polypeptide having an amino acid sequence of at least 45% similarity to SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8;

25 (iv) a polypeptide as defined in paragraph (ii) or (iii) which induces apoptosis;

(v) a polypeptide encoded by a nucleic acid sequence substantially as set forth in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 or derivative or homolog thereof;

30

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 30 -

- (vi) a polypeptide encoded by a nucleic acid molecule capable of hybridizing to the nucleotide sequence as set forth in one of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 under low stringency conditions;
- 5 (vii) a polypeptide as defined in paragraph (v) or (vi) which induces apoptosis; and
- (viii) a non-apoptosis inducing derivative of the polypeptide defined in paragraphs (i) to (vii).
- 10 The present invention should be understood to extend to the expression product of the nucleic acid molecule according to this aspect of the present invention.

Although not intending to limit the invention to any one theory or mode of action, the BH3 region is responsible for some of the cytotoxic actions of Bmf. The BH3 region forms an amphipathic α -helix that interacts with the elongated hydrophobic cleft formed by the BH1, BH2 and BH3 regions of pro-survival molecules such as, for example, Bcl-x_L. The pro-apoptotic action of Bmf reflects its ability to bind to the anti-apoptotic members of the Bcl-2 family.

15

20 Still without limiting the invention to any one theory or mode of action, the pro-apoptotic activity of Bmf is thought to be regulated both at the transcriptional level and at the post-translational level. Sequence analysis of the non-coding 5' region of *Bmf* has revealed a number of putative binding sites for transcription factors such as AP1. Bmf is proposed to interact *via* a dynein light chain such as DLC2. A dynein light chain is a highly conserved protein which is a component of the myosin V motor complex.

25

The interaction of Bmf with the myosin V motor complex regulates the pro-apoptotic activity of Bmf. Single or multiple amino acid mutations in Bmf which abolish binding to the dynein light chain are encompassed by the present invention.

30

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 31 -

Accordingly, a related aspect of the present invention is directed to a variant of an isolated *bmf* nucleic acid molecule comprising one or more nucleotide mutations in said nucleic acid molecule resulting in at least one amino acid addition, substitution and/or deletion to the polypeptide encoded by said variant wherein said polypeptide cannot bind, couple or otherwise associate with a dynein light chain, such as DLC2.

Preferably, the mutation results in an altered amino acid sequence in the region which binds the dynein light chain. The present invention should be understood to extend to variants of *Bmf* comprising a mutation resulting in an amino acid addition, substitution and/or deletion in a region functionally equivalent to the regions hereinbefore defined.

Accordingly, the present invention is more particularly directed to a variant of an isolated *bmf* nucleic acid molecule comprising one or more nucleotide mutations in said nucleic acid molecule resulting in at least one amino acid addition, substitution and/or deletion in the region of the polypeptide encoded by said variant which binds the dynein light chain wherein said polypeptide cannot bind, couple or otherwise associate with a dynein light chain.

Mutations contemplated by the present invention which occur in combination with one or more mutations in another location are also contemplated by the present invention.

The present invention extends to the expression products of the nucleic acid molecule variants defined according to this aspect of the present invention.

Accordingly, the present invention is directed to a variant of an isolated *Bmf* polypeptide comprising at least one amino acid addition, substitution and/or deletion wherein said polypeptide cannot bind, couple or otherwise associate with the dynein light chain.

The present invention extends to derivatives of the nucleic acid molecules and polypeptides according to this aspect of the present invention. The term "derivatives" should be understood as previously defined.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 32 -

As hereinbefore defined, reference to "Bmf" and "*bmf*" should be understood to include reference to the variant molecules defined according to this aspect of the present invention.

5 The Bmf of the present invention may be in multimeric form meaning that two or more molecules are associated together. Where the same Bmf molecules are associated together, the complex is a homomultimer. An example of a homomultimer is a homodimer. Where at least one Bmf is associated with at least one non-Bmf molecule, then the complex is a heteromultimer such as a heterodimer. A heteromultimer may include a molecule of another member of the Bcl-2 family or other molecule capable of modulating apoptosis.
10 Furthermore, the present invention contemplates fusion, or hybrids or heteromeric dimers between Bmf and other molecules such as Bim.

The present invention contemplates, therefore, a method for modulating expression of *bmf* in a mammal, said method comprising administering to said mammal a modulating
15 effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to up-regulate or down-regulate or otherwise modulate expression of *bmf*. For example, *bmf* antisense sequences such as oligonucleotides may be introduced into a cell to enhance the ability of that cell to survive. Conversely, a nucleic acid molecule encoding Bmf or a derivative thereof may be introduced to decrease the survival capacity of any cell expressing the
20 endogenous *bmf* gene. Modulation of the expression of *bmf* should be understood to extend to modulating transcriptional and translation events such as the splicing pattern of *Bmf* RNA.

Another aspect of the present invention contemplates a method of modulating activity of
25 Bmf in a mammal, said method comprising administering to said mammal a modulating effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to increase or decrease Bmf activity.

Modulation of said activity by the administration of an agent to a mammal can be achieved
30 by one of several techniques, including but in no way limited to introducing into said mammal a proteinaceous or non-proteinaceous molecule which:

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 33 -

- (i) modulates expression of *bmf*;
- (ii) functions as an antagonist of Bmf; and
- 5 (iii) functions as an agonist of Bim.

Said proteinaceous molecule may be derived from natural or recombinant sources including fusion proteins or following, for example, natural product screening. Said non-
10 proteinaceous molecule may be, for example, a nucleic acid molecule or may be derived from natural sources, such as for example natural product screening or may be chemically synthesized. The present invention contemplates chemical analogues of Bmf capable of acting as agonists or antagonists of Bmf. Chemical agonists may not necessarily be derived from Bmf but may share certain conformational similarities. Alternatively, chemical
15 agonists may be specifically designed to mimic certain physiochemical properties of Bmf. Antagonists may be any compound capable of blocking, inhibiting or otherwise preventing Bmf from carrying out its normal or pathological biological functions. Antagonists include, but are not limited to parts of Bmf or peptides thereof, monoclonal antibodies specific for Bmf or parts of Bmf, and antisense nucleic acids or oligonucleotides which prevent
20 transcription or translation of *bmf* genes or mRNA in mammalian cells. Agonists of Bmf and *bmf* include, for example, the derivative or variant molecules or peptides hereinbefore defined which interact with anti-apoptotic molecules such as Bcl-2, to prevent their functional activity thereby promoting apoptosis. Agonists may also include molecules capable of disrupting or preventing binding of Bmf to the dynein light chain or the
25 interaction of dynein light chain with dynein intermediate chain.

Said proteinaceous or non-proteinaceous molecule may act either directly or indirectly to modulate the expression of *bmf* or the activity of Bmf. Said molecule acts directly if it associates with *Bmf* or Bmf to modulate the expression or activity of *bmf* or Bmf. Said
30 molecule acts indirectly if it associates with a molecule other than *bmf* or Bmf which other molecule either directly or indirectly modulates the expression or activity of *bmf* or Bmf.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 34 -

Accordingly, the method of the present invention encompasses the regulation of *bmf* or Bmf expression or activity *via* the induction of a cascade of regulatory steps which lead to the regulation of *bmf* or Bmf expression or activity.

- 5 Increased *bmf* expression or Bmf activity is useful, for example, for treatment or prophylaxis in conditions such as cancer and deletion of autoreactive lymphocytes in autoimmune disease. Decreased *bmf* expression or Bmf activity is useful in regulating inhibition or prevention of cell death or degeneration such as under cytotoxic conditions during, for example, γ -irradiation and chemotherapy or during HIV/AIDS or other viral
- 10 infections, ischaemia or myocardial infarction. Since Bmf is expressed in germ cells, modulating *bmf* expression or Bmf activity is useful, for example, as a contraceptive or method of sterilisation by preventing generation of fertile sperm.

- Another aspect of the present invention contemplates a method of modulating apoptosis in
- 15 a mammal, said method comprising administering to said mammal an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to modulate the expression of a nucleotide sequence encoding *bmf*.

- Yet another aspect of the present invention contemplates a method of modulating apoptosis
- 20 in a mammal, said method comprising administering to said mammal an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to modulate the activity of Bmf.

- Still another aspect of the present invention contemplates a method of modulating apoptosis in a mammal, said method comprising administering to said mammal an
- 25 effective amount of Bmf or *bmf* or derivative thereof.

- The Bmf, *bmf* or derivative thereof or agent used may also be linked to a targeting means such as a monoclonal antibody, which provides specific delivery of the Bmf, *bmf* or agent to the target cells.

30

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 35 -

In a preferred embodiment of the present invention, the Bmf, *bmf* or agent used in the method is linked to an antibody specific for said target cells to enable specific delivery to these cells.

- 5 Modulation of Bmf or *bmf* may be accompanied simultaneously or sequentially with the modulation of other molecules or genes such as but not limited to *bim* or Bim.

Administration of the Bmf, *bmf* or agent, in the form of a pharmaceutical composition, may be performed by any convenient means. Bmf, *bmf* or agent of the pharmaceutical
10 composition are contemplated to exhibit therapeutic activity when administered in an amount which depends on the particular case. The variation depends, for example, on the human or animal and the Bmf, *bmf* or agent chosen. A broad range of doses may be applicable. Considering a patient, for example, from about 0.01 mg to about 10 mg of Bmf or agent may be administered per kilogram of body weight per day. Dosage regimes may
15 be adjusted to provide the optimum therapeutic response. For example, several divided doses may be administered daily, weekly, monthly or other suitable time intervals or the dose may be proportionally reduced as indicated by the exigencies of the situation. The Bmf or agent may be administered in a convenient manner such as by the oral, intravenous (where water soluble), intranasal, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intradermal
20 or suppository routes or implanting (e.g. using slow release molecules). With particular reference to use of Bmf or agent, these peptides may be administered in the form of pharmaceutically acceptable nontoxic salts, such as acid addition salts or metal complexes, e.g. with zinc, iron or the like (which are considered as salts for purposes of this application). Illustrative of such acid addition salts are hydrochloride, hydrobromide,
25 sulphate, phosphate, maleate, acetate, citrate, benzoate, succinate, malate, ascorbate, tartrate and the like. If the active ingredient is to be administered in tablet form, the tablet may contain a binder such as tragacanth, corn starch or gelatin; a disintegrating agent, such as alginate acid; and a lubricant, such as magnesium stearate.

- 30 A further aspect of the present invention relates to the use of the invention in relation to mammalian disease conditions. For example, the present invention is particularly

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 36 -

applicable to, but in no way limited to, use in therapy or prophylaxis in relation to cancer, degenerative diseases, autoimmune disorders, viral infections or for germ cell regulation.

5 Accordingly, another aspect of the present invention relates to a method of treating a mammal, said method comprising administering to said mammal an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to modulate the expression of *bmf* wherein said modulation results in modulation of apoptosis.

10 In another aspect, the present invention relates to a method of treating a mammal, said method comprising administering to said mammal an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to modulate the activity of Bmf wherein said modulation results in modulation of apoptosis.

15 In another aspect, the present invention relates to a method of treating a mammal, said method comprising administering to said mammal an effective amount of Bmf or derivative thereof for a time and under conditions sufficient to modulate apoptosis.

20 Yet another aspect of the present invention relates to a method of treating a mammal, said method comprising administering to said mammal an effective amount of *bmf* or derivative thereof for a time and under conditions sufficient to modulate apoptosis.

25 In yet another aspect, the present invention relates to the use of an agent capable of modulating the expression of *bmf* or derivative thereof in the manufacture of a medicament for the modulation of apoptosis.

Another aspect of the present invention relates to the use of an agent capable of modulating the expression of Bmf or derivative thereof in the manufacture of a medicament for the modulation of apoptosis.

30 A further aspect of the present invention relates to the use of Bmf or *bmf* or derivative thereof in the manufacture of a medicament for the modulation of apoptosis.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 37 -

Still yet another aspect of the present invention relates to agents for use in modulating *bmf* expression wherein modulating expression of said *bmf* modulates apoptosis.

- 5 A further aspect of the present invention relates to agents for use in modulating Bmf expression wherein modulating expression of said Bmf modulates apoptosis.

Another aspect of the present invention relates to Bmf or *bmf* or derivative thereof for use in modulating apoptosis.

10

In a related aspect of the present invention, the mammal undergoing treatment may be human or an animal in need of therapeutic or prophylactic treatment.

- 15 In yet another further aspect, the present invention contemplates a pharmaceutical composition comprising *bmf*, Bmf or derivative thereof or an agent capable of modulating *bmf* expression or Bmf activity together with one or more pharmaceutically acceptable carriers and/or diluents. *bmf*, Bmf or said agent are referred to as the active ingredients.

- The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions
20 (where water soluble) and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dilution medium comprising, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol and liquid polyethylene glycol,
25 and the like), suitable mixtures thereof and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of surfactants. The preventions of the action of microorganisms can be brought about by various anti-bacterial and anti-fungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium
30 chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 38 -

use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminium monostearate and gelatin.

5 Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with the active ingredient and optionally other active ingredients as required, followed by filtered sterilization or other appropriate means of sterilization. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, suitable methods of preparation include vacuum drying and the freeze-drying technique which yield a powder of active ingredient plus any additionally desired
10 ingredient.

When *bmf*, *Bmf* and/or *Bmf* modulators are suitably protected, they may be orally administered, for example, with an inert diluent or with an assimilable edible carrier, or it may be enclosed in hard or soft shell gelatin capsule, or it may be compressed into tablets,
15 or it may be incorporated directly with the food of the diet or administered *via* breast milk. For oral therapeutic administration, the active ingredient may be incorporated with excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tablets, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers and the like. Such compositions and preparations should contain at least 1% by weight of active compound. The percentage of the
20 compositions and preparations may, of course, be varied and may conveniently be between about 5 to about 80% of the weight of the unit. The amount of active compound in such therapeutically useful compositions is such that a suitable dosage will be obtained. Preferred compositions or preparations according to the present invention are prepared so that an oral dosage unit form contains between about 0.1 μg and 200 mg of active
25 compound. Alternative dosage amounts include from about 1 μg to about 1000 mg and from about 10 μg to about 500 mg. These dosages may be per individual or per kg body weight. Administration may be per hour, day, week, month or year.

The tablets, troches, pills, capsules, creams and the like may also contain the components
30 as listed hereafter. A binder such as gum, acacia, corn starch or gelatin; excipients such as dicalcium phosphate; a disintegrating agent such as corn starch, potato starch, alginic acid

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 39 -

and the like; a lubricant such as magnesium stearate; and a sweetening agent such as sucrose, lactose or saccharin may be added or a flavouring agent such as peppermint, oil of wintergreen or cherry flavouring. When the dosage unit form is a capsule, it may contain, in addition to materials of the above type, a liquid carrier. Various other materials may be present as coatings or to otherwise modify the physical form of the dosage unit. For instance, tablets, pills or capsules may be coated with shellac, sugar or both. A syrup or elixir may contain the active compound, sucrose as a sweetening agent, methyl and propylparabens as preservatives, a dye and flavouring such as cherry or orange flavour. Of course, any material used in preparing any dosage unit form should be pharmaceutically pure and substantially non-toxic in the amounts employed. In addition, the active compound(s) may be incorporated into sustained-release preparations and formulations.

Pharmaceutically acceptable carriers and/or diluents include any and all solvents, dispersion media, coatings, anti-bacterial and anti-fungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art and except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, their use in the therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions.

It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the mammalian subjects to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active material calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the novel dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on (a) the unique characteristics of the active material and the particular therapeutic effect to be achieved, and (b) the limitations inherent in the art of compounding such an active material for the treatment of disease in living subjects having a diseased condition in which bodily health is impaired as herein disclosed in detail.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 40 -

The principal active ingredient is compounded for convenient and effective administration in effective amounts with a suitable pharmaceutically acceptable carrier in dosage unit form as hereinbefore disclosed. A unit dosage form can, for example, contain the principal active compound in amounts ranging from 0.5 μg to about 2000 mg. Expressed in
5 proportions, the active compound is generally present in from about 0.5 μg to about 2000 mg/ml of carrier. In the case of compositions containing supplementary active ingredients, the dosages are determined by reference to the usual dose and manner of administration of the said ingredients.

10 The pharmaceutical composition may also comprise genetic molecules such as a vector capable of transfecting target cells where the vector carries a nucleic acid molecule capable of modulating *bmf* expression or Bmf activity. The vector may, for example, be a viral vector.

15 Conditions requiring modulation of physiological cell death include enhancing survival of cells utilising, for example, antisense sequence in patients with neurodegenerative diseases, myocardial infarction, muscular degenerative disease, hypoxia, ischaemia, HIV infection or for prolonging the survival of cells being transplanted for treatment of disease. Alternatively, the molecules of the present invention are useful for, for example, reducing
20 the survival capacity of tumour cells or autoreactive lymphocytes. The antisense sequence may also be used for modifying *in vitro* behaviour of cells, for example, as part of a protocol to develop novel lines from cell types having unidentified growth factor requirements; for facilitating isolation of hybridoma cells producing monoclonal antibodies, as described below; and for enhancing survival of cells from primary explants
25 while they are being genetically modified.

Still another aspect of the present invention is directed to an immunointeractive molecule comprising an antigen binding portion having specificity for Bmf or *bmf* or derivative thereof.

30

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 41 -

Reference to "immunointeractive molecule" should be understood as a reference to any molecule comprising an antigen binding portion or a derivative of said molecule. Examples of molecules contemplated by this aspect of the present invention include, but are not limited to, monoclonal and polyclonal antibodies (including synthetic antibodies, hybrid antibodies, humanized antibodies, catalytic antibodies) and T cell antigen receptor binding molecules. Preferably, said immunoreactive molecule is a monoclonal antibody.

According to this preferred embodiment, there is provided a monoclonal antibody having specificity for Bmf or *bmf* or derivative thereof.

Reference to a molecule "having specificity for Bmf or *bmf*" should be understood as a reference to a molecule, such as a monoclonal antibody, having specificity for any one or more epitopes of Bmf or *bmf*. These epitopes may be conformational epitopes, linear epitopes or a combination of conformational and linear epitopes of either the native Bmf or *bmf* molecule or the denatured molecule.

More preferably, there is provided a monoclonal antibody having specificity for Bmf.

The immunointeractive molecules of the present invention may be naturally occurring, synthetic or recombinantly produced. For example, monoclonal or polyclonal antibodies may be selected from naturally occurring antibodies to Bmf or *bmf* or may be specifically raised to Bmf or *bmf*. In the case of the latter, Bmf or *bmf* may first need to be associated with a carrier molecule. The antibodies and/or recombinant Bmf of the present invention are particularly useful as therapeutic or diagnostic agents. Alternatively, fragments of antibodies may be used such as Fab fragments. Furthermore, the present invention extends to recombinant and synthetic antibodies, to antibody hybrids and to antibodies raised against non-Bmf antigens but which are cross-reactive with any one or more Bmf epitopes. A "synthetic antibody" is considered herein to include fragments and hybrids of antibodies. The antibodies of this aspect of the present invention are particularly useful for immunotherapy and may also be used as a diagnostic tool for assessing apoptosis or monitoring the program of a therapeutic regime.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 42 -

For example, Bmf and *bmf* can be used to screen for naturally occurring antibodies to Bmf and *bmf*, respectively. These may occur, for example in some degenerative disorders.

5 For example, specific antibodies can be used to screen for Bmf proteins. The latter would be important, for example, as a means for screening for levels of Bmf in a cell extract or other biological fluid or purifying Bmf made by recombinant means from culture supernatant fluid. Techniques for the assays contemplated herein are known in the art and include, for example, sandwich assays, ELISA and flow cytometry.

10

It is within the scope of this invention to include any second antibodies (monoclonal, polyclonal or fragments of antibodies) directed to the first mentioned antibodies discussed above. Both the first and second antibodies may be used in detection assays or a first antibody may be used with a commercially available anti-immunoglobulin antibody. An

15 antibody as contemplated herein includes any antibody specific to any region of Bmf.

Both polyclonal and monoclonal antibodies are obtainable by immunization with the protein or peptide derivatives and either type is utilizable for immunoassays. The methods of obtaining both types of sera are well known in the art. Polyclonal sera are less preferred

20 but are relatively easily prepared by injection of a suitable laboratory animal with an effective amount of Bmf, or antigenic parts thereof, collecting serum from the animal, and isolating specific sera by any of the known immunoabsorbent techniques. Although antibodies produced by this method are utilizable in virtually any type of immunoassay, they are generally less favoured because of the potential heterogeneity of the product.

25

The use of monoclonal antibodies in an immunoassay is particularly preferred because of the ability to produce them in large quantities and the homogeneity of the product. The preparation of hybridoma cell lines for monoclonal antibody production derived by fusing an immortal cell line and lymphocytes sensitized against the immunogenic preparation can

30 be done by techniques which are well known to those who are skilled in the art. (See, for example, Douillard and Hoffman, Basic Facts about Hybridomas, in *Compendium of*

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 43 -

Immunology Vol. II, ed. by Schwartz, 1981; Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495-499, 1975; Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology* 6: 511-519, 1976).

- 5 Screening for immunointeractive molecules, such as antibodies, can be a time consuming and labour intensive process. However, the inventors have developed a rapid and efficient flow cytometric screening procedure for the identification of immunointeractive molecules, and in particular antibodies, directed to low abundance cytoplasmic proteins such as, but not limited to, Bmf.
- 10 The method according to this aspect of the present invention is based on the analysis of a population of cells, following the incubation of these cells with the antibody of interest together with or separately to a reporter molecule, said population of cells comprising both cells expressing the protein of interest and cells which do not express the protein of interest. This analysis is preferably flow cytometric analysis and the cells expressing the
- 15 protein of interest are preferably transfected with a nucleic acid molecule encoding the protein of interest to thereby express high levels of said protein. Where the protein is a cytoplasmic protein the cells are permeabilized prior to incubation with the antibody of interest. By screening a population of cells comprising both cells which do not express and cells which do express the protein of interest, determination of which antibodies bind to the
- 20 protein of interest is simplified since where the subject antibody is directed to the protein of interest, a double fluorescence peak is observed. The lower intensity peak represents background staining while the higher fluorescence intensity peak is the result of specific staining. Where the antibody being screened according to this method is not directed to the protein of interest, a single peak of low fluorescence intensity is observed. Antibodies not
- 25 specific to the protein of interest but bound to some unknown epitope present in both populations of cells produces a single peak with high fluorescence intensity. This technique provides a rapid and accurate method of screening for immunointeractive molecules directed to low abundance intracytoplasmic molecules (O'Reilly, 1998, *supra*).
- 30 Accordingly, another aspect of the present invention provides a method of detecting an immunointeractive molecule, in a sample, specific for a protein of interest produced by a

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 44 -

cell, said method comprising contacting the sample to be tested with a population of cells comprising a defined ratio of cells producing the protein of interest and cells not producing the protein of interest for a time and under conditions sufficient for immunointeractive molecules, if present in said sample, to interact with said protein of interest and the
5 subjecting said immunointeractive molecule-protein complex to detecting means.

Preferably said immunointeractive molecule is an antibody.

More preferably, said detecting means comprises an anti-immunoglobulin antibody
10 labelled with a reporter molecule capable of giving a detectable signal. Even more preferably said reporter molecule is fluorochrome.

Reference to "sample" should be understood as a reference to any sample potentially comprising an immunointeractive molecule, such as an antibody. Said immunointeractive
15 molecule may be produced by natural, recombinant or synthetic means.

The method of the present invention is predicated on subjecting the cells incubated with the sample of the present invention to flow cytometric analysis to produce a fluorescent signal wherein a differential fluorescent signal is indicative of antibody binding to the
20 target protein expressed by said cells.

The method exemplified herein is directed, but not limited to, screening for immunointeractive molecules comprising an antigen binding site directed to epitopes of Bmf. The promyelomonocytic cell line FDC-P1 is transfected with a Bcl-2 expression
25 construct and an EE (Glu-Glu) epitope-tagged Bmf construct. A 1:1 ratio of Bcl-2 transfected cells to Bmf transfected cells are fixed, permeabilized and contacted with the immunointeractive molecule of interest, such as a hybridoma supernatant. Visualization of antibodies bound intracellular molecules can be achieved *via* a number of techniques known to those skilled in the art, including, for example, the use of fluorescently labelled
30 reporter molecules. Where the antibody of interest is directed to Bmf, a double

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 45 -

fluorescence peak is observed, the lower intensity peak representing background staining of the Bcl-2 transfected negative control cells.

5 In another aspect of the present invention, the molecules of the present invention are also useful as screening targets for use in applications such as the diagnosis of disorders which are regulated by Bmf. For example, screening for the levels of Bmf or *bmf* in tissue as an indicator of a predisposition to, or the development or, cancer, a degenerative disease or infertility. The screening of this aspect of the present invention may also be directed to detecting mutations in Bmf or *bmf*.

10 Accordingly, another aspect of the present invention contemplates a method for detecting Bmf in a biological sample from a subject, said method comprising contacting said biological sample with an immunointeractive molecule as hereinbefore defined specific for Bmf or its derivatives thereof for a time and under conditions sufficient for an immunointeractive molecule-Bmf complex to form, and then detecting said complex.

15 Preferably said immunointeractive molecule is an antibody. Even more preferably, said antibody is a monoclonal antibody.

20 Reference to biological sample according to this aspect of the present invention should be understood as a reference to any sample comprising tissue from a subject, said "tissue" should be understood in its broadest sense to include biological fluid, biopsy samples or any other form of tissue or fluid or extracts therefrom such as DNA or RNA properties.

25 Still another aspect of the present invention contemplates a method for detecting *bmf* in a biological sample from a subject, said method comprising contacting said biological sample with an immunointeractive molecule as hereinbefore defined specific for *bmf* or its derivatives thereof for a time and under conditions sufficient for an immunointeractive molecule-*bmf* complex to form, and then detecting said complex.

30

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 46 -

Reference to an "immunointeractive" molecule should be understood as a reference to any molecule which couples, binds or otherwise associates with *bmf* or Bmf or derivative thereof. For example, said interactive molecule may be a nucleic acid molecule or an anti-nuclear antibody.

5

The presence of Bmf may be determined in a number of ways such as by Western blotting, ELISA or flow cytometry procedures. *Bmf* mRNA or DNA may be detected, for example, by *in situ* hybridization or Northern blotting or Southern blotting. These, of course, include both single-site and two-site or "sandwich" assays of the non-competitive types, as well as
10 in the traditional competitive binding assays. These assays also include direct binding of a labelled antibody to a target.

Sandwich assays are among the most useful and commonly used assays and are favoured for use in the present invention. A number of variations of the sandwich assay technique
15 exist, and all are intended to be encompassed by the present invention. Briefly, in a typical forward assay, an unlabelled antibody is immobilized on a solid substrate and the sample to be tested brought into contact with the bound molecule. After a suitable period of incubation, for a period of time sufficient to allow formation of an antibody-antigen complex, a second antibody specific to the antigen, labelled with a reporter molecule
20 capable of producing a detectable signal is then added and incubated, allowing time sufficient for the formation of another complex of antibody-antigen-labelled antibody. Any unreacted material is washed away, and the presence of the antigen is determined by observation of a signal produced by the reporter molecule. The results may either be qualitative, by simple observation of the visible signal, or may be quantitated by
25 comparing with a control sample containing known amounts of hapten. Variations on the forward assay include a simultaneous assay, in which both sample and labelled antibody are added simultaneously to the bound antibody. These techniques are well known to those skilled in the art, including any minor variations as will be readily apparent. In accordance with the present invention the sample is one which might contain Bmf including cell
30 extract, tissue biopsy or possibly serum, saliva, mucosal secretions, lymph, tissue fluid and respiratory fluid. The sample is, therefore, generally a biological sample comprising

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 47 -

biological fluid but also extends to fermentation fluid and supernatant fluid such as from a cell culture.

In the typical forward sandwich assay, a first antibody having specificity for the Bmf or antigenic parts thereof, is either covalently or passively bound to a solid surface. The solid surface is typically glass or a polymer, the most commonly used polymers being cellulose, polyacrylamide, nylon, polystyrene, polyvinyl chloride or polypropylene. The solid supports may be in the form of tubes, beads, discs of microplates, or any other surface suitable for conducting an immunoassay. The binding processes are well-known in the art and generally consist of cross-linking covalently binding or physically adsorbing, the polymer-antibody complex is washed in preparation for the test sample. An aliquot of the sample to be tested is then added to the solid phase complex and incubated for a period of time sufficient (e.g. 2-40 minutes or overnight if more convenient) and under suitable conditions (e.g. from room temperature to about 40°C such as 25°C) to allow binding of any subunit present in the antibody. Following the incubation period, the antibody subunit solid phase is washed and dried and incubated with a second antibody specific for a portion of the hapten. The second antibody is linked to a reporter molecule which is used to indicate the binding of the second antibody to the hapten.

An alternative method involves immobilizing the target molecules in the biological sample and then exposing the immobilized target to specific antibody which may or may not be labelled with a reporter molecule. Depending on the amount of target and the strength of the reporter molecule signal, a bound target may be detectable by direct labelling with the antibody. Alternatively, a second labelled antibody, specific to the first antibody is exposed to the target-first antibody complex to form a target-first antibody-second antibody tertiary complex. The complex is detected by the signal emitted by the reporter molecule.

By "reporter molecule" as used in the present specification, is meant a molecule which, by its chemical nature, provides an analytically identifiable signal which allows the detection of antigen-bound antibody. Detection may be either qualitative or quantitative. The most

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 48 -

commonly used reporter molecules in this type of assay are either enzymes, fluorophores or radionuclide containing molecules (i.e. radioisotopes) and chemiluminescent molecules.

In the case of an enzyme immunoassay, an enzyme is conjugated to the second antibody, generally by means of glutaraldehyde or periodate. As will be readily recognized, however, a wide variety of different conjugation techniques exist, which are readily available to the skilled artisan. Commonly used enzymes include horseradish peroxidase, glucose oxidase, β -galactosidase and alkaline phosphatase, amongst others. The substrates to be used with the specific enzymes are generally chosen for the production, upon hydrolysis by the corresponding enzyme, of a detectable color change. Examples of suitable enzymes include alkaline phosphatase and peroxidase. It is also possible to employ fluorogenic substrates, which yield a fluorescent product rather than the chromogenic substrates noted above. In all cases, the enzyme-labelled antibody is added to the first antibody hapten complex, allowed to bind, and then the excess reagent is washed away. A solution containing the appropriate substrate is then added to the complex of antibody-antigen-antibody. The substrate will react with the enzyme linked to the second antibody, giving a qualitative visual signal, which may be further quantitated, usually spectrophotometrically, to give an indication of the amount of hapten which was present in the sample. "Reporter molecule" also extends to use of cell agglutination or inhibition of agglutination such as red blood cells on latex beads, and the like.

Alternately, fluorescent compounds, such as fluorescein and rhodamine, may be chemically coupled to antibodies without altering their binding capacity. When activated by illumination with light of a particular wavelength, the fluorochrome-labelled antibody adsorbs the light energy, inducing a state of excitability in the molecule, followed by emission of the light at a characteristic color visually detectable with a light microscope. As in the EIA, the fluorescent labelled antibody is allowed to bind to the first antibody-hapten complex. After washing off the unbound reagent, the remaining tertiary complex is then exposed to the light of the appropriate wavelength the fluorescence observed indicates the presence of the hapten of interest. Immunofluorescence and EIA techniques are both very well established in the art and are particularly preferred for the present method.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 49 -

However, other reporter molecules, such as radioisotope, chemiluminescent or bioluminescent molecules, may also be employed.

The present invention also contemplates genetic assays such as involving PCR analysis to
5 detect *bmf* or its derivatives.

The present invention further provides genetically modified animals in which one or both alleles of *bmf* are mutated alone or in combination with another mutation in one or both alleles for another *Bcl-2* molecule such as but not limited to genes encoding Blk, Bad, Bik, Hrk, Bid, Bim, Noxa, bcl3 and/or Puma. The animals may also have mutations in other genes or alleles of genes. Preferably, the genetically modified animals are laboratory test animals such as murine species (e.g. mice, rats), rabbits, guinea pigs or hamsters, livestock animals such as sheep, pigs, horses or cows or non-human mammals such as primates. Conveniently, and preferably, the genetically modified animal is a murine species such as a
15 mouse or rat.

The genetic modification is generally in the form of a mutation such as a single or multiple nucleotide substitution, deletion and/or addition or inversion or insertion. Generally, such a genetically modified animal is referred to as a "knock-out" animal.

20 Genetically modified animals and in particular knock-out murine animals may be prepared by any number of means. In one method, a targeting DNA construct is prepared comprising a nucleotide sequence which is sufficiently homologous to a target sequence such as *bmf* or *bim* to permit homologous recombination. The *bmf* or *bim* targeting sequence
25 may be isogenic or non-isogenic to the target *Bmf* or *Bim* sequence. The targeting DNA construct generally comprises a selectable marker within the targeting sequence such that by homologous recombination, the target *bmf* or *bim* gene is disrupted by an insertional mutation. The targeting DNA construct is generally introduced into an embryonic stem cell or embryonic stem cell line. One suitable targeting vector is shown in Figure 5A.

30

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 50 -

As an alternative to using a selectable marker, a mutation may be introduced which induces a phenotypic change which may then be selected or detected.

Accordingly, another aspect of the present invention provides a method of producing a
5 genetically modified non-human animal, said method comprising introducing into
embryonic stem cells of an animal a genetic construct comprising a *bmf* nucleotide
sequence carrying a single or multiple nucleotide substitution, addition and/or deletion or
inversion or insertion wherein there is sufficient *bmf* nucleotide sequences to promote
homologous recombination with a *bmf* gene within the genome of said embryonic stem
10 cells selecting for said homologous recombination and selecting embryonic stem cells
which carry a mutated *bmf* gene and then generating a genetically modified animal from
said embryonic stem cell.

Preferably, the genetically modified animal is a murine species such as a mouse or rat.
15

The *Bmf* nucleotide sequence may be isogenic or non-isogenic to the *bmf* gene in the
embryonic stem cell.

The term "isogenic" means that the *bmf* nucleotide sequence in the construct is derived
20 from the same animal strain from which the embryonic stem cell has been derived.

The present invention further contemplates non-homologous-mediated integration of the
target DNA sequence.

25 A range of selectable markers may be employed and reference may be made to U.S. Patent
No. 5,789,215 for general methodologies.

The above method may be similarly adopted for introducing a plurality of mutations into
different genes such as, in addition to *bmf*, other Bcl-2 genes (e.g. those encoding Bim,
30 Blk, Bad, Bid, Hrk, Noxa or Puma) and/or other structural or regulatory genes.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 51 -

Breeding protocols may also be adopted to introduce mutations or other genetic modifications into *Bmf*. In one approach, an EMS or other mutagenized mouse is crossed with a non-mutagenized mouse to produce a G1 generation. The G1 generation may then be crossed with an index strain to produce G1F1 kindreds which are then screened
5 phenotypically for mutation in *bmf*. Mutations in *bmf* may be dominant or recessive and mutations may be detected directly on *bmf* or by its effect on another gene or on its effect in alleviating the effects of a first mutation on another gene.

All genetically modified animals including knock-out mice carrying mutations in one or
10 both *bmf* alleles alone or in combination with mutations in other genes such as other Bcl-2 family genes are encompassed by the present invention.

The present invention is further described by the following non-limiting Examples.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 52 -

EXAMPLE 1***Identification and cloning of Bmf***

The inventors sought novel BH3-only proteins that played a role in embryogenesis. Since Mcl-1-deficient mice have the most severe developmental defect of all knock-out mice lacking pro-survival Bcl-2 family members, Mcl-1 was used as bait. Bmf (Bcl-2 modifying factor) was identified through yeast 2-hybrid screening of a day 17 mouse embryonic library using Mcl-1 as bait. The method used is as follows.

The cDNA libraries from day 17 mouse embryos or from mouse embryos from embryonic day 9 to one day post-partum were prepared in pAD-GAL4-2.1 (HybriZAP-2.1 kit, Stratagene). The bait vector was made by cloning mouse *mcl-1* lacking the sequences encoding its hydrophobic C-terminus into pGBT-9 (Clontech). Yeast transformation and plasmid rescue were performed as previously described (Puthalakath *et al.*, 1999, *supra*). 7×10^5 clones were screened and one positive clone was obtained. Interaction between Mcl-1 and the novel protein was confirmed by β -galactosidase staining (Puthalakath *et al.*, 1999, *supra*). Sequence analysis revealed that the clone was a partial one lacking the 5' end. This partial clone was used as the probe to isolate full-length clones by screening a cDNA library derived from the p53^{-/-} KO52DA20 thymoma cell line (Strasser *et al.*, *Cell* 79: 329, 1994). Human *bmf* was isolated by screening a human activated T cell cDNA library using mouse *bmf* as probe. To screen for Bmf-interacting proteins, mouse *bmf* was subcloned into a pGBT-9 derivative harboring the gene for chloramphenicol acetyltransferase as the selection marker. Out of 5×10^6 clones screened, 60 positive clones were initially selected, of which 6 were later found to be false positives.

Detailed sequence analysis (Krogh *et al.*, 1994, *supra*) revealed that Bmf harbors a BH3 domain most similar to that found in Bim, Bik and EGL-1 (Figures 1A and B). In the yeast 2-hybrid system, Bmf interacted with Mcl-1 and other pro-survival Bcl-2 proteins (Bcl-2, Bcl-x_L and Bcl-w) but not with the pro-apoptotic family members tested (Bax, Bid and Bad).

When transiently overexpressed in 293T cells, Bmf could be co-immunoprecipitated with pro-survival Bcl-2 family members Bcl-2 and Bcl-w (Figure 1C), as well as Bcl-x_L and Mcl-

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 53 -

- 1, but did not bind pro-apoptotic Bax or the BH3-only protein Bim. The interaction of Bmf with Bcl-2 or Bcl-w was greatly diminished by mutating the invariant leucine (L138A) within its BH3 domain (Figure 1C). Furthermore, mutations of conserved residues within the BH1 (G145E) or BH2 (W188A) domain of Bcl-2, which abolish its binding to Bim
- 5 (O'Connor *et al.*, *EMBO J.* 17: 384, 1998) or Bax (Yin *et al.*, *Nature* 369: 321, 1994), also disrupt its binding to Bmf. Significantly, endogenous Bmf could be co-immunoprecipitated with endogenous Bcl-2 from detergent lysed MCF-7 human breast carcinoma cells (Figure 1D), excluding the possibility that these proteins associate only when overexpressed.
- 10 The biological activity of Bmf was investigated by transiently overexpressing it in Jurkat human T lymphoma cells, as well as in stably transfected L929 mouse fibroblasts (Figure 1E) or in IL-3-dependent FDC-P1 mouse promyelocytic cells (Figure 2C). Expression of Bmf triggered apoptosis in ~80% of Jurkat cells within 24 hours and reduced formation of L929 fibroblast colonies by about 65% (Figure 1E). Bmf-induced apoptosis in Jurkat cells
- 15 could be blocked by the caspase inhibitor baculovirus p35, or by co-expression of Bcl-2 or its homologs (Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1) but not by BH1 (G145E) or BH2 (W188A) domain mutants of Bcl-2. Consistent with its pro-apoptotic activity, high levels of Bmf could be expressed stably in FDC-P1 cells only when Bcl-2 (or one of its homologs) was also expressed. Such Bmf/Bcl-2 co-expressing FDC-P1 cells died more rapidly than Bcl-2
- 20 expressing cells in response to cytokine withdrawal (Figure 2C), γ -irradiation or treatment with etoposide. In all the cell death assays performed, Bmf mutants that lack the BH3 domain or have the L138A mutation in it were inert (Figures 1E and 2C). These results establish that Bmf is a BH3-only protein that binds pro-survival Bcl-2 family members to initiate apoptosis.
- 25

EXAMPLE 2

Expression patterns of Bmf

- The expression pattern of Bmf was investigated by Northern blotting, RT-PCR and
- 30 Western blotting. *bmf* mRNA was found in many cell lines of B and T lymphoid, myeloid or fibroblastoid origin and in mouse embryos at all developmental stages from E9 to birth

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 54 -

(Figure 1F). Western blotting of cell lysates using affinity purified rabbit polyclonal antibodies or rat monoclonal antibodies (described below) detected a single band corresponding to Bmf in many organs, with prominent levels found in pancreas, liver, kidney and hematopoietic tissues (Figure 1G). Thus, Bmf is expressed during embryogenesis and in many adult tissues.

Monoclonal rat antibodies to dynein light chains and Bmf were generated using a previously published protocol (O'Reilly *et al.*, 1998, *supra*). In brief, Wistar rats were immunized with purified recombinant mouse DLC1/LC8 or mouse Bmf. Spleen cells from immunized rats were fused with Sp2/0 myeloma cells. The resulting hybridoma clones were screened for production of specific antibodies by immunofluorescent staining and flow cytometric analyses. Hybridomas were cloned twice and antibodies were purified either on a protein-G column (Amersham Pharmacia) or on a sepharose column conjugated with MAR 18.5 (monoclonal mouse anti-rat Ig κ) antibodies. Monoclonal antibody 11F7 (rat IgG 2a/ κ) recognizes mouse and human DLC1/LC8 and DLC2 whereas 10D6 (rat μ/κ) detects mouse and human DLC1/LC8 but not DLC2. Monoclonal antibodies 9G10 and 12E10 (both rat γ 2a/ κ) detect endogenous mouse and human Bmf by Western blotting and immunoprecipitation. To generate polyclonal anti-Bmf antibodies, New Zealand White rabbits were immunized with 500 μ g of recombinant mouse Bmf. Booster immunisations were given at intervals of three weeks. Serum was collected after 12 days and purified over a sepharose column conjugated with recombinant mouse Bmf protein.

EXAMPLE 3

Apoptotic structure

To assess whether *bmf* expression was induced by apoptotic stimuli, RT-PCR analyses were performed of mRNA from thymocytes exposed to various forms of stress, including cytokine deprivation, γ -irradiation or treatment with dexamethasone or ionomycin (described below). None of these stimuli had any impact on *bmf* expression (Figure 2A), prompting the inventors to investigate whether Bmf is regulated post-translationally, perhaps by interacting with other proteins. A yeast 2-hybrid screen of a mouse embryo

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 55 -

cDNA library with Bmf as bait isolated 14 independent clones of Mcl-1 and, surprisingly, more than 40 clones encoding dynein light chain (DLC). In a previous screen, Bim had isolated exclusively DLC1/LC8 (Puthalakath *et al.*, 1999, *supra*). In contrast, most dynein light chain clones interacting with Bmf encoded the closely related protein DLC2 (Naisbitt *et al.*, *J. Neurosci.* 20: 4524, 2000). Co-immunoprecipitation experiments in transiently transfected 293T cells confirmed the interaction of Bmf with DLC2 (Figure 2B). Sequence comparison revealed that Bmf has, in addition to the BH3 domain, a short region (aa67-DKATQTLSP) that closely resembles one in Bim (aa51-DKSTQIPSP) that mediates its binding to DLC1/LC8 (Figure 1A). This is the DLC-binding motif of Bmf, because mutations within it (A69P or D67K68A69>AAA, hereafter referred to as AAA mutation) abrogated the interaction of Bmf with DLC2 in yeast and in mammalian cells (Figure 2B). Moreover, upon IL-3 deprivation or γ -irradiation, FDC-P1 cells co-expressing Bcl-2 and non-DLC2-binding mutants of Bmf died much more rapidly than those co-expressing Bcl-2 and wild-type Bmf (Figure 2C). These Bmf mutants also suppressed the formation of L929 fibroblast colonies more potently than wild-type Bmf. Hence, interaction with DLC2 negatively regulates the pro-apoptotic activity of Bmf.

RT-PCR analysis of *bmf* mRNA expression was performed using the following primers: 5' (sense) primer 5'CCGGATGGATCACCAGGAATG3' [SEQ ID NO:11], 3' (antisense) primer 5'CAGAGCTGACAAAGGCACAG3' [SEQ ID NO:12]. Detection of the PCR products on Southern blots was performed using the internal *bmf* primer 5'CCACTTCCTGGAGAACATCA3' [SEQ ID NO:13]. For analysis of GAPDH expression, the following primers were used: 5' (sense) primer 5'TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG3' [SEQ ID NO:14], 3' (antisense) primer 5'TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT3' [SEQ ID NO:15] and the internal primer 5'CCCGCATCGAAGGTGGAAGAG3' [SEQ ID NO:16].

- 56 -

EXAMPLE 4
Functional model

5 The question considered by the inventors is why Bmf is controlled by binding to highly related partners, DLC-1 or DLC-2. It is proposed that Bmf is sequestered to sites within the cell in order to sense distinct stress stimuli. Separation of cellular proteins into the filamentous actin and the paclitaxel (taxol)-polymerizable microtubular fractions revealed that, consistent with previous results (Puthalakath *et al.*,1999, *supra*), Bim and dynein intermediate chain (IC74) largely co-migrated with microtubular components (P2), whereas

10 Bmf and myosin V were confined to the filamentous actin-containing P1 fraction (Figure 3A). Furthermore, treating cells with actin depolymerizing agents, such as cytochalasin D or *C. difficile* toxin B, released Bmf from the filamentous actin-containing P1 fraction whereas the fractionation of Bim was unaffected (Figure 3B).

15 For subcellular fractionation, 5×10^6 MCF-7 cells were lysed in 500 μ L extraction buffer containing 1% Triton-X-100. Cell debris and nuclei were removed by centrifugation at 2000 *g*. The supernatant was then incubated for 13 minutes at 37°C with 100 μ M paclitaxel (taxol) and 5 units of apyrase (Sigma). This mixture was then loaded on top of a 0.5 mL cushion of 7.5% sucrose (made in the extraction buffer) and centrifuged at 140,000 *g* for 30

20 minutes at 30°C. The pellet was saved as the microtubular P2 fraction and the supernatant as the S fraction. To obtain the actin-enriched P1 fraction without contamination by microtubular constituents, MCF-7 cells were cultured for 2 hrs in the presence of 2 μ g/mL colchicine and 1 μ g/mL nocodazole prior to lysis. These lysates were then cleared of cell debris and nuclei (described above) and subsequently centrifuged for 60 minutes at 4°C at

25 140,000 *g* to obtain the pellet (P1) fraction. For fractionation of extracts on sucrose gradients, 10^7 cells were lysed in 500 μ L extraction buffer. After removing cellular debris and nuclei, the supernatants were treated with 100 μ M paclitaxel (taxol) plus 5 units of apyrase and incubated at 37°C for 13 minutes before loading onto a 5-20% sucrose gradient (prepared in extraction buffer containing 1% Triton X-100) and centrifuging for 18 hours at

30 15°C at 140,000 *g*.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 57 -

The distinct localization of Bmf and Bim may be determined largely by their preferred dynein light chain partners. Contrary to a previous report (Benashski *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272: 20929, 1997), by using monoclonal antibodies that either recognize only DLC1/LC8 or both DLC1/LC8 and DLC2 (Figure 3C), the inventors showed that purified myosin V motor complexes contained DLC2 but not DLC1/LC8 (Figure 3D). This observation indicated that Bmf, by being preferentially bound to DLC2, might be complexed with myosin V on filamentous actin rather than forming part of the dynein motor complex. Consistent with this notion, incubation of extracts from mouse spleen cells with recombinant Bmf and Bim confirmed that only Bmf associated with myosin V (Figure 3E). Furthermore, Bmf and Bim showed distinct migration patterns after subcellular fractionation of lysates from MCF-7 cells on sucrose gradients (Figure 3F). Since DLC1/LC8 forms homodimers avidly and since it binds Bim and IC74 through the same region (Lo *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276: 14059, 2001), one partner of a DLC1/LC8 homodimer probably interacts with IC74 whilst the other binds Bim, thereby sequestering it to the microtubular dynein motor complex. It is likely that DLC2 homodimers sequester Bmf to filamentous actin by binding with one arm to Bmf and with the other to myosin V.

The inventors next investigated whether Bmf and Bim are activated by distinct apoptotic stimuli using cells that express both proteins endogenously. Consistent with our previous results (Puthalakath *et al.*, 1999, *supra*), UV-irradiation of MCF-7 cells released Bim from the pellet fraction where the dynein motor complex resided. When lysates of healthy or damaged MCF-7 cells were compared by sucrose gradient centrifugation, it became apparent that Bmf also translocated from denser to lighter fractions in response to UV-irradiation (Figure 4A). Treatment with paclitaxel (taxol), a chemotherapeutic drug known to polymerize microtubules, released Bim but not Bmf (Figure 4A). Consistent with a critical role for Bim in this pathway to apoptosis, Bim-deficient thymocytes are abnormally resistant to the cytotoxic effects of paclitaxel (Frisch and Ruoslahti, *Science* 286(5445): 1735-1738, 1999). On the other hand, anoikis (absence of cell attachment and integrin signaling), an apoptotic stimulus that affects the actin cytoskeleton (Frisch and Ruoslahti, 1997, *supra*), resulted in the selective release of Bmf but not Bim (Figure 4A). Since these experiments were conducted in the presence of the broad-spectrum caspase inhibitor zVAD-fmk at a

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 58 -

concentration (50 μ M) sufficient to block caspase activation, the release of Bmf and/or Bim are likely to represent initiating events in apoptosis signaling rather than being a consequence of apoptotic changes. Importantly, the inventors showed that endogenous Bmf (together with DLC2) released during anoikis could be co-immunoprecipitated with endogenous Bcl-2 isolated from mitochondria (Figure 4B). In contrast, negligible Bmf was found complexed with Bcl-2 isolated from mitochondria of healthy cells.

Collectively, the inventors' data demonstrate that Bmf and Bim represent two pro-apoptotic BH3-only proteins that transduce distinct death signals caused by different forms of cell stress. They seem to represent sentinels mounted on the main cytoskeletal structures to monitor the well-being of the cell. For example, disturbance of the microtubules by paclitaxel activates Bim but not Bmf, whereas anoikis, which affects the actin cytoskeleton, activates Bmf but not Bim. Since deregulated expression of anti-apoptotic Bcl-2 can promote tumorigenesis (Strasser *et al.*, *Nature* 348: 331, 1990), it is possible that abnormalities in pro-apoptotic BH3-only proteins can also cause cancer. The gene for human *bmf* is located on chromosome 15q14, identified as the site of a candidate tumor suppressor gene lost in many metastatic but not primary carcinomas (Wick *et al.*, *Oncogene* 12: 973, 1996). Anoikis has been implicated as a barrier against metastatic tumor growth (Ruoslahti and Reed, *Cell* 77: 477, 1994). Metastatic tumors harboring 15q14 mutations may, therefore, have abnormalities in their expression or function of Bmf.

EXAMPLE 5

Generation of Bmf knock-out mice

Mice are selected with a C57BL/6 background which are back crossed into C57BL/6. Offspring are genotyped using PCR using primers specific for wild-type or mutant *bmf* genes.

A *bmf* targeting vector is generated as shown in Figure 5A. A neomycin or hygromycin sequence is used as the selectable marker. The construct is introduced into embryonic stem

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 59 -

cells and transformed cells selected using neomycin or hygromycin. The transformed embryonic stem cells are then used to generate genetically modified mice.

EXAMPLE 6**5 *Genomic organization of Bmf and identification of promoter regions***

The genomic organization of the murine *bmf* gene is shown in Figure 5A. Upstream of this region comprises a promoter region as outlined in SEQ ID NO:9. A corresponding promoter from the human *bmf* gene is outlined in SEQ ID NO:10.

10

Those skilled in the art will appreciate that the invention described herein is susceptible to variations and modifications other than those specifically described. It is to be understood that the invention includes all such variations and modifications. The invention also includes all of the steps, features, compositions and compounds referred to or indicated in
15 this specification, individually or collectively, and any and all combinations of any two or more of said steps or features.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 60 -

CLAIMS

1. A nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding or complementary to a sequence encoding an amino acid sequence substantially as set forth in one of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or a derivative or homolog thereof or having at least about 45% or greater similarity to one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 or a derivative or homolog thereof.
2. The nucleic acid molecule of Claim 1 comprising a nucleotide sequence which encodes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2.
3. The nucleic acid molecule of Claim 1 comprising a nucleotide sequence which encodes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:4.
4. The nucleic acid molecule of Claim 1 comprising a nucleotide sequence which encodes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:6.
5. The nucleic acid molecule of Claim 1 comprising a nucleotide sequence which encodes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:8.
6. The nucleic acid molecule of Claim 1 comprising a nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1 or a nucleotide sequence having at least about 45% similarity thereto or a nucleotide sequence capable of hybridizing to SEQ ID NO:1 or its complementary form under low stringency conditions.
7. The nucleic acid molecule of Claim 1 comprising a nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:3 or a nucleotide sequence having at least about 45% similarity thereto or a nucleotide sequence capable of hybridizing to SEQ ID NO:3 or its complementary form under low stringency conditions.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 61 -

8. The nucleic acid molecule of Claim 1 comprising a nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:5 or a nucleotide sequence having at least about 45% similarity thereto or a nucleotide sequence capable of hybridizing to SEQ ID NO:5 or its complementary form under low stringency conditions.

9. The nucleic acid molecule of Claim 1 comprising a nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:7 or a nucleotide sequence having at least about 45% similarity thereto or a nucleotide sequence capable of hybridizing to SEQ ID NO:7 or its complementary form under low stringency conditions.

10. The nucleic acid molecule of Claim 1 comprising the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1.

11. The nucleic acid molecule of Claim 1 comprising the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:3.

12. The nucleic acid molecule of Claim 1 comprising the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:5.

13. The nucleic acid molecule of Claim 1 comprising the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:7.

14. An isolated protein comprising an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 or a nucleotide sequence having at least about 45% similarity to the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 or a nucleotide sequence capable of hybridizing to SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 or a complement thereof under low stringency conditions.

15. The isolated protein of Claim 14 comprising an amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 62 -

16. The isolated protein of Claim 14 comprising an amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:3.

17. The isolated protein of Claim 14 comprising an amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:5.

18. The isolated protein of Claim 14 comprising an amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:7.

19. The isolated protein of Claim 14 comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or having at least 45% similarity thereto.

20. The isolated protein of Claim 14 comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:4 or having at least 45% similarity thereto.

21. The isolated protein of Claim 14 comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:6 or having at least 45% similarity thereto.

22. The isolated protein of Claim 14 comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:8 or having at least 45% similarity thereto.

23. The isolated protein of Claim 14 having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2.

24. The isolated protein of Claim 14 having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:4.

25. The isolated protein of Claim 14 having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:6.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 63 -

26. The isolated protein of Claim 14 having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:8.

27. A variant of an isolated *bmf* nucleic acid molecule comprising one or more nucleotide mutations in said nucleic acid molecule resulting in at least one amino acid addition, substitution and/or deletion to the polypeptide encoded by said variant wherein said polypeptide cannot bind, couple or otherwise associate with a dynein light chain, such as DLC2.

28. The variant of Claim 28 wherein the mutation results in an altered amino acid sequence in the region which binds to the dynein light chain.

29. A variant of an isolated Bmf polypeptide comprising at least one amino acid addition, substitution and/or deletion wherein said polypeptide cannot bind, couple or otherwise associate with the dynein light chain.

30. A method of modulating activity of Bmf in a mammal, said method comprising administering to said mammal a modulating effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to increase or decrease Bmf activity.

31. A method of modulating apoptosis in a mammal, said method comprising administering to said mammal an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to modulate the expression of a nucleotide sequence encoding *bmf*.

32. A method of modulating apoptosis in a mammal, said method comprising administering to said mammal an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to modulate the activity of Bmf.

33. A method of treating a mammal, said method comprising administering to said mammal an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 64 -

modulate the expression of *bmf* wherein said modulation results in modulation of apoptosis.

34. A method of treating a mammal, said method comprising administering to said mammal an effective amount of an agent for a time and under conditions sufficient to modulate the activity of Bmf wherein said modulation results in modulation of apoptosis.

35. The method of Claim 30 or 31 or 32 or 33 or 34 wherein the mammal is a human.

36. A pharmaceutical composition comprising *bmf*, Bmf or derivative thereof or an agent capable of modulating *bmf* expression or Bmf activity together with one or more pharmaceutically acceptable carriers and/or diluents. *bmf*, Bmf or said agent are referred to as the active ingredients.

37. A monoclonal antibody having specificity for Bmf or *bmf* or derivative thereof.

38. A method of detecting an immunointeractive molecule, in a sample, specific for a protein of interest produced by a cell, said method comprising contacting the sample to be tested with a population of cells comprising a defined ratio of cells producing the protein of interest and cells not producing the protein of interest for a time and under conditions sufficient for immunointeractive molecules, if present in said sample, to interact with said protein of interest and the subjecting said immunointeractive molecule-protein complex to detecting means.

39. The method of Claim 38 wherein the interactive molecule is an antibody.

40. A genetically modified animal in which one or both alleles of *bmf* are mutated alone or in combination with another mutation in one or both alleles for another *Bcl-2* molecule such as but not limited to genes encoding Blk, Bad, Bik, Hrk, Bid, Bim, Noxa and/or Puma.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 65 -

41. The genetically modified animal of Claim 40 wherein said animal is a mouse.
42. The genetically modified animal of Claim 40 wherein said animal is a rat.
43. The genetically modified animal of Claim 40 wherein said animal is a pig.
44. A method of producing a genetically modified non-human animal, said method comprising introducing into embryonic stem cells of an animal a genetic construct comprising a *bmf* nucleotide sequence carrying a single or multiple nucleotide substitution, addition and/or deletion or inversion or insertion wherein there is sufficient *bmf* nucleotide sequences to promote homologous recombination with a *bmf* gene within the genome of said embryonic stem cells selecting for said homologous recombination and selecting embryonic stem cells which carry a mutated *bmf* gene and then generating a genetically modified animal from said embryonic stem cell.
45. The method of Claim 44 wherein the genetically modified animal is a mouse or rat.
46. Use of Bmf in the manufacture of a medicament for the treatment of a condition in a human.
47. Use of Bmf in the manufacture of a medicament for the treatment of a condition in a non-human.

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

1/11

MEPSQCVVEEL EDDV FQEDGEPTQPGSL L SADL FAQSLLDCPL SRLQL FPL THCGGPGLRPMSQEDKATQTLS*
 MEPPQCVVEEL EDDV FQSEDEGPTQPGSL L SADL FAQSLLDCPL SRLQL FPL THCGGPGLRPISQEDKATQTLS*
 A SPSCGVMIL PCGVTEEPQRL FYGNAGYRL PL PASFPANVPIGEPPEGQWVQHQAEVQIARKLQCIADQFHRL
 A SPSCGVMIL PCGVTEEPQRL FYGNAGYRL PL PASFPAGSPLGEPPEGQ F LQHRAEVQIARKLQCIADQFHRL
 HTGQHQQNDRPWWKQVFLFLQNLALNRQENREGVGPW human
 HTGQHQQNDRPWWKQVFLFLQNLALNRQENREGVGPW mouse

Figure 1A

I	A	R	K	L	Q	C	I	A	D	O	F	H	R	L	Bmf
I	A	Q	E	L	R	R	I	G	D	I	F	N	A	Y	Bim
I	G	S	K	L	A	A	C	D	D	F	D	A	Q	EGL-1	
Y	G	R	Q	L	A	I	I	G	D	D	N	R		Bak	
L	S	E	C	L	K	R	I	G	D	E	L	D	S	N	Bax
L	A	L	L	A	C	I	G	D	E	M	D	V	S		Bid
L	A	L	L	A	C	I	G	D	E	M	D	V	S		Bik
T	A	A	R	L	K	A	I	G	D	E	L	H	Q	R	Hrk
Y	G	R	E	L	R	R	M	S	D	E	F	V	D	S	Bad

Figure 1B

2/11

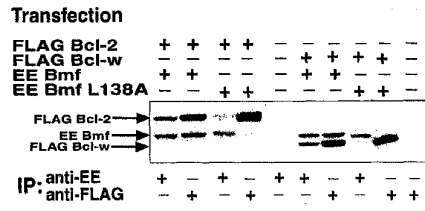


Figure 1C

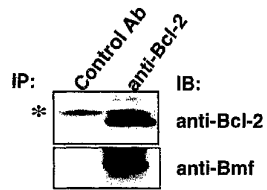


Figure 1D

3/11

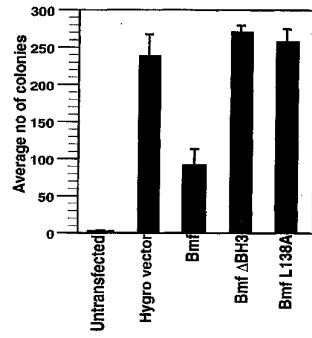
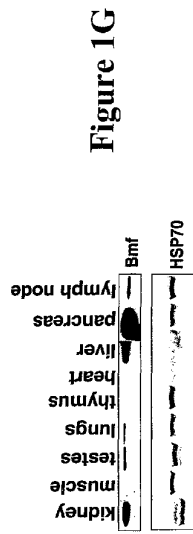
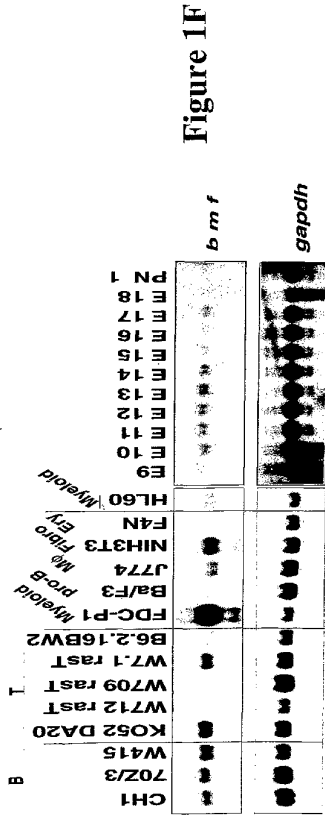


Figure 1E



5/11

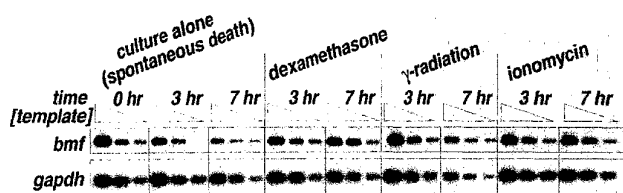


Figure 2A

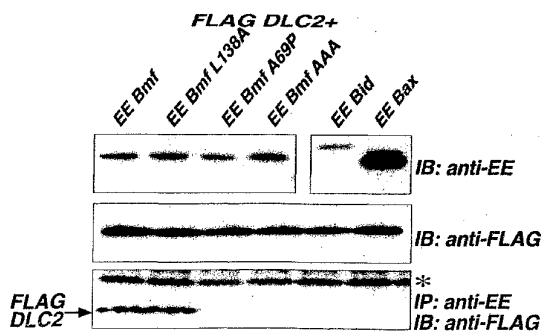


Figure 2B

6/11

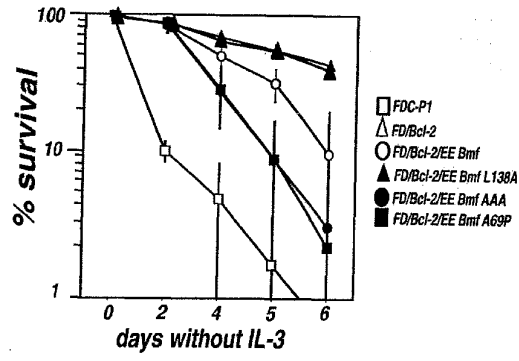


Figure 2C

7/11

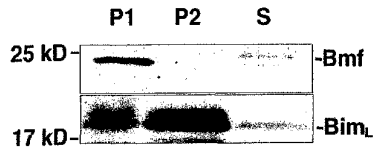


Figure 3A

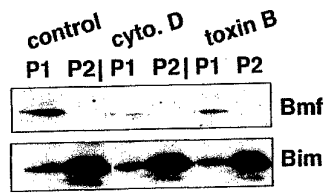


Figure 3B

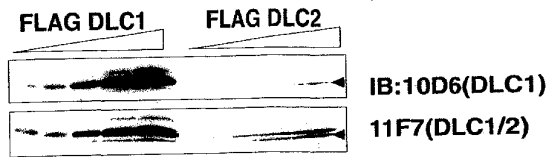


Figure 3C

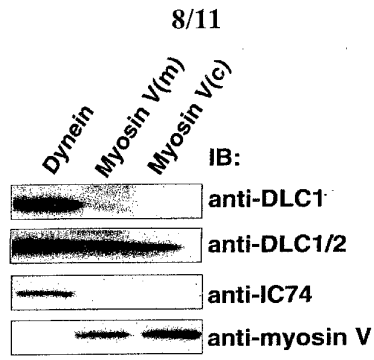


Figure 3E

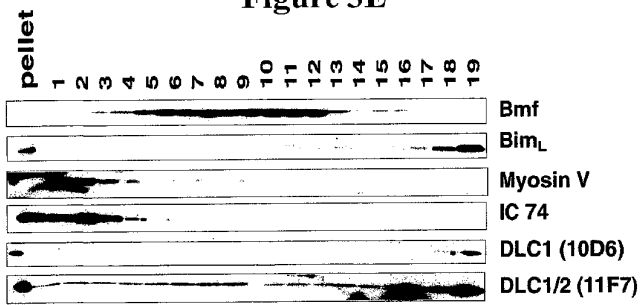


Figure 3D

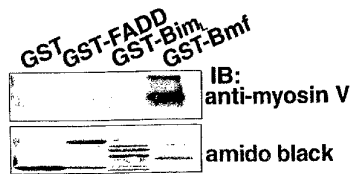


Figure 3F

9/11

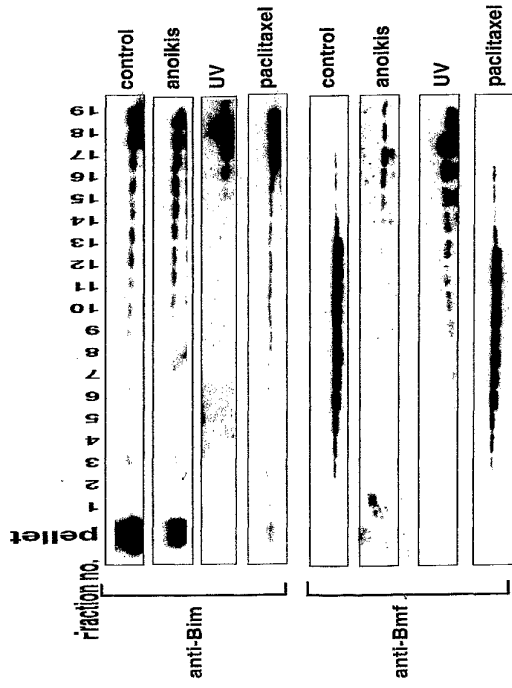


Figure 4A

10/11

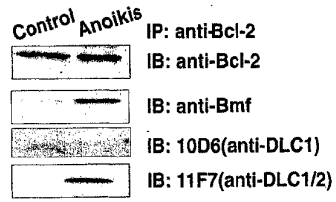


Figure 4B

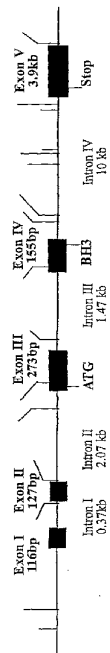


Figure 5A

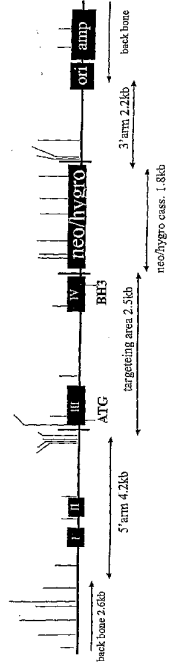


Figure 5B

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 1 -

SEQUENCE LISTING

<110> The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research
 Strasser, Andreas (US only)
 Puthalakath, Hamsa (US only)
 Villunger, Andreas (US only)
 Coultas, Leigh (US only)
 Beaumont, Jennifer (US only)
 O'Reilly, Lorraine (US only)
 Huang, David (US only)

<120> Novel therapeutic molecules

<130> 2529271/EJH

<140> International

<141> 2002-05-30

<150> AU PR5351

<151> 2001-05-30

<160> 27

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 4688

<212> DNA

<213> mouse

<400> 1
 cggcagagc ggagcgggcy tatTTTggaa acaatacgc gcggtgtgcc gtggcctcct 60
 ccgcgccag ctgcgcctg cagcagtcgc tgcgcagcc cgcgccaccg cctccaccg 120
 cagcccgctg gagtttccc ccttcttccc aatcagtggt gggcaccaag cccccgagt 180
 gttcttcacc ctggaccctg cgcagagcc ctggcctcac aactcggagg ctgagacgct 240
 gtccctggagt caccaggag agatggagcc acctcagtg gtggaggagc tagaagatga 300
 tgtgttccag toagaggatg gggagccagc gacacagcct gggggcttgc tctctgctga 360
 cctgtttgcc cagagccagc tggactgtcc cctcagtcga ctccagctct tccctctcac 420
 ccaactgtgt ggtcccgac tccggcccat aagccaggaa gacaaggcca ctccagaccct 480
 cagtcagct tcccagacc aggtgtcat gctgccttgt ggggtgacag aggaacccca 540
 gagactcttt tacggcaacg ctggctacag gttctctctc cctgccagtt tccctgcaag 600
 ctccaccctt ggggagcagc cccctgaag acagttcct cagcaccgag cagaggtgca 660
 gatcgcaga aagcttcagt gtattgcaga ccagttccat cggcttcata cgcaacaaca 720
 ccagcagaac cgagaccgtg cgtggtagca ggtcttctc ttccttcaaa acctgcacct 780

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 2 -

gaacagacaa gaaaacaggg aagggtggg gccctgggga ggcgggaccy cccctggccgg 840
 atggatcacc aggaatgcag tctgggagga cagatactgt ctgtttaagt tttgttatec 900
 gtaactttct atccatgtgt acatattaca tgccccagtg ggatcttctt tcccogttca 960
 gaacctccac tgaggatggg ggcctttgtc aaacactgtt gaaggagagg cagctgtgtc 1020
 tgctggtaga gttcctaagg ctctgaagat gaccagttgg tgatgttctc caggaagtgg 1080
 actgagactt gotaccggag ctggttaagt caggttaggc tccagttacc atcaaacatg 1140
 tcagccctcc ttcgtgctg atggatcatg gctttaacco accagagacc tgtctgggag 1200
 cctcctggct aagatcaact gtgccttggc tagcccgalt caogtctggg tteccaactg 1260
 gcacagccag cgcaccaccg atgggctcag ggattcttac tcagacgctg tcaacttccg 1320
 gaagacctca gggaggtcag gacttotoca agaaccctc aaatttgcca caaatgaaat 1380
 caaactgtag aggttcaag tctgactcgg tctacatgg aagcccttg attggtcccc 1440
 aagggtgcaa actactgcca cctttgctgg agccaagtag ccagtcacca tgcogttgta 1500
 cocagggcc tgtgcctttg tcagctctgt tttcagaaga cccgtccaat gactggaactg 1560
 gatctgtctg catccatctc agcagaagca cttggagatg ggggtggcctt gctggggcgg 1620
 tgggaacca gcagccatcc caetgataag ttggteccgg gggaaatcta gacctcttgg 1680
 tttccttggg aacgtgtacc tctctcccct taccoccat ccttttctgt acctagccgg 1740
 atacaggaag aagctaggac tgaggctttg tcagctgaaa agtyactttg gaagtaacag 1800
 acaatgttta gacctaggaa actgcagagc tgacacatct tgaatctccc tttagctttc 1860
 agctaggcca gaaaggagag ttctagaacc cagcaggacc ttagctgcct gggagctcct 1920
 tcttctctc cccgctgcag tgctcagga gggaaacgaaa agcagctgat cttagaaatt 1980
 aagtcctaag tgttatgtat gtaaggaaag acattgggtc tataatgaa agcagccaaag 2040
 gctcaaaaga agatggttc cctagacaaa gaagaacaca ggattattca aggactttgg 2100
 aggagaaact cagagtagec tcaaatgaa caagcccagt gactcccat tctgcagaag 2160
 tggggggggg gggcggattt cagtaccata aaagggcacc ggatctctg ggtgtccagt 2220
 tgggcagggt tctccctgcc aaggctaccg acagaggggg ctcatagagg ctgaggtcca 2280
 gectgtgccc tgcctcttag cctgcacatc ctgatgtggg cagggctctgc ccagagtaag 2340
 gaatgycttt cctaattygc acaaaggtae tgtgtgcact ctcaagtggtc ctgaggagga 2400
 ccttaaggca tgtgtataag cctttgtgtt tttctgctca gatgacctgg agatattacc 2460
 tcttcttggc cacaatcatt tttctcaggg tctataccat agttcgtctg ctaagaaagt 2520

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 3 -

```

gggtttctgt ttgcaaggag aggggaccca agtaatgaat atgaagactg gttctgaggg 2580
tgggcttgat talttgtgaa gccagcctt cctacatccc accctccctg cagtttagat 2640
gtgtgtggga catatgtggt cttccccttt cctggatcaa ggctatgaca ggcaggcttc 2700
tggtatgtgc ttggtacatg tgctgcaata catgtgcttg atggtacatg cgtgccctc 2760
ccatacaga accctgtact tcagttatct ttaacataac ttagtagact tccatctgt 2820
cctaaggcat gactgtcagc ttcagcaacc ttgctaggty caggctgggt accctgtggc 2880
ctgagaactg agccocagat ttgacctgaa cattgagcct ggaccaggca gaagctggtc 2940
agaatgtact gttccattt tgggccaagc cgggacaaa cttactaact caggcaagcc 3000
agggtgaaac ttaaacctc ttttatctt aacctgaac caggctggag ttgaagctca 3060
atgataaagg gcttgccctg cggtaagag accctcggat ggatccagc actgtaaaaa 3120
aaaaataaat aaaaatagc cccctctct caacctctg gaggcagctg gcagccagc 3180
tcaaggaggc aagaggttc cctggtctg ttgctttaat tggccggta tctctgctg 3240
gtgaattggt tttatagtct ctgagtcag cccctggaca accccycyc ctttgctct 3300
ccagaactcc aggagcttg ctgtctctag tgaagagtgg agattcagat tctgaggag 3360
ggagggaggg tctgacctgt gtggtgacct gtaaccagct gaaggcaaca ggcttttctg 3420
gtgtgctgag gatgggggt gggagaagag ctggaaaact ctgtagaat gccctagagg 3480
aacagaagcc ctgtattcag gggccaact gctctactaa ttcacaatcc ccaggaggca 3540
tttctaaaag ccagtgaaca gatctggaga ggaacatccc ccagtcctg cactgactcc 3600
cccagggaga ctggsgtgg acgcaggaga gtggggggag ggtgggcaact ttgctggcc 3660
ctgtctctct gtttcaaagt ttggctgtgc tgttcaaatg tcccacagg cctgtctctg 3720
ctcaatcaga ggtgaaaaa gatcacctcc cggtagctcc ctccaggccc caggggatgg 3780
gctgtgtcca gagctatgtg gcagagcttg ttccagagc ccagagaggc cccgctggcc 3840
tgcttctctg cccagctggc gaaacgcaag cccaacactg agcatggcag ggagtggtg 3900
ttggggacag tctagccaag gccctgtct gtcccaagct ttccaggaac taagcagtga 3960
ggtaactgtg acagtcctgc ctggtcagcy aggagaatat tctgagcttt cccgctctg 4020
gacttactgg gggggggcg ggtaccagtg tatggagtaa caagacatca gccctctgtg 4080
ctctgcagga tttgggggaa tcagtcagct ggccactgtg gctgctatga agataaggcc 4140
ttttggagac aggtatcct ggctgatac cctggttga cctagaggga tacagggtgg 4200

```

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 4 -

```

agccacagtc atttcaagtt cctgggggtt cctgtgggct gcagacctag gggacagagc 4260
ctcaaggaag acagcagaac aaagctgagc tcttccatat atgccagott tggccaaggt 4320
gctatgaggt ctgtgacccc aggcttgac tgcccctttc tctacagttg tctgatgtcc 4380
accccatctc tgggttcaca gaaactgaca cggggagacc cagcgagatg tagcatttcc 4440
ttcatcccca gctgtggttg cccgggtctt gggcatcctg ccttaaggaa aggaatgggg 4500
accattattt tttaaacctg atataatatt tgaccttttt ttggttcttt atatgtatac 4560
atgtgtaaat atcctctcat ccaatcaagt gtacagtttt taataaacc atttaaagca 4620
aaaaaaaaa aaaaaaactc gagagtactt ctagagcggc cgcgggcccc tcgattttcc 4680
accoggaa 4688

```

```

<210> 2
<211> 185
<212> PRT
<213> mouse

```

```

<400> 2
Met Glu Pro Pro Gln Cys Val Glu Glu Leu Glu Asp Asp Val Phe Gln
1 5 10 15
Ser Glu Asp Gly Glu Pro Gly Thr Gln Pro Gly Gly Leu Leu Ser Ala
20 25 30
Asp Leu Phe Ala Gln Ser Gln Leu Asp Cys Pro Leu Ser Arg Leu Gln
35 40 45
Leu Phe Pro Leu Thr His Cys Cys Gly Pro Gly Leu Arg Pro Ile Ser
50 55 60
Gln Glu Asp Lys Ala Thr Gln Thr Leu Ser Pro Ala Ser Pro Ser Gln
65 70 75 80
Gly Val Met Leu Pro Cys Gly Val Thr Glu Glu Pro Gln Arg Leu Phe
85 90 95
Tyr Gly Asn Ala Gly Tyr Arg Leu Pro Leu Pro Ala Ser Phe Pro Ala
100 105 110
Gly Ser Pro Leu Gly Glu Gln Pro Pro Glu Gly Gln Phe Leu Gln His
115 120 125
Arg Ala Glu Val Gln Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln
130 135 140
Phe His Arg Leu His Thr Gln Gln His Gln Gln Asn Arg Asp Arg Ala
145 150 155 160
Trp Trp Gln Val Phe Leu Phe Leu Gln Asn Leu Ala Leu Asn Arg Gln
165 170 175

```


WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 6 -

gccagctcct gccacetcoca gcagacotca gggagggttg ggtttctcta aggaaccctc 1500
 aaacatgtcg caaaatgaac caaacttctg gctaggccto aaaaactgact tggctcccact 1560
 tggaggcccc aggatgggc ctgaggtaca gagccactgc caccactggo ggctgggac 1620
 cagctgggtg tcagccacgg atgagccgaa tagccagtca gcatgttgct gctggcagcc 1680
 tgtcctttg tcagctcttc ttcaaaaaga cccaccogac agaccgactt ccacccocaa 1740
 catcggcact gaggacatc gggggcaagt ttgcagtggg gccggaaaa atgggtggcca 1800
 cctaccatg agagtcagcc gtaggggacc ccagaccctt tggttcctt ggaaacaaca 1860
 taactcttcc ccttatccc cagtctcttt tcataactag tggatacag aagaagccag 1920
 gacagtggct ttgocagcta agtgaacttt agagtaacag ataacgatta gagtgggaa 1980
 ccgtcaaacg tgggtacaca ttctctatct tcctccagct tccagctagg ccagaagggc 2040
 atgctctgga acccagcagg atcaagctg cctgtgcaag tcttcccttc tctccctgct 2100
 gccgcaacta tggagaggat ctaaacgacg cgggtggcca gctccgatag caggcacagg 2160
 gaactctgta accagacgct agaaactaaa ttataacttt tgcatactgt agaaaagaca 2220
 acattgtgct taacagtgaa gtaaggccca aggaagang gottccctgg acaagaaga 2280
 cctcagggct acccaaggaa ataggaggag tctagagtag actcacaact ctgaacaagc 2340
 ccaagtcttc cagttctgag gagaggaggt cttcagtact attgaaggag acattgatct 2400
 ttggatgta cagtgtgca ggttgttoac tgcacaaggg cactgcagc taatggaggc 2460
 tggaaatcag cttgtgttct gctcactaag ctgtgtgctt gccctggtgt ggggtaactt 2520
 ctccaagaa gaaggggtgc ctttctaalt ttgcaagggt gccataggg ctccagcac 2580
 cctggaggag aagggcctca aactgtgcat gtaagccttt gtttgttct gctcagatat 2640
 tctggatatt acctcttctt ggtcagaalt ctattctcag ggtgtgtacc atgatttgtc 2700
 tgctaaagag aogggttctt gtttttcag agaaggagcc ggggaccagc ttgaagactg 2760
 gctctgggac acactgacca ttgtgaaatt cagccttccc tgtgggtctc cataccattt 2820
 tatgatgtgt atgggacata cgttgttctc cctctctctg atcaaggtgg tgacaggcag 2880
 cctgctgccc tatgcttcag tggcacacac caaaaaaac gggattattt acagcagoc 2940
 ctattcaacc cttttggcag actctccacc ttagttcagt gagagagaaa atgatttaga 3000
 tcttggctgt ggggcaaggc catcagcttc agagaccttg ccaggcccag gctgggtgoc 3060
 ctgtggcctg agaactgagc ccagactttg acaaacccac ctoaacatca agcctggggc 3120
 aggtggaagg tggctcagct gcactgtctc catcttatgc aaagccagga actcactcac 3180

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 7 -

tgtcttaagt gagccagggc aaaatttaca cccctcacgt ttccctctcc cttcttcccc 3240
 accaacaanaa cccagggaggt agctggcaga gtagctgtca ggaaggagaa aggttctttc 3300
 tggctgggtg tttttaattg gcttagtgat ctaaactggc cccctctccc tctgctgggt 3360
 gagttggcct aaacattcct caagtctagc ttccaggagac ctgcccctcc ccccccacct 3420
 ccaccccctc agactccatc ccccacccc aggagcctgg ctgtctctag cgaggggtgg 3480
 agaatacagat ttagagggag ggagagtctg acctggatcc tgacctgtaa ccagctgaag 3540
 acggtggagg ctttctggct tgctgagggt gggggttggg agagggactg gaaacctcc 3600
 tccctgggaa agaaatgctt gggaggaagg gaagcctgat attcagggtc aaaaacgccc 3660
 ttctaattca caaccccaaa gcaagggttt ctagaagttg gtaaacagat ctggtgaggg 3720
 aagtcctcag gccagagcct ggactcctgc aatgagggtg gaggactcag cctggcctct 3780
 gctggcctg tttcaaaagtc tgggccaactg gcagcctctc ctgtctcaat ccgaggtgga 3840
 aaaagatcac cctcccagtg acctcccctc agccccagg ggagtaggtc tgtgtccgaa 3900
 gctatgtggc aggtctgttt gaaggaccca gaggggccc gctgacctgt ctcaactgctc 3960
 ctggcagccc agccccatcg gcaggtggcc cctgcctggg ggttattcgg gacggttcag 4020
 ccagggcctc ccaggaagag tgctgtggag ccacgggtac tgtcctggac agcaaggagc 4080
 atgtacccc agtgagcact tctttttgag ggacttgatg gggagggtgg gtaggcagaa 4140
 gggacgtggc agaagcggga agactttggt caccatggct ctgcagcctc tctgcaaatc 4200
 agtgcctggc tgggcttggg accagttctt gtgtgtgaag gtgaggactc ttggaagcag 4260
 gccatcctgg ccagacaccc gtagcagaag gggctcacct gtcaccctta ggcagcctga 4320
 gggctgtggg ggacttttga gtcttgagg gatagcggaa aaagctgagc tcataggtgc 4380
 ccagccagcc tcccagctaa aggtgctcag agccccctg cccctctctc ctgtgcaggt 4440
 ggcagctgcc cctccctgct ctgggagcat tgctagcctt ctaccaccatc cctggatcca 4500
 caggggctat cggagagacc cagtgagaat gtagcatttt gttcaccctc agggtagctg 4560
 cctggggctc tgggcaactc gccctctggg gagaggaaga agaaaggggc cccatttttt 4620
 aaaaaactgt acagagcctt tggctttatg tgtttatggt cttcacatgc atatgtgtgt 4680
 atgtgtgtat atcttcccc ccataattg gtacaatttt taataaaatc atttaagca 4740
 aaaaaaaaaa aaaaaaactm ragaawamwt cttagcgggc cgggggccc togattttcc 4800
 acccgggttg ggtaccaggt tagtgtacc aattcgccct atagtgagtc gtahtacaat 4860

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 8 -

```

tcactggcgc tggtttaca cgtcgtgact gggaaaacct ggcgttacca acctaatcgc 4920
cttgagcaca tcccccttcg ccagctggcg taatagcga 4959

<210> 4
<211> 183
<212> PRT
<213> human

<400> 4
Glu Pro Ser Gln Cys Val Glu Glu Leu Glu Asp Asp Val Phe Gln Pro
1 5 10 15
Glu Asp Gly Glu Pro Val Thr Gln Pro Gly Ser Leu Leu Ser Ala Asp
20 25 30
Leu Phe Ala Gln Ser Leu Leu Asp Cys Pro Leu Ser Arg Leu Gln Leu
35 40 45
Phe Pro Leu Thr His Cys Cys Gly Pro Gly Leu Arg Pro Thr Ser Gln
50 55 60
Glu Asp Lys Ala Thr Gln Thr Leu Ser Pro Ala Ser Pro Ser Gln Gly
65 70 75 80
Val Met Leu Pro Cys Gly Val Thr Glu Glu Pro Gln Arg Leu Phe Tyr
85 90 95
Gly Asn Ala Gly Tyr Arg Leu Pro Leu Pro Ala Ser Phe Pro Ala Val
100 105 110
Leu Pro Ile Gly Glu Gln Pro Pro Glu Gly Gln Trp Gln His Gln Ala
115 120 125
Glu Val Gln Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln Phe His
130 135 140
Arg Leu His Val Gln Gln His Gln Gln Asn Gln Asn Arg Val Trp Trp
145 150 155 160
Gln Ile Leu Leu Phe Leu His Asn Leu Ala Leu Asn Gly Glu Glu Asn
165 170 175

Arg Asn Gly Ala Gly Pro Arg
180

<210> 5
<211> 54
<212> DNA
<213> mouse

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..(
<223> BH3 domain of mouse bmf

<400> 5

```

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 9 -

```
cagatgcgcc gaaagcttca gtgtattgca gaccagttcc atogggcttca taag      54
<210> 6
<211> 18
<212> PRT
<213> mouse
<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> BH3 domain of mouse bmf
<400> 6
Gln Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln Phe His Arg Leu
1           5           10           15
His Thr
<210> 7
<211> 54
<212> DNA
<213> human
<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> BH3 domain of human bmf
<400> 7
cagattgcgcc gaaagcttca gtgcattgca gaccagttcc acogggcttca tgtg      54
<210> 8
<211> 18
<212> PRT
<213> mouse
<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> BH3 domain of human bmf
<400> 8
Gln Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln Phe His Arg Leu
1           5           10           15
His Val
<210> 9
<211> 2000
<212> DNA
<213> mouse
<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> bmf promoter
```

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 10 -

```

<400> 9
actctgacca gctcagacat gcacttttgg ccaagcctct gggtaaaata atatacctcc 60
tttlggctta gtgoccttttg ctggaaatct atcaatttgg ggggactgtg ctactggcta 120
aocctgactc cocactcttt cccctttccc tctttgtcct ttggagacag tatttttcta 180
ttctagcaac cacagccctc aatattgctg gttcattctg tttcaggtga cttctgaggg 240
agcaaaggaa agaatgatgg gaaaaggta caaggagact tcaggctcta ttgggctgaa 300
ggtccagctc coactgaaact taaatctaag tttaacaacc agagagcagc tcgggtgtca 360
gagcaactgt gagccctact gccctgggtg ggtcagggtt gttgcaggac tggtccctcc 420
tcaactgctct ctggactcat cattttatct ttoctaaaac tcaggcttgg tcaagtcact 480
catctccaat aaaatctttg ctgcctcccc ttataaaat acagattctt cagtctggca 540
ttccagggac acctctgtag tctgacctga accacactgc ccactgcctac cgttctgtaa 600
tctcagtggt cacccaatga tccagtcacc aagcctccct ctgctccctg cacaggtaag 660
ctctccagct cagcaectca gtctgtacc cttaggcctg ggctattctt ttttatttta 720
tttatttttt atttttttga gacggagtct cattgtctgc caggctggag tgcggtggcg 780
ctatctccgc coactgcaac cttoacctcc taggttcaag caattctcct acctcagcct 840
cccaagtagc tgggattaca ggcactgcgc accacgcccg cctgattttt gtatttttag 900
tagagacagg gtttccctg tggccaggc tggctccaa ccactgagct caagtgaacc 960
accgctctog goctcccaaa gtttgggat tacaggcgtg agacatgtgc atctggtttt 1020
ccttaltgaa aaatatttcc cattcaattt aaaagctgic tccttgaggc cttctccagc 1080
ctttgtatc tgaatttttc tgcattcttc aatagtcatt atccttggaa tgaatacaat 1140
tccaataact tttcactatt ttcaggctca cctctcttag tagactgtaa gctccttgag 1200
ggcagacgcc aggtttctgg cactcagccc aatattctgg acagactagg tgcctggtaa 1260
atgocctgta agtagcccat agactccctt acgoggtctg caggacatgc tgcctctctg 1320
gcagcaccag cacagctctc aaatgctgoc atatgcgaga tatgtgtcaa ccgctcaagc 1380
agccccggcc tctctgagcg ctccgcttct cagccagggt cttattttgc cagtgccacc 1440
gcccagtc aaagaggacc taaggctccc cctggatgtg tttgttcaa acacaccttc 1500
agctttggag ctgcagtttt cttoagacct gctgggcagg cgggagggag ctttccctg 1560
aggctgggat cocataggga cccgcacct gcacctgca cccactggac gcaccagcct 1620
cataaaaaa ctccccctc ccttcccc tccctttgtg gacgcgcagc aattattctg 1680

```

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 11 -

```

cccattgcg tgaaaaaaga gacaaaagtt actttggcgc cccctctccc acacctaata 1740
cagaggattc agggactctc tggcgcttcc agagcctgtg ttaggacacg aatccgcact 1800
ggcgacggcg ctccgactgc gcttctggcg acggtcggaa ttttgcctcg ccccttgcaa 1860
tgtrtccatg ggaaggttcc tacattcgtg accgtccctg gcagcggccc agcccgggac 1920
ttggcgcttc actcgccatt ggtcagtcct cggcgtgacg cgcagggggg cggggcctca 1980
tcagctgttt cgggatgcc                                     2000

<210> 10
<211> 1833
<212> DNA
<213> human

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> bmf_promoter

<400> 10
ctagtgtttg gttctcagca cccacatggt ggcacacac catcctaac tccaatttca 60
ggagattcca cccctctcta tagtccctt gggcatcagg cacacacctg gtacacacac 120
atgcatgaag gcaaacacc cacacgaata aagtaaaat aaatatatct aaaaacaatt 180
aaaaaagaaa aacagaaaga aagaaccaa agtaataaa taaaatttt aaaacaaaaa 240
atagccaaag acaattgagt ctgggagccc cagatccagc cagcttgtat cttagagcag 300
actgtaagta gagactgtaa ctaagcccag ctctctgct ttgcccgtgt ctctattgca 360
gctcatttag gttgtggcag ggcctctgtt ctttctactga tttctgcctc cccactcagt 420
ttccccaaa attcatcttc tgtaaaatct ttgctaccag tctctataa agtaattcct 480
tggggctgaa gagatggctc aagtgggtaa aagcactggg tgctctcca gaggaaccag 540
gttcaattcc aagaactcac acggcagttc atagctgtct gtaactctgg ttccggatga 600
cacgctgtca caaagacata catacaggcg aaacactaac gcacataaaa taaaaattaa 660
caaattactt ttaaaaaata cagactcctc agcctgggat tccagggggc acctctgcaa 720
tctgacctga atctactcgc ccataccctc acatctaaa tcatagttaa gatgccagag 780
agcttgatgg gggggagggg ggaagggggg ggcgtgagc tgatcttctt ttccagacat 840
gttaagtact ttattctagc tccctgacct ctctgggtca ggaactgttt atttggttt 900
tatttagtga aatattcccc attctcaag gcccgactca aaaaactttg cttattatcc 960
ctaaaaatagc accattcaag ctggtttcaa tcattcacat gtgaagtatc ggttcattga 1020

```

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 12 -

```

ggtcaggcac cagaagtcta gcacttagac caggacotgg cacatagtag gtgttcaaaa 1080
aaatgtggag toatccttag attggccata gtacacgaga tgcgttttgc tttcttagca 1140
gtccaagaac agccttctgc tgcctccata gatagggtgc tccgagctac ccctttgatt 1200
tcccctctgc tagagtcctt ttttcaacag tgatcttcca cagtctagaa gagaggacat 1260
ggcctttctt ttgcacttga tggatccgaa tgcatttgg ttctagatgc agacacacgt 1320
gttctctccc agcttctctc agacacgccc aacaggaaag agggcagttt tttgttttgg 1380
ttttttattt gttttgcttt ttttttatta gggaccagca gctcggtttt ttttttttcc 1440
cgctatatac tacaagcgcg gctctgaaaa tcccagctcc ctctgagccc ggctttttgg 1500
aagtcctgca ataactcagc ccatttccaa gtacacaaaa gtoacttagg cgtcttctcc 1560
cccactacc tagtagaaaa cctagggact ctctgtcgtt tctggggctt gcattaggaa 1620
ccgaatctcc accctctaca gcctccaat tgcgcttctg acggaggtca gaaatgcgcc 1680
cggcccctta taatgtttcc aagggaaggt ttgtacattg gtgattgtcc ctggcagctg 1740
cccagttgga gacttgacc tccacttccc attggtcagt gtttggagtg acgcaaaagag 1800
gggcggggcc toatcagctg tttcgggat gcc 1833

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> 5' sense primer

<400> 11
ccggatggat caccaggaat g 21

<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> 3' antisense primer

<400> 12.
cagagctgac aaaggcaag 19

<210> 13
<211> 20
<212> DNA

```

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 13 -

```

<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> internal bmf primer
<400> 13
ccacttcctg gagaacatca                20
<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> 5' sense primer
<400> 14
tgatgacatc aagaaggtagg tgaag        25
<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> 3' antisense primer
<400> 15
tccttgaggg ccatgtaggc cat           23
<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> internal primer
<400> 16
cccggcatcg aaggtggaag ag           22
<210> 17
<211> 185
<212> PRT
<213> mouse
<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()

```

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 14 -

```

<223> predicted amino acid sequence of mouse Bmf

<400> 17
Met Glu Pro Pro Gln Cys Val Glu Glu Leu Glu Asp Asp Val Phe Gln
1      5      10      15

Ser Glu Asp Gly Glu Pro Gly Thr Gln Pro Gly Gly Leu Leu Ser Ala
20     25     30

Asp Leu Phe Ala Gln Ser Gln Leu Asp Cys Pro Leu Ser Arg Leu Gln
35     40     45

Leu Phe Pro Leu Thr His Cys Cys Gly Pro Gly Leu Arg Pro Ile Ser
50     55     60

Gln Glu Asp Lys Ala Thr Gln Thr Leu Ser Pro Ala Ser Pro Ser Gln
65     70     75     80

Gly Val Met Leu Pro Cys Gly Val Thr Glu Glu Pro Gln Arg Leu Phe
85     90     95

Tyr Gly Asn Ala Gly Tyr Arg Leu Pro Leu Pro Ala Ser Phe Pro Ala
100    105    110

Gly Ser Pro Leu Gly Glu Gln Pro Pro Glu Gly Gln Phe Leu Gln His
115    120    125

Arg Ala Glu Val Gln Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln
130    135    140

Phe His Arg Leu His Thr Gln Gln His Gln Gln Asn Arg Asp Arg Ala
145    150    155    160

Trp Trp Gln Val Phe Leu Phe Leu Gln Asn Leu Ala Leu Asn Arg Gln
165    170    175

Glu Asn Arg Glu Gly Val Gly Pro Trp
180    185

<210> 18
<211> 184
<212> PRT
<213> human

<220>
<221> misc_feature
<222> {}..{}
<223> predicted amino acid sequence of human Bmf

<400> 18
Met Glu Pro Ser Gln Cys Val Glu Glu Leu Glu Asp Asp Val Phe Gln
1      5      10      15

Pro Glu Asp Gly Glu Pro Val Thr Gln Pro Gly Ser Leu Leu Ser Ala
20     25     30

Asp Leu Phe Ala Gln Ser Leu Leu Asp Cys Pro Leu Ser Arg Leu Gln

```

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 15 -

```

          35          40          45
Leu Phe Pro Leu Thr His Cys Cys Gly Pro Gly Leu Arg Pro Thr Ser
 50                    55                    60
Gln Glu Asp Lys Ala Thr Gln Thr Leu Ser Pro Ala Ser Pro Ser Gln
 65          70          75          80
Gly Val Met Leu Pro Cys Gly Val Thr Glu Glu Pro Gln Arg Leu Phe
          85          90          95
Tyr Gly Asn Ala Gly Tyr Arg Leu Pro Leu Pro Ala Ser Phe Pro Ala
 100         105         110
Val Leu Pro Ile Gly Glu Gln Pro Pro Glu Gly Gln Trp Gln His Gln
 115         120         125
Ala Glu Val Gln Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln Phe
 130         135         140
His Arg Leu His Val Gln Gln His Gln Gln Asn Gln Asn Arg Val Trp
 145         150         155         160
Trp Gln Ile Leu Leu Phe Leu His Asn Leu Ala Leu Asn Gly Glu Glu
 165         170         175
Asn Arg Asn Gly Ala Gly Pro Arg
 180

```

```

<210> 19
<211> 15
<212> PFT
<213> mouse/human

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (..)
<223> partial amino acid sequence of Bmf

```

```

<400> 19
Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln Phe His Arg Leu
 1          5          10          15

```

```

<210> 20
<211> 15
<212> PFT
<213> mouse/human

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (..)
<223> partial amino acid sequence of Bim

```

```

<400> 20
Ile Ala Gln Glu Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Phe Asn Ala Tyr
 1          5          10          15

```

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 16 -

```
<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> mouse/human

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> partial amino acid sequence of EGL-1

<400> 21
Ile Gly Ser Lys Leu Ala Ala Met Cys Asp Asp Phe Asp Ala Gln
1          5          10          15

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> mouse/human

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> partial amino acid sequence of Bak

<400> 22
Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn Arg Arg
1          5          10          15

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> mouse/human

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> partial amino acid sequence of Bax

<400> 23
Leu Ser Glu Cys Leu Lys Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser Asn
1          5          10          15

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> mouse/human

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> partial amino acid sequence of Bid

<400> 24
Leu Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly Asp Glu Met Asp Val Ser
1          5          10          15

<210> 25
```

WO 02/097094

PCT/AU02/00693

- 17 -

<211> 15
<212> PRT
<213> mouse/human

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> partial amino acid sequence of Bik

<400> 25
Leu Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly Asp Glu Met Asp Val Ser
1 5 10 15

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> mouse/human

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> partial amino acid sequence of Hrk

<400> 26
Thr Ala Ala Arg Leu Lys Ala Leu Gly Asp Glu Leu His Gln Arg
1 5 10 15

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> mouse/human

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> partial amino acid sequence of Bad

<400> 27
Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Val Asp Ser
1 5 10 15

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/00693
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : C12N 15/12, C07K 14/435, 16/18, A61K 38/17, 39/395, 48/00		
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)		
SEE ELECTRONIC DATABASE BOX BELOW		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SEE ELECTRONIC DATABASE BOX BELOW		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
GENPEPT, SWISS-PROT, PIR, EMBL, GENBANK; SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMBL database Accession Number AK024472. Homo sapiens mRNA for FLJ00065 protein. 29 September 2000. & GenPept database Accession Number BAB15762. See whole document, the sequence shows 100% homology with SEQ ID NO:4, 6 and 8 and 87% homology with SEQ ID NO: 2.	1, 3-9, 11-14, 16-22 and 24-26
X	EMBL database Accession Number AC025429. Homo sapiens chromosome 15 clone CTD-2006D8 map 15q14. 15 March 2000. See whole document, the sequence shows 100% homology with SEQ ID NO:4, 6 and 8 and 87% homology with SEQ ID NO: 2.	1, 3-9, 11-14, 16-22 and 24-26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input 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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 4 July 2002	Date of mailing of the international search report 17 JUL 2002	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929	Authorized officer J.H. CHAN Telephone No : (02) 6283 2340	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/00693
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos : 40 (in part) because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claim 40 refers to genetically modified animals. The claim does not exclude the animal from being a human being. Thus, the claim comprises excluded subject matter under Rule 39 of the PCT. Therefore this aspect of the claim has not been searched.
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos : 38 and 39 (complete) and 36 (in part) because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: See additional sheet below.
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos : because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU02/00693

Supplemental Box

(To be used when the space in any of Boxes I to VIII is not sufficient)

Continuation of Box No: I

The scope of claims 36 (in part) is unduly broad and speculative. A meaningful and economically feasible search could not encompass the complete subject matter of the claims. Claim 36 in part refers to an agent capable of modulating *bmf* expression, hence the claim encompasses an agent *per se*. There is no support for what is encompassed within the scope of the term "agent". It is not feasible to perform a meaningful and economical search on this aspect of claim 36. Therefore this aspect of claim 36 has not been searched.

Claims 38 and 39 have not been searched, as these claims do not comply with rule 6.3 of the PCT. This rule refers to the claims defining the technical features of the invention. The present invention appears to lie in the identification and characterisation of the mouse and human Bmf or BMF proteins and the nucleotides that encode them. These claims are directed to a method of detecting an immunointeractive molecule in a sample specific for a protein of interest. The claims do not comprise the mouse Bmf or human BMF proteins or the nucleotides that encode them. Thus the claims are not limited to the technical features of the invention. Therefore the claims were not searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/00693
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Science (2001) 293 (5536): 1829-1832. Puthalakath H <i>et al.</i> "Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis." & GenBank database accession numbers AY029253 & AY029254 & GenPept database accession numbers AAK38747 & AAK38748 respectively. See whole document, Mus musculus Bmf sequences are 100% identical to SEQ ID NOs: 1, 2, 5-8 and Homo sapiens BMF sequences are 100% identical to SEQ ID NOs: 3-8.	1-37 and 40-47
P, X	GenBank database accession number AF506761. Rattus norvegicus Bcl-2 modifying factor (Bmf), mRNA. 16 May 2002. & GenPept database accession number AAM28890. See whole document, sequence is up to 96% identical to SEQ ID NOs: 1-8.	1-37 and 40-47

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
// C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

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

- (72) 発明者 ピュタラカス, ハマス
オーストラリア国, ビクトリア 3 0 3 3, ケイラー イースト, ヒーザリー クレセント 2
0
- (72) 発明者 ヴィランガー, アンドレアス
オーストラリア国, ビクトリア 3 0 1 6, ウィリアムスタウン, ゲリブランド ストリート 1
8
- (72) 発明者 クールタス, リー
オーストラリア国, ビクトリア 3 0 5 7, ブランズウィック イースト, カニング ストリート
5 / 1 - 3
- (72) 発明者 ボーモント, ジェニファー
オーストラリア国, ウェスタン オーストラリア 6 0 5 9, ディアネッラ, ヴァレンチン アベ
ニュー 6 4 A
- (72) 発明者 オライリー, ロレイン, アン
オーストラリア国, ビクトリア 3 1 9 2, チェルテンハム, ムーンダ グローブ 2 0
- (72) 発明者 ファング, ディヴィッド, チング, シアング
オーストラリア国, ビクトリア 3 0 6 8, ノース フィッツロイ, レイ ストリート 4 6 8

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 BA80 CA04 DA02 GA11 HA01 HA15
4B064 AG27 CC24 DA13
4B065 AA90X AA91X AA91Y AB01 BA02 CA24 CA44
4C084 AA07 AA17 MA16 MA35 MA52 MA66 NA14 ZB072 ZB212 ZB262
ZC782
4H045 AA10 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA71 FA74

专利名称(译)	Bcl-2调节因子 (BMF) 序列及其在调节细胞凋亡中的应用		
公开(公告)号	JP2004532042A	公开(公告)日	2004-10-21
申请号	JP2003500259	申请日	2002-05-30
申请(专利权)人(译)	沃尔特伊丽莎堂研究院医学研究		
[标]发明人	ストラッサーアンドレアス ピュタラカスハマス ヴィランガーアンドレアス クールタスリー ポーモントジェニファー オライリーロレインアン ファングディヴィッドチングシヤング		
发明人	ストラッサー,アンドレアス ピュタラカス,ハマス ヴィランガー,アンドレアス クールタス,リー ポーモント,ジェニファー オライリー,ロレイン,アン ファング,ディヴィッド,チング,シヤング		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K45/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/11 C12N15/12 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 C07K14/4747		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K45/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00.105 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/53.D C12N5/00.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/MA16 4C084/MA35 4C084/MA52 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB072 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZC782 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
代理人(译)	高桥 健		
优先权	2001PR5351 2001-05-30 AU		
其他公开文献	JP4314386B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明总体上涉及能够调节哺乳动物细胞凋亡的新型分子，以及涉及编码该分子的遗传序列。更具体地，本发明涉及Bcl-2蛋白家族的新成员，在本文中被称为“Bmf”，并且涉及编码其的遗传序列以及调控序列，例如指导Bmf表达的启动子序列。Bmf包含BH3结构域，其促进与存活前Bcl-2家族成员的相互作用，从而触发细胞凋亡。因此，Bmf被视为仅BH3的分子。本发明的分子可用于例如治疗，诊断，抗体产生以及用作能够调节生理细胞死亡或存活和/或调节细胞周期进入的治疗剂的筛选工具。本发明进一步考虑了遗传修饰的动物，其中Bmf的一个或两个等位基因被突变或部分或全部被单独或全部缺失，或者与另一种Bcl-2型分子（例如但不限于Bim）的一个或两个等位基因中的突变一起缺失。所述转基因动物尤其可用于筛选改善由细胞凋亡缺陷引起的疾病症状或特异性促进靶细胞凋亡的试剂。

配列番号：	説明
1	マウス b m f のスクレオチド配列
2	マウスB m f のアミノ酸配列
3	ヒト b m f のスクレオチド配列
4	ヒトB m f のアミノ酸配列
5	マウス b m f のBH3領域のスクレオチド配列
6	マウスB m f のBH3領域のアミノ酸配列
7	ヒト b m f のBH3領域のスクレオチド配列
8	ヒト b m f のBH3領域のアミノ酸配列
9	マウス b m f プロモーターのスクレオチド配列
10	ヒト b m f プロモーターのスクレオチド配列
11	5' センسプライマー
12	3' アンチセンスプライマー
13	内部 b m f プライマー
14	5' センスプライマー
15	3' アンチセンスプライマー
16	内部プライマー
17	マウスB m f の予測アミノ酸配列
18	ヒトB m f の予測アミノ酸配列
19	B m f の部分的アミノ酸配列
20	B i m の部分的アミノ酸配列
21	E G L - 1の部分的アミノ酸配列
22	B a k の部分的アミノ酸配列
23	B a x の部分的アミノ酸配列
24	B l d の部分的アミノ酸配列
25	B l k の部分的アミノ酸配列
26	H r k の部分的アミノ酸配列
27	B a d の部分的アミノ酸配列