

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 510030

(P2003 - 510030A)

(43)公表日 平成15年3月18日 (2003.3.18)

| (51) Int. Cl <sup>7</sup> | 識別記号 | F I           | テ-マコード* (参考) |
|---------------------------|------|---------------|--------------|
| C 1 2 N 15/09             | ZNA  | A 6 1 K 48/00 | 2 G 0 4 5    |
| A 6 1 K 38/00             |      | A 6 1 P 35/00 | 4 B 0 2 4    |
| 48/00                     |      | 37/06         | 4 B 0 6 3    |
| A 6 1 P 35/00             |      | 43/00 105     | 4 B 0 6 5    |
| 37/06                     |      | C 0 7 K 14/47 | 4 C 0 8 4    |

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 50数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 519726(P2001 - 519726)

(86)(22)出願日 平成12年9月1日(2000.9.1)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月4日(2002.3.4)

(86)国際出願番号 PCT/NL00/00612

(87)国際公開番号 W001/016165

(87)国際公開日 平成13年3月8日(2001.3.8)

(31)優先権主張番号 99202858.9

(32)優先日 平成11年9月2日(1999.9.2)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 99203465.2

(32)優先日 平成11年10月21日(1999.10.21)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71)出願人 レアト ベー . フェー .  
LEADD B . V .

オランダ国 レイデン ワッセナルセウ  
エフ 72

(72)発明者 ノテボーン , マティーウ ヒューベルツス  
マリア

オランダ国 レイデン ゼーフォレル 14

(72)発明者 ダネン - ファン オールスホット , アスト  
リト アドリアナ アンナ マリア

オランダ国 ベルケル エン ローデンレ  
イス ベルリオーズブレイン 19

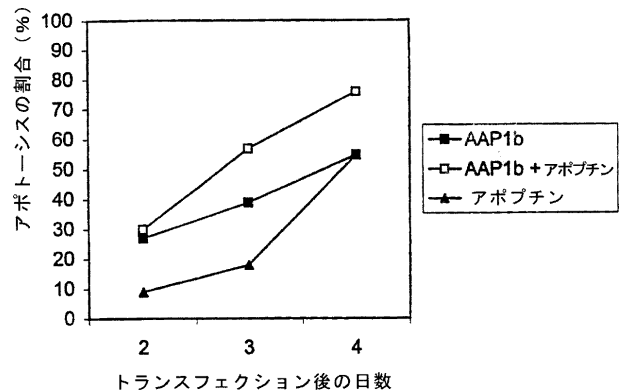
(74)代理人 弁理士 西教 圭一郎 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アポプチン関連タンパク質

(57)【要約】

本発明はアポトーシスの分野に関する。本発明は、特に p 5 3 が (部分的に) 機能的でないような場合、たとえば、単独で作用することができる、アポプチンと逐次的に、または共同して作用することができる、新規の組合せ療法または新規の治療用化合物のような新規の治療上の可能性を提供する。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 アポトーシスを提供することが可能であるアポプチン関連タンパク物質をコードする単離された、または組換えの核酸またはその機能的同等物またはその断片。

【請求項2】 前記アポプチン関連タンパク物質がアポプチンと共局在する請求項1に記載の核酸。

【請求項3】 前記アポプチン関連タンパク物質がマウスの転写因子YY1に結合する請求項1または2に記載の核酸。

【請求項4】 cDNAライブラリに由来する、請求項1～3のいずれか1項に記載の核酸。

【請求項5】 前記cDNAライブラリがヒトcDNAを含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸。

【請求項6】 図1または図2に示すようなアポプチン関連タンパク物質をコードする核酸分子にハイブリッド形成することが可能である、請求項1～5のいずれか1項に記載の核酸。

【請求項7】 図1または図2に示すようなアポプチン関連タンパク物質をコードする核酸分子、またはその機能的同等物またはその機能的断片に少なくとも70%相同である、請求項1～6のいずれか1項に記載の核酸。

【請求項8】 請求項1～7のいずれか1項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項9】 遺伝子送達媒体を含む請求項8に記載のベクター。

【請求項10】 請求項1～7のいずれか1項に記載の核酸もしくは請求項8または9に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項11】 酵母細胞または脊椎動物細胞のような真核細胞である、請求項10に記載の宿主細胞。

【請求項12】 アポトーシスを提供することが可能である、単離された、または組換えのアポプチン関連タンパク物質。

【請求項13】 アポプチンと共局在することが可能である請求項12に記載のタンパク物質。

【請求項14】 マウスの転写因子YY1に結合する請求項12または13に

記載のタンパク物質。

【請求項15】 請求項1～7のいずれか1項に記載の核酸によってコードされる請求項12～14のいずれか1項に記載のタンパク物質。

【請求項16】 図3に示されるようなアミノ酸配列の少なくとも一部を含む請求項12～15のいずれか1項に記載のタンパク物質またはその機能的同等物またはその機能的断片。

【請求項17】 請求項12～16のいずれか1項に記載のタンパク物質またはその機能的同等物またはその機能的断片を特異的に認識する単離された、または合成の抗体。

【請求項18】 請求項17に記載の抗体により特異的に認識可能なタンパク物質。

【請求項19】 アポトーシス誘導のための、請求項1～7のいずれか1項に記載の核酸、請求項8または9に記載のベクター、請求項10または11に記載の宿主細胞、請求項12または16または18のいずれか1項に記載のタンパク物質の使用。

【請求項20】 前記アポトーシスがp53に非依存性である請求項19に記載の使用。

【請求項21】 アポプチンまたはその機能的同等物またはその断片をコードする核酸の使用もしくは アポプチンまたはその機能的同等物またはその断片の使用をさらに含む請求項19または20に記載の使用。

【請求項22】 請求項1～7のいずれか1項に記載の核酸、請求項8または9に記載のベクター、請求項10または11に記載の宿主細胞、請求項12または16または18のいずれか1項に記載のタンパク物質を含む医薬組成物。

【請求項23】 アポプチンまたはその機能的同等物またはその断片をコードする核酸、もしくはアポプチンまたはその機能的同等物またはその断片をさらに含む請求項22に記載の医薬組成物。

【請求項24】 アポトーシスの誘導のための請求項22または23に記載の医薬組成物。

【請求項25】 前記アポトーシスがp53に非依存性である請求項24に記

載の医薬組成物。

【請求項26】 亢進した細胞増殖または低下した細胞死が認められる疾患の治療のための請求項22～25のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項27】 前記疾患が癌または自己免疫疾患を含む請求項26に記載の医薬組成物。

【請求項28】 亢進した細胞増殖または低下した細胞死が認められる疾患を持つ個人を治療するための方法であって、請求項22～27のいずれか1項に記載の医薬組成物で前記個人を治療することを含む方法。

【請求項29】 試料中で癌細胞または癌易発性である細胞の存在を検出するための方法であって、請求項1～7のいずれか1項に記載の核酸もしくは請求項8または9に記載のベクターで前記試料中の細胞に形質移入すること、および前記試料中の細胞のアポトーシスの比率を決定することを含む方法。

【請求項30】 試料中で癌細胞または癌易発性である細胞の存在を検出するための方法であって、請求項1～7のいずれか1項に記載の核酸もしくは請求項8または9に記載のベクターで前記試料中の細胞に形質移入すること、および前記試料中の細胞において前記核酸またはベクターに由来するタンパク物質の細胞内局在を決定することを含む方法。

【請求項31】 前記細胞における前記タンパク物質の存在が抗体により前記細胞を免疫染色することによって検出される請求項30に記載の方法。

【請求項32】 前記抗体が請求項17に記載の抗体を含む請求項31に記載の方法。

【請求項33】 推定上の癌誘発物質を同定するための方法であって、前記物質に細胞試料を委ねること、および請求項29～32のいずれか1項に記載の方法で細胞試料中における癌細胞または癌易発性である細胞の存在を検出することを含む方法。

【請求項34】 前記推定上の癌誘発物質が、遺伝子またはその機能的断片を含む請求項33に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明はアポトーシスの分野に関する。アポトーシスは、不必要な、変造した又は悪性の細胞を除去するための能動的な、プログラムされた生理的過程である (Earnshaw, 1995, Duke et al., 1996)。アポトーシスは、細胞の収縮、核の断片化、ドメインサイズの断片へのDNAの濃縮と切断を特徴とし、ほとんどの細胞ではそれに続いて、ヌクレオソーム間での分解を生じる。アポトーシスを受けている細胞は、膜に取り囲まれたアポトーシス体に断片化する。最終的には、近隣の細胞及び/又はマクロファージがこのような死に行く細胞を迅速に貪食する (Wyllie et al., 1980; White, 1996)。たとえば、DAPIのような、正常なDNAを強く、規則的に染色するが、アポトーシスのDNAは弱くおよび/または不規則に染色する試薬によって、アポトーシスであることについて、組織培養条件下で増殖している細胞および組織材料の細胞を分析することができる (Notteboorn et al., 1994; Telford et al., 1992)。

**【0002】**

種々の調節性の刺激によってアポトーシス過程を開始することができる (Wyllie, 1995; White 1996; Levine, 1997)。ヒトの病因、たとえば、亢進した増殖または細胞死の低下が認められる (Kerr et al., 1994; Paulovich, 1997) 癌の進展や自己免疫疾患において細胞生存率の変化は重要な役割を担っている。種々の化学療法剤および放射線照射は、多数の場合、野生型p53タンパク質を介して、腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導することが実証されている (Thompson, 1995; Bellamy et al., 1995; Steller, 1995; McDonnell et al., 1995)。

**【0003】**

しかしながら、多数の腫瘍は、その進展の最中、p53における突然変異を獲得し、それは癌の療法に対する乏しい反応と相関することが多い。腫瘍形成性のDNAウイルスにおける形質転換する特定の遺伝子は、直接結合することによってp53を不活化することができる (Teodoro, 1997)。かかる物質の例は、腫瘍性DNAウイルス、SV40のラージT抗原である。数種の(白血病性)腫瘍について、プロト癌遺伝子、Bcl-2またはBcr-ablの高い発現レベル

がアポトーシスを誘導する化学療法剤への強い耐性に関係している (Hockenberry, 1994; Sachs and Lotem, 1997)。

#### 【0004】

機能的な p53 を欠いているかかる腫瘍については、p53 に非依存性のアポトーシスの誘導に基づいて、代替の抗腫瘍療法が開発中である (Thompson, 1995; Paulovich et al., 1997)。p53 を必要としない、および/または Bcl-2 や Bcr-ab1 様のものであるような抗アポトーシス活性によって阻害されない、アポトーシスの誘導に参与する因子を探索しなければならない。このような因子は、別のアポトーシス経路の一部であるかも知れないし、またはアポトーシスを阻害する化合物の(はるか)下流にあるのかも知れない。

#### 【0005】

アポプチンは、ニワトリの貧血ウイルスに由来する小型タンパク質であり (CAV; Noteborn and De Boer, 1995; Noteborn et al., 1991; Noteborn et al., 1994, 1998a)、ヒトの悪性細胞および形質転換細胞株でアポトーシスを誘導することができるが、形質転換されていないヒトの培養細胞では誘導しない。in vitro では、アポプチンは、正常なリンパ系細胞、真皮細胞、表皮細胞、内皮細胞および平滑筋細胞でプログラム細胞死を誘導することはできない。しかしながら、正常細胞を形質転換すると、アポプチンによるアポトーシスに感受性になる。正常なヒトの線維芽細胞におけるアポプチンの長期にわたる発現は、アポプチンがこのような細胞において毒性を有さず、形質転換活性も有さないことを示した (Danen-van Oorschot, 1997; Noteborn, 1996)。

#### 【0006】

正常な細胞では、アポプチンは細胞質に優勢に見いだされるが、形質転換細胞または悪性細胞、すなわち、過形成、化生、異形成、または形成不全を特徴とする細胞では、それが核に位置していたということは、アポプチンの局在はその活性に関係することを示唆している (Danen-van Oorschot et al., 1997)。アポプチン誘導のアポトーシスは機能的 p53 の非存在下で生じ (Zhuang et al., 1995a)、Bcl-2、Bcr-ab1 (Zhuang et al., 1995) または Bcl-2 関連タンパク質、BAG-1 (Danen-van Oorschot, 1997a; Noteborn, 1996

)によって阻害することができない。

【0007】

したがって、アポプチンは、腫瘍細胞、またはそのほかの過形成、化生、形成不全または異形成、特に、機能的なp53の欠損およびBcl-2の(過剰)発現およびそのほかのアポトーシス阻害物質のためにアポトーシスの(化学)療法的誘導に耐性になっている腫瘍細胞の選択的な破壊のための治療用化合物である(Noteborn and Pietersen, 1998)。前悪性細胞、最小限に形質転換された細胞でさえアポプチンの死を誘導する効果に感受性であると思われる。さらに、NotebornとZhang(1998年)は、癌易発性の細胞の診断および癌易発性の細胞の治療にアポプチン誘導のアポトーシスを用いることができることを示した。

【0008】

少なくとも*in vitro*ではなく、正常なヒトの細胞においてアポプチンがアポトーシスを誘導しないという事実は、アポプチン治療の毒性効果は*in vivo*では極めて低いことを示している。NotebornとPietersen(1998年)およびPietersenら(1998年)は、アポプチンを発現したアデノウイルスは*in vivo*で急性毒性効果を有さないという証拠を提供した。さらに、ヌードマウスにおいてアポプチンは強い抗腫瘍活性を有することが示された。

【0009】

しかしながら、当該技術で入手可能な多数の治療用、抗癌剤または抗自己免疫疾患用化合物をさらに増やすには、特に、p53が(部分的に)機能しない場合には、単独で作用する、アポプチンと逐次作用する、またはアポプチンと共同して作用する追加的な治療用化合物が所望される。

【0010】

発明は、新規の治療上の可能性、たとえば、特に、p53が(部分的に)機能しない場合には、単独で作用する、アポプチンと逐次作用する、またはアポプチンと共同して作用する新規の組合せ療法または新規の治療用化合物を提供する。

【0011】

第1の実施の形態において、発明は、単独で またはその他のアポトーシス誘導物質との併用でアポトーシスの誘導が可能なアポプチン関連タンパク物質をコードする単離された、または組換えの核酸、またはその機能的同等物またはその断片を提供する。本明細書では、タンパク物質は、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含み、任意で、たとえば、グリコシル化、ミリスチル化、リン酸化、脂質の付加、単独または別のものとの二量体化または多量体化、または公知のそのほかのいかなる修飾（翻訳後）によって修飾された物質として定義される。

#### 【0012】

本明細書では、アポプチン関連は、アポプチンにより誘導可能なアポトーシス経路に見い出される事象のカスケードに特異的に関与する物質、好ましくはp53非依存性のアポトーシス経路に特異的に関与する物質のカスケードに属するとして定義する。

#### 【0013】

好ましい実施の形態では、発明は、アポトーシスの提供が可能な、アポプチン関連のタンパク物質をコードする単離された、または組換えの核酸、またはその機能的同等物またはその断片を提供する。さらに好ましくは、2つのアポトーシス誘導物質が同一の細胞に存在する場合、コードされたアポプチン関連タンパク物質は、そのほかのアポトーシス誘導物質、たとえばアポプチンとともに共局在する。正常な形質転換されていない細胞では、2つのアポトーシス誘導タンパク質は細胞質に共局在するが、形質転換された細胞、または悪性細胞では、2つのアポトーシス誘導タンパク質は核に共局在する。もう1つの実施の形態では、アポプチン関連物質は、マウスのAAP-1ホモログであるRYBPに結合することが以前示された（Garcia et al., 1999）マウスの転写因子、YY1に結合することが可能である。最も好ましい実施の形態では、アポトーシスの提供が可能であるアポプチン関連タンパク物質をコードする単離された、または組換えの核酸、またはその機能的同等物またはその断片は、cDNAライブラリ、好ましくは、家禽からの送達が可能であるような、脊椎動物のcDNAライブラリ、しかし、さらに好ましくは哺乳類のcDNAライブラリに由来し、好ましくはその際

、前記cDNAはヒトのcDNAを含む。

【0014】

もう1つの実施の形態では、発明は、図1または図2に示すような、アポトーシスの提供が可能であるアポプチン関連タンパク物質をコードする、特に、本明細書ではAAP-1と省略され、アポプチン関連タンパク質-1と呼ばれるアポトーシスの提供が可能である新規タンパク質、またはその機能的同等物またはその断片をコードする核酸分子にハイブリッド形成することが可能である、アポトーシスの提供が可能であるアポプチン関連タンパク物質をコードする単離された、または組換えの核酸、またはその機能的同等物またはその断片を提供する。当然、AAP-1タンパク質に関連可能な追加的アポプチン関連タンパク物質をコードする単離された、または組換えの核酸、またはその機能的同等物またはその断片もこれとともに提供され、アポプチンカスケードに位置するかかる追加的タンパク質に到達する手段および方法は、本明細書にある詳細な説明に従う。

【0015】

特に、発明は、図1または図2で示されるアポプチン関連タンパク物質をコードする核酸分子またはその機能的同等物またはその断片に少なくとも70%相同である、好ましくは少なくとも80%相同である、さらに好ましくは少なくとも90%相同である、最も好ましくは95%相同である、アポトーシスの提供が可能であるアポプチン関連タンパク物質をコードする単離された、または組換えの核酸、またはその機能的同等物またはその断片を提供する。

【0016】

さらに、本発明は、上記の発明に従った核酸を含むベクターを提供する。かかるベクターの例は、ベクター、pMT2SM-AAP-1-aまたは-b、Mycのタグを付けたAAP-1-aまたはAAP-1-bのcDNAを発現するpMT2SMベクター、アポプチン関連タンパク質の断片を発現するプラスミド、発明に従った核酸を含むpMALやpET22bのような大腸菌の過剰発現ベクターなどのように本明細書で与えられる詳細な説明で与えられる。このようなベクターおよびそのほかのベクターは、たとえば、上記で定義したような、カスケードから追加的なアポプチン関連タンパク物質を見出すのに、または発明に従

った核酸によりコードされたタンパク質を（過剰）発現するのに有用である。

【0017】

さらにもう1つの実施の形態では、本発明は、上記の発明に従った核酸を含むベクターを提供し、前記ベクターは、遺伝子送達媒体を含み、遺伝子治療において発明を極めて有用なものにしている。発明に従った核酸によって遺伝子送達媒体を装備することによって、および過剰増殖している、または細胞死の割合が低下している細胞（単数）または細胞（複数）を前記媒体の標的とすることによって、前記遺伝子送達媒体は、前記細胞（単数）または細胞（複数）にアポトーシスに必要な手段を提供し、治療の可能性にさらに近づくことになる。

【0018】

さらに、本発明は、上記の発明に従った核酸またはベクターを含む宿主細胞を提供する。例には、本明細書の詳細な説明に記載されるような、形質転換された、または形質移入された細菌の細胞または酵母細胞が含まれる。好ましくは、発明に従った核酸またはベクターで形質転換された、または形質移入された哺乳類細胞またはC o s細胞のような、酵母細胞または脊椎動物細胞のような形質転換された真核細胞である、発明に従った宿主細胞である。前記細胞は、アポプチンと関連する能力とともに、アポトーシスの提供が可能であるタンパク物質を発現することまたは産生することが可能である。

【0019】

発明はさらに、アポトーシスの提供が可能である、単離された、または組換えのアポプチン関連タンパク物質を提供する。図4において本明細書で示される例について言えば、腫瘍細胞またはそのほかの過剰増殖細胞のような細胞におけるかかるアポプチン関連タンパク物質の発現は、アポトーシス過程を誘導する。特にp53とは非依存性に、単独でもそのようにできるし、またはアポプチンのようなそのほかのアポトーシス誘導物質の存在下でもそのようにできるということは、p53がないような場合でも、発明に従った物質によってアポトーシスを誘導できることを示している。アポトーシスの提供が可能であるアポプチン関連タンパク物質をもう1つのアポトーシス誘導物質、たとえばアポプチンとともに用いる場合、2つのタンパク物質は、正常細胞の細胞質に共局在し、結果としてア

ポトーシスを生じない。一方、形質転換細胞または悪性細胞では、2つのアポトーシス誘導タンパク質は核に共局在して、アポトーシスを誘導する。発明はまた、AAP1のマウスにおけるホモログであるRYBPに結合することがすでに明らかにされている転写因子、YY1に結合する、発明に従ったタンパク物質を提供する。特に、発明は、たとえば、図3に示すようなアミノ酸配列の少なくとも一部、または、単独で、またはアポプチンのようなそのほかのアポトーシス誘導物質との併用でアポトーシスの提供が可能である、その機能的同等物またはその断片を含む、発明に従った核酸によってコードされる発明に従ったタンパク物質を提供する。

#### 【0020】

本発明はまた、上記の発明に従ったタンパク物質、またはその機能的同等物またはその断片を特異的に認識する単離された、または合成の抗体も提供する。かかる抗体は、たとえば、アポプチン関連タンパク物質または免疫原性のあるその断片または同等物で実験動物を免疫し、前記免疫動物からポリクローナル抗体を採取する（詳細な説明において本明細書で示されるように）ことによって入手可能であり、または、モノクローナル抗体、または(単鎖)抗体または核酸ライブラリに由来する組換え核酸から発現される結合タンパクを作成することによるような公知のそのほかの方法によって入手可能であり、たとえば、ファージ・ディスプレイ法で入手可能である。

#### 【0021】

かかる抗体とともに、本発明はまた、上記の発明に従ったかかる抗体により特異的に認識可能な、たとえば、免疫沈降、ウエスタンブロット、またはそのほかの公知の免疫的手法を介して入手可能なタンパク物質も提供する。

#### 【0022】

さらに、たとえば、図4に示すように、アポトーシスの誘導のために、発明に従った核酸、ベクター、宿主細胞、またはタンパク物質の使用を提供する。特に、前記アポトーシスがp53に依存しない場合にかかる使用は提供される。特に、アポプチンまたはその機能的同等物またはその断片をコードする核酸の使用、またはアポプチンまたはその機能的同等物またはその断片の使用をさらに含むか

かる使用も提供される。図4に見られるように、アポプチン誘導のこのような物質を併用することは、処理された腫瘍細胞におけるアポトーシスの比率を高める。

#### 【0023】

発明によって提供されるかかる使用は治療的観点から特に有用である。本発明は、これとともに、上記の発明に従った核酸、ベクター、宿主細胞またはタンパク物質を含む医薬組成物を提供する。加えて、アポプチンまたはその機能的同等物またはその断片をコードする核酸、またはアポプチンまたはその機能的同等物またはその断片をさらに含む、発明に従った、かかる医薬組成物が提供される。

#### 【0024】

特に、たとえばアポトーシスがp53に依存しない場合前記アポトーシスの誘導のために、一般に疾患が癌または自己免疫疾患を含む場合のように亢進した細胞増殖または低下した細胞死が認められる前記疾患の治療のために、かかる医薬組成物を提供する。これとともに、本発明は、上記の発明に従った医薬組成物で個人を治療することを含む、亢進した細胞増殖または低下した細胞死が認められる疾患を持つ前記個人を治療するための方法を提供する。特に、このような組成物は、形質転換した細胞に特異的なアポトーシス経路の因子を含む。したがって、癌や自己免疫疾患のようなアポトーシス経路における異常に関連した疾患の新しい治療だけでなく、診断にも、このような組成物は必須である。

#### 【0025】

診断の分野において、発明は、試料の中で癌細胞または癌易発性である細胞の存在を検出するための方法であって、発明に従った核酸またはベクターで前記試料における細胞に形質移入すること、前記細胞を培養すること、および前記試料におけるアポトーシス細胞の比率を決定することを含む方法を提供する。たとえば、我々は、AAP-1の細胞内局在が、正常な、形質転換されていない細胞に比べて、腫瘍形成性の/形質転換した細胞では異なっていると結論付けることができる。さらに、核におけるAAP-1の集積は、アポトーシスの誘導と関連するが、細胞質における局在は、細胞の生存率および正常な増殖能と関連する。したがって、本発明は、前記試料の中で癌細胞または癌易発性である細胞の存在を

検出するための方法であって、上記の発明に従った核酸またはベクターで試料における細胞に形質移入すること、および前記試料中の細胞における前記核酸またはベクターに由来するタンパク物質の細胞内局在を決定することを含む方法を提供する。特に、発明は、免疫蛍光アッセイまたはそのほかの公知の免疫アッセイのような抗体による前記細胞の免疫染色によって前記細胞における前記タンパク物質の存在を検出する場合を提供する。好ましくは、前記抗体は、発明に従った抗体を含む。

#### 【0026】

また、本発明は、形質転換遺伝子またはその機能的断片のような推定上の癌誘発物質を同定するための方法であって、たとえば形質移入による、または単に細胞を取り囲んでいる培地に物質を提供することによるような、物質に細胞試料を委ねることおよび上記の発明に従った方法によって細胞試料における癌細胞または癌易発性である細胞の存在を検出することを含む方法も提供する。

#### 【0027】

加えて、本発明は、細胞をたとえば紫外線のような癌を誘導する物質に委ねること、および上記の発明に従った方法によって細胞試料中の癌細胞または癌易発性の細胞の存在を検出することを含む、前記細胞試料の癌易発性を検出する方法、およびそれによってこのような細胞が採取された個人の癌易発性を検出する治療法を提供する。

#### 【0028】

発明は以下の詳細な説明においてさらに詳細に説明されるが、それは発明を限定するものではない。

#### 【0029】

##### 詳細な説明

我々は、アポトーシスの誘導に必須である、アポプチン関連の細胞性化合物を同定するために酵母2ハイブリッド系を用いた (Durfee et al., 1993)。使用した系は、アポプチンと生理的に関係することが可能なヒトのタンパク質を同定するために *in vivo* の戦略である。それは、関心のあるタンパク質に結合可能なタンパク質をコードするクローンのために cDNA ライブラリをスクリー

ニングするのに用いられてきた (Fields and Song, 1989; Yang et al., 1992) 。発明は、たとえば、新規のアポプチン関連タンパク質を提供し、そのうちの1つはアポプチン関連タンパク質 - 1、略してAAP - 1と命名されている。発明はまた、この新しく発見されたAAP - 1タンパク質またはその機能的同等物またはその断片の機能の妨害を介してアポトーシスを誘導するための、および/またはAAP - 1または関連する遺伝子またはその機能的同等物またはその断片の(過剰)発現によるアポトーシスの誘導のための方法も提供する。

#### 【0030】

発明はまた、AAP - 1様タンパク質の機能の妨害および/またはその(過剰)発現に基づいた抗腫瘍療法を提供する。AAP - 1様タンパク質は、正常では、不死化された細胞株においてさほど豊富には存在しない。したがって、異常に高いレベルのAAP - 1様タンパク質は細胞の形質転換の逆の過程、すなわちアポトーシスの誘導を生じる。発明はさらに、腫瘍特異的である、アポプチン誘導のアポトーシスのメディエータを提供する。発明は、AAP - 1様タンパク質単独またはアポプチンおよび/またはアポプチン様化合物との併用に基づいた、癌、自己免疫疾患または関連疾患のための治療法を提供する。

#### 【0031】

##### pGBT9 - VP3の構築

酵母2ハイブリッド系によるアポプチン関連タンパク質の同定を可能にする、おとりのプラスミドを構築するために、NdeIおよびBamHIによってプラスミドpET - 16b - VP3 (Noteborn, 未発表)を処理した。低融点アガロースから0.4kbのNdeI - BamHIのDNA断片を単離した。制限酵素EcoRIとBamHIによってプラスミドpGBT9 (米国、パロアルトのクロンテック・ラボラトリーズ社)を処理した。約5.4kbの断片を単離し、EcoRI - NdeIのリンカーおよびそれ自体のATG開始コドンから始まるアポプチンをコードする配列を含む0.4kbのDNA断片に連結した。GAL4結合ドメイン配列の融合遺伝子および酵母プロモータADHの調節下にあるアポプチンを含有する最終的なコンストラクトをpGBT - VP3と呼び、制限酵素分析およびサンガー法 (Sanger, 1977) による配列決定によって正しいことが

証明された。

【0032】

クローニング工程はすべて本質的にはManiatisら(1992年)により記載されたように行った。CsCl勾配における遠心分離およびセファクリルS500(ファルマシア)におけるカラムクロマトグラフィによってプラスミドpGBT-VP3を精製した。

【0033】

GAL4活性化ドメインをタグにしたcDNAライブラリ

アポプチン関連タンパク質を検出するために、GAL4転写活性化ドメインに融合した、エプスタイン・バー・ウイルスで形質転換したヒトB細胞のcDNAを含有する発現用ベクターpACTを用いた。pACTcDNAライブラリは、Durféeら(1993年)により記載されたようにラムダ-ACTcDNAライブラリに由来する。

【0034】

細菌株およびウイルス株

大腸菌株、JM109は、プラスミドpGBT9およびpGBT-VP3に関する形質転換受け入れ側だった。アポプチン関連のpACT-cDNAを回収するのに必要な形質転換のために細菌株、エレクトロマックス(electromax)/DH10Bを用い、米国のGIBCO-BRLから入手した。

【0035】

cDNAライブラリ、および用いた酵母2ハイブリッド系の一部であるそのほかすべての形質転換をスクリーニングするのに酵母株Y190を用いた。

【0036】

培地

薬物選抜用に、大腸菌に対してアンピシリン(50マイクログラム/ml)をルリア・プロス(LB)プレートに加えた。酵母のYPDおよびSC培地は、Roseら(1990年)により記載されたように調製した。

【0037】

プラスミドpGBT-VP3およびpACT-cDNAによるコンピテント酵

母株 Y 1 9 0 の形質転換およびベータ・ガラクトシダーゼ活性のスクリーニング

K l e b e ら ( 1 9 8 3 年 ) に より 記 載 さ れ た 方 法 に 従 っ て 、 酵 母 株 Y 1 9 0 を コ ン ピ テ ン ト に し て 、 形 質 転 換 し た 。 酵 母 細 胞 を ま ず p G B T - V P 3 で 形 質 転 換 し 、 続 い て p A C T - c D N A で 形 質 転 換 し 、 こ の よ う な 形 質 転 換 し た 酵 母 細 胞 を ヒ ス チ ジ ン 欠 損 プ レ ー ト で 、 ロ イ シ ン と ト リ プ ト フ ァ ン も 除 い て 増 殖 さ せ た 。

#### 【 0 0 3 8 】

ヒスチジン陽性で十分に湿らせたハイボンド - N フィルターを酵母のコロニーの上に置いた。フィルターを持ち上げ、液体窒素に沈めて、酵母細胞を透過性にした。フィルターを融解し、0.27%のベータ・メルカプトエタノールと1mg/mlのX-galを含有するZ-緩衝液(1リットル当り、16.1gの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5.5gの $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.75gのKClおよび0.246gの $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、pH7.0)とともににペトリ皿の中でワットマン3MMろ紙上にコロニー側を載せた。少なくとも15分間または一晩、フィルターをインキュベートした。

#### 【 0 0 3 9 】

酵母からのプラスミドの回収

H o f f m a n と W i n s t o n ( 1 9 8 7 年 ) に より 記 載 さ れ た グ ル ス ラ ー ゼ - アルカリ溶解法を用いて、ヒスチジンおよびベータガラクトシダーゼ陽性の酵母細胞からの全DNAを調製し、製造元の指示書に従ってバイオラッドのジーンパルサーを用いたエレクトロポレーションによってエレクトロマックス/DH10B細菌を形質転換するのに用いた。

抗生物質、アンピシリンを含有するLB培地に形質転換体を入れた。

#### 【 0 0 4 0 】

アポプチン関連pACTクローンの単離

コロニー・フィルターアッセイによって、コロニーを溶解し、pACTに特異的な(配列分析の項も参照のこと)、放射性標識した17ヌクレオチドのオリゴマーにハイブリッド形成させた。pACTクローンからプラスミドDNAを単離し、XhoI消化によってcDNA挿入物の存在を解析した。

## 【0041】

## 配列分析

サンガー法に従い、ユーロゲンテック (Eurogentec) (ベルギー、Seraing) により実行されたジデオキシNTPを用いて、アポプチン関連タンパク質をコードする配列を含むサブクローンを配列決定した。用いた配列決定用プライマーは、5' - T A C C A C T A C A A T G G A T G - 3' のDNA配列を含むpACT特異的な17個ヌクレオチドだった。

## 【0042】

EMBL / ジェンバンクの既知の遺伝子配列とアポプチン関連cDNAの配列を比較した。

## 【0043】

## pMAL - AAP1およびpET22b - AAP1の構築

アポプチン関連タンパク質の産生と単離を可能にする、タンパクの過剰発現用プラスミドを構築するために、プラスミド、pMALTBおよびpET22bを用いた。プラスミドpMALTBはpMAL - C2 (ニューイングランド・バイオラボズ) に由来し、Xa因子部位がトロンビン部位で置き換えられている。BamHIとSalIでプラスミドpMALTBを処理し、アガロース/TBEゲル (キアゲンのゲル抽出キット) から $\pm 7.0$  kbのDNA断片を単離した。正方向プライマー: 5' - A A C G G G A T C C G G C G G C A T G G G C G A C A A G A A G A G C C C G A C C 3' および逆方向プライマー: 5' A A A A G T C G A C T C A G A A A G A T T C A T C A T T G A C T G C T G A C A T 3' によるpACT - AAP - 1 bにおけるPCR反応によって完全なオープンリーディングフレームをコードするAAP - 1配列を得た。BamHIとSalIで $\pm 0.7$  kbのDNA断片を消化し、アガロース/TBEゲル (キアゲンのゲル抽出キット) から単離した。IPTG誘導可能なtacプロモータの調節下でMBP遺伝子とAAP1遺伝子の間の融合を含有する最終的なコンストラクトをpMAL - AAP1と呼んだ。

## 【0044】

NdeIとNotIでプラスミドpET22b (ノバゲン) を処理し、 $\pm 5.$

5 kbのDNA断片をアガロース/TBEゲル(キアゲンのゲル抽出キット)から単離した。正方向プライマー: 5' GGG AATTCCATATGGGCGAC AAGAAGAGCCCCGACC3' および逆方向プライマー: 5' AAGG AAGTACGCGGCCGCGAAAGATTTCATCATTGACTGCT GACATGT3' によるpACT-AAP-1bにおけるPCR反応によってオープンリーディングフレームをコードするAAP-1配列を得た。NdeIとNotIでPCR産物进行处理し、±0.7 kbのDNA断片をアガロース/TBEゲル(キアゲンのゲル抽出キット)から単離した。IPTG誘導可能なT7lacプロモータの調節下でAAP1遺伝子と(His)<sub>6</sub>テイルの間の融合を含有する最終的なコンストラクトをpET22b-AAP1と呼んだ。

#### 【0045】

両コンストラクトは制限酵素分析およびサンガー法(Sanger, 1977)によるDNA配列決定によって正しいことが証明された。

#### 【0046】

クローニング工程はすべて本質的にはManiatisら(1992年)により記載されたように行った。

#### 【0047】

MBP-AAP1およびAAP1-(His)<sub>6</sub>の過剰発現のための細菌株プラスミドpMAL-AAP1によるタンパク産生には、大腸菌株B834(DE3)を用い、pET22b-AAP1の場合には、大腸菌株BL21(DE3)を用いた。両株はノバゲンから入手した。

#### 【0048】

##### 結果および考察

アポプチンは、ヒトの腫瘍に由来する細胞株のような形質転換した細胞でアポトーシスを誘導する。この細胞形質転換に特異的な、および/または腫瘍特異的なアポトーシス経路における必須の化合物を同定するために、酵母による遺伝的スクリーニングを行った。我々は、エプスタイン・バー・ウイルスにより形質転換されたヒトB細胞(Durfee et al., 1993)から作成した完全なcDNAコピーを含有するプラスミドベクターpACTに基づいたヒトのcDNAライブラリ

を用いた。

【0049】

GAL4-DNA結合ドメインとアポプチンの融合遺伝子産物を発現するおとりのプラスミドの構築

形質転換された/腫瘍形成性のヒトのcDNAライブラリにおけるアポプチン関連タンパク質の存在を調べるために、いわゆるおとりのプラスミドを構築しなければならなかった。その目的で、複数クローニング部位またはプラスミドpGBT9において、アポプチンから約40塩基対下流で隣接する、完全なアポプチンをコードする領域をクローニングした。

【0050】

アポプチンとGAL4-DNA結合ドメインの間の融合領域について制限酵素による解析および配列決定によってpGBT-VP3と呼ばれる最終的なコンストラクトを解析した。

【0051】

酵母におけるGAL4反応性プロモータのトランス活性化によってアポプチン関連タンパク質をコードする遺伝子(断片)を決定した。

【0052】

アポプチン遺伝子は、プラスミドpGBT-VP3のGAL4-DNA結合ドメインに融合するが、形質転換ヒトB細胞に由来するcDNAはすべてプラスミドpACTのGAL4活性化ドメインに融合する。前記cDNAにコードされるタンパク物質の1つがアポプチンに結合すれば、GAL4-DNA結合ドメインはGAL4活性化ドメインの近傍となり、結果的にGAL4反応性プロモータの活性化を生じ、それはリポーター遺伝子HIS3およびLacZを調節する。

【0053】

アポプチンを発現するプラスミドおよびアポプチン関連タンパク質断片を発現するプラスミドを含有する酵母は、ヒスチジン欠損培地中で増殖することができ、ベータ・ガラクトシダーゼアッセイで青色に染色される。それに続いて、アポプチン関連タンパク質をコードするcDNA挿入物を伴ったプラスミドを単離し、性状分析することができる。

## 【0054】

しかしながら、我々はそのようにできる前に、pGBT-VP3単独またはpACTベクターとの併用による酵母細胞の形質転換はGAL4反応性プロモータの活性化を生じないことを確定した。

## 【0055】

形質転換ヒトB細胞株に由来するcDNAによってコードされるアポプチン関連タンパク質の同定

我々は、pGBT-VP3とpACT-cDNAによる形質転換の際にヒスチジン欠損（ロイシンおよびトリプトファンも欠く）培地で増殖することができ、ベータ・ガラクトシダーゼアッセイで青色に染色される2つの酵母コロニーを見出した。このような結果は、観察されたコロニーが、おとりのプラスミドpGBT-VP3のほかにアポプチン関連タンパク質の可能性のあるものをコードするpACTプラスミドも含有することを示している。

## 【0056】

陽性のコロニーからプラスミドDNAを単離し、細菌で形質転換した。pACT特異的な標識DNAプローブを用いたフィルター・ハイブリッド形成アッセイによって、pACTプラスミドを含有するコロニーを決定することができた。それに続いて、pACTのDNAを単離し、cDNA挿入物の存在を示す制限酵素XhoIで消化した。最終的に、サンガー法（Sanger et al., 1977）を用いることによってcDNA挿入物を含有するpACTプラスミドを配列決定した。

## 【0057】

アポプチン関連タンパク質の説明

アポプチン関連タンパク質に関する酵母の遺伝的スクリーニングによって、結果的に1種類のタンパク質、すなわち、AAP-1と省略され、アポプチン関連タンパク質-1と呼ばれる新規のタンパク質を含む2つのcDNAクローンAおよびBが検出された。cDNA、AAP-1-bはATG開始コドンを伴った完全なオープンリーディングフレームを含むが、AAP-1-a cDNA配列は、AAP-1-bのDNA配列に完全に相同である、部分的なAAP-1のオープンリーディングフレームを含有する。

## 【0058】

AAP-1-aおよびAAP-1-bのcDNAクローンの決定されたDNA配列をそれぞれ図1および図2に示す。クローンAAP-1-bの検出されたDNA配列に由来し、完全なAAP-1のアミノ酸配列を表すアミノ酸配列を図3に提供する。

## 【0059】

哺乳類細胞におけるAAP-1タンパク質の同定のための発現用ベクターの構築

クローニングしたcDNA、AAP-1-aおよびAAP-1-bが実際に(アポプチン関連)タンパク質をコードしているかどうか検討するために、我々は以下の実験を行った。

## 【0060】

DNAプラスミド、pMT2SMは、SV-40形質転換のCos細胞のような形質転換された哺乳類細胞において外来遺伝子の高い発現レベルを可能にするアデノウイルスの5主要後期プロモータ(MLP)およびSV40のoriを含有する。さらに、pMT2SMベクターは、外来遺伝子産物とともにインフレームにあるMycタグ(アミノ酸:EQKLISEEDL)を含有する。このMycタグは、たとえば、Mycタグ特異的9E10抗体によってアポプチン関連タンパク質の認識を可能にする。

## 【0061】

Mycタグを付けたAAP-1-aおよびAAP-1-bを発現するpMT2SMベクターを以下のように構築した。制限酵素、XhoIでpACT-AAP-1-aおよびpACT-AAP-1-bのクローンを消化し、cDNA挿入物を単離した。XhoIで発現用ベクター、pMT2SMを消化し、子ウシの腸アルカリホスファターゼで処理して、単離したAAP-1のcDNA挿入物に連結した。配列の解析によって、正しい方向でAAP-1-aおよびAAP-1-bのcDNAを含有するpMT2SMコンストラクトを同定した。

## 【0062】

プラスミドpMT2SM-AAP-1-aおよびpMT2SM-AAP-1-

bでC o s細胞に形質移入することによってM y c タグをつけたA A P - 1タンパク質の合成を分析した。陰性対照として、C o s細胞を擬似的に形質移入換した。形質移入の2日後、細胞を溶解し、M y c タグ特異的な抗体、9 E 1 0を用いてウエスタンブロットを行った。

#### 【0063】

p M T 2 S M - A A P - 1 - aおよびp M T 2 S M - A A P - 1 - bで形質移入されたC o s細胞は、およそ33kDa(A A P - 1 - a)または35kDa(A A P - 1 - b)の予想サイズで、特異的なM y c タグを付けたA A P - 1産物を合成することが証明された。予想どおり、擬似的に形質移入換したC o s細胞の細胞溶解物は、M y c タグ特異的な抗体と反応するタンパク質産物を含有していなかった。

#### 【0064】

このような結果は、我々が、アポトーシス誘導タンパク、アポプチンに関連する能力を伴ったタンパク質産物を生じることができるc D N Aを単離することができたことを示している。

#### 【0065】

形質転換した哺乳類細胞システムにおけるアポプチンによるM y c タグを付けたA A P - 1の共免疫沈降

次に我々は、M y c タグ特異的な抗体、9 E 1 0を用いた共免疫沈降によってアポプチンとA A P - 1タンパク質の会合を分析した。9 E 1 0抗体はアポプチンには直接結合しないことが明らかにされており、それによって、(m y c タグの付いた)アポプチン関連タンパク質とアポプチンの共免疫沈降を行うのに9 E 1 0の使用が可能になっている。

#### 【0066】

この目的で、アポプチンをコードするプラスミドp C M V - V P 3とp M T 2 S M - A A P - 1 - aプラスミドでC o s細胞に共形質移入した。陰性対照として、アポプチンを発現するp C M V - V P 3とアポプチンとは会合しないm y c タグの付いたベータ・ガラクトシダーゼをコードするp c D N A 3 . 1 . L a c Z - m y c / H i s - L a c Zで細胞に形質移入した。

## 【0067】

形質移入の2日後、50mMのトリス(7.5)、250mMのNaCl、5mMのEDTA、0.1%のトリトンX100、1mg/mlの $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ および新しく加えた、PMSF、トリプシン阻害剤、リユーベプチンおよび $\text{Na}_3\text{VO}_4$ のようなプロテアーゼ阻害剤から成る緩衝液中で細胞を溶解した。My c タグ特異的な抗体、9E10を用いて、Notebornら(1998年)によって記載されたように、特異的なタンパク質を免疫沈降し、ウエスタンブロットによって解析した。

## 【0068】

それぞれMy c タグおよびアポプチンに対して特異的な9E10抗体および11.3抗体によるウエスタンブロットの染色は、「全」細胞溶解物が、アポプチンおよびMy c タグの付いたAAP-1タンパク質またはベータ・ガラクトシダーゼ産物を含有することを示した。My c タグの付いたAAP-1産物の免疫沈降には16kDaのアポプチン産物の免疫沈降が伴っていた。それに対して、my c タグの付いたベータ・ガラクトシダーゼの免疫沈降には、アポプチンタンパク質の有意な共沈は生じなかった。

## 【0069】

全体で、3回の別々の免疫沈降実験を行い、それらはすべて、アポプチンのAAP-1タンパク質への会合能を示した。

## 【0070】

このような結果は、新しく決定されたAAP-1タンパク質が、酵母においてのみではなく、哺乳類の形質転換細胞系においてもアポプチンと特異的に会合することができることを示している。

## 【0071】

ヒトの形質転換細胞における新規のAAP-1タンパク質の過剰発現はアポトーシス過程を誘導する。

## 【0072】

加えて、我々はAAP-1がアポトーシス活性を持つかどうかを調べた。まず、我々は、ヒトの形質転換細胞において新規AAP-1タンパク質の細胞内局在

を分析した。この目的で、Danen-van Oorschotが記載したように、それぞれmycタグの付いたAAP-1-aまたはAAP-1-bタンパク質をコードするプラスミドpMT2SM-AAP-1-aまたはpMT2SM-AAP-1-bによってヒト骨肉腫に由来するSaos-2細胞に形質移入した。

#### 【0073】

mycタグ特異的な抗体9E10および核のDNAを染色するDAPIを用いた間接免疫蛍光法によって、部分的なAAP-1タンパク質および完全なAAP-1タンパク質の双方が細胞の核に存在することが判った。実際、それは、クロマチン/DNA構造と共に共局在している。

#### 【0074】

最終的に我々は、完全なAAP-1タンパク質または部分的なAAP-1タンパク質をコードするcDNAは両方共、(過剰)発現するとアポトーシスの誘導を生じるのかどうかを調べた。形質移入の4日後、AAP-1陽性の細胞の大多数は、DAPIによって異常に染色され、それはアポトーシスの誘導を示すものである(Telford, 1992; Danen-van Oorschot, 1997)。

#### 【0075】

Saos-2細胞のようなヒトの腫瘍細胞におけるアポプチンと両AAP-1タンパク質の共発現は、アポプチンまたはAAP-1タンパク質の単独発現よりもさらに速いアポトーシス過程を生じる。完全なAAP-1タンパク質のアポトーシス活性の結果を図4に示す。AAP-1タンパク質が、p53を欠くSaos-2細胞においてアポトーシスを誘導するという事実は、AAP-1がp53非依存性にアポトーシスを誘導できることを示している。このような結果は、ほかの(化学)療法剤が失敗した場合、AAP-1を抗腫瘍剤として使用できることを意味する。さらに、アポプチンとAAP-1がp53非依存性の経路を誘導するという知見は、AAP-1がアポプチン誘導のアポトーシス経路に適合することを示している。

#### 【0076】

ヒトの腫瘍細胞におけるアポプチンとAAP-1の共局在

形質転換したヒト細胞においてアポプチンとA A P - 1 が共局在する可能性を確証するために、アポプチンおよびA A P - 1 をコードするプラスミドをS a o s - 2 細胞に形質移入した。A A P - 1 上のm y c タグに対する特異的m A b、m y c 9 E 1 0 およびアポプチンのC末端に対するp A b、V P - 3 を用いた共焦点レーザー走査顕微鏡による間接免疫蛍光法によってA A P - 1 およびアポプチンの発現をモニターした。

【0077】

A A P - 1 をコードするプラスミドおよびアポプチンをコードするプラスミドで共形質移入された細胞は、核においてこれらのタンパク質を優勢に発現していた。アポプチンもA A P - 1 も顆粒構造を有し、上述した独特の構造を有していた。共焦点レーザー走査顕微鏡によって、このような核構造においてA A P - 1 とアポプチンの部分的な共局在が明瞭に示された。

【0078】

結論的に言えば、我々は、ヒトの腫瘍細胞において核に存在し、( p 5 3 非依存性に ) アポトーシスを誘導することができるアポプチン関連タンパク質、すなわち、新規のA A P - 1 タンパク質を同定した。さらに、A A P - 1 とアポプチンが同一の細胞に発現する場合、2つのアポトーシス誘導タンパク質は、ヒトの腫瘍細胞の核に共局在する。

【0079】

A A P - 1 は細胞質構造においてヒトの正常な2倍体細胞に局在する。

次に我々は、A A P - 1 が、正常なヒト2倍体の形質転換していない細胞においてヒトの腫瘍細胞で見いだされたのと同様に挙動するかどうかを調べた。

【0080】

この目的で、供給元(オランダ、Almereのロシュ)のプロトコールに従ってフジーン(Fugene)を用いて、m y c タグの付いた完全なA A P タンパク質をコードするp M T 2 S M - A A P - 1 - b プラスミドでヒトの2倍体、V H 1 0 線維芽細胞に形質移入した。平行してヒトの腫瘍細胞に由来するS a o s - 2 細胞もp M T 2 S M - A A P - 1 - b プラスミドで形質移入した。

【0081】

mycタグに特異的な抗体9E10を用いた間接免疫蛍光法によって、正常な2倍体、VH10線維芽細胞では、AAP-1は細胞質に局在することが示された。予想どおり、ヒトの腫瘍Saos-2細胞では、AAP-1は核に局在する。

#### 【0082】

さらに我々は、AAP-1単独を発現する細胞について記載したように、AAP-1の細胞内局在の際のヒトVH10線維芽細胞におけるAAP-1とアポプチンの共発現の効果を調べた。免疫蛍光のデータは、アポプチンとAAP-1の双方共が細胞質構造に局在することを示している。このような知見は、AAP-1および/またはアポプチンの発現が、1つまたはそのほかの(ヒトの)2倍体細胞において核の局在化を生じないことを示している。

#### 【0083】

ヒト線維芽細胞におけるアポプチンとAAP-1の共局在

形質転換されていない細胞におけるアポプチンとAAP-1の共局在の可能性を確認するために、アポプチンおよびAAP-1をコードするプラスミドでVH10細胞に形質移入した。AAP-1上のmycタグに対する特異的mAb、myc 9E10およびアポプチンのC末端に対するpAb、VP3-cを用いた共焦点レーザー走査顕微鏡による間接免疫蛍光法によってAAP-1およびアポプチンの発現をモニターした。(共)局在についておよびDAPIでの核染色によるアポトーシスの誘導について細胞をスクリーニングした。

#### 【0084】

AAP-1をコードするプラスミドおよびアポプチンをコードするプラスミドで共形質移入された細胞は、細胞質においてこれらのタンパク質を優勢に発現していた。アポプチンもAAP-1も繊維質で時に顆粒状の構造を有した。共焦点レーザー走査顕微鏡によって、このような細胞質構造においてAAP-1とアポプチンの共局在が生じることが明瞭に示された。同様の細胞質構造は、AAP-1を単独で発現した場合、また逆にアポプチンを単独で発現した場合にも認められた。

#### 【0085】

したがって、アポプチンの存在下でも非存在下でも、AAP-1は、ヒトの形質転換していない線維芽細胞では細胞質局在を有し、繊維質の塊状構造を有する。

#### 【0086】

結論的に言えば、我々は、ヒトの腫瘍形成性の細胞に対して、ヒトの2倍体の形質転換していない細胞において区別して局在する、アポプチン関連タンパク質、すなわちAAP-1を同定した。このような結果は、AAP-1は、正常な2倍体細胞では腫瘍形成性細胞とは異なった方法で機能していることを示している。さらに、AAP-1とアポプチンが、同一の正常な形質転換していない細胞に発現する場合、2つのアポトーシス誘導タンパク質は細胞質に共局在する。

#### 【0087】

アポプチンタンパク質に対するSV40ラージT抗原の核局在シグナルの共有結合の誘導における効果

以下に実験において、我々は、アポプチンとSV40LT抗原の核局在シグナルのキメラタンパク質(SV40ラージT抗原のアミノ酸N末端-プロリン-プロリン-リジン-リジン-リジン-アルギニン-リジン-バリン-C末端がアポプチンのN末端と共有結合している)の発現が、形質転換していない、または形質転換している細胞においてアポトーシスの誘導を生じるかどうかを調べた。キメラタンパクはNLS-アポプチンと呼ぶ。

#### 【0088】

この目的で、キメラタンパク、NLS-アポプチンをコードするプラスミドで形質転換していないVH10ヒト線維芽細胞および形質転換している骨肉腫由来のSaos-2細胞(Danen-van Oorschot et al., 1997)に形質移入した。形質転換した細胞では、NLS-アポプチンの発現は、アポプチンの核への局在化を生じ、アポトーシスの誘導を生じた。しかしながら、正常なヒト線維芽細胞におけるNLS-アポプチンの発現は、アポプチンの核への局在化を生じたが、アポトーシスの誘導は生じなかった。このことは、核の中にアポプチンを輸送する「力」はそれ自体ではアポトーシス活性を生じないことを示している。アポプチンは、追加的な腫瘍関連事象を必要とすると思われる。

## 【0089】

正常なヒト線維芽細胞におけるA A P - 1に対するN L S - アポプチンの発現の影響

次に我々は、N L S アポプチンの発現が、正常なヒト線維芽細胞におけるA A P - 1の細胞内局在および/またはアポトーシス活性に影響を及ぼすかどうかを調べた。この目的で、N L S - アポプチンまたはA A P - 1をコードするプラスミドでV H 1 0細胞に共形質移入した。蛍光顕微鏡を用いた間接免疫蛍光法とD A P I染色によって、アポトーシスを誘導することなく、N L S - アポプチンとA A P - 1の双方が核に局在することが明瞭に立証された。このことは、N L S - アポプチンを介してA A P - 1を核に輸送する「力」それ自体では、A A P - 1のアポトーシス活性を生じないことを示している。A A P - 1様アポプチンが、形質転換された細胞の核においてアポトーシス誘導的になるには、追加的な腫瘍関連事象を必要とすると思われる。

## 【0090】

ヒトの2倍体の形質転換されていない細胞ではA A P - 1はアポトーシスを誘導しない。

## 【0091】

以下の実験において我々は、A A P - 1は単独で、またはアポプチンとの併用で、ヒトの腫瘍形成性/形質転換細胞で認められたように、ヒトの2倍体の形質転換していない線維芽細胞においてアポトーシスを誘導することができるかどうかを調べた。

## 【0092】

この目的で、上述したようにp M T 2 S M - A A P - 1 - bプラスミドでV H 1 0細胞に形質移入した。m y c - タグに特異的な、および/またはアポプチンに特異的な抗体を用いた免疫蛍光法およびD A P I染色によって、形質移入された細胞を解析した。D A P Iはアポトーシスを受けているDNAとは異なった方法で無傷のDNAを染色する(Telford, et al., 1992)。解析によって、A A P - 1単独、またはA A P - 1とアポプチンの両方を含有するV H 1 0線維芽細胞は、アポトーシスを受けないことが明瞭に示された。

## 【0093】

得られた結果は、AAP-1のようなアポプチン関連タンパク質は、腫瘍細胞と比べて、「健全な」細胞では異なった方法で挙動する可能性があることを示している。

## 【0094】

## 癌細胞の診断的アッセイ

現在の報告に基づいて、我々は、AAP-1の細胞内局在は、ヒトの正常な形質転換されていない細胞と比べて、腫瘍形成性/形質転換した細胞では異なっていると結論付けることができる。さらに、核におけるAAP-1の集積はアポトーシスの誘導と関連するが、細胞質における局在は細胞の生存率および正常な増殖能に関連する。したがって、我々は、正常な「健全な」形質転換していない細胞に対して、(ヒトの)癌細胞を同定するための診断的アッセイを開発することができる。

## 【0095】

該アッセイは、AAP-1をコードするプラスミドでたとえばヒトに由来する、(ヒトの)「疑わしい」細胞に形質移入すること、またはAAP-1を発現しているウイルスベクターを細胞に感染させることから成る。それに続いて、1) 過剰発現しているAAP-1遺伝子によるアポトーシスを受ける能力について、および2) 細胞質から核へのAAP-1の局在の移動について細胞を調べる。

## 【0096】

AAP-1の細胞内局在は、AAP-1に特異的なモノクローナル抗体および/または本明細書に記載されたmyc-タグのようなAAP-1に結合するタグに特異的なモノクローナル抗体による免疫蛍光法を用いて決定することができる。AAP-1を発現している分析した細胞におけるアポトーシスの比率および/またはAAP-1の核での局在の比率が、AAP-1陽性の対照の「健全な」細胞におけるものよりも有意に高ければ、分析した細胞が腫瘍形成性になっている/形質転換されていると結論付けることができる。陽性対照としては、AAP-1の発現には、既知のヒト腫瘍形成性細胞を使用する。

## 【0097】

SV40ラージT抗原とAAP-1の共発現は、AAP-1の転位およびアポトーシスの誘導を生じる。

【0098】

我々は、健常な個人に由来する正常なヒト細胞におけるAAP-1誘導のアポトーシスに対する形質転換遺伝子の発現の効果を調べた。この目的で、完全なAAP-1タンパク質をコードするプラスミドpMT2SM-AAP-1bおよびSV40ラージT抗原をコードするプラスミドpR-s884または陰性対照のプラスミドpCMV-neo (Noteborn and Zhang, 1998) のどちらかで、ヒトVH10、2倍体線維芽細胞に一過性に形質移入した。

【0099】

間接免疫蛍光法によって、AAP-1が誘導するアポトーシスについて細胞を分析した。AAP-1が陰性対照とともに形質移入された場合、正常なVH10細胞はアポトーシスを受けなかった。結果は、予想どおり、AAP-1の発現はヒトの正常な2倍体細胞ではアポトーシスを誘導することができず、上述のデータを裏付けた。しかしながら、AAP-1とSV40ラージT抗原の両方を発現しているヒトの正常な2倍体線維芽細胞は、AAP-1が誘導するアポトーシスを受けた。

【0100】

AAP-1耐性からAAP-1感受性への変遷は、おそらく、AAP-1タンパク質が細胞質局在から核局在に転位するという事実によって説明することができる。この変遷は、形質転換タンパク質である、SV40ラージT抗原をコードするプラスミドの形質移入の2日後にはすでに明らかになる。この例では、過剰発現したAAP-1の細胞質から核への転位を生じ、アポトーシスの誘導がそれに続く、DNA腫瘍ウイルスに由来する形質転換産物のために、このような出来事が起きると結論付けることができる。

【0101】

AAP-1が誘導するアポトーシスに基づいた、癌を誘導する遺伝子、物質、および癌の易発性に関する診断的アッセイ

現在の報告に基づいて、我々は、癌を誘導する、および/または形質転換する

物質または遺伝子の同定に関する診断的アッセイを開発することができる。

#### 【0102】

第1の種類のアッセイは、推定上の形質転換する/癌を誘導する遺伝子をコードするプラスミドと共に、AAP-1をコードするプラスミドで、たとえばヒト起源の「正常」細胞に形質移入すること、またはAAP-1を発現するウイルスベクターを該細胞に感染させることから成る。それに続いて、1) 過剰発現しているAAP-1遺伝子によるアポトーシスを受ける能力について、および2) 細胞質から核へのAAP-1の局在の移動について細胞を調べる。

#### 【0103】

AAP-1の細胞内局在は、AAP-1に特異的なモノクローナル抗体および/または本明細書に記載されたmyc-タグのようなAAP-1に結合するタグに特異的なモノクローナル抗体による免疫蛍光法を用いて決定することができる。AAP-1と推定上の形質転換する/癌を誘導する遺伝子を共発現している正常な細胞におけるアポトーシスの比率および/またはAAP-1の核での局在の比率が、対照プラスミドを発現しているAAP-1陽性の対照細胞におけるものよりも有意に高ければ、分析した遺伝子が実際に形質転換する/癌を誘導する活性を有していると結論付けることができる。

#### 【0104】

診断試験の第2の例は、推定上の発癌物質と共に培養した正常な2倍体細胞の治療に基づく。たとえば、種々の時間の長さで物質を培養培地に加えることができる。それに続いて、AAP-1をコードするプラスミドで細胞に形質移入する。このアプローチは、第1の正常な2倍体細胞に形質移入すること/感染させること、次いで調べるべき物質で細胞を治療することによっても行うことができる。

#### 【0105】

アッセイのそれに続く工程は、この項で第1の種類のアッセイで記載されたものと同様である。AAP-1と推定上の発癌物質を発現している正常な細胞におけるアポトーシスの比率および/またはAAP-1の核での局在の比率が、対照物質を発現しているAAP-1陽性の対照細胞におけるものよりも有意に高けれ

ば、分析した物質が実際に形質転換する / 癌を誘導する活性を有していると結論付けることができる。

#### 【0106】

診断試験の第3の例は、調べられるべき且つ好適な培地で培養されるべき、癌易発性の可能性のある個人の皮膚生検に由来する培養された正常の2倍体細胞の治療に基づく。次に細胞にUVを照射し、その後、AAP-1をコードするプラスミドで形質移入する、またはAAP-1を発現しているウイルスベクターを感染させる、もしくはまず、形質移入する / 感染させて、次いで照射する。並行して、正常な健常人の2倍体細胞を対照として使用する。

#### 【0107】

アッセイのそれ続く工程は、この項で第1の種類のアッセイで記載されたものと同様である。UV処理の後、癌易発性の可能性のある個人に由来する2倍体細胞におけるアポトーシスおよび / またはAAP-1の核局在に比率が、UV処理したAAP-1陽性の対照細胞よりも有意に高ければ、分析した個人は、癌易発性であると結論付けることができる。

#### 【0108】

AAP-1およびYY1は形質転換された細胞において互いに会合する。

AAP-1のマウスにおけるホモログである、RYBP (Garcia et al., 1999) はYY1と相互作用することができる。YY1は細胞性およびウイルス性のタンパク質の転写を活性化したり、抑制したりすることができる。タンパク-タンパクの相互作用はYY1の活性に影響を及ぼすことができる。AAP-1もYY1と相互作用する可能性がある。AAP-1とYY1との間の相互作用は、YY1の活性に影響を与えることができ、結果として転写の活性化または抑制を生じることができた。遺伝子の転写は、アポプチンおよび / またはAAP-1のアポトーシス活性に重要でありえた。

#### 【0109】

*in vitro*においてAAP-1がYY1と複合体を形成するかどうかを立証するために、AAP-1をコードするプラスミドおよびYY1をコードするプラスミド (pCMV-HAVY-1 ; 米国、ボストン、ハーバード大学医学部

、Yang, Shi教授より供与)をCos細胞に共形質移入した。陰性対照として、LacZとともにYY-1を形質移入した。細胞を溶解し、AAP-1(またはLacZ)のmycタグに対する特異的抗体、抗myc9E10およびYY1に対する特異抗体、抗YY1を用いて、免疫沈降アッセイを行った。生じた複合体をウエスタンブロット法により解析した。細胞溶解物では、予想どおり、AAP-1および/またはYY1および/またはLacZが検出された。

#### 【0110】

AAP-1およびYY1を形質移入した細胞では、mycタグの付いたAAP-1特異抗体で免疫沈降した場合、AAP-1とYY1の両方が検出できたことは明らかであった。プロットは32kD(AAP-1)のバンドと67kD(YY1)のバンドを示していた。さらに、我々は、YY1に特異的な抗体を用いて免疫沈降を行った。再び、ウエスタンブロットでは、YY1とAAP-1の両方が検出された。

#### 【0111】

AAP-1のみを発現するプラスミドで形質移入された細胞では、AAP-1のみを検出することができた。YY1をコードするプラスミドで形質移入された細胞は、YY1の発現を示し、AAP-1は検出されなかった。AAP-1のYY1との特異的な結合を除外するために、AAP-1とLacZを細胞に形質移入し、LacZに特異的な抗体で免疫沈降を行った。ウエスタンブロット上にLacZタンパクは現れたが、AAP-1タンパクは現れなかった。

#### 【0112】

したがって、得られた結果は、AAP-1は転写関連因子、YY1と特異的に結合することを示している。

#### 【0113】

MBP-AAP1とAAP1-(His)6の産生および単離

MBP-AAP1とAAP1(His)6の融合タンパクの産生の可能性を調べるために、タンパク過剰発現カセットpMALTBおよびpET22bで、オープンリーディングフレームをコードするAAP1核酸をクローニングした。製造元の指示書(ノバゲン)に従って、大腸菌細胞で誘導して可溶性融合タンパク

の産生を導いた。

【0114】

アフィニティ・クロマトグラフィ（アミロース樹脂；ニューイングランド バイオラボズ）およびイオン交換クロマトグラフィ（ハイ-S；バイオラッド）を紹介したMBP - AAP1融合タンパクの単離によって90～95%純粋な完全長のタンパク質が得られる。このタンパク質のサイズ除外クロマトグラフィ（ファルマシア・スーパーロース6HR 10/30）は、MBP - AAP1調製物の実質的な部分が、異なった1つの種、ホモ三量体または四量体として挙動するらしいことを示している。この知見は、組換えAAP1（MBP融合タンパクの形態）は、正しい折り畳みを行うことが可能であり、生物学的に活性があるらしいことを示唆している。

【0115】

金属アフィニティ・クロマトグラフィ（Ni<sup>2+</sup> - NTA；キアゲン）によるAAP1 - (His)<sub>6</sub>タンパクの単離によって±80%純粋なタンパク質バッチが得られた。

【0116】

結論的に言えば、AAP1のMBPへの融合は、生物学的に活性があると思われる、適正に折り畳まれた、可溶性のAAP1を生じる。

【0117】

AAP - 1タンパク質に対するポリクローナル抗体の作製

AAP - 1タンパク質に対するポリクローナル抗体を作製するために、推定上の免疫原性ペプチドを合成した（AAP - 1ペプチドは、アミノ酸N末端 - CTKTSETNHTSRPRLK - C末端から成る；ベルギー、SA、ユーロゲンテック）。その後、製造元の常法に従って特異的ペプチドをウサギに注射した。

【0118】

ELISAおよびウエスタンブロット解析によって、AAP - 1ペプチドを注射されたウサギに由来する血清は、上述のAAP - 1産物に特異的であることが示された。このような結果は、我々がアポプチン関連タンパク質、AAP - 1を検出するのに用いることができる特異的抗体を作製したことを意味する。

## 【0119】

結論的に言えば、我々は、特異的な因子によるA A P - 1タンパク質の機能の妨害によってアポトーシスの誘導が生じる証拠を提供した。A A P - 1タンパク質の機能妨害を利用して、( p 5 3 に非依存性の ) アポトーシスの誘導に基づいた治療法が可能である。かかる妨害因子の例はアポプチンである。アポトーシスを誘導し、アポプチン活性を高めることも知られているもう1つのC A V由来タンパク質はV P 2である ( Noteborn et al., 1997 )。

## 参考文献

1. Bellamy, C.O.C., Malcomson, R.D.G., Harrison, D.J., and Wyllie, H. 1995. Cell death and disease: The biology and regulation of apoptosis. *Seminars in Cancer Biology* 6, 3-12.
2. Danen-Van Oorschot, A.A.A.M., Fischer, D.F., Grimbergen, J.M., Klein, B., Zhuang, S.-M., Falkenburg, J.H.F., Backendorf, C., Quax, P.H.A., Van der Eb, J.A., and Noteborn, M.H.M. (1997). Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proceedings National Academy Sciences, USA*: 94, 5843-5847.
3. Danen-Van Oorschot, A.A.A.M, Den Hollander, A., Takayama, S., Reed, J., Van der Eb, A.J. and Noteborn, M.H.M. (1997a). BAG-1 inhibits p53-induced but not apoptin-induced apoptosis. *Apoptosis* 2, 395-402.
4. Duke, R.C., Ocjius, D.M., Young, J, D-E. (1996). Cell suicide in health and disease. *Scientific American* December 1996, 48-55.
5. Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.-L., Yeh, S.-H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.-H., and Elledge, S.J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphate type I catalytic subunit. *Genes and Development* 7, 555-569.
6. Earnshaw, W.C., 1995. Nuclear changes in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 337-343.
7. Fields, S. and Song, O.K. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
8. Garcia, E., Marcos-Gutierrez, C., Del Mar Lorente, M., Moreno, J.C., and Vidal, M. RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian polycomb complex, and with the transcription factor YY1. (1999). *EMBO Journal* 18, 3404-3418.

9. Hockenberry, D.M. (1994). Bcl-2 in cancer, development and apoptosis. *Journal of Cell Science*, Supplement 18, 51-55.
10. Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57, 267-272.
11. Kerr, J.F.R., Winterford, C.M., and Harmon, B.V. (1994). Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013-2026.
12. Klebe, R.J., Harriss, J.V., Sharp, Z.D., and Douglas, M.G. (1983). A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* 25, 333-341.
13. Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
14. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press, New York, USA.
15. McDonnell T.J., Meyn, R.E., Robertson, L.E. (1995). Implications of apoptotic cell death regulation in cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* 6, 53-60.
16. Noteborn, M.H.M. (1996). PCT application WO 96/41191. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells as essential characteristic for the development of an anti-tumor therapy.
17. Noteborn, M.H.M., and De Boer, G.F. (1996). Patent USA/no. 030, 335.
18. Noteborn, M.H.M., De Boer, G.F., Van Roozelaar, D., Karreman, C., Kranenburg, O., Vos, J., Jeurissen, S., Zantema, A., Hoeben, R., Koch, G., Van Ormondt, H., and Van der Eb, A.J. (1991). Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *Journal of Virology* 65, 3131-3139.

19. Noteborn, M.H.M., and Pietersen, A. (1998). A gene delivery vehicle expressing the apoptosis-inducing proteins VP2 and/or apoptin. PCT Application no. PCT/NL98/00213
20. Noteborn, M.H.M., Todd, D., Verschueren, C.A.J., De Gauw, H.W.F.M., Curran, W.L., Veldkamp, S., Douglas, A.J., McNulty, M.S., Van der Eb, A.J., and Koch, G. (1994). A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *Journal of Virology* 68, 346-351.
21. Noteborn, M.H.M., Verschueren, C.A.J., Koch, G., and Van der Eb, A.J. (1998). Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope. *Journal General Virology*, 79, 3073-3077.
22. Noteborn, M.H.M., and Zhang, Y. (1998). Methods and means for determining the transforming capability of agents, for determining the predisposition of cells to become transformed and prophylactic treatment of cancer using apoptin-like activity. PCT Application no. PCT/NL98/00457
23. Noteborn, M.H.M., Danen-van Oorschot, A.A.A.M., Van der Eb, A.J. (1998a). Chicken anemia virus: Induction of apoptosis by a single protein of a single-stranded DNA virus. *Seminars in Virology* 8, 497-504.
24. Paulovich, A.G., Toczyski, D., Hartwell, H. (1997). When checkpoints fail. *Cell* 88, 315-321.
25. Pietersen, A.M., Van der Eb, M.M., Rademaker, H.J., Van den Wollenberg, D.J.M., Rabelink, M.J.W.E., Kuppen, P.J.K., Van Dierendonck, J.H., Van Ormondt, H., Masman, D., Van de Velde, C.J.H., Van der Eb, Hoeben, R.C., and Noteborn, M.H.M. (1998). Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene. *Gene Therapy* 6, 882-892.
26. Rose, M.D., Winston, F., and Hieter, P. (1990). *Methods in yeast genetics. A laboratory course manual.*

- Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
27. Sachs, L. and Lotem, J. (1993). Control of programmed cell death in normal and leukemia cells: New implications for therapy. *Blood* 82, 15-21.
  28. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings National Academic Sciences USA* 74, 5463-5467.
  29. Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449.
  30. Telford, W.G., King, L.E., Fraker, P.J. (1992). Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry* 13, 137-143.
  31. Teodoro, J.G. and Branton, P.E. (1997). Regulation of apoptosis by viral gene products. *Journal of Virology* 71, 1739-1746.
  32. Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
  33. White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes and development* 10, 1-15.
  34. Wyllie, A.H. (1995). The genetic regulation of apoptosis. *Current Opinion in Genetics and Development* 5, 97-104.
  35. Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R. (1980). Cell death: The significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 68, 251-306.
  36. Yang, X., Hubbard, E.J.A., and Carlson, M. (1992). A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science* 257, 680-682.
  37. Zhuang, S.-M., Landegent, J.E., Verschueren, C.A.J., Falkenburg, J.H.F., Van Ormondt, H., Van der Eb, A.J., Noteborn, M.H.M. (1995). Apoptin, a protein encoded by chicken anemia virus, induces cell death in various human hematologic malignant cells in vitro. *Leukemia* 9 S1, 118-120.

38. Zhuang, S.-M., Shvarts, A., Van Ormondt, H., Jochemsen, A.-G., Van der Eb, A.J., Noteborn, M.H.M. (1995). Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces a p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Research* 55, 486-489.

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

ベクター pMT2SM - AAP - 1 - a の部分配列を示す。AAP - 1 - a cDNA の DNA 配列は太字で示す。

##### 【図2】

ベクター pMT2SM - AAP - 1 - b の部分配列を示す。AAP - 1 - b cDNA の DNA 配列は太字で示す。

##### 【図3】

アポプチン関連クローン AAP - 1 - b (太字) の解析された領域のアミノ酸配列を示す。さらに、AAP - 1 アミノ酸配列が GAL4 活性化ドメインとともにインフレームにあることを説明するために、pACT の複数クローニング部位の3つのC末端アミノ酸、H - E - G を示す。この特徴は、AAP - 1 領域が酵母細胞で実際に合成されることを立証している。図3における23位のアミノ酸が AAP - 1 様タンパク質の最初のアミノ酸に相当することに注目のこと。

本明細書における機能的ドメインまたは断片は、たとえば、アミノ酸1位(図3における23位)から約54位までの転写因子結合ドメイン;アミノ酸約25位(図3における47位)から約42位までの亜鉛フィンガーモチーフ、タンパク-タンパク相互作用および/またはタンパク-核酸相互作用ドメイン;アミノ酸の約32~226位であるアポトーシス関連領域;アミノ酸の約74~81位である核局在化シグナル;およびアミノ酸の102~108位である核局在化シグナル、またはもう1つのAAP - 1 様タンパク質における同等位として同定することができる。

##### 【図4】

Saos - 2 細胞における AAP - 1 - b タンパク質のアポトーシス活性を、

単独で発現した場合（黒色四角）またはアポプチンと組み合わせた場合（白抜き  
の四角）で示す。アポプチン誘導のアポトーシスの比率も示す（黒色三角）。

## 【図1】

```

                                XhoI
1      ACCANACCCAAAAAAGAGATCTGGAATTCGGATCCTCGAGGCCACGAAGGCCGAAACAG
61     TGCTGAAGCCTTTAAATGCAGCATCTGCGATGTGAGGAAAGGCACCTCCACCAGAAAACC
121    TCGGATCAATTCTCAGCTGGTGGCNCAACAAGTGGCACAACAGTATGCCACCCACCACC
181    CCTAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAGTTGAAAAGCAGGACAAAGAGAAACCTGAGAAAAGA
241    CAAGGAAATTAGTCCTAGTGTACCAAGAAAAATACCAACAAGAAAACCAAACCAAAGTC
301    TGACATTCTGAAGATCCTCCTAGTGAAGCAAACAGCATACAGTCTGCCAAATGCTACAA
361    AAAGACCAGCGAAACAAATCACACCTCAAGGCCCCGGCTGAAAACGTGGACAGGAGCAC
421    TGCACAGCAGTTGGCAGTAACTGTGGGCAACGTCACCGTCATTATCACAGACTTTAAGGA
481    AAAGACTCGCTCCTCATCGACATCCTCATCCACAGTGACCTCCAGTGCAGGGTCAGAACA
541    GCAGAACCAGASCAGCTCGGGGTCAGAGAGCACAGACAAGGGCTCCTCCCGTTCCTCCAC
601    GCCAAAGGGCGACATGTCAGCAGTCAATGATGAATCTTCTGAAATTGCACATGGAATTG
661    TGAAAACATGAATCAGGGTATGAAATTCAAAACCTCCACCTGCCCATGCTGCTTGCAATC
721    CCTGGAGAATCTTCTGTGGACATCGACCTCTTAGTGATGCTGCCAGGATAATTTCTGCTT
781    GCCATGGGCATCTGGCCACCAAGGAATTCGCACCTGACGATTACTCTTGACACTTTTA
841    TGTATTCCATTGTTTTATATGATTTTCCTAACAAATCATTATAATTGGATGTGCTCCTGA
                                XhoI
901    ATCTACTTTTTATAAAAAAGCCTTYGTGGCCTCGAGAGATCTATGA

```

Fig. 1

## 【図2】

```

1      TATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACCCACCAACCCAAAAAAGAGATCTGGAAT
      XhoI
61     TCGGATCCTCGAGGCCACGAAGGCCTTCTCCTCCGAGCGGGCCGGTTTCGGCTTGGGG
121    GGGGCGGGGTACAGCCCATCCATGACCATGGGCGACAAGAAGAGCCCGACCAGGCCAAAA
181    AGACAAGCGAAACCTGCCGAGACGAAGGGTTTTGGGATTGTAGCGTCTGCACCTTCAGA
241    AACAGTGTGAGCCTTTAAATGCAGCATCTGCGATGTGAGGAAAGGCACCTCCACCAGA
301    AAACCTCGGATCAATTCTCAGTGGTGGCACAACAAGTGGCACAACAGTATGCCACCCCA
361    CCACCCCTAAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAGTTGAAAAGCAGGACAAAGAGAAACCTGAG
421    AAAGACAAGGAAATTAGTCTAGTGTACCAAGAAAAATACCAACAAGAAAACCAAACCA
481    AAGTCTGACATTCTGAAAGATCCTCCTAGTGAAGCAAACAGCATACAGTCTGCAAATGCT
541    ACAACAAAGACCAGCGAAACAAATCACACCTCAAGGCCCCCGGCTGAAAAACGTGGACAGG
601    AGCACTGCACAGCAGTTGGCAGTAACCTGTGGCAACGTCACCGTCATTATCACAGACTTT
661    AAGGAAAAGACTCGCTCCTCATCGACATCCTCATCCACAGTGACCTCCAGTGCAGGGTCA
721    GAACAGCAGAACCAGAGCAGCTCGGGGTCAGAGAGCACAGACAAGGGCTCCTCCCGTTCC
781    TCCACGCCAAAGGGCGACATGTCAGCAGTCAATGATGAATCTTTCTGAAATTGCACATGG
841    AATTGTGAAACTATGAATCAGGGTATGAAATTCAAAACCTCCACCTGCCCATGCTGCTT
901    GCATCCCTGGAGAATCTTCTGTGGACATCGACCTCTTAGTGATGCTGCCAGGATAATTT
961    TGCTTGCCATGGGCACTGGCCACCAAGGAATTCGCACCCCTGACGATTACTCTTGACAC
1021   TTTTATGTATCCATGTTTTTATATGATTTTCTTACAATCATTATAATTGGATGTGCT
      XhoI
1081  CCTGAATCTACTTTTTTATAAAAAGGCCTTCGTGGCCTCGAGAGATCTATGA

```

Fig. 2

## 【図3】

```

1      HEGLSPPSGA GFGLGGAGYS PSMIMGDKKS PTRPKRQAKP
41     AADEGFWDCS VCTFRNSAEA FKCSICDVRK GTSTRKPRIN
81     SOLVAQQVAQ QYATPPPPKK EKKEKVEKQD KEKPEKDKEI
121    SPSVTKKNTN KKTKPKSDIL KDPPSEANSI QSANATTKTS
161    ETNHTSRPRL KNVDRSTAQQ LAVTVGNVTV IITDFKEKTR
201    SSSSTSSSTVT SSAGSEQQNQ SSSGSESTDK GSSRSSTPKG
241    DMSAVNDESF *NCTWNCENY ESGYEIQNLH LPMLLASLEN
281    LLWTSTS**C CQDNFCLPWA SGHQGISHPD DYS*HFYVFH
321    CFI*FS*QSF IIGCAPESTF YKKAFFVASRD L*

```

Fig. 3

【図4】

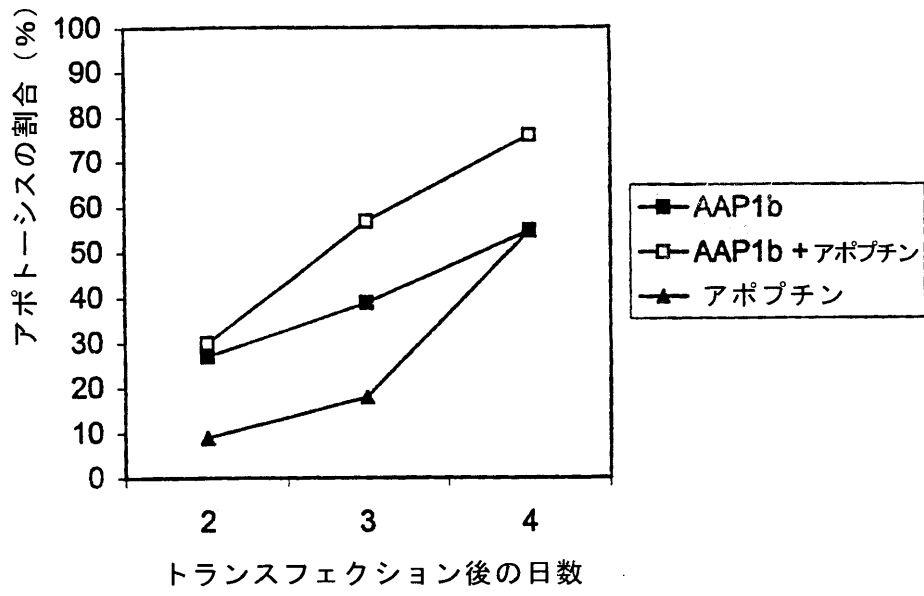


Fig. 4

## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT   |  | International Application No.<br>PCT/NL 00/00612  |
|---|--|---|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 7 C12N15/12 C12N5/10 C12N1/19 C07K14/47 C07K16/18<br>A61K48/00 A61K38/17 A61K31/713 A61P35/00 A61P37/00<br>C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/50   |  |   |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |  |   |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 C12N C07K A61K A61P C12Q G01N   |  |   |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |  |   |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, MEDLINE  |  |   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |  |   |
| Category *  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.   |
| X   | GARCIA E ET AL: "RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1"<br>EMBO JOURNAL,<br>vol. 18, no. 12,<br>15 June 1999 (1999-06-15), pages<br>3404-3418, XP002131759<br>cited in the application<br>98.7% identity in 226 aa overlap with SeqIdNo.10 / 91.1% identity in 824 nt overlap with SeqIdNo.9<br>---<br>--- | 1-4, 6-18   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.  |  | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.  |
| * Special categories of cited documents :   |  |   |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>*E* earlier document but published on or after the international filing date<br>*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)<br>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed |  | *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>*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<br>*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.<br>*&* document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search   |  | Date of mailing of the international search report  |
| 20 February 2001  |  | 06/03/2001  |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax (+31-70) 340-3016   |  | Authorized officer<br><br>Lonnoy, O   |

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intl. Application No  
 PCT/NL 00/00612

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                             |
|--|---|-----------------------------|
| Category   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.       |
| X  | DATABASE EMHUMI<br>E.M.B.L. Databases;<br>Accession Number: AF179286,<br>1 September 1999 (1999-09-01)<br>ZHENG L ET AL: "Homo sapiens death<br>effector domain-associated factor mRNA,<br>complete cds"<br>XP002160804<br>99.514% identity in 1029 nt overlap with<br>SeqIdNo.9<br>abstract    | 1-18                        |
| X  | DATABASE EM_HUM<br>E.B.I., Hinxton, U.K.;<br>Accession Number: AF085840,<br>29 August 1998 (1998-08-29)<br>WOESSNER J ET AL: "Homo sapiens full<br>length insert cDNA clone YI44E12"<br>XP002160805<br>abstract   | 1-7                         |
| X  | WO 99 28460 A (LEADD B V ;DANEN VAN<br>OORSCHOT ASTRID ADRI (NL); NOTEBORN<br>MATHIEU H) 10 June 1999 (1999-06-10)<br>the whole document  | 1,2,4,<br>8-13,15,<br>17-33 |
| X  | EP 0 924 296 A (LEADD B V)<br>23 June 1999 (1999-06-23)<br><br>the whole document   | 1,2,4,<br>8-13,15,<br>17-33 |
| X  | WO 99 28461 A (LEADD B V ;DANEN VAN<br>OORSCHOT ASTRID ADRI (NL); NOTEBORN<br>MATHIEU H) 10 June 1999 (1999-06-10)<br>claim 8   | 1,2,4,<br>8-13,15,<br>17-33 |
| P,X  | WO 99 57144 A (INCYTE PHARMA INC<br>;PATTERSON CHANDRA (US); AZIMZAI YALDA<br>(US); RED) 11 November 1999 (1999-11-11)<br>SeqIdNo.43: 100.0% identity in 228 aa<br>overlap with SeqIdNo.10 / SeqIdNo.108:<br>98.9% identity in 1046 bp overlap with<br>SeqIdNo.9                                | 1-18,22                     |
| P,X  | DATABASE EM_HUM<br>E.B.I., Hinxton, U.K.;<br>Accession Number: AB029551,<br>19 January 2000 (2000-01-19)<br>SAWA C ET AL: "Homo sapiens YEAF1 mRNA for<br>YY1 and E4TF1 associated Factor 1,<br>complete cds"<br>XP002160806<br>98.7% identity in 1046 nt overlap with<br>SeqIdNo.9<br>abstract | 1-18,22                     |
|  | ---   |                             |
|  | -/--  |                             |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int: Jonal Application No  
PCT/NL 00/00612

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| A  | DANEN-VAN OORSCHOT A A A M ET AL:<br>"APOPTIN INDUCES APOPTOSIS IN HUMAN<br>TRANSFORMED AND MALIGNANT CELLS BUT NOT IN<br>NORMAL CELLS"<br>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF<br>SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF<br>SCIENCE. WASHINGTON,<br>vol. 94, 1 May 1997 (1997-05-01), pages<br>5843-5847, XP002052232<br>ISSN: 0027-8424<br>cited in the application<br>--- |                       |
| A  | ZHUANG S -M ET AL: "APOPTIN, A PROTEIN<br>DERIVED FROM CHICKEN ANEMIA VIRUS, INDUCES<br>P53- INDEPENDENT APOPTOSIS IN HUMAN<br>OSTEOSARCOMA CELLS"<br>CANCER RESEARCH,US,AMERICAN ASSOCIATION<br>FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD,<br>vol. 55, no. 3,<br>1 February 1995 (1995-02-01), pages<br>486-489, XP000602162<br>ISSN: 0008-5472<br>---                               |                       |
| A  | WO 96 41191 A (AESCULAAP BV)<br>19 December 1996 (1996-12-19)<br>cited in the application<br>---   |                       |
| A  | WO 98 46760 A (PIETERSEN ALEXANDRA MARIA<br>;LEADD B V (NL); NOTEBORN MATHEUS HUBERT)<br>22 October 1998 (1998-10-22)<br>cited in the application<br>---   |                       |
| A  | KALENIK J ET AL: "Yeast two-hybrid<br>cloning of a novel zinc finger protein<br>that interacts with the multifunctional<br>transcription factor YY1"<br>NUCLEIC ACIDS RESEARCH.,<br>vol. 25, no. 4,<br>15 February 1997 (1997-02-15), pages<br>843-849, XP002160803<br>---   |                       |
| A  | WO 99 08108 A (LEADD B V ;NOTEBORN MATHIEU<br>HUBERTUS MARI (NL))<br>18 February 1999 (1999-02-18)<br>cited in the application<br>-----  |                       |

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-34

Present claim 6 relates to a nucleic acid capable of hybridising to a nucleic acid molecule encoding an apoptin-associating proteinaceous substance as shown in figure 1 or 2.

Present claim 7 relates to a nucleic acid being at least 70% homologous to a nucleic acid molecule encoding an apoptin-associating proteinaceous substance as shown in figure 1 or 2.

Present claims 4, 5 and claims dependent thereon relate to an extremely large number of possible compounds. In fact, backtranslation of the polypeptide sequence in polynucleotide sequence already generates a very great number of nucleic acid sequences. A claim relating to a nucleic acid hybridising to said polynucleotide sequence embraces an enormous set of theoretically possible nucleic acid sequences. Hence, the claims contain so many possible embodiments that a lack of clarity (and conciseness) within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT arise to such an extent as to render a meaningful search of the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and concise), namely to the conventional nucleic acid/nucleic acid, protein/protein, and protein/six-frame translated nucleic acid comparisons of the sequences of the figures 1, 2 and 3.

Present claim 1 relates to a nucleic acid encoding an apoptin-associating proteinaceous substance capable of providing apoptosis.

Present claim 12 relates to an apoptin-associating proteinaceous substance capable of providing apoptosis.

Present claims 1, 12 and claims dependent thereon relate to compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that they are capable of providing apoptosis. The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds depicted in figure 1, figure 2 and figure 3.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int: lonal Application No

PCT/NL 00/00612

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9928460 A                              | 10-06-1999          | EP 0921192 A               | 09-06-1999          |
|   |                     | AU 1446099 A               | 16-06-1999          |
|   |                     | EP 1036171 A               | 20-09-2000          |
| EP 0924296 A                              | 23-06-1999          | NONE                       |                     |
| WO 9928461 A                              | 10-06-1999          | EP 0927757 A               | 07-07-1999          |
|   |                     | AU 1511899 A               | 16-06-1999          |
|   |                     | EP 1036173 A               | 20-09-2000          |
| WO 9957144 A                              | 11-11-1999          | AU 3885999 A               | 23-11-1999          |
|   |                     | EP 1075518 A               | 14-02-2001          |
| WO 9641191 A                              | 19-12-1996          | AU 718422 B                | 13-04-2000          |
|   |                     | AU 5913696 A               | 30-12-1996          |
|   |                     | CA 2221495 A               | 19-12-1996          |
|   |                     | EP 0830604 A               | 25-03-1998          |
|   |                     | JP 11506340 T              | 08-06-1999          |
|   |                     | US 5958424 A               | 28-09-1999          |
| WO 9846760 A                              | 22-10-1998          | EP 0872552 A               | 21-10-1998          |
|   |                     | EP 0878546 A               | 18-11-1998          |
|   |                     | AU 6856398 A               | 11-11-1998          |
|   |                     | BR 9808542 A               | 23-05-2000          |
|   |                     | EP 0975764 A               | 02-02-2000          |
|   |                     | NO 994967 A                | 15-12-1999          |
|   |                     | PL 336312 A                | 19-06-2000          |
|   |                     | SK 142899 A                | 12-06-2000          |
| WO 9908108 A                              | 18-02-1999          | AU 8752998 A               | 01-03-1999          |
|   |                     | BR 9811163 A               | 25-07-2000          |
|   |                     | EP 1004021 A               | 31-05-2000          |
|   |                     | NO 20000736 A              | 11-04-2000          |
|   |                     | PL 338683 A                | 20-11-2000          |



|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | Apoptin相关蛋白   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2003510030A</a>   | 公开(公告)日 | 2003-03-18 |
| 申请号            | JP2001519726  | 申请日     | 2000-09-01 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 利德股份有限公司  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | Reato基地.磷酸盐.  |         |            |
| [标]发明人         | ノテポーンマティーウヒューベルツスマリア<br>ダネンファンオールスホットアストリトアドリアナアンナマリア   |         |            |
| 发明人            | ノテポーン,マティーウヒューベルツスマリア<br>ダネン-ファン オールスホット,アストリト アドリアナ アンナ マリア  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/48 A61K38/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/19 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/574  |         |            |
| CPC分类号         | C07K16/18 A61K38/00 A61K48/00 C07K14/4747   |         |            |
| FI分类号          | A61K48/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00.105 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/19 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/48.M G01N33/48.P G01N33/53.D G01N33/574.D C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B A61K37/02  |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA12 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QQ02 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QS34 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/DA27 4C084/NA14 4C084/ZB21 4C084/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74 |         |            |
| 优先权            | 1999202858 1999-09-02 EP<br>1999203465 1999-10-21 EP  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

本发明涉及细胞凋亡领域。本发明提供了一种新颖的联合疗法，其可以单独地，顺序地或与凋亡素协同作用，例如其中p53没有（部分）功能。它提供了新的治疗潜力，例如新的治疗化合物。

