

(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 - 511076

(P2003 - 511076A)

(43)公表日 平成15年3月25日(2003.3.25)

(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 31/711	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/711		35/76	4 B 0 2 4
35/76		39/395	D 4 B 0 5 0
38/00			N 4 B 0 6 3
39/395		48/00	4 B 0 6 4
審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全148数 ) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 530493(P2001 - 530493)

(86) (22)出願日 平成12年10月13日(2000.10.13)

(85)翻訳文提出日 平成14年4月12日(2002.4.12)

(86)国際出願番号 PCT/US00/28364

(87)国際公開番号 W001/027290

(87)国際公開日 平成13年4月19日(2001.4.19)

(31)優先権主張番号 60/159,613

(32)優先日 平成11年10月14日(1999.10.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/175,534

(32)優先日 平成12年1月11日(2000.1.11)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 キュラジェン コーポレイション  
アメリカ合衆国 コネチカット州 06511  
ニュー ヘイブン ロング ウォーフ ド  
ライブ 555

(72)発明者 クイン, ケリー イー.  
アメリカ合衆国 コネチカット 06790,  
トリントン, グリーンフィールド ドライ  
ブ 51

(74)代理人 弁理士 山本 秀策 ( 外 2 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質およびそれをコードする核酸

(57)【要約】

大動脈カルボキシペプチダーゼ関連ポリペプチドをコードする核酸、これらの核酸によってコードされるポリペプチド、およびこれらの核酸およびポリペプチドを用いる方法が開示される。1つの実施形態において、A C P L Xタンパク質は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態において、A C P L Xタンパク質は、配列番号2に実質的に相同であり、そして以下に詳細に議論されるように、天然の対立遺伝子改変体または変異誘発に起因してアミノ酸配列が異なるが、配列番号2のタンパク質の機能的活性を保持する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 単離されたポリペプチドであって、以下：

- a) 配列番号2によって提供されるアミノ酸配列の成熟形態；
  - b) 配列番号2によって提供されるアミノ酸配列の成熟形態の改変体であって、ここで、該成熟形態中の任意のアミノ酸が異なるアミノ酸に改変され、ただし、該成熟形態の配列中の15%以下のアミノ残基がそのように改変される、改変体；
  - c) 配列番号2によって提供されるアミノ酸配列；
  - d) 配列番号2によって提供されるアミノ酸配列の改変体であって、ここで該選択された配列中で特定される任意のアミノ酸が異なるアミノ酸に改変され、ただし、該配列中の15%以下のアミノ酸残基がそのように改変される、改変体；  
および
  - e) a) ~ d) のいずれかのフラグメント
- からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項2】 請求項1に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドが、配列番号2によって提供されることによって提供される配列の天然に存在する対立遺伝子改変体である、ポリペプチド。

【請求項3】 請求項2に記載のポリペプチドであって、ここで、前記改変体が単一ヌクレオチド多型の翻訳である、ポリペプチド。

【請求項4】 請求項1に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドが請求項1に記載の改変体ポリペプチドであり、ここで、前記選択された配列中で特定される任意のアミノ酸が保存的置換を提供するように改変される、ポリペプチド。

【請求項5】 単離された核酸分子であって、該核酸分子が、以下：

- a) 配列番号2によって提供されるアミノ酸配列の成熟形態；
- b) 配列番号2によって提供されるアミノ酸配列の成熟形態の改変体であって、ここで、該選択された配列の該成熟形態中の任意のアミノ酸が異なるアミノ酸に改変され、ただし、該成熟形態の配列中の15%以下のアミノ残基がそのように改変される、改変体；

c) 配列番号2によって提供されるアミノ酸配列；

d) 配列番号2によって提供されるアミノ酸配列の改変体であって、ここで、該選択された配列中で特定される任意のアミノ酸が異なるアミノ酸に改変され、ただし、該配列中の15%以下のアミノ酸残基がそのように改変される、改変体；

e) 配列番号2によって提供されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの任意の改変体の、少なくとも一部をコードする核酸フラグメントであって、ここで、該選択された配列の任意のアミノ酸が異なるアミノ酸に改変され、ただし、該配列中の10%以下のアミノ酸残基がそのように変化される、核酸フラグメント；および

f) 該核酸分子のいずれかの相補体からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項6】 請求項5に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子が天然に存在する対立遺伝子核酸改変体のヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項7】 改変体ポリペプチドをコードする請求項5に記載の核酸分子であって、ここで、該改変体ポリペプチドが天然に存在するポリペプチド改変体のポリペプチド配列を有する、核酸分子。

【請求項8】 請求項5に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子が前記改変体ポリペプチドをコードする単一ヌクレオチド多型を含む、核酸分子。

【請求項9】 請求項5に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子が以下：

a) 配列番号1によって提供されるヌクレオチド配列；

b) ヌクレオチド配列であって、ここで、配列番号1によって提供されるヌクレオチド配列中の1つ以上のヌクレオチドが、該選択された配列によって提供されるヌクレオチドから異なるヌクレオチドに改変され、ただし、17%以下のヌクレオチドがそのように改変される、ヌクレオチド配列；

c) 配列番号1によって提供される配列の核酸フラグメント；および

d) 核酸フラグメントであって、ここで、配列番号1によって提供されるヌク

レオチド配列中の1つ以上のヌクレオチドが、該選択された配列によって提供されるヌクレオチドから異なるヌクレオチドに改変され、ただし、17%以下のヌクレオチドがそのように改変される、核酸フラグメント；

からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項10】 請求項5に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子は、配列番号1によって提供されるヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列の相補鎖にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、核酸分子。

【請求項11】 請求項5に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子が、以下：ヌクレオチド配列であって、前記選択されたヌクレオチド配列のコード配列において特定される任意のヌクレオチドが、該選択された配列によって提供されるヌクレオチドから異なるヌクレオチドに改変され、ただし、該選択されたコード配列中の17%以下のヌクレオチドがそのように変化される、ヌクレオチド配列、第1のポリヌクレオチドの相補体である単離された第2のポリヌクレオチド、またはこれらいずれかのフラグメントを含む、核酸分子。

【請求項12】 請求項11に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項13】 前記核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む、請求項12に記載のベクター。

【請求項14】 請求項12に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項15】 請求項1に記載のポリペプチドに免疫特異的に結合する、抗体。

【請求項16】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項15に記載の抗体。

【請求項17】 前記抗体がヒト化抗体である、請求項15に記載の抗体。

【請求項18】 サンプル中の請求項1に記載のポリペプチドの存在または量を決定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 該サンプルを提供する工程；

(b) 該サンプルに該ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体を導入する工程；および

(c) 該ポリペプチドに結合する抗体の存在または量を測定して、それによって該サンプル中のポリペプチドの存在または量を決定する工程、を包含する、方法。

【請求項19】 サンプル中の請求項5に記載の核酸分子の存在または量を決定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 該サンプルを提供する工程；  
(b) 該サンプルに該核酸分子に結合するプローブを導入する工程；および  
(c) 該核酸分子に結合する該プローブの存在または量を測定して、それによって該サンプル中の該核酸分子の存在または量を決定する工程、を包含する、方法。

【請求項20】 請求項1に記載のポリペプチドに結合する因子を同定する方法であって、該方法は、以下：

(a) 該ポリペプチドに該因子を導入する工程；および  
(b) 該因子が該ポリペプチドに結合するか否かを決定する工程、を包含する、方法。

【請求項21】 病態の処置における使用のための潜在的な治療因子を同定するための方法であって、ここで、該病態は、請求項1に記載のポリペプチドの異常な発現または異常な生理学的相互作用に関連し、該方法は、以下：

(a) 請求項1に記載のポリペプチドを発現しかつ該ポリペプチドに起因する特性または機能を有する細胞を提供する工程；  
(b) 候補物質を含有する組成物と該細胞とを接触させる工程；および  
(c) 該物質が該ポリペプチドに起因する該特性または該機能を変更するか否かを決定する工程を包含し、

これによって、該物質の存在中に観察された変更が、該細胞を該物質を欠く組成物と接触させた際に観察されない場合、該物質が潜在的な治療因子として同定される、方法。

【請求項22】 請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節するための方法であって、該方法は、請求項1に記載のポリペプチドを発現する細胞サンプルに、該ポリペプチドの活性を調節するに十分な量で該ポリペプチドに結合する化

合物を導入する工程を包含する、方法。

【請求項23】 請求項1に記載のポリペプチドと関連する病態を処置または予防する方法であって、該方法は、そのような処置または予防が所望される被験体に、該被験体の該病態を処置または予防するに十分な量で請求項1に記載のポリペプチドを投与する工程を包含する、方法。

【請求項24】 前記被験体がヒトである、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 請求項1に記載のポリペプチドと関連する病態を処置または予防する方法であって、該方法は、そのような処置または予防が所望される被験体に、該被験体の該病態を処置または予防するに十分な量で請求項5に記載の核酸を投与する工程を包含する、方法。

【請求項26】 前記被験体がヒトである、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 請求項1に記載のポリペプチドと関連する病態を処置または予防する方法であって、該方法は、そのような処置または予防が所望される被験体に、該被験体の該病態を処置または予防するに十分な量で請求項15に記載の抗体を投与する工程を包含する、方法。

【請求項28】 前記被験体がヒトである、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 請求項1に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含有する、薬学的組成物。

【請求項30】 請求項5に記載の核酸分子および薬学的に受容可能なキャリアを含有する、薬学的組成物。

【請求項31】 請求項15に記載の抗体および薬学的に受容可能なキャリアを含有する、薬学的組成物。

【請求項32】 請求項29に記載の薬学的組成物を1つ以上の容器に含む、キット。

【請求項33】 請求項30に記載の薬学的組成物を1つ以上の容器に含む、キット。

【請求項34】 請求項31に記載の薬学的組成物を1つ以上の容器に含む、キット。

【請求項35】 ヒトの疾患と関連する症候群を処置するための医薬の製造

における治療剤の使用であって、該疾患が請求項1に記載のポリペプチドと関連する病態から選択され、ここで、該治療剤が請求項1に記載のポリペプチドである、使用。

【請求項36】 ヒトの疾患と関連する症候群を処置するための医薬の製造における治療剤の使用であって、該疾患が請求項1に記載のポリペプチドと関連する病態から選択され、ここで、該治療剤が請求項5に記載の核酸である、使用。

【請求項37】 ヒトの疾患と関連する症候群を処置するための医薬の製造における治療剤の使用であって、該疾患が請求項1に記載のポリペプチドと関連する病態から選択され、ここで、該治療剤が請求項15に記載の抗体である、使用。

【請求項38】 請求項1に記載のポリペプチドと関連する病態に対する活性もしくは潜伏のモジュレーターまたは該病態の疾病素質をスクリーニングするための方法であって、該方法は、以下：

a) 請求項1に記載のポリペプチドと関連する病態に対する増加した危険状態の試験動物に試験化合物を投与する工程であって、ここで、該試験動物は請求項1に記載のポリペプチドを組み換え発現する、工程；

b) 工程(a)の該化合物を投与する工程の後に該試験動物中の該ポリペプチドの活性を測定する工程；および

c) 該試験動物における該タンパク質の活性を、該ポリペプチドが投与されていないコントロール動物における該ポリペプチドの活性と比較する工程であって、ここで、該コントロール動物に関連した該試験動物中の該ポリペプチドの活性における変化は、該試験化合物が請求項1に記載のポリペプチドと関連する病態の潜伏のモジュレーターまたは該病態の疾病素質であることを示す、工程を包含する、方法。

【請求項39】 請求項36に記載の方法であって、ここで、前記試験動物が、野生型試験動物に関連して増加したレベルで、試験タンパク質導入遺伝子を発現するかまたはプロモーターの制御下で該導入遺伝子を発現する、組換え試験動物であり、ここで、該プロモーターは、該導入遺伝子のネイティブな遺伝子プ

ロモーターではない、方法。

【請求項40】 第1の哺乳動物被験体における請求項1に記載のポリペプチドの変化したレベルと関連する疾患の存在または該疾患の疾病素質を決定するための方法であって、該方法は、以下：

a) 該第1の哺乳動物被験体由来のサンプル中の該ポリペプチドの発現レベルを測定する工程；および

b) 工程(a)の該サンプル中の該ポリペプチドの量を、該疾患を有さないことが既知であるかまたは該疾患にかかりにくいことが既知である第2の哺乳動物被験体由来のコントロールサンプル中に存在する該ポリペプチドの量と比較する工程を包含し、

ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の該第1の被験体における該ペプチドの発現レベルにおける変化が、該疾患の存在または該疾患の疾病素質を示す、方法。

【請求項41】 第1の哺乳動物被験体における請求項5に記載の核酸分子の変化したレベルと関連する疾患の存在または該疾患の疾病素質を決定するための方法であって、該方法は、以下：

a) 該第1の哺乳動物被験体由来のサンプル中の該核酸の量を測定する工程；および

b) 工程(a)の該サンプル中の該核酸の量を、該疾患を有さないことが既知であるかまたは該疾患にかかりにくいことが既知である第2の哺乳動物被験体由来のコントロールサンプル中に存在する該核酸の量と比較する工程を包含し、

ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の該第1の被験体における該核酸のレベルにおける変化が、該疾患の存在または該疾患の疾病素質を示す、方法。

【請求項42】 哺乳動物において病理学的状態を処置する方法であって、該方法は、該病理状態を緩和するに十分な量でポリペプチドを該哺乳動物に投与する工程を包含し、ここで、該ポリペプチドが、配列番号2によって提供されるアミノ酸配列またはそれらの生物学的に活性なフラグメントを含むポリペプチドに少なくとも95%同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドである、方法。

【請求項43】 哺乳動物の病理状態を処置する方法であって、該方法は、該病理状態を緩和するに十分な量で請求項15に記載の抗体を該哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の分野)**

本発明は、該してポリヌクレオチドおよびそれらによりコードされるポリペプチドに関する。本発明は、より具体的には、ヒト大動脈カルボキシペプチダーゼに関連するポリペプチドをコードするヌクレオチドに関する。

**【0002】****(発明の背景)**

カルボキシペプチダーゼは、ポリペプチド鎖の遊離カルボキシ(C)末端においてアミノ酸を除去するヒドロラーゼ酵素のファミリーである。カルボキシペプチダーゼファミリーのメンバーは、複数の生物学的活性に關与している。

**【0003】**

カルボキシペプチダーゼは、メタロカルボキシペプチダーゼの少なくとも2つのサブファミリーに分けることができる。1つのサブファミリーとしては、カルボキシペプチダーゼ様サブファミリーが挙げられる。そのメンバーとしては、例えば、カルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼA2、カルボキシペプチダーゼBおよびカルボキシペプチダーゼB2が挙げられる。

**【0004】**

第2のサブファミリーとしては、調節B型カルボキシペプチダーゼが挙げられる。このメンバーとしては、例えば、カルボキシペプチダーゼH、カルボキシペプチダーゼM、カルボキシペプチダーゼN、カルボキシペプチダーゼV、AEBP1、ACPLX、MsCPX1およびMsCPXが挙げられる。このサブファミリーのメンバーは、ポリペプチドホルモンプロセシング活性およびカルボキシ末端アルギニン残基を有する細胞性ペプチドのプロセシングを含む活性に關与する。さらに、血管平滑筋細胞(例えば、大動脈滑筋細胞)の表面に存在するカルボキシペプチダーゼは、生物学的に活性な血管作用性ペプチド(例えば、血管の正常状態(tone)および管腔の直径に影響を及ぼす、ブラジキニン、アンギオテンシンII)のレベルに複雑な影響を与えることが報告されている。カルボキシペプチダーゼはまた、血管作用性ペプチドの異化不活性化を担うことが報

告されている。

【0005】

本発明は、カルボキシペプチダーゼの上記されたメンバーに類似の配列を有するポリペプチドをコードする新規ヒト核酸配列の発見に基づく。本明細書中に記載される、この大動脈カルボキシペプチダーゼ様核酸、ポリヌクレオチド、タンパク質およびポリペプチドまたはそれらのフラグメントは、ACPLX核酸およびポリペプチドと集合的にいわれる。ACPLX核酸としては、配列番号1に見出される核酸を含み、そしてポリペプチドは配列番号2によりコードされる。

【0006】

従って、本発明の1つの局面は、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された大動脈カルボキシペプチダーゼ様核酸分子を含む。種々の実施形態では、この核酸分子は、配列番号1を含むヌクレオチド配列を含み得る。あるいは、コードされる大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質(ACPLX)は、改変体アミノ酸配列を保有し得、これにより開示されたアミノ酸配列に対して100%未満の同一性または類似性を有し得る。

【0007】

本発明はさらに、配列番号2のアミノ酸を含む単離されたポリペプチドを含む。配列番号2により提供される、アミノ酸配列の成熟形態の改変体、またはそのアミノ酸の改変体もまた含まれる。種々の実施形態では、配列中の15%、10%、9%、8%、5%、3%、2%または1%以下のアミノ酸残基が、異なるアミノ酸に変更される。

【0008】

本発明はまた、ACPLXに免疫特異的に結合する抗体をさらに含む。好ましい実施形態では、モノクローナルであり、かつヒト起源である。このような抗体は、被検体における病理学的状態を処置する際に最も有用であり、ここでこの処置は、被検体に抗体を投与することを含む。

【0009】

本明細書中に記載される、核酸分子が発現される条件下で、大動脈カルボキシ

ペプチダーゼ様核酸を発現する宿主細胞を培養することによりACPLXを産生する方法もまた、本発明に含まれる。

【0010】

本発明はまた、ペプチドの1つに免疫特異的に結合する抗体を哺乳動物由来のサンプルを導入し、次いでそのサンプル中の抗体およびポリペプチドを含む反応複合体の形成を検出することにより、哺乳動物（例えば、ヒト）由来のサンプル中の大動脈カルボキシペプチダーゼ様ポリペプチドの存在を検出する方法をさらに含む。サンプル中の複合体の形成を検出することは、このサンプル中のポリペプチドの存在を示す。

【0011】

本発明はまた、核酸に選択的に結合する核酸プローブを哺乳動物由来のサンプルに導入し、次いでその核酸がサンプル中の核酸分子に結合するか否かを決定することにより、哺乳動物（例えば、ヒト）由来のサンプル中の大動脈カルボキシペプチダーゼ様ポリペプチドの存在を検出する方法をさらに含む。サンプル中の複合体の形成を検出することは、このサンプル中のポリペプチドの存在を示す。核酸プローブの結合は、その核酸分子がサンプル中に存在することを示す。

【0012】

本発明はまたさらに、哺乳動物（例えば、ヒト）由来の大動脈カルボキシペプチダーゼ様核酸の変更されたレベルと関連する病理の処置における使用のための潜在的な治療剤を同定する方法をなお含む。この方法は、治療剤の候補物質である化合物をこのポリペプチドを発現する細胞へ導入することを含む。候補物質の特性または機能が細胞の存在下で変更される場合、この物質は、潜在的な治療剤として同定される。

【0013】

本発明はまた、病理学的状態を緩和するに十分な量で、ACPLXを被検体へ投与することにより、本明細書中に記載されるポリペプチドに関連する、哺乳動物（例えば、ヒト）における病理学的状態を処置または予防する方法を含む。あるいは、哺乳動物は、本明細書中に記載される抗体を、病理学的状態を緩和するに十分な量で投与することにより処置し得る。

## 【0014】

本発明の処置の方法が想定される病理学的状態としては、例えば、癌（乳癌および卵巣癌）、高血圧障害、血管内皮障害（例えば、アテローム性動脈硬化症）、バソプレシン - ニューロフィシン プレ - ホルモン産物のプロセッシングおよび/または輸送が挙げられる。

## 【0015】

他に規定されない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および化学用語は、本発明が属する分野の当業者により通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と類似するかまたは等価な方法および材料が、本発明を実施するかまたは試験するために使用され得るが、適切な方法および材料が、以下に記載される。本明細書中に記載される全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、その全体が参考として援用される。コンフリクトの場合、本明細書（定義を含む）は制御される。さらに、材料、方法および実施例は、例示のみであり、そして限定することは意図されない。

## 【0016】

本発明の他の特色および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。

## 【0017】

（発明の詳細な説明）

本発明は、大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質ファミリーの新規メンバーをコードする核酸を提供する。新規大動脈カルボキシペプチダーゼに関する核酸およびポリペプチドは、本明細書中で該して、ACPLX核酸およびポリペプチドといわれる。2382ヌクレオチド長の核酸（配列番号1）が、本発明の含まれる。この配列は、図1に示され、そしてまた本明細書中でAL035460Aといわれる。

## 【0018】

101～2305の2,205ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム（「ORF」）は、図1に示される核酸配列中に存在する。このORFは、ヌクレオチド101におけるatg開始コドンで始まり、そしてヌクレオチド230

5において始まる t g a コドンで終結する。開始コドンから上流の推定非翻訳領域は、図1において下線を付される。開始コドンおよび終結コドンは、太字である。ORFは、734アミノ酸残基のポリペプチド(配列番号2)(「AL035460\_\_GENESCAN\_\_predicted\_\_pep」)をコードする。コードされるポリペプチドの配列は、図2に示される。

【0019】

開示されるACPLX核酸配列は、2379bpのMus musculusメタロカルボキシペプチダーゼCPX-1 mRNA(GENEBANK-ID:AF077738)に対して2129塩基のうち1760において同一(82%同一性)である。この相同性は、AL035460Aの配列の塩基73と2201との間、ならびにAF077738の配列の塩基112と2236との間に存在する。

【0020】

コードされるアミノ酸配列はまた、722残基のポリペプチドである、マウスメタロカルボキシペプチダーゼCPX-1(SPTREMBL ACC:Q9Z100)に関する。コードされるACPLXポリペプチドの733残基のうち622(84%)は、マウスメタロカルボキシペプチダーゼCPX-1ポリペプチドに同一であり、773残基のうち661(90%)ポジティブである。開示されるACPLXポリペプチド配列は、ACC:Q9Z100において見出されないさらなる残基を含む。開示されるACPLXポリペプチドはまた、746残基のマウスカルボキシペプチダーゼX2(SPTREMBL-ACC:O54860)に関する配列を含む。開示されるACPLXポリペプチドの領域41~733およびマウスカルボキシペプチダーゼX2の残基61~759について、698残基のうち377(54%)は、同一であり、そして698残基のうち486(69%)はポジティブである。

【0021】

開示されるACPLXポリペプチドと他のカルボキシペプチダーゼファミリーのメンバーとの間の多重配列整列は、図3Aおよび3Bに示される。マウスAEBP1ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号\_\_)(「Q61281」)、(「

Q14113」)、マウス大動脈カルボキシペプチダーゼ様2ポリペプチド(配列番号\_\_)(「O88442」)、マウスカルボキシペプチダーゼX2ポリペプチド(配列番号\_\_)(「O54860」)および本発明のACPLXポリペプチド(配列番号2)の比較が示される。

【0022】

開示されるACPLXポリペプチドは、Q61281タンパク質に対して、366残基のうち202(55%)で同一であり、そしてそれと366残基のうち260(71%)でポジティブである。Q61281タンパク質は、Nature 378:92~96, 1995に記載される。

【0023】

開示されるACPLXポリペプチドは、Q14113タンパク質に対して、408残基のうち286(54%)で同一であり、そしてそれと408残基のうち286(70%)でポジティブである。Q14113タンパク質は、Biochem Biophys. 228:441~14, 1996に記載される。

【0024】

開示されるACPLXポリペプチドは、O88442タンパク質に対して、623残基のうち334(53%)で同一であり、そしてそれと623残基のうち433(69%)でポジティブである。Q88442タンパク質は、J. Biol. Chem. 273:15654~60, 1998に記載される。

【0025】

開示されるACPLXポリペプチドは、O54860タンパク質に対して、698残基のうち377(54%)で同一であり、そしてそれと698残基のうち486(69%)でポジティブである。

【0026】

図4は、開示されるACPLXポリペプチドがまた、マウスCPX-1に高度に類似することを示す。マウスCPPX1ポリペプチド(AFO77738)およびACPLXポリペプチド(配列番号2)(「ALO35460\_\_GENESCAN\_\_predicted\_\_pep」)のアミノ酸配列中の同一の領域および保守的アミノ酸置換の領域を示す比較が示される。

## 【0027】

開示されるACPLXポリペプチド配列は、複数のドメインを含む。これらのドメインは、図2に示される。これらは、アミノ末端シグナルペプチド様配列、161-残基ジスコイジンドメインおよび亜鉛結合残基を有する2つのカルボキシペプチダーゼ(CP)触媒切断ドメインを含む。この第1のCPドメインは、残基299から409に存在し、そして第2のCPドメインは、残基421~689にわたる。開示されるACPLXポリペプチドがメタロカルボキシペプチダーゼファミリーメンバーの間で高度に保存されるカルシウム結合部位である。

## 【0028】

この配列相同性は、ACPLXが、調節B型カルボキシペプチダーゼサブファミリーのメンバーであり、そして例えば、マウスCPX-1に対するヒトオルソログ(ortholog)と考えられ得る。新規ポリペプチドと他の調節B型カルボキシペプチダーゼとの間の関係は、表Iに示される。

## 【0029】

## 【表1】

(表1. 2つのカルボキシペプチダーゼファミリー)

膵臓カルボキシペプチダーゼ様ファミリー

- カルボキシペプチダーゼ A 膵臓-消化
- カルボキシペプチダーゼ A2 膵臓プロカルボキシペプチダーゼは、芳香族C末端残基に対して作用する
- カルボキシペプチダーゼ B 膵臓-消化
- カルボキシペプチダーゼ B2 (U)トロンビン活性化可能なフィブリン溶解インヒビター (TAFI) (プロアミノゲンアクチベーター)

調節B型カルボキシペプチダーゼファミリー

- カルボキシペプチダーゼ E (CBPE) プロインスリンのようなプロホルモン中間体を処理する (Fnckerら, Trends Biochem Sci. 24:390-93, 1999).
- カルボキシペプチダーゼ M ペプチドホリモン活性を調節する (Rehli et al., J Biol Chem. 270: 15644-49, 1995).
- カルボキシペプチダーゼ D 7kDgp180のホリモン, 180kDaのB型肝炎ウイルス結合タンパク質 (McGwireら, Life Sci. 60:715-24, 1997).
- カルボキシペプチダーゼ N 血清中のホリモン-1およびアフィニトキシンを切断しそして不活性化する (Tanら, Anesthesiology70:267-75, 1989).
- カルボキシペプチダーゼ Z 細胞外ペプチドまたはC末端Arg残基を処理し得る (Songら, J Biol Chem. 272:10543-50, 1997).
- AEBP1 転写に関与する因子の切断により転写を調節する (Muiseら, Biochem J. 343:341-45, 1999).
- ACPLX 分化した血管平滑筋細胞の機能化 (Layneら, J. Biol. Chem. 273:15654-60, 1998).
- Ms\_CPX2 おそらく活性なカルボキシペプチダーゼとしてよりも結合タンパク質として作用する (Xinら, DNA Cell Biol 17:897-909, 1998).
- Ms\_CPX1 そのジスライントメインを介して脂肪相互作用を媒介することにより発生における役割を有し得る (Leiら, DNA Cell Biol. 18:175-85, 1999).

CPドメインは、触媒活性のために重要であるいくつかの活性部位を各マウスホモログである、CPX-1と、各々95および91%のアミノ酸同一性(表2を参照のこと)を有する(Leiら, DNA Cell Biol. 18:175-85, 1999)。CPX-1に存在せず、そして本発明のカルボキシペプチダーゼ様タンパク質にも存在しないこの触媒活性は、本発明に従うALCLPLXポリペプチドが、酵素切断機能を欠き得ることを示す。しかし、亜鉛結合領域(ほとんどのヒトメトロプロテイナーゼには存在しない)が、本発明のタンパ

ク質およびCPX-1の両方に存在する。この亜鉛結合領域は、各々、2つのポリペプチドのH498およびH491における第2の触媒ドメイン内に位置付けられる。公知ではない、この過剰な亜鉛結合ドメインの機能は、分子上のさらなる酵素部位として機能し得る。

【0030】

メタロプロテイナーゼファミリーのメンバーと本発明のALCLPLXポリペプチドとの間の配列相同性の関係は、表IIに示される。

【0031】

(表II. メタロカルボキシペプチダーゼファミリーのメンバーとAL035460\_\_Aによってコードされるポリペプチドとの間のタンパク質ドメイン配列相同性)

【0032】

【表2】

遺伝子番号	Total	ジスロイジン	Ca	1 <sup>st</sup> CP	2 <sup>nd</sup> CP	Zn
Hu_CBPA	POOR					
Hu_CBPA2	POOR					
Hu_CBPB	POOR					
Hu_CBPB2 (U)	POOR					
Hu_CBPH (E)	50%	5%	77%	74%	67%	Y
Hu_CBPM	POOR	0%	46%	66%	59%	Y
Hu_CBPD	POOR	12%	77%	54%	43%	Y
Hu_CBPN	POOR	16%	15%	74%	62%	N
Hu_CBPZ	POOR	13%	69%	54%	48%	Y
Hu_AEBP1	53%	52%	92%	71%	54%	N
Hu_ACPLX(sgnl)	53%	51%	92%	71%	54%	N
Ms_AEBP1	54%	40%	85%	70%	54%	N
Ms_ACPLX	54%	53%	85%	70%	48%	N
Ms_CPX2	58%	58%	85%	71%	57%	N
Ms_CPX1	86%	87%	92%	95%	91%	Y
Ms_CBPH (E)	POOR	5%	77%	74%	65%	Y

Hu = ヒト

Ms = マウス

P O O R = 全長にわたって50%以下の一致

T o t a l = 全長タンパク質配列にわたる%同一性。

残りの値は、特定のドメイン内の%相同性として分類される。

C a = カルシウム結合領域。

1<sup>st</sup> C P = 第1のカルボキシペプチダーゼ触媒ドメイン (残基299~409)

。

2<sup>nd</sup> C P = 第2のカルボキシペプチダーゼ触媒ドメイン (残基421~689)

。

Z e n = 第3の触媒亜鉛結合部位の存在 ( Y ) または非存在 ( N ) 。

### 【0033】

本発明のタンパク質とヒトカルボキシペプチダーゼファミリーのメンバーとの間の、第1および第2のC Pドメインの比較に基づいて、開示されたA C P L Xポリペプチド ( A L 0 3 5 4 6 0 Aタンパク質 ) は、カルボキシペプチダーゼE ( h u \_ \_ C B P H ( E ) ) と最も配列同一性を共有する。第1および第2のC P領域に対するパーセント同一性は、それぞれ、74%および67%である。C P Eは、プロホルモンプロセシング酵素であり、そしてその前駆体プロインスリンからのインスリンの産生を担う。C P Eの変異改変体を発現するマウスは、不都合なインスリン調節を有し、外因性インスリンを用いた処理によって抑制され得る肥満および高血糖症の表現型が生じることを伴う ( N a g g e r t r a、N a t u r e G e n e t . 1 0 : 1 3 5 - 1 4 2、1 9 9 5 ) 。

### 【0034】

開示されたA C P L Xポリペプチドは、触媒部位においてh u \_ \_ C P Eと同じ類似性を示すが、開示されたA C P L Xポリペプチドは、アミノ末端において大きく異なる。例えば、ジスコイジンドメインは、開示されたA C P L Xポリペプチド中に存在するが、h u \_ \_ C P Eには存在しない。タンパク質上のジスコイジンドメインは、そのタンパク質が、レセプターとリガンドとの間の細胞表面相互作用を媒介する細胞表面上のコラーゲンと相互作用することを可能にする ( V o g e l、F A S E B J . 1 3 : S 7 7 - 8 2、1 9 9 9 ) 。

### 【0035】

従って、本発明のカルボキシペプチダーゼ様タンパク質は、細胞表面を媒介するプロホルモンプロセシングと相互作用する結合タンパク質として、および/またはホルモンもしくは他のリガンドとそれらのレセプターとの相互作用として機能し得る。AL035460Aカルボキシペプチダーゼ核酸は、特定の癌(例えば、乳癌および卵巣癌)において差示的にダウンレギュレートされる。この配列の発現分析は、実施例に提供される。従って、このAL035460A核酸またはタンパク質は、正常細胞を癌性細胞と区別する際の差示的診断剤として、そしてこれらの癌の処置における治療剤として使用され得る。

#### 【0036】

大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質をコードする本発明の新規核酸としては、その配列が図1に提供されるタンパク質またはそのフラグメントが挙げられる。本発明はまた、変異体核酸もしくは改変体核酸、またはこのような核酸のフラグメントを含み、これらのいずれかの塩基は、図1に示される対応する塩基から変更され得るが、その大動脈カルボキシペプチダーゼ様活性および生理学的機能は維持するタンパク質をなおコードする。本発明はさらに、その配列がまさに記載されたものに相補的である核酸を含む。変異体核酸または改変体核酸において、18%まで、または18%以上の塩基が、そのように変更され得る。

#### 【0037】

本発明の新規カルボキシペプチダーゼ様タンパク質としては、その配列が図2に提供されるタンパク質が挙げられる。本発明はまた、変異体タンパク質もしくは改変体タンパク質、またはこれらの機能フラグメントを含み、これらのいずれかの残基は、図2に示される対応する残基から変更され得るが、その大動脈カルボキシペプチダーゼ様活性および生理学的機能は維持するタンパク質をなおコードする。変異体タンパク質または改変体タンパク質において、18%まで、または18%以上の残基が、そのように変更され得る。本発明はさらに、本発明のタンパク質のいずれかに免疫特異的に結合する、抗体または抗体フラグメント(例えば、 $F_{ab}$ または $(F_{ab})_2$ )を含む。

#### 【0038】

カルボキシペプチダーゼ様タンパク質の核酸およびタンパク質ならびに本発明

のコード核酸は、種々の高血圧障害および/または血管内皮障害に關与する潜在的な治療適用に有用である。さらなる治療適用は、このタンパク質に歸する推定プロホルモンプロセシング機能と關連する。例えば、大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質をコードするcDNAは、遺伝子治療に有用であり得、そして大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質は、その必要がある被験体に投与される場合、有用であり得る。非限定的な例として、本発明の組成物は、高血圧またはアテローム性動脈硬化症の病態もしくは匹敵する血管病態を患う患者の処置に対して効果を有する。さらに、本発明の組成物は、プロホルモンプロセシングにおける機能不全と關連する状態を処置する際に有用であり得る。大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質をコードする新規核酸、および本発明のタンパク質、またはこれらのフラグメントは、診断適用にさらに有用であり得、ここで、この核酸もしくはタンパク質の存在または核酸もしくはタンパク質の量が、評価される。これらの物質は、治療方法または診断方法に使用するための本発明の新規物質に免疫特異的に結合する抗体の産生にさらに有用である。

#### 【0039】

AL035460A中に存在するALCLPXは、第20番染色体から得られたゲノム配列から誘導された(20p12.3-13: GenBank Acc. AL035460)。AL035460の遺伝子マッピングにより、ゲノム配列に關して同じ位置にマップする以下の疾患が明らかになった。従って、AL035460Aの大動脈カルボキシペプチダーゼ様遺伝子産物が、1つ以上の疾患：ハレルフォルデン - シュパッツ症候群、尿崩症および/または乳癌および卵巣癌における腫瘍抑制に役割を果たす。

#### 【0040】

ハレルフォルデン - シュパッツ症候群(HSS)(OMIM#234200)は、顕著な知見としては、希有であり、脳の鉄蓄積を伴う常染色体の劣性神経変性障害である。臨床特徴としては、錐体外路機能不全、小児期での発生、および過酷な進行性の経過が挙げられる。組織学的研究によって、脳幹神経節における重症の鉄沈着が明らかになる。全身性および脳脊髄の流動性鉄のレベルは、正常であり、フェリチン、トランスフェリンおよびセルロプラスミンの血漿レベルも

同様である。逆に、全身性鉄過重の障害（例えば、ヘモクロマトーシス（hemochromatosis））において、脳の鉄は、増加せず、これは、脳の鉄代謝および鉄輸送と全身の鉄代謝および鉄輸送との間に根本的な差異が存在することを示唆する。正常な脳において、非血液の鉄は、局所的に蓄積し、そして脳幹神経節において最も高い。病的な脳の鉄蓄積は、一般的な障害（パーキンソン病、アルツハイマー病およびハンティングトン病を含む）において見出される。正常な脳および異常な脳の、鉄輸送、鉄代謝および鉄機能を洞察するために、本発明者らのアプローチは、HSSに関して遺伝子をマップすることであった。第1のゲノムスキャンが、大きな血族ファミリー（HS1）由来のサンプルを用いて実行された。このファミリーは、マッピングに関して非常に力強かったが、全ての影響されたメンバーにおいてホモ接合性を示す領域は、4cMのみに広がり、連鎖を検出するために非常に近接したマーカーを必要とする。このHSS遺伝子は、染色体20p12.3-p13上でD20S906およびD20S116が隣接する間隔に対してマップされる。連鎖は、多様な民族背景のさらなる9個のさらなるファミリーにおいて確認された。

#### 【0041】

尿崩症と関連して、アルギニンバソプレシンおよびその対応するニューロフィシンは、通常の前駆体形態で合成され、これは、タンパク質分解によって切断され、生物学的に機能的なペプチドを生じる（Sachsら、Recent Prog. Horm. Res. 25: 447-491, 1969）。遺伝性尿崩症を有するラットは、アルギニンバソプレシンおよびニューロフィシンの1種の両方の合成を欠く（Sundeら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 248: 345-364, 1975）。

#### 【0042】

ペプチドホルモンアルギニンバソプレシンおよびオキシトシン（OXT）の両方は、そのそれぞれの「キャリア」タンパク質、ニューロフィシンと一緒に視床下部の視索上核（SON）および室傍核（PVN）で合成される（Brownstein, M. J.; Russell, J. T.; Gainer, H. Synthesis, transport, and release of poste

rior pituitary hormones. Science 207 : 373 - 378 , 1980 )。

【0043】

バソプレシンおよびオキシトシンは、各核内で大型細胞ニューロンの別々の集団によって産生される。ニューロフィシンと一緒に、これらは、神経分泌小胞にパッケージングされ、そして神経下垂体中の神経終末に軸索的に輸送され、これらはここで、保存されるかまたは血流に分泌されるかのいずれかである。バソプレシンは、より大量の前駆体として合成され、この前駆体は、そのホルモンに加えて、そのキャリアタンパク質、ニューロフィシン、および糖タンパク質を含む。このタンパク質前駆体の機能ドメインは、2つのイントロンによって隔てられた3つのエキソンによってコードされる。最初のエキソンは、ホルモンをコードし、そして第2のエキソンは、キャリアタンパク質の大部分をコードし、そして第3のエキソンは、糖タンパク質をコードする。単一ヌクレオチド欠失は、尿崩症を有するブラトルバロラット中の第2のエキソン中に見出される。(Schmaleら、EMBO J. 3 : 3289 - 93、1984)。さらに、バソプレシン(ニューフィジン(neuphysin))に対する結合タンパク質における単一アミノ酸変異が、常染色体優性神経下垂体尿崩症を有するヒト被験体中で発見された(Repaskeら、J Clin Endocrinol Metab 79 (2) : 421 - 7、1994)。

【0044】

上記のように、尿崩症は、バソプレシンニューロフィシン前駆体タンパク質中の変異によって引き起こされ得、分泌小胞へのホルモンの不適切な標的化を引き起こす。結果として、前駆体タンパク質は、小胞体に蓄積し、そしてさらなるプロセッシングのためのゴルジには決して到達しない(Oliasら、DNA Cell Biol. 15 : 929 - 935、1996)。AL035460Aからの遺伝子産物は、バソプレシン - ニューロフィシンプレホルモン産物のプロセッシングおよび/または輸送に関与し得る。ALCLPLX遺伝子(例えば、AL035460A)からの遺伝子産物の機能における欠損は、活性なバソプレシンの産生および分泌に欠損を引き起こし得、これは、尿崩症の発生を導き得る。

## 【0045】

癌に関連して、AL035460A遺伝子は、この遺伝子が乳癌および卵巣癌における腫瘍抑制遺伝子として作用する（すなわち、正常組織に対して腫瘍細胞株における減少した発現）ことと一致する発現プロファイルを示すことが、実施例において示される。従って、このような腫瘍細胞は、ACPLX核酸（例えば、AL035460A）のトランスフェクションおよび発現の後に、インビトロおよびインビボの両方で増殖速度に減少を示すことが推定される。

## 【0046】

（ACPLX核酸）

本発明の新規核酸は、ACPLXポリペプチドまたはACPLXタンパク質をコードする核酸を含有する。本明細書において使用されるように、用語ポリペプチドおよびタンパク質は、交換可能である。

## 【0047】

いくつかの実施形態において、ALCPLX核酸は、成熟ACPLXポリペプチドをコードする。本明細書中で使用される場合、本明細書中に記載されるポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態は、天然に存在するポリペプチドあるいは前駆体形態またはプロタンパク質の産物に関係する。天然に存在するポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質としては、非制限例として、対応する遺伝子によってコードされる完全長遺伝子産物が挙げられる。あるいは、これは、本明細書中で記載されるオープンリーディングフレームによってコードされる、ポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質として規定され得る。産物「成熟」形態は、さらに非制限例として、遺伝子産物が産生される細胞中で発生し得る、1以上の天然に存在するプロセッシング工程の結果として発生する。ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態に導くこのようなプロセッシング工程の例としては、オープンリーディングフレームの開始コドンによってコードされる、N-末端メチオニン残基の切断、またはシグナルペプチドもしくはリーダー配列のタンパク分解性切断が挙げられる。従って、残基1～N（ここで、残基1は、N-末端メチオニンである）を有する、前駆体ポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟形態は、N-末端メチオニンの除去後に残った残基2～N末端を有する。あ

るいは、残基1～Nを有する前駆体ポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟形態（ここで、残基1～残基MのN末端シグナル配列が切断される）は、残った残基M+1～残基Nを有する。本明細書中でさらに使用されるように、ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態は、タンパク質分解性切断事象以外の、翻訳後修飾事象の工程から生じ得る。このようなさらなるプロセスとしては、非制限例として、グリコシル化、ミリストイル化、またはリン酸化が挙げられる。一般に、成熟ポリペプチドまたは成熟タンパク質は、これらのプロセスの1つのみの作用、またはそれらの任意の組み合わせから得られ得る。

#### 【0048】

A L C L P L X核酸の間は、配列番号1で提供される配列の核酸あるいはそれらのフラグメントである。さらに、本発明には、配列番号1の変異体核酸または改変体核酸あるいはそれらのフラグメントが挙げられ、任意のこれらの塩基は、配列番号1に示される対応する塩基から変化され得るが、A C P L X様の活性および生理学的機能の少なくとも1つを維持するタンパク質をなおコードする。本発明には、配列番号1の核酸配列の相補体（それらのフラグメント、誘導體、アナログおよびホモログを含む）がさらに挙げられる。本発明は、その構造が化学的改変を含む、核酸または核酸フラグメントあるいはそれらの相補体をさらに含む。

#### 【0049】

本発明の1つの局面は、A C P L Xタンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸分子に関する。また、A C P L Xをコードする核酸（例えば、A C P L X mRNA）を同定するためにハイブリダイゼーションプローブとして使用するための十分な核酸フラグメントおよびA C P L X核酸分子の増幅または変異のためのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマーとして使用するためのフラグメントも含まれる。本明細書において使用されるように、用語「核酸分子」は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、ヌクレオチドアナログを使用して産生されるDNAまたはRNAのアナログ、ならびにそれらの誘導體、フラグメントおよびホモログを含むことが意図される。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得

るが、好ましくは、二本鎖DNAである。

#### 【0050】

「プローブ」とは、種々の長さの核酸配列をいい、好ましくは、使用に依存して、少なくとも約10ヌクレオチド(nt)、100nt、または例えば、約6,000ntほどの大きさの間である。プローブは、同一、類似または相補的な核酸配列の検出において使用される。より長いプローブは、通常、天然供給源または組換え供給源から入手され、非常に特異的であり、そしてオリゴマーよりもはるかに遅くハイブリダイズする。プローブは、一本鎖または二本鎖であり得、そしてPCR、メンブレンベースのハイブリダイゼーション技術またはELISAのような技術において特異性を有するように設計される。

#### 【0051】

「単離された」核酸分子は、この核酸の天然の供給源中に存在するその他の核酸分子から分離されているものである。単離された核酸分子の例としては、ベクター中に含まれる組換えDNA分子、異種宿主細胞中に維持される組換えDNA分子、部分的または実質的に精製された核酸分子、および合成DNAまたはRNA分子が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、「単離された」核酸は、この核酸が由来する生物のゲノムDNA中でこの核酸に天然に隣接する配列(すなわち、この核酸の5'末端および3'末端に位置する配列)を含まない。例えば、種々の実施形態で、単離されたACPLX核酸分子は、この核酸が由来する細胞のゲノムDNA中でこの核酸分子に天然で隣接する、約50kb、25kb、5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb、または0.1kb未満のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子、例えば、cDNA分子は、組換え技術により産生される場合、その他の細胞物質または培養培地を実質的に含まないか、または化学的に合成される場合、化学物質前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まないものであり得る。

#### 【0052】

本発明の核酸分子、例えば、配列番号1のヌクレオチド配列を有する核酸分子、またはこのヌクレオチド配列の任意の相補体は、標準的な分子生物学的技法および本明細書で提供される配列情報を用いて単離され得る。ハイブリダイゼーシ

ョンプローブとして、配列番号1の核酸の全部または一部を使用して、ACPLX核酸配列は、標準的なハイブリダイゼーションおよびクローニング技術(例えば、Sambrookら(編)、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、1989;およびAusubelら、(編)、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、NY、1993に記載される)を用いて単離され得る。

#### 【0053】

本発明の核酸は、標準的なPCR増幅技法に従って、テンプレートとしてcDNA、mRNAあるいはゲノムDNA、および適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅され得る。このように増幅された核酸は、適切なベクター中にクローン化され、そしてDNA配列分析により特徴付けられ得る。さらに、ACPLXヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技術、例えば、自動化DNA合成機を用いることにより調製され得る。

#### 【0054】

本明細書で用いられる用語「オリゴヌクレオチド」は、一連の連結されたヌクレオチド残基をいい、このオリゴヌクレオチドは、PCR反応で用いられる十分な数のヌクレオチド塩基を有する。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノム配列もしくはcDNA配列に基づき得るか、またはそれから設計され得、そして特定の細胞もしくは組織において、同一、類似もしくは相補的DNAまたはRNAを増幅し、確認し、もしくはその存在を示すために用いられる。オリゴヌクレオチドは、約10nt、50nt、または100ntの長さ、好ましくは約15nt~30ntの長さを有する核酸配列の部分を含む。1つの実施形態では、100ntより少ない長さの核酸分子を含むオリゴヌクレオチドは、さらに、配列番号1の少なくとも6個連続するヌクレオチド、またはその相補体を含む。オリゴヌクレオチドは、化学的に合成され得、そしてプローブとして用いられ得る。

#### 【0055】

別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列の相補体である核酸分子を含む。別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列またはこのヌクレオチド配列の一部分の相補体である核酸分子を含む。配列番号1に示されるヌクレオチド配列に相補的である核酸分子は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列に十分相補的である核酸分子であり、配列番号1に示される核酸配列に対しミスマッチがほとんどまたは全くなく水素結合し得、それによって安定な二本鎖を形成する。

#### 【0056】

本明細書で用いる用語「相補的」は、核酸分子のヌクレオチド単位間のWatson-CrickまたはHoogsteen塩基対形成をいい、そして用語「結合」は、2つのポリペプチドまたは化合物または関連ポリペプチドまたは化合物またはその組合せ間の物理的または化学的相互作用を意味する。結合は、イオン性、非イオン性、ファンデルワールス性、疎水性相互作用などを含む。物理的相互作用は直接的であるかまたは間接的であり得る。間接的相互作用は、別のポリペプチドまたは化合物を介するか、またはその効果に起因し得る。直接的結合は、別のポリペプチドもしくは化合物を介して、またはその効果に起因して生じない、その他の実質的な化学的中間体がない相互作用をいう。

#### 【0057】

さらに、本発明の核酸分子は、配列番号1の核酸配列の一部のみ（例えば、プローブまたはプライマーとして使用され得るフラグメント、あるいはACPLXの生物学的に活性な部分をコードするフラグメント）を含み得る。本明細書中に提供されるフラグメントは、少なくとも6個の（連続する）核酸配列または少なくとも4個の（連続する）アミノ酸の配列（それぞれ、核酸の場合には、特異的なハイブリダイゼーションを可能にし、またはアミノ酸の場合には、エピトープの特異的な認識を可能にするに十分な長さ）として規定され、そして全長配列未満のせいぜいいくらかの部分である。フラグメントは、選択された核酸配列またはアミノ酸配列の任意の連続する部分に由来し得る。誘導体は、直接的にかまたは改変もしくは部分的置換によってかのいずれかでネイティブな化合物から形成

される核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、ネイティブな化合物に類似する構造を有する（しかし、同一ではない）が、特定の成分または側鎖に関してそれとは異なる核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、合成物であり得るか、または進化的に異なる起源に由来し得、そして野生型と比較して、類似の代謝活性または反対の代謝活性を有し得る。

#### 【0058】

誘導体およびアナログは、以下に記載のように、誘導体またはアナログが、修飾された核酸またはアミノ酸を含む場合、全長、または全長以外のものであり得る。本発明の核酸またはタンパク質の誘導体またはアナログは、種々の実施形態において、本発明の核酸もしくはタンパク質に、同一の大きさの核酸またはアミノ酸配列にわたって、または整列した配列と比較した場合（この整列は、当該分野で公知であるコンピューター相同性プログラムによって実施される）、少なくとも約70%、80%、85%、90%、95%、98%、もしくは99%もの同一性（好ましい同一性は、80~99%）で実質的に相同であるか、あるいはそのコードする核酸がストリンジェントの、中程度にストリンジェントの、または低いストリンジェントの条件下で上記のタンパク質をコードする配列の相補体にハイブリダイズし得る、領域を含む分子を包含するが、これらに限定されない。例えば、Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、NY、1993、および以下を参照のこと。例示のプログラムは、Gapプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package、Version 8 for UNIX（登録商標）、Genetics Computer Group、University Research Park、Madison、WI）（デフォルト設定を使用、これは、SmithおよびWatermanのアルゴリズム（Adv. Appl. Math.、1981、2:482-489、これらは、その全体が参考として本明細書中に援用される）を使用する）である。

#### 【0059】

「相同な核酸配列」もしくは「相同なアミノ酸配列」、またはその改変体とは

、上記で考察したように、ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルにおける相同性によって特徴付けられる配列をいう。相同なヌクレオチド配列は、ACPLXポリペプチドのアイソフォームをコードする配列をコードする。アイソフォームは、例えば、RNAの選択的スプライシングの結果として、同一の生物の異なる組織において発現され得る。あるいは、アイソフォームは、異なる遺伝子によってコードされ得る。本発明において、相同なヌクレオチド配列は、ヒト以外の種（哺乳動物が挙げられるが、これに限定されず、従って、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよび他の生物が挙げられ得る）のACPLXポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。相同なヌクレオチド配列はまた、天然に生じる対立遺伝子改変体および本明細書に記載されるヌクレオチド配列の変異体が挙げられるが、これらに限定されない。しかし、相同的ヌクレオチド配列は、ヒトACPLXタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含まない。相同核酸配列は、配列番号2の保存的アミノ酸置換（以下を参照のこと）、およびACPLX活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む。ACPLXタンパク質の生物学的活性は以下に記載されている。相同的アミノ酸配列は、ヒトACPLXポリペプチドのアミノ酸配列をコードしない。

#### 【0060】

ヒトACPLX遺伝子のクローニングから決定されたヌクレオチド配列は、他の細胞型（例えば、他の組織由来）におけるACPLXホモログ、ならびに他の哺乳動物由来のACPLXホモログを同定および/またはクローニングする際の使用のために設計されるプローブおよびプライマーの作製を可能にする。このプローブ/プライマーは、代表的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、代表的には、配列番号1の少なくとも約12個、約25個、約50個、約100個、約150個、約200個、約250個、約300個、約350個もしくは約400個以上の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列；または配列番号1のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列；あるいは配列番号1の天然に存在する変異体の少なくとも約12個、約25個、約50個、約100個、約150個、約200個、約250個、約300個、約350個もしくは約400個以上の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列または配列番号1の天然

に存在する変異体のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

【0061】

ヒトACPLXヌクレオチド配列に基づくプローブは、同じまたは相同なタンパク質をコードする転写物またはゲノム配列を検出するために使用され得る。種々の実施形態において、このプローブはさらに、プローブに付着した標識基を含み、例えば、この標識基は放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。このようなプローブは、ACPLXタンパク質を誤って発現する細胞または組織を同定するための診断試験キットの一部として、例えば、被験体由来の細胞のサンプル中のACPLXをコードする核酸のレベルを測定すること（例えば、ACPLX mRNAレベルを検出すること、またはゲノムACPLX遺伝子に変異しているかまたは欠失しているか否かを決定すること）によって使用され得る。

【0062】

「ACPLXの生物学的に活性な部分を有するポリペプチド」は、本発明のポリペプチドの活性に類似するが必ずしも同一ではない活性を示すポリペプチドをいい、用量依存性の有無に関わらず、特定の生物学的アッセイにおいて測定されるような成熟形態を含む。「ACPLXの生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、ACPLXの生物学的活性（ACPLXタンパク質の生物学的活性は、以下に記載される）を有するポリペプチドをコードする、配列番号1の一部を単離し、ACPLXタンパク質のコードされた部分を発現させ（例えば、インビトロでの組換え発現によって）、そしてACPLXのコードされた部分の活性を評価することによって調製され得る。例えば、ACPLXの生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、必要に応じて、ATP結合ドメインを含み得る。別の実施形態において、ACPLXの生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、1つ以上の領域を含む。

【0063】

（ACPLXの改変体）

本発明はさらに、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号1に示されるヌクレ

オチド配列とは異なる核酸分子を包含する。従って、これらの核酸は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列によってコードされるACPLXタンパク質(例えば、配列番号2のポリペプチド)と同じACPLXタンパク質をコードする。別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

【0064】

配列番号1に示されるヒトACPLXヌクレオチド配列に加えて、ACPLXのアミノ酸配列における変化を導くDNA配列多型は、集団(例えば、ヒト集団)内に存在し得ることが、当業者によって理解される。ACPLX遺伝子中のこのような遺伝的多型は、天然の対立遺伝子のバリエーションに起因して、集団内の個体間に存在し得る。本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、ACPLXタンパク質、好ましくは哺乳動物のACPLXタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子をいう。このような天然の対立遺伝子のバリエーションは、代表的には、ACPLX遺伝子のヌクレオチド配列において1~5%の変動性を生じ得る。天然の対立遺伝子バリエーションの結果であり、そしてACPLXの機能的活性を変化させない、ACPLX内の任意および全てのこのようなヌクレオチドのバリエーションならびに得られるアミノ酸多型は、本発明の範囲内であると意図される。

【0065】

さらに、他の種由来のACPLXタンパク質をコードし、従って、配列番号1のヒト配列とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子は、本発明の範囲内にあることが意図される。本発明のACPLXのcDNAの天然の対立遺伝子改変体およびホモログに対応する核酸分子は、本明細書中に開示されるヒトACPLX核酸に対するその相同性に基づいて、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で、標準的なハイブリダイゼーション技術に従うハイブリダイゼーションプローブとしてヒトcDNAまたはその一部を用いて単離され得る。例えば、可溶性ヒトACPLX cDNAは、ヒトの膜結合ACPLXに対するその相同性に基づいて単離され得る。同様に、膜結合ヒトACPLX cDNAは、可溶性ヒトACPLXに対するその相同性に基づいて単離され得る。

## 【0066】

従って、別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも6ヌクレオチド長であり、そしてストリンジェント条件下で配列番号1のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズする。別の実施形態では、この核酸は、少なくとも10、25、50、100、250、500または750ヌクレオチド長である。別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、コード領域にハイブリダイズする。本明細書中で用いられる場合、用語「ストリンジェント条件下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関して、互いに少なくとも60%相同なヌクレオチド配列が代表的には互いにハイブリダイズしたままである条件を記載することを意図する。

## 【0067】

ホモログ（すなわち、ヒト以外の種由来のACPLXタンパク質をコードする核酸）または他の関連配列（例えば、パラログ（paralog））は、特定のヒト配列の全てまたは一部をプローブとし、核酸ハイブリダイゼーションおよびクローニングに関して当該分野で周知の方法を使用して、低い、中程度の、または高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションによって入手され得る。

## 【0068】

本明細書で用いられる場合、語句「ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」は、その条件下で、プローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズするが、その他の配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、そして異なる状況で異なる。より長い配列は、より短い配列より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度およびpHで、特定の配列の熱融解点（ $T_m$ ）より約5 低いように選択される。この $T_m$ は、標的配列に相補的なプローブの50%が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする（規定されたイオン強度、pHおよび核酸濃度下）温度である。標的配列は一般に過剰で存在するので、 $T_m$ では、50%のプローブが平衡状態で占有されている。代表的には、ストリンジェントな条件は、pH7.0~8.3で、塩濃度が約1.0Mナトリウムイオンより少なく、代表的には約0.01~1.0

Mナトリウムイオン（またはその他の塩）、そして温度が短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド（例えば、10nt～50nt）について少なくとも約30、そしてより長いプローブ、プライマーおよびオリゴヌクレオチドについて少なくとも約60であるような条件である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドのような、脱安定化剤の添加で達成され得る。

#### 【0069】

ストリンジェント条件は、当業者に公知であり、そしてCURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出され得る。好ましくは、この条件は、互いに少なくとも約65%、約70%、約75%、約85%、約90%、約95%、約98%または約99%相同な配列が、代表的には互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。ストリンジェントハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、6×SSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA、および500mg/ml変性サケ精子DNAを含む高塩緩衝液中での65でのハイブリダイゼーションである。このハイブリダイゼーションに、0.2×SSC、0.01% BSA中での50での1回以上の洗浄が続く。ストリンジェント条件下で配列番号1の配列にハイブリダイズする、本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書中で使用される場合、「天然に存在する」核酸分子とは、天然に存在する（例えば、天然のタンパク質をコードする）ヌクレオチド配列を有する、RNA分子またはDNA分子をいう。

#### 【0070】

第2の実施形態では、配列番号1またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、中程度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸配列が提供される。中程度のストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、55での6×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDSおよび100mg/ml変性サケ精子DNA中でのハイブリダイゼーション、続いて1×SSC、0.1% SDS中での

37 での1回以上の洗浄である。用いられ得る中程度のストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である。例えば、Ausubelら(編), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NYおよびKriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NYを参照のこと。

【0071】

第3の実施形態では、配列番号1、またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸が提供される。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、35%ホルムアミド、5×SSC、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100mg/mlの変性サケ精子DNA、10%(重量/容量)デキストラン硫酸中での40 でのハイブリダイゼーション、続いて2×SSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTAおよび0.1% SDS中での50 での1回以上の洗浄である。用いられ得る低ストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である(例えば、種交差ハイブリダイゼーションについて用いられるように)。例えば、Ausubelら(編), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NYならびにKriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; ShiloおよびWeinberg, 1981, Proc Natl Acad Sci USA 78:6789-6792を参照のこと。

【0072】

(保存的変異)

集団中に存在し得る、ACPLX配列の天然に存在する対立遺伝子改変体に加

えて、当業者は、配列番号1のヌクレオチド配列への変異によって変化が導入され得、それによって、ACPLXタンパク質の機能的能力を変更することなく、コードされるACPLXタンパク質のアミノ酸配列に変化がもたらされることをさらに理解する。例えば、「非必須」アミノ酸残基にてアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換は、配列番号1の配列において行われ得る。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を変更することなく、ACPLXの野生型配列から、変更され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要とされる。例えば、本発明のACPLXタンパク質の間で保存されているアミノ酸残基は、特に変更を受け入れ難いと予測される。

#### 【0073】

さらに、ACPLXメンバー間で保存されるアミノ酸残基(図3A~Cおよび図4のように示される整列によって示される)は、変更を受けにくいと予想される。例えば、本発明のACPLXタンパク質は、ACPLXメンバー(すなわち、カルボキシペプチダーゼファミリーのタンパク質、およびACPLXホモログ)の中で典型的に保存される領域である少なくとも1つのドメインを含み得る。そのようなので、これらの保存ドメインは、おそらく、変異を受けにくいようである。しかし、他のアミノ酸残基(例えば、ACPLXタンパク質のメンバー間で保存されてないかまたは半分保存されているのみのアミノ酸残基)は、活性に必ずしも必須でないかもしれず、従って、おそらくより変更を受けやすい。

#### 【0074】

本発明の別の局面は、活性に必須ではないアミノ酸残基における変化を含む、ACPLXタンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなACPLXタンパク質は、アミノ酸配列が、配列番号2とは異なるが、生物学的活性をなお保持する。1つの実施形態では、単離された核酸分子は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、このタンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列に少なくとも約75%の相同性であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、この核酸分子によってコードされるタンパク質は、配列番号2に少なくとも約80%相同性であり、より好ましくは配列番号2に少なくとも約90%、約95%、約98%相同性であり、そして最も好ましくは少なくとも約99%相同性である。

## 【0075】

配列番号2のタンパク質に相同なACPLXタンパク質をコードする単離された核酸分子は、配列番号1のヌクレオチド配列に1以上のヌクレオチドの置換、付加または欠失を導入することにより作製され得、その結果、1以上のアミノ酸の置換、付加または欠失が、コードされるタンパク質に導入される。

## 【0076】

変異は、標準技術（例えば、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発）によって配列番号1のヌクレオチド配列に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換が、1以上の推定非必須アミノ酸残基にて作製される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される、アミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。これらのファミリーとしては、以下が挙げられる：塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アルパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）。従って、ACPLX中の推定非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖のファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態では、変異は、ACPLXコード配列の全てまたは一部に沿って（例えば、飽和変異誘発（saturation mutagenesis）によって）ランダムに導入され得、そして得られる変異体は、ACPLXの生物学的活性についてスクリーニングされて、活性を維持する変異体を同定し得る。配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21または23の変異誘発に続いて、コードされるタンパク質は、当該分野で公知の任意の組換え技術によって発現され得、そしてこのタンパク質の活性が決定され得る。

## 【0077】

1つの実施形態では、変異ACPLXタンパク質は、以下についてアッセイされ得る：(1)他のACPLXタンパク質、他の細胞表面タンパク質、または生物学的に活性なそれらの部分と、タンパク質：タンパク質相互作用を形成する能力、(2)変異ACPLXタンパク質と、ACPLXのレセプターとの間の複合体形成；(3)変異ACPLXタンパク質が細胞内標的タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する能力；(例えば、アビジンタンパク質)；(4)BRAタンパク質に結合する能力；あるいは(5)抗ACPLXタンパク質抗体に特異的に結合する能力。

## 【0078】

(アンチセンスACPLX核酸)

本発明の別の局面は、配列番号1またはそのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズし得るかまたは相補的である、単離されたアンチセンス核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的である(例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的であるかまたはmRNA配列に相補的である)ヌクレオチド配列を含む。特定の局面では、少なくとも約10、約25、約50、約100、約250もしくは約500ヌクレオチドまたは全体のACPLXコード鎖、またはそれらの一部のみ相補的な配列を含む、アンチセンス核酸分子が提供される。配列番号2のACPLXタンパク質のフラグメント、ホモログ、誘導体およびアナログをコードする核酸分子、または配列番号1のACPLXの核酸配列に相補的なアンチセンス核酸がさらに提供される。

## 【0079】

1つの実施形態では、アンチセンス核酸分子は、ACPLXをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。用語「コード領域」とは、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含む、ヌクレオチド配列の領域をいう(例えば、配列番号2に対応する、ヒトACPLXのタンパク質コード領域)。別の実施形態では、このアンチセンス核酸分子は、ACPLXをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対してアンチセンス

である。用語「非コード領域」とは、コード領域に隣接する、アミノ酸に翻訳されない、5'配列および3'配列をいう(すなわち、5'非翻訳領域および3'非翻訳領域ともいわれる)。

#### 【0080】

本明細書中に開示されるACPLXをコードするコード鎖配列(例えば、配列番号1)を考慮すれば、本発明のアンチセンス核酸は、WatsonおよびCrickまたはHoogsteenの塩基対合の規則に従って設計され得る。アンチセンス核酸分子は、ACPLX mRNAのコード領域全体に相補的であり得るが、より好ましくは、ACPLX mRNAのコード領域または非コード領域の一部にのみにアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ACPLX mRNAの翻訳開始部位を取り囲む領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さが約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45または約50ヌクレオチドであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を用いて、化学的合成または酵素連結反応を用いて構築され得る。例えば、アンチセンス核酸(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド)は、天然に存在するヌクレオチド、またはこの分子の生物学的安定性を増大させるように、もしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成される二重鎖の物理的安定性を増大させるように設計された種々に改変されたヌクレオチドを用いて化学的に合成され得る(例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが用いられ得る)。

#### 【0081】

アンチセンス核酸を作製するために用いられ得る改変されたヌクレオチドの例としては以下が挙げられる: 5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 $\beta$ -D-ガラクトシルクエオシン(galactosylqueosine)、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチ

ルグアニン、1 - メチルイノシン、2 , 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、 - D - マンノシルクエオシン (mannosylqueosine)、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン (queosine)、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2 , 6 - ジアミノプリン。あるいは、このアンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向でサブクローニングされた発現ベクターを用いて生物学的に生成され得る (すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、以下の小節にさらに記載される、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向である)。

#### 【0082】

本発明のアンチセンス核酸分子は、代表的には被験体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、その結果それらは、ACPLXタンパク質をコードする細胞性mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズするか、またはそれに結合し、それによってこのタンパク質の発現を、例えば転写および/または翻訳を阻害することによって阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成する従来のヌクレオチド相補性によってか、または例えばDNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんのメジャーグループ (major groove) における特異的相互作用を介してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接的注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的化するように改変され得、次いで全身に投与される。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、それらが選択された細胞表面上に発現されたレセプターまた

は抗原に特異的に結合するように改変され得る。これは、例えば、そのアンチセンス核酸分子を細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することによる。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中に記載されるベクターを用いて細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強力な *pol II* プロモーターまたは *pol III* プロモーターの制御下に置かれているベクター構築物が、好ましい。

#### 【0083】

なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸分子は、 $\beta$ -アノマー核酸分子である。 $\beta$ -アノマー核酸分子は、相補的RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する。ここで、通常の $\beta$ -ユニットとは対照的に、鎖は、互いに平行に走行する (Gaultierら (1987) *Nucleic Acids Res* 15:6625~6641)。このアンチセンス核酸分子はまた、2'-*o*-メチルリボヌクレオチド (Inoueら、(1987) *Nucleic Acids Res* 15:6131~6148) またはキメラRNA-DNAアナログ (Inoueら (1987) *FEBS Lett* 215:327~330) を含み得る。

#### 【0084】

このような改変としては、非制限的な例として、改変塩基、および糖リン酸バックボーンが改変または誘導体化された核酸が挙げられる。これらの改変は、少なくとも一部は、改変された核酸の化学的安定性を増強するために実施され、その結果、それらは、例えば、被験体での治療的適用におけるアンチセンス結合核酸として使用され得る。

#### 【0085】

(ALCLPLXリボザイムおよびPNA部分)

なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、一本鎖核酸 (例えば、mRNA) を切断し得るリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子であり、これらは、(その一本鎖核酸に対して) 相補領域を有する。従って、リボザイム (例えば、ハンマーヘッド型リボザイム

(HaseihoffおよびGerlach(1988)Nature 334 : 585~591に記載される))を使用して、ACPLX mRNA転写物を触媒的に切断し、それによってACPLX mRNAの翻訳を阻害し得る。ACPLXをコードする核酸に特異性を有するリボザイムは、本明細書中に開示されるACPLX DNAのヌクレオチド配列(すなわち、配列番号1)に基づいて設計され得る。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、ACPLXをコードするmRNA内で切断されるヌクレオチド配列に相補的である、テトラヒメナL-19 IVS RNAの誘導体が構築され得る。例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号;およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照のこと。あるいは、ACPLX mRNAを使用して、RNA分子のプールから、特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNAを選択し得る。例えば、Bartelら(1993)Science 261:1411~1418を参照のこと。

#### 【0086】

あるいは、ACPLX遺伝子発現は、ACPLXの調節領域(例えば、ACPLXのプロモーターおよび/またはエンハンサー)に相補的なヌクレオチド配列を標的化し、標的細胞中でACPLX遺伝子の転写を妨害する三重らせん構造を形成することによって阻害され得る。一般には、Helene.(1991)Anticancer Drug Des.6:569~84;Heleneら(1992)Ann.N.Y.Acad.Sci.660:27~36;およびMaher(1992)Bioassays 14:807~15を参照のこと。

#### 【0087】

種々の実施形態において、ACPLXの核酸は、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格で改変され、例えば、その分子の安定性、ハイブリダイゼーションまたは可溶性を改善し得る。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格を改変して、ペプチド核酸を生成し得る(Hyrupら(1996)Bioorg Med Chem 4:5~23を参照のこと)。本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースリン酸骨格が偽ペプチド骨格によって置換され、そして4つの天然の核塩基(nucleobase)の

みが保持されている核酸模倣物（例えば、DNA模倣物）をいう。PNAの中性の骨格は、低いイオン強度の条件下でDNAおよびRNAに対する特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、上記のHyrupら（1996）；Perry-O'Keefeら（1996）PNAS 93：14670～675において記載されるような標準的固相ペプチド合成プロトコルを用いて行われ得る。

#### 【0088】

ACPLXのPNAは、治療的適用および診断的適用において使用され得る。例えば、PNAは、例えば転写または翻訳の停止を誘導することまたは複製を阻害することによる、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンスまたは抗遺伝子剤として使用され得る。ACPLXのPNAはまた、例えばPNA指向性PCRクランピングによる遺伝子における一塩基対変異の分析において；他の酵素（例えば、S1ヌクレアーゼ）と組み合わせて使用される場合の人工制限酵素として（Hyrup B.（1996）上記）；またはDNA配列およびハイブリダイゼーションのプロープもしくはプライマーとして（Hyrupら（1996）上記；Perry-O'Keefe（1996）、上記）、使用され得る。

#### 【0089】

別の実施形態において、ACPLXのPNAは、例えば、それらの安定性または細胞性取り込みを増強するために、PNAに脂溶性基または他のヘルパー基を結合することによって、PNA-DNAキメラの形成によって、またはリボソームもしくは当該分野において公知の薬物送達の他の技術の使用によって改変され得る。例えば、PNAおよびDNAの有利な特性を組合せ得る、ACPLXのPNA-DNAキメラが生成され得る。PNA部分が高い結合親和性および特異性を提供する一方で、そのようなキメラは、DNA認識酵素（例えば、RNase HおよびDNAポリメラーゼ）がDNA部分と相互作用するのを可能にする。PNA-DNAキメラは、塩基のスタッキング、核塩基間の結合数および方向に関して選択される適切な長さのリンカーを使用して連結され得る（Hyrup（1996）上記）。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrup（1996）上記およびFinnら（1996）Nucl Acids Res 24：335

7～63において記載されるように行われ得る。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホラミダイトカップリング化学を用いて固体支持体上で合成され得、そして改変されたヌクレオシドアナログ（例えば、5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホラミダイト)が、PNAとDNAの5'末端との間に使用され得る(Magら(1989)Nucl Acid Res 17:5973～88)。次いで、PNAモノマーが段階様式でカップリングされ、5'PNAセグメントおよび3'DNAセグメントを有するキメラ分子を生成する(Finnら(1996)上記)。あるいは、5'DNAセグメントおよび3'PNAセグメントを用いて、キメラ分子が合成され得る。Peter senら(1975)Bioorg Med Chem Lett 5:1119～11124を参照のこと。

#### 【0090】

他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、以下のような他の付属の基を含み得る：ペプチド（例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的化するため）、または細胞膜を横切る輸送を容易にする因子（例えば、Letsingerら、1989、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:6553～6556；Lemaitreら、1987、Proc.Natl.Acad.Sci.84:648～652；PCT公開番号WO88/09810を参照のこと）、または血液脳関門（例えば、PCT公開番号WO89/10134を参照のこと）。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発切断剤（例えば、Krolら、1988、BioTechniques 6:958～976を参照のこと）、またはインターカレーター剤（例えば、Zon、1988、Pharm.Res.5:539～549を参照のこと）で改変され得る。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発切断剤など）に結合され得る。

#### 【0091】

(ACPLXポリペプチド)

本発明のACPLXポリペプチドは、その配列が配列番号2に提供されるAC

P L X様タンパク質を含む。本発明はまた、なおそのA C P L X様活性および生理学的機能を維持するタンパク質、またはその機能的フラグメントをコードするが、その任意の残基が配列番号2に示される対応する残基から変化し得る、変異体または改変体タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、この変異体または改変体タンパク質において、20%までまたはそれ以上の残基がそのように変化され得る。いくつかの実施形態において、本発明に従ったA L C L P L Xポリペプチドは、成熟ポリペプチドである。

#### 【0092】

一般に、A C P L X様機能を保持するA C P L X様改変体は、配列中の特定位置の残基が他のアミノ酸により置換され、そしてさらに、親タンパク質の2つの残基間にさらなる残基を挿入する可能性、および親配列から1つ以上の残基を欠失する可能性を含む任意の改変体を含む。任意のアミノ酸置換、挿入または欠失が、本発明に包含される。好適な状況では、この置換は、上記で規定されるような保存的置換である。

#### 【0093】

本発明の1つの局面は、単離されたA C P L Xタンパク質、およびその生物学的に活性な部分、またはその誘導體、フラグメント、アナログもしくはホモログに関する。抗A C P L X抗体を惹起するための免疫原としての使用に適するポリペプチドフラグメントもまた提供される。1つの実施形態では、ネイティブなA C P L Xタンパク質が、標準的なタンパク質精製技法を用いる適切な精製スキームにより、細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態では、A C P L Xタンパク質は、組換えDNA技法により生産される。組換え発現の代替えとして、A C P L Xタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技法を用いて化学的に合成され得る。

#### 【0094】

「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、A C P L Xタンパク質の由来する細胞または組織供給源由来の細胞性物質または他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、あるいは化学合成される場合に化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。用語「細胞性物質を実

質的に含まない」は、A C P L Xタンパク質の調製物を含み、この調製物において、A C P L Xタンパク質が単離または組換え産生される細胞の細胞性成分から、A C P L Xタンパク質は分離されている。1つの実施形態において、用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、非A C P L Xタンパク質（本明細書中において「夾雑タンパク質」とも呼ばれる）を約30%未満（乾燥重量にて）、より好ましくは非A C P L Xタンパク質を約20%未満、なおより好ましくは非A C P L Xタンパク質を約10%未満、そして最も好ましくは非A C P L Xタンパク質を約5%未満有する、A C P L Xタンパク質の調製物を含む。A C P L Xタンパク質またはその生物学的に活性な部分が組換え産生される場合、好ましくは、調製物はまた、培養培地を実質的に含まない。すなわち、培養培地は、そのタンパク質調製物の容量の約20%未満、より好ましくは約10%未満、そして最も好ましくは約5%未満を示す。

#### 【0095】

用語「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、タンパク質が、そのタンパク質の合成に関与する化学前駆体または他の化学物質から分離されているA C P L Xタンパク質の調製物を含む。1つの実施形態において、用語「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、化学前駆体または非A C P L Xの化学物質を約30%未満（乾燥重量にて）、より好ましくは化学前駆体または非A C P L X化学物質を約20%未満、なおより好ましくは化学前駆体または非A C P L X化学物質を約10%未満、そして最も好ましくは化学前駆体または非A C P L X化学物質を約5%未満有する、A C P L Xタンパク質の調製物を含む。

#### 【0096】

A C P L Xタンパク質の生物学的に活性な部分は、全長A C P L Xタンパク質より少ないアミノ酸を含み、そしてA C P L Xタンパク質の少なくとも1つの活性を示す、A C P L Xタンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列）に十分に相同なアミノ酸配列、またはA C P L Xタンパク質のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含むペプチドを含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、A C P L Xタンパク質の少なくとも1つの活性を有するド

メインまたはモチーフを含む。ACPLXタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、長さが10、25、50、100またはそれより多いアミノ酸であるポリペプチドであり得る。

【0097】

本発明のACPLXタンパク質の生物学的に活性な部分は、ACPLXタンパク質間に保存される上記の同定されたドメインの少なくとも1つを含み得る。さらに、タンパク質の他の領域が欠失している他の生物学的に活性な部分は、組換え技術によって調製され得、そしてネイティブなACPLXタンパク質の機能的活性のうちの1つ以上について評価され得る。

【0098】

1つの実施形態において、ACPLXタンパク質は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態において、ACPLXタンパク質は、配列番号2に実質的に相同であり、そして以下に詳細に議論されるように、天然の対立遺伝子改変体または変異誘発に起因してアミノ酸配列が異なるが、配列番号2のタンパク質の機能的活性を保持する。従って、別の実施形態において、ACPLXタンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列に少なくとも約45%相同なアミノ酸配列を含み、そして、配列番号2のACPLXタンパク質の機能的活性を保持するタンパク質である。

【0099】

(2つ以上の配列間の相同性の決定)

2つのアミノ酸配列または2つの核酸の相同性の百分率を決定するために、配列は、至適な比較の目的のために整列される(例えば、ギャップは、配列間の最適な整列について比較される配列のいずれかに導入され得る)。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でのアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められる場合、分子はその位置で相同である(すなわち、本明細書中で使用される場合、アミノ酸または核酸の「相同性」は、アミノ酸または核酸の「同一性」と等価である)。

【0100】

核酸配列の相同性は、2つの配列間の同一性の程度として決定され得る。相同性は、当該分野において公知のコンピュータプログラム（例えば、GCGプログラムパッケージにおいて提供されるGAPソフトウェア）を用いて決定され得る。NeedlemanおよびWunsch 1970 J Mol Biol 48:443~453を参照のこと。核酸配列比較のための以下の設定（GAP作製ペナルティー、5.0、およびGAP伸長ペナルティー、0.3）を用いてGCG GAPソフトウェアを使用すると、上記で言及される類似の核酸配列のコード領域は、配列番号1に示されるDNA配列のCDS（コード）部分と、好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性の程度を示す。

#### 【0101】

用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列が、特定の比較領域にわたって、残基毎を基準として同一である程度をいう。用語「配列同一性のパーセンテージ」は、以下により算出される：この比較領域にわたって最適に整列された2つの配列を比較すること、両方の配列において同一の核酸塩基（例えば、核酸の場合にはA、T、C、G、U、またはI）が存在する位置の数を決定し、一致した位置の数を導くこと、この一致した位置の数を、比較領域の内の位置の総数（すなわち、ウインドウサイズ）で除算すること、およびその結果を100で乗算して、配列同一性のパーセンテージを導くこと。用語「実質的な同一性」は、本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチド配列の特徴を示し、ここでこのポリヌクレオチドは、比較領域にわたり参照配列と比較して、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも85%の配列同一性、そして頻繁には90~95%の配列同一性、より通常には少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。用語「陽性（positive）残基の百分率」は、以下により算出される：その比較領域にわたって最適に整列された2つの配列を比較すること、同一のアミノ酸および保存的アミノ酸置換が、上記のように両方の配列において存在する位置の数を決定し、一致した位置の数を導くこと、この一致した位置の数を、比較領域中の位置の総数（すなわち、ウインド

ウサイズ)で除算すること、およびその結果を100で乗算して、陽性残基の百分率を導くこと。

#### 【0102】

(キメラタンパク質および融合タンパク質)

本発明はまた、ACPLXキメラタンパク質または融合タンパク質を提供する。本明細書中で使用される場合、ACPLX「キメラタンパク質」またはACPLX「融合タンパク質」は、非ACPLXポリペプチドに作動可能に連結された、ACPLXポリペプチドを含む。「ACPLXポリペプチド」は、ACPLXに対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいうが、「非ACPLXポリペプチド」は、ACPLXタンパク質に対して実質的に相同ではないタンパク質(例えば、ACPLXタンパク質とは異なり、かつ同一でかまたは異なる生物体由来するタンパク質)に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。ACPLX融合タンパク質において、このACPLXポリペプチドは、ACPLXタンパク質のすべてまたは一部分に対応し得る。1つの実施形態では、ACPLX融合タンパク質は、ACPLXタンパク質の少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含む。別の実施形態では、ACPLX融合タンパク質は、ACPLXタンパク質の少なくとも2つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結された」は、ACPLXポリペプチドおよび非ACPLXポリペプチドが、インフレームで互いに融合されていることを示すことが意図される。非ACPLXポリペプチドは、ACPLXポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

#### 【0103】

例えば、1つの実施形態では、ACPLX融合タンパク質は、第2のタンパク質の細胞外ドメインに連結されたACPLXポリペプチドを含む。このような融合タンパク質は、ACPLX活性を調節する化合物についてのスクリーニングアッセイでさらに利用され得る(このようなアッセイは、以下に詳細に記載される)。

#### 【0104】

別の実施形態においては、この融合タンパク質は、GST-ACPLX融合タ

ンパク質であり、ここではA C P L X配列が、G S T（すなわち、グルタチオンS - トランスフェラーゼ）配列のC末端に融合される。このような融合タンパク質は、組換えA C P L Xの精製を容易にし得る。

#### 【0105】

さらに別の実施形態において、この融合タンパク質は、そのN末端に異種シグナル配列を含むA C P L Xタンパク質である。例えば、ネイティブのA C P L Xシグナル配列（すなわち、配列番号2のアミノ酸）は、別のタンパク質から除去され、シグナル配列と置換され得る。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）において、A C P L Xの発現および/または分泌は、異種シグナル配列の使用によって増加され得る。

#### 【0106】

別の実施形態においては、この融合タンパク質は、A C P L X - 免疫グロブリン融合タンパク質であり、ここでは1つ以上のドメインを含むA C P L X配列が、免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合される。本発明のこのA C P L X - 免疫グロブリン融合タンパク質は、薬学的組成物中に取り込まれ、そして被験体に投与されて、細胞の表面上でA C P L XリガントとA C P L Xタンパク質との間の相互作用を阻害し、それによってインビボのA C P L X媒介信号伝達を抑制し得る。1つの非限定的な例においては、意図される本発明のA C P L Xリガントは、A C P L Xレセプターである。このA C P L X - 免疫グロブリン融合タンパク質を用い、A C P L X同族リガントの生体利用性に影響を与え得る。A C P L Xリガント/A C P L X相互作用の阻害は、増殖障害および分化障害の両方の処置、ならびに細胞生存の調節（例えば、促進または阻害）に、治療的に有用であり得る。さらに、本発明のこのA C P L X - 免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体中で抗A C P L X抗体を産生するための免疫原として用いられ得、A C P L Xリガントを精製し、そしてA C P L XリガントとのA C P L Xの相互作用を阻害する分子を同定するスクリーニングアッセイで用いられ得る。

#### 【0107】

本発明のA C P L Xキメラまたは融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技

法により産生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントを、従来の技法に従って、例えば、連結のための平滑末端または粘着(stagger)末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じて粘着(cohesive)末端のフィルイン、所望しない連結を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結を採用することにより、インフレームで一緒に連結する。別の実施形態では、融合遺伝子を、自動化DNA合成機を含む従来技法により合成し得る。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR増幅を、キメラ遺伝子配列を生成するために次いでアニールおよび再増幅され得る、2つの連続遺伝子フラグメント間の相補的オーバハングを生じるアンカープライマーを用いて実施し得る(例えば、Ausbelら(編)CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、1992を参照のこと)。さらに、融合成分(例えば、GSTポリペプチド)をすでにコードした多くの発現ベクターが市販されている。ACPLXをコードする核酸は、この融合成分がACPLXタンパク質にインフレーム連結されるように、このような発現ベクター中にクローン化され得る。

#### 【0108】

(ACPLXアゴニストおよびアンタゴニスト)

本発明はまた、ACPLXアゴニスト(模倣物)として、またはACPLXアンタゴニストとして機能するACPLXタンパク質の改変体に関する。ACPLXタンパク質の改変体、例えば、ACPLXタンパク質の離散した点変異または短縮型が、変異誘発により生成され得る。ACPLXタンパク質のアゴニストは、天然に存在する形態のACPLXタンパク質と実質的に同じ生物学的活性、またはその生物学的活性のサブセットを保持し得る。ACPLXタンパク質のアンタゴニストは、天然に存在する形態のACPLXタンパク質の1つ以上の活性を、例えば、ACPLXタンパク質を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流または上流メンバーに競合的に結合することにより阻害し得る。従って、特異的生物学的効果が、限られた機能の改変体を用いた処理により惹起され得る。1つの実施形態では、このタンパク質の天然に存在する形態の生物学活性のサブセットを有する改変体を用いた被験体の処置は、ACPLXタンパク質の天然に存在する

形態を用いた処置に対して被験体におけるより少ない副作用を有する。

#### 【0109】

ACPLXアゴニスト(模倣物)として、またはACPLXアンタゴニストのいずれかとして機能するACPLXタンパク質の改変体は、ACPLXタンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト活性のためのACPLXタンパク質の変異体、例えば短縮型変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより同定され得る。1つの実施形態では、ACPLX改変体の多彩なライブラリーは、核酸レベルのコンビナトリアル変異誘発により生成され、そして多彩な遺伝子ライブラリーによりコードされる。ACPLX改変体の多彩なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を、潜在的なACPLX配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、あるいは、その中にACPLX配列のセットを含む(例えば、ファージディスプレイのための)より大きな融合タンパク質のセットとして発現可能であるように、遺伝子配列に酵素的に連結することにより産生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的なACPLX改変体のライブラリーを産生するために用いられ得る種々の方法がある。縮重遺伝子配列の化学的合成は、自動化DNA合成機中で実施され得、次いでこの合成遺伝子は、適切な発現ベクター中に連結される。遺伝子の縮重セットの使用は、1つの混合物において、潜在的なACPLX配列の所望のセットをコードする配列のすべての供給を可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成する方法は当該分野で公知である(例えば、Narang(1983)Tetrahedron 39:3; Itakuraら(1984)Annu Rev Biochem 53:323; Itakuraら(1984)Science 198:1056; Ikeら(1983)Nucl Acid Res 11:477を参照のこと)。

#### 【0110】

(ポリペプチドライブラリー)

さらに、ACPLXタンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーを用いて、ACPLXタンパク質の改変体のスクリーニングおよび引き続く選択のためのACPLXフラグメントの多彩な集団を生成し得る。1つの実施形態では、

コード配列フラグメントのライブラリーは、ACPLXコード配列の二本鎖PCRフラグメントを、1分子あたり約1つのみのニックが生じる条件下、ヌクレアーゼで処理すること、二本鎖DNAを変性させること、異なるニック産物からのセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成するためにこのDNAを再生すること、S1ヌクレアーゼを用いた処理により再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去すること、および得られるフラグメントライブラリーを発現ベクター中に連結することにより生成し得る。この方法により、ACPLXタンパク質の種々のサイズのN末端および内部フラグメントをコードする発現ライブラリーが派生し得る。

#### 【0111】

点変異または短縮により作成されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、選択された性質を有する遺伝子産物のcDNAライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技法が当該分野で公知である。このような技法を、ACPLXタンパク質のコンビナトリアル変異誘発により生成された遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、高スループット分析に適した最も広く用いられる技法は、代表的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター中にクローニングすること、得られるベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、およびこのコンビナトリアル遺伝子を、所望の活性の検出が、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下で発現することを含む。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増大する新規技法であるリクルーシブエンセブル変異誘発(REM)を、スクリーニングアッセイと組み合わせて用い、ACPLX改変体を同定し得る(ArkinおよびYourvan(1992)PNAS 89:7811-7815; Delgraveら(1993)Protein Engineering 6:327-331)。

#### 【0112】

(ACPLX抗体)

ACPLXタンパク質に対する抗体、またはACPLXタンパク質のフラグメ

ントもまた、本発明に含まれる。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン(Ig)分子の免疫学的に活性な部分(すなわち、抗原に特異的に結合する(免疫反応する)抗原結合部位を含む分子)をいう。このような抗体としては、ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、 $F_{ab}$ フラグメント、 $F_{ab}$ フラグメントおよび $F_{(ab')_2}$ フラグメント、ならびに $F_{ab}$ 発現ライブラリーが挙げられるが、これらに限定されない。一般的に、ヒト由来の抗体分子は、IgG、IgM、IgA、IgEおよびIgDの任意のクラスに関連し、これらは分子内に存在する重鎖の性質によってお互いに異なる。特定のクラスは同様にサブクラス(例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>など)を有する。さらに、ヒトにおいては、軽鎖は鎖または鎖であり得る。本明細書中で抗体に対する参照は、ヒト抗体種のすべてのこのようなクラス、サブクラスおよび型に対する参照を含む。

#### 【0113】

本発明の単離されたACPLX関連タンパク質は、抗原、またはその一部もしくはフラグメントとして役立つことが意図され得、そしてさらに、免疫原として使用され、ポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体の調製のための標準的な技術を用いて、抗原に免疫特異的に結合する抗体を生成し得る。全長タンパク質が使用され得るか、あるいは本発明は、免疫原として使用するための抗原の抗原性ペプチドフラグメントを提供する。抗原性ペプチドフラグメントは、全長タンパク質のアミノ酸配列(例えば、配列番号2において示されるアミノ酸配列)の少なくとも6アミノ酸残基を含み、そしてそれらのエピトープを含み、その結果このペプチドに対して惹起された抗体は、全長タンパク質またはこのエピトープを含む任意のフラグメントと特定の免疫複合体を形成する。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも10アミノ酸残基、または少なくとも15アミノ酸残基、または少なくとも20アミノ酸残基、または少なくとも30アミノ酸残基を含む。この抗原性ペプチドにより含まれる好ましいエピトープは、そのペプチド表面上に位置するタンパク質の領域であり；通常、これらは親水性領域である。

#### 【0114】

本発明の特定の実施形態では、抗原性ペプチドにより包含される少なくとも1

つのエピトープは、ACPLXタンパク質の表面上に位置するACPLX関連タンパク質の領域、例えば、親水性領域である。ヒトACPLX関連タンパク質配列の疎水性分析は、ACPLX関連タンパク質のどの領域が特に親水性であるか、そしてそれ故、抗体産生を標的にするために有用な表面残基をコードするようであるかを示す。抗体産生を標的にする手段として、親水性および疎水性の領域を示すヒドロパシープロットを、例えば、フーリエ変換とともにまたはなしの、Kyte DoolittleまたはHopp Woods法を含む、当該分野で周知の任意の方法により生成し得る。例えば、それらの全体が本明細書に参考として援用される、HoppおよびWoods、1981、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78:3824-3828; KyteおよびDoolittle 1982、J. Mol. Biol. 157:105-142を参照のこと。抗原性タンパク質またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログ内の1つ以上のドメインに対して特異的な抗体はまた、本明細書中で提供される。

#### 【0115】

本発明のタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはオルソログは、これらのタンパク質成分に免疫特異的に結合する抗体の産生における免疫原として利用され得る。

#### 【0116】

当該分野において公知の種々の手順が、本発明のタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはオルソログに対して指向されるポリクロナール抗体またはモノクロナール抗体の産生のために使用され得る（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, および Lane D, 1998, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。これらの抗体のうちいくつかは、以下で考察される。

#### 【0117】

（ポリクロナール抗体）

ポリクロナール抗体の産生のために、種々の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の動物）は、ネイティブなタンパク質、その合成改変体、または前記の誘導体を用いる1以上の注射によって免疫され得る。適切な免疫原性調製物は、例えば、天然に存在する免疫原性タンパク質、免疫原性タンパク質を提示する化学的に合成されたポリペプチド、または組換え的に発現される免疫原性タンパク質を含み得る。さらに、このタンパク質は、免疫されている哺乳動物において免疫原性であることが知られている第2のタンパク質に結合体化され得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、および大豆トリブシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。この調製物はさらに、アジュバントを含み得る。種々のアジュバントが免疫学的応答を増加させるために使用され、このようなアジュバントとしては、Freund's（完全および不完全）、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニック（pluronic）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、ジニトロフェノールなど）、ヒトにおいて使用可能なアジュバント（例えば、Bacille Calmette - GuerinおよびCorynebacterium parvum）または類似の免疫刺激剤が挙げられるが、これらに限定されない。使用され得るアジュバントのさらなる例としては、MPL - TDMアジュバント（モノホスホリルリピドA、合成トレハロースジコリノミコレート）が挙げられる。

#### 【0118】

免疫原性タンパク質に対して指向されるポリクロナール抗体分子は、哺乳動物から（例えば、血液から）単離され得、そして周知の技術（例えば、プロテインAまたはプロテインGを用いるアフィニティクロマトグラフィー（これは、主に免疫血清のIgG画分を提供する））によってさらに精製され得る。続いて、または代替的に、求められている免疫グロブリンの標的である特定の抗原またはその抗原のエピトープがカラムに固定され、免疫アフィニティクロマトグラフィーによって免疫特異的抗体を精製し得る。免疫グロブリンの精製は、例えば、D. Wilkinson (The Scientist (The Scientis

t, Inc., Philadelphia PAより発行)、第14巻、第8号(2000年4月17日)、25~28頁)によって考察される。

【0119】

(モノクローナル抗体)

本明細書で用いられる用語「モノクローナル抗体」(MAb)または「モノクローナル抗体組成物」は、独特の軽鎖遺伝子産物および独特の重鎖遺伝子産物からなる唯一の分子種の抗体分子を含む抗体分子の集団をいう。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)は、すべての分子の集団に同一である。従って、MAbは、抗原への独特の結合親和性によって特徴付けられる抗原の特定のエピトープと免疫反応可能な抗原結合部位を含む。

【0120】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ方法(例えば、KohlerおよびMilstein, Nature, 256:495(1975)に記載されるような方法)を使用して調製され得る。ハイブリドーマ方法において、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主細胞は、免疫因子で代表的に免疫され、免疫因子に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生し得るリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫され得る。

【0121】

免疫因子としては、代表的に、タンパク質抗原、そのフラグメントまたはその融合タンパク質が挙げられる。一般的には、以下のいずれかである: ヒト起源の細胞が望まれる場合は、末梢血リンパ球が使用され、または非ヒト哺乳動物供給源が望まれる場合は、脾臓細胞またはリンパ節細胞が使用される。次いで、適切な融合因子(例えば、ポリエチレングリコール)を使用して、リンパ球を不死化細胞株に融合し、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press(1986)第59-103頁)。不死化細胞株は、哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシおよびヒト起源の骨髄腫細胞に通常形質転換される。通常ラットまたはマウスの骨髄腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、1以上の物質(融合されていない不死化細胞の増殖も生存

も阻害する)を適切に含む適切な培養培地中で培養され得る。例えば、親の細胞が酵素、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPRT)を欠く場合、ハイブリドーマからの培養培地は、代表的にヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含み(「HAT培地」)、それらの物質はHGPRT欠失細胞の増殖を阻害する。

#### 【0122】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合する細胞株であり、それらは選択された抗体産生細胞の安定な高レベルの抗体の発現を支持し、そしてHAT培地のような培地に敏感である。より好ましい不死化細胞株はマウス骨髄腫細胞株であり、それらを、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CaliforniaおよびAmerican Type Culture Collection, Manassas, Virginiaから得ることが可能である。ヒト骨髄腫およびマウス-ヒト骨髄腫細胞株はまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載される(Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984); Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Application, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987)第51-63頁)。

#### 【0123】

次いで、ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、抗原に対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって決定されるか、またはインビトロ結合アッセイ(例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)または酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA))によって決定される。このような技術およびアッセイは、当該分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、MunsonおよびPollard, Anal. Biochem., 107:220(1980)のスキッチャード分析によって決定され得る。好ましくは、標的抗原に対する高い程度の特異性および高結

合親和性を有する抗体が、単離される。

【0124】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、希釈手順を限定することによって、クローンをサブクローニングし得、そして標準方法によって増殖し得る。例えば、この目的のために適切な培養培地としては、Dulbecco's Modified Eagle's MediumおよびRPMI-1640培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物内の腹水としてインビボで増殖され得る。

【0125】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順（例えば、タンパク質Aセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィー）によって、培養培地または腹水から、単離または精製され得る。

【0126】

モノクローナル抗体はまた、組換えDNA方法（例えば、米国特許第4,816,567号に記載される方法）によって作製され得る。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離され得、そして配列決定され得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として役立つ。一旦単離されると、DNAは、発現ベクターに配置され得、次いでそれらは、宿主細胞（例えば、さもなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しないサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髓腫細胞）にトランスフェクトされ、組換え宿主細胞内でのモノクローナル抗体の合成を得る。DNAはまた、例えば、相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインをコードする配列の置換（米国特許第4,816,567号；Morrisson, Nature 368, 812-13 (1994)）によってか、または非免疫グロブリンポリペプチドについてのコード配列のすべてまたは一部の配列をコードする免疫グロブリンへの共有結合的な連結によって改変され得る。

このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常領域に置換され得るか、または本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変領域に置換され得、キメラ二価の抗体を作製する。

#### 【0127】

##### (ヒト化抗体)

本発明のタンパク質抗原に対する抗体は、さらにヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。これらの抗体は、投与された免疫グロブリンに対するヒトの免疫応答を引き起こさないヒトへの投与に適する。抗体のヒト化形態は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらのフラグメント(例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>または他の抗体の抗原結合配列)であり、それらは主にヒト免疫グロブリンの配列から構成され、そして非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含む。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列についてのげっ歯類CDRまたはCDR配列の置換によって、Winterおよび共同研究者の方法(Jonesら、Nature, 321:522-525(1986); Riechmannら、Nature, 332:323-327(1988); Verhoeyenら、Science, 239:1534-1536(1988))の後に達成され得る。(米国特許第5,225,539号もまた参照のこと。)いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFv骨格(framework)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、患者の抗体においても、移入されたCDRまたは骨格配列においても見出されない残基を含み得る。一般に、ヒト化抗体は、すべての少なくとも1つ、および代表的には2つの可変領域を実質的に含む。これらの領域内で、すべてのまたは実質的にすべてのCDR領域は非ヒト免疫グロブリンの領域に対応し、そしてすべてまたは実質的にすべての骨格領域はヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の領域に対応する。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)、代表的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を必要に応じて含む(Jonesら、1986; Riechmannら、1988; およびPresta、Curr. Opin. Struct. Biol., 2:593-596(1992))。

#### 【0128】

## (ヒト抗体)

C D Rを含む軽鎖および重鎖の両方の全体配列がヒト遺伝子から本質的に生じる抗体分子に、ヒト抗体は十分に関連する。このような抗体を、「ヒト抗体」、または「十分なヒト抗体」と本明細書中で呼ぶ。ヒトモノクローナル抗体は、トリオーマ ( t r i o m a ) 技術によって調製され得る；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 ( K o z b o r ら、1983 Immunol Today 4:72を参照のこと) およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技術 ( C o l e ら、1985: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 第77-96頁)。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実行において使用され得、そしてヒトハイブリドーマの使用によってか ( C o t e ら、1983. Proc Natl Acad USA 80:2026-2030を参照のこと)、またはインビトロでのEpstein Barr Virusを用いたヒトB細胞による形質転換によって ( C o l e ら、1985: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 第77-96頁を参照のこと) 産生され得る。

## 【0129】

さらに、ヒト抗体はまた、さらなる技術 ( フェージディスプレイライブラリー ( H o o g e n b o o m および W i n t e r , J . M o l . B i o l . , 227:381 (1991); M a r k s ら、J . M o l . B i o l . , 222:581 (1991) ) を含む) を使用して産生され得る。同様に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物 ( 例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が、部分的または完全に不活化されているマウス) に導入することによって、ヒト抗体は作製され得る。チャレンジの際にヒト抗体産生が観察され、このことはすべての点 ( 遺伝子再配列、アセンブリー、および抗体レパートリーを含む) でヒトにおいて観察されたものに密接に類似する。このアプローチは、例えば、以下に記載される: 米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,611,016号、およびM a r k s ら ( B i o / T e c h n o

logy 10、779-783(1992)); Lonbergら(Nature 368 856-859(1994)); Morrison(Nature 368、812-13(1994)); Fishwildら(Nature Biotechnology 14、845-51(1996)); Neuberger(Nature Biotechnology 14、826(1996)); ならびにLonbergおよびHuszar(Intern. Rev. Immunol. 13 65-93(1995))。

#### 【0130】

ヒト抗体は、抗原によるチャレンジに应答して動物の内因性抗体よりもヒト抗体を十分に産生するように改変されたトランスジェニック非ヒト動物を使用して、さらに産生され得る。(PCT公開WO94/02602を参照のこと。)非ヒト宿主における重免疫グロブリン鎖および軽免疫グロブリン鎖をコードする内因性遺伝子は、不活性化されており(*incapacitate*)、そしてヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする活性な遺伝子座は、宿主のゲノムに挿入される。例えば、要求性ヒトDNAセグメントを含む酵母人工染色体を使用して、ヒト遺伝子は組み込まれる。次いで、すべての所望の改変を提供する動物を、完全な改変の相補体よりもより少ない改変の相補体を含む中間トランスジェニック動物を雑種することによって子孫として得る。このような非ヒト動物の好ましい実施形態は、マウスであり、PCT公開WO96/33735およびWO96/34096に開示されるようにXenomous™と呼ばれる。この動物は、ヒト免疫グロブリンを十分に分泌するB細胞を産生する。目的の免疫原での免疫後の動物から(例えば、ポリクローナル抗体の調製)、あるいは動物由来の不活化されたB細胞(例えば、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ)から、抗体を直接得ることが可能である。さらに、ヒト可変領域を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子は、抗体を直接得るために回復され、そして発現され得るか、または抗体のアナログ(例えば、1本鎖Fv分子)を得るために、さらに改変され得る。

#### 【0131】

内因性免疫グロブリン重鎖の発現を欠く非ヒト宿主(マウスとして例証される

)を作製するための方法の例は、米国特許第5,939,598号に記載される。それを、以下の工程を包含する方法によって得ることが可能である：遺伝子座の再配置を防ぎ、そして再配置された免疫グロブリン重鎖遺伝子座の転写物の形成を防ぐために、胚幹細胞における少なくとも1つの内因性重鎖遺伝子座由来のJセグメント遺伝子を欠失する工程であって、ここで、該欠失が、選択マーカーをコードする遺伝子を含む標的ベクターによってもたらされる、工程；およびトランスジェニックマウス（その体細胞および生殖細胞は、選択マーカーをコードする遺伝子を含む）を、胚幹細胞から作製する工程。

#### 【0132】

目的の抗体（例えば、ヒト抗体）を産生する方法は、米国特許第5,916,771号に開示される。それは以下の工程を包含する：重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、培養中の1つの哺乳動物宿主細胞に導入する工程、軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、別の哺乳動物宿主細胞に導入する工程、およびハイブリッド細胞を形成するために2つの細胞融合する工程。ハイブリッド細胞は、重鎖および軽鎖を含む抗体を発現する。

#### 【0133】

この手順のさらなる改善において、免疫原上の臨床的に関連するエピトープを同定する方法、および関連するエピトープに高い親和性で免疫特異的に結合する抗体を選択する関連する方法は、PCT公開WO99/53049に開示される。

#### 【0134】

(F<sub>ab</sub>フラグメントおよび1本鎖抗体)

本発明に従って、技術は、本発明の抗原性タンパク質に特異的な1本鎖抗体の産生に適用され得る（例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと）。さらに、方法は、F<sub>ab</sub>発現ライブラリーの構築に適用されて（例えば、Huseら、1989 Science 246:1275-1281を参照のこと）、タンパク質またはその誘導體、フラグメント、アナログまたはホモログについての所望の特異性を有するモノクローナルF<sub>ab</sub>フラグメントの迅速かつ効果的な同定を可能にし得る。タンパク質抗原に対するイディオタイプを含む抗体フラグ

メント ( ( i ) 抗体分子のペプシン消化によって産生される  $F_{(ab')_2}$  フラグメント ; ( i i )  $F_{(ab')_2}$  フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって産生された  $F_{ab}$  フラグメント ; ( i i i ) パパインおよび還元剤を用いた抗体分子の処理によって産生された  $F_{ab}$  フラグメント、および ( i v )  $F_v$  フラグメントを含むが、これらに限定ない) は、当該分野で公知の技術によって産生され得る。

#### 【0135】

##### (二重特異的抗体)

二重特異的抗体は、モノクローナル抗体 (好ましくはヒトモノクローナル抗体またはヒト化されたモノクローナル抗体) であって、これは少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有する。この場合において、結合特異性の1つは、本発明の抗原性タンパク質に対してである。第2の結合標的は、任意の他の抗原であり、そして有利には細胞表面タンパク質あるいはレセプターまたはレセプターサブユニットである。

#### 【0136】

二重特異的抗体を作製する方法は、当該分野で公知である。伝統的に、二重特異的抗体の組換え生成は、2つの免疫グロブリンの重鎖/軽鎖の対の同時発現に基づき、ここでこの2つの重鎖は異なる特異性を有する (MilsteinおよびCuello、Nature, 305:537-539 (1983))。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな組み合わせのために、これらのハイブリドーマ (クアドローマ) は、10の異なる抗体分子の潜在的混合物を作製し、このうち1つのみが正確な二重特異的構造を有する。この正確な分子の精製は、通常アフィニティークロマトグラフィー工程によって達成される。同様の手順は、1993年5月13日開示のWO93/08829、およびTraunckerら、1991 EMBO J., 10:3655-3659において開示される。

#### 【0137】

所望の結合特異性 (抗体 - 抗原結合部位) を有する抗体可変ドメインは、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合され得る。この融合は、好ましくは免疫グロ

ブリン重鎖定常ドメインを有し、ヒンジ、CH<sub>2</sub>、およびCH<sub>3</sub>領域の少なくとも部分を含む。この融合物中の少なくとも1つに存在する軽鎖結合のために必要な部位を含む第1の重鎖定常領域(CH<sub>1</sub>)を有することが好ましい。この免疫グロブリン重鎖融合体、および所望の場合、この免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別々の発現ベクターに挿入され、そして適切な宿主生物体に同時トランスフェクトされる。二重特異的抗体の作製のさらなる詳細は、例えば、Sureshら、Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照のこと。

#### 【0138】

WO96/27011に記載される別のアプローチに従って、抗体分子の対の間の界面は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロダイマーのパーセンテージを最大化するために操作され得る。好ましい界面は、抗体定常ドメインのCH<sub>3</sub>領域の少なくとも一部を含む。この方法において、第1の抗体分子の界面からの1つ以上の小さなアミノ酸側鎖は、より大きな側鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)で置換される。大きな側鎖についての同一または同様のサイズの代償的な「空洞」は、大きなアミノ酸側鎖を小さなアミノ酸側鎖(例えば、アラニンまたはスレオニン)で置換することによって、第2の抗体分子の界面上に生成される。このことは、ホモダイマーのような他の不必要な最終生成物に対して、ヘテロダイマーの収量を増加するための機構を提供する。

#### 【0139】

二重特異的抗体は、全長抗体または抗体フラグメント(例えば、F(ab')<sub>2</sub>二重特異的抗体)として調製され得る。抗体フラグメントから二重特異的抗体を作製するための技術は、文献において記載される。例えば、二重特異的抗体は、化学結合を使用して調製され得る。Brennanら、Science 229:81 (1985)は、インタクトな抗体がタンパク分解的に切断されてF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを作製する手順を記載する。これらのフラグメントは、ビスナルジチオールを安定化し、そして分子間ジスルフィド形成を阻止するために、ジチオール錯化剤亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元される。次いで、この作製されたF(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、チオニトロベンゾエート(TBN)誘導体に

変換される。次いで、F a b ' - T B N誘導体の1つは、メルカプトエチルアミンでの還元によってF a b ' - チオールに再変換され、そしてこれは等モル量の他のF a b ' - T B N誘導体と混合されて二重特異的抗体を形成する。生成された二重特異的抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として使用され得る。

#### 【0140】

さらに、F a b ' フラグメントは、E . c o l i から直接回収され得、そして化学的にカップリングされて二重特異的抗体を形成する。S h a l a b y ら、J . E x p . M e d . 175 : 217 - 225 ( 1992 ) は、完全にヒト化された二重特異的抗体F ( a b ' )<sub>2</sub>分子の生成を記載する。各F a b ' フラグメントは、E . c o l i から別々に分泌され、そしてインビトロでの指向された化学的カップリングに供され、二重特異的抗体を形成する。従って、形成されたこの二重特異的抗体は、E r b B 2レセプターを過剰発現する細胞および正常なヒトT細胞に結合し得、そしてヒト胸部腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解性活性を誘因し得る。

#### 【0141】

組換え細胞培養物から直接二重特異的抗体フラグメントを作製し、そして単離するための種々の技術が記載されてきた。例えば、二重特異的抗体は、ロイシンジッパーを使用して産生される。K o s t e l n y ら、J . I m m u n o l . 148 ( 5 ) : 1547 - 1553 ( 1992 )。F o sおよびJ u nタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって2つの異なる抗体のF a b ' 部分に結合される。この抗体ホモダイマーは、ヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、次いで再酸化されて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた、抗体ホモダイマーの産生のために使用され得る。H o l l i n g e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 90 : 6444 - 6448 ( 1993 ) に記載されるこの「ディアボディー ( d i a b o d y )」技術は、二重特異的抗体フラグメントを作製するための代替的な機構を提供した。このフラグメントは、短すぎて同じ鎖上の2つのドメインの間を対にできないリンカーによって軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> ) に接続された重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> ) を含む。従って、1つのフラグメントのV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインは、別のフラグメントの相補的な

$V_L$ および $V_H$ ドメインと対になるように強制され、これによって2つの抗原結合部位が形成する。単鎖 $F_v(sF_v)$ ダイマーの使用によって二重特異的抗体フラグメントを作製するための別のストラテジーもまた、報告されてきた。Gruberら、*J. Immunol.* 152:5368(1994)を参照のこと。

【0142】

2つより多い結合価を有する抗体が意図される。例えば、三重特異的抗体が調製され得る。Tuttら、*J. Immunol.* 147:60(1991)。

【0143】

例示的な二重特異的抗体は、2つの異なるエピトープに結合し得、このうち少なくとも1つは、本発明のタンパク質抗原に起源を有する。あるいは、免疫グロブリン分子の抗抗原性アームは、T細胞レセプター分子のような白血球(例えば、CD2、CD3、CD28、またはB7)、あるいはIgGに対するFcレセプター(FcR)(例えば、FcRI(CD64)、FcRII(CD32)およびFcRIII(CD16))上の標的化分子に結合するアームに、特定の抗原を発現する細胞に対する細胞の防御機構に焦点を合わせるように結合され得る。二重特異的抗体はまた、特定の抗原を発現する細胞に対する細胞傷害性因子に指向するために使用され得る。これらの抗体は抗原結合アーム、および細胞傷害性因子または放射性核種キレーター(例えば、EOTUBE、DPTA、DOTA、またはTETA)に結合するアームを保有する。目的の別の二重特異的抗体は、本明細書中に記載のタンパク質抗原に結合し、そしてさらに組織因子(TF)に結合する。

【0144】

(ヘテロ接合体抗体)

ヘテロ接合体抗体はまた、本発明の範囲内である。ヘテロ接合体抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不必要な細胞に標的化するために(米国特許第4,676,980号)、およびHIV感染の処置のために(WO91/00360;WO92/200373;EP03089)提案されてきた。この抗体(架橋剤を含む抗体を含む)は、インビトロで、合成タンパク質化学において公知の方法を使用して調製され得ることが意

図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応の使用またはチオエーテル結合の形成によって構築され得る。この目的のための適切な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル - 4 -メルカプトブチルイミデート、ならびに例えば米国特許第4,676,980号において開示される試薬が挙げられる。

#### 【0145】

(エフェクター機能操作)

本発明の抗体を、エフェクター機能について、例えば癌の処置における抗体の効力を増大するように改変することが望ましい。例えば、システイン残基は、Fc領域に導入され得、これによってこの領域における鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にする。従って、作製されるこのホモダイマー抗体は、改良されたインターナリゼーションの能力および/または増加した補体媒介細胞死滅、ならびに抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を有し得る。Caronら、J. Exp. Med., 176:1191-1195(1992)およびShopes、J. Immunol. 148:2918-2922(1992)を参照のこと。増大した抗腫瘍活性を有するホモダイマー抗体はまた、Wolffら、Cancer Research, 53:2560-2656(1993)に記載されるヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製され得る。あるいは、抗体は操作され得、これは二重のFc領域を有し、そしてこれによって増大した補体溶解およびADCCの能力を有し得る。Stevensonら、Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230(1989)を参照のこと。

#### 【0146】

(免疫接合体)

本発明はまた、細胞傷害性の薬剤(例えば、化学療法剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素学的に活性な毒素、あるいはそれらのフラグメント)、または放射性同位体(すなわち、放射性接合体))に結合した抗体を含む免疫接合体に関する。

#### 【0147】

このような免疫接合体の作製において有用な化学療法剤は、上記に記載される。使用され得る酵素学的に活性な毒素およびそれらのフラグメントとしては、ジ

フテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖 (*Pseudomonas aeruginosa*由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン (*modeccin*) A鎖、 $\alpha$ -サルシン、*Aleurites fordii*タンパク質、ジアンチン (*dianthin*) タンパク質、*Phytolacca americana*タンパク質 (PAPI、PAPII、およびPAPP-S)、*momordica charantia*インヒビター、クルシン (*curcin*)、クロチン (*crotin*)、*sepaonaria officinalis*インヒビター、ゲロニン (*gelonin*)、ミトゲリン (*mitogellin*)、レストリクトシン (*restrictocin*)、フェノマイシン (*phenomycin*)、エノマイシン (*enomycin*)、およびトリコテセン (*tricothecene*) が挙げられる。種々の放射性核種は、放射性結合した抗体の作製のために利用可能である。その例としては、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{131}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、および $^{186}\text{Re}$ が挙げられる。

#### 【0148】

抗体および細胞傷害性因子の接合体は、種々の二官能性タンパク質 - カップリング剤 (例えば、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオール) プロピオネート (SPDP)、イミノチオラン (*iminothiolane*) (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (例えば、ジメチルアジピミデート HCL)、活性エステル (例えば、ジスクシンイミジルスベレート)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド (*glutaredhyde*))、ビスアジド化合物 (例えば、ビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン)、ビス - ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えば、トリエン2, 6 - ジイソシアネート)、およびビス - 活性フッ素化合物 (例えば、1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼン)) を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vittettaら、*Science*, 238: 1098 (1987) に記載されるように調製され得る。炭素 - 14 - 標識1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) は、放射性ヌクレオチドの抗体への結合のための例示的なキレート剤である。WO94/11026を参照のこと

と。

【0149】

別の実施形態において、腫瘍の前標的化における利用のために、この抗体は、「レセプター」（例えば、ストレプトアビジン）に結合され得、ここで抗体-レセプター接合体は患者に投与され、続いて除去剤を使用して結合していない接合体が循環から除去され、次いで細胞傷害性因子に次々に結合する「リガンド」（例えば、アビジン）が投与される。

【0150】

（ACPLX組換え発現ベクターおよび宿主細胞）

本発明の別の局面は、ACPLXタンパク質、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログをコードする核酸を含むベクター、好ましくは発現ベクターに関する。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」は、これが接続された別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。ベクターの1つの型は「プラスミド」であり、これはさらなるDNAセグメントが連結し得る環状の二本鎖DNAループをいう。ベクターの別の型はウイルス性ベクターであり、ここでさらなるDNAセグメントはこのウイルス性ゲノムに連結され得る。特定のベクターは宿主細胞中で自発的に複製し得、この中に導入される（例えば、細菌の複製起源を有する細菌ベクターおよびエピソームの哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳類ベクター）は、宿主細胞に導入される際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、そしてこれによって宿主のゲノムと同調して複製される。さらに、特定のベクターは、これが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」といわれる。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、このプラスミドはベクターの最も一般的に使用される形態であるため、交換可能に使用され得る。しかし、本発明は、ウイルス性ベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）のような発現ベクターのこのような他の形態を含むことを意図し、これは等価な機能を果たす。

【0151】

本発明の組換え発現ベクターは、本発明の核酸を、宿主細胞における核酸の発現に適切な形態で含み、これはこの組換え発現ベクターが、発現のために使用される宿主細胞に基いて選択される1つ以上の調節配列を含むこと意味し、これは発現される核酸配列に作動可能に連結される。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結」は、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする（例えば、このベクターが宿主細胞に導入される場合、インビトロ転写／翻訳系または宿主細胞において）ような様式で調節配列に連結されることを意味することを意図する。

#### 【0152】

用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことを意図する。このような調節配列は、例えば、Goeddel、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press、San Diego、Calif. (1990)に記載されている。調節配列は、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、および特定の宿主細胞のみにおいてヌクレオチド配列の発現を指向する配列（例えば、組織特異的調節配列）を含む。発現ベクターの設計が形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどのような因子に依存し得ることは当業者に理解される。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され、それにより、本明細書に記載されるような核酸によりコードされるタンパク質またはペプチド（融合タンパク質または融合ペプチドを含む）（例えば、ACPLXタンパク質、ACPLXタンパク質の変異形態、融合タンパク質など）を生成し得る。

#### 【0153】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞における、ACPLXタンパク質の発現のために設計され得る。例えば、ACPLXタンパク質は、細菌細胞（例えば、Escherichia coli）、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを用いる）、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現され得る。適切な宿主細胞は、Goeddel、GENE EXPRES

SION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press、San Diego、Calif. (1990)においてさらに考察される。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを用いて、インビトロで転写および翻訳され得る。

【0154】

原核生物におけるタンパク質の発現は、最も頻繁には、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを有する *Escherichia coli* において実行される。融合ベクターは、そこにコードされるタンパク質に、通常、組換えタンパク質のアミノ末端に、多数のアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、代表的には、以下の3つの目的のために役立つ：(i) 組換えタンパク質の発現を増加させること；(ii) 組換えタンパク質の溶解度を増加させること；および(iii) 親和性精製においてリガンドとして作用することによって組換えタンパク質の精製の際に補助すること。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解の切断部位が、融合部分と組換えタンパク質との結合部に導入され、そして融合タンパク質の精製の後に、組換えタンパク質が組換えタンパク質の融合部分から分離されることを可能にする。このような酵素、およびその同族の認識配列は、第Xa因子、トロンビン、およびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを、それぞれ、標的の組換えタンパク質に融合する pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) Gene 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) および pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) が挙げられる。

【0155】

適切な誘導性非融合 *E. coli* 発現ベクターの例としては、pTrc (Amannら (1988) Gene 69:301-315) および pET 11

d (Studierら、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89) が挙げられる。

【0156】

E. coliにおける組換えタンパク質発現を最大化するための1つのストラテジーは、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌中でタンパク質を発現させることである。例えば、Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128を参照のこと。別のストラテジーは、各アミノ酸についての個々のコドンが、E. coliにおいて優先的に利用されるように、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変更することである(例えば、Wadaら(1992) Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118を参照のこと)。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準的なDNA合成技術によって実行され得る。

【0157】

別の実施形態において、ACPLX発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母Saccharomyces cerevisiaeにおける発現のためのベクターの例には、pYepSec1 (Baldaireら、(1987) EMB O J 6: 229-234)、pMfa (KurjanおよびHerskowitz、(1982) Cell 30: 933-943)、pJRY88 (Schultzら、(1987) Gene 54: 113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、およびpicZ (Invitrogen Corp., San Diego, Calif.) が挙げられる。

【0158】

あるいは、ACPLXは、バキュロウイルス発現ベクターを使用して、昆虫細胞中で発現され得る。培養された昆虫細胞(例えば、SF9細胞)中でのタンパ

ク質の発現のために利用可能なバキュロウイルスベクターには、pAcシリーズ (Smithら(1983) Mol Cell Biol 3:2156-2165) およびpVLシリーズ (LucklowおよびSummers(1989) Virology 170:31-39) が挙げられる。

【0159】

なお別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8 (Seed(1987) Nature 329:840) およびpMT2PC (Kaufmanら(1987) EMBO J 6:187-195) が挙げられる。哺乳動物細胞中で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルスの調節エレメントによって提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方のための他の適切な発現系については、例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989の第16章および第17章を参照のこと。

【0160】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型(例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現する)中で優先的に核酸の発現を指向し得る。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター(肝臓特異的; Pinkertら, 1987. Genes Dev 1:268-277)、リンパ特異的プロモーター(CalameおよびEaton, 1988. Adv. Immunol. 43:235-275)、特に、T細胞レセプタープロモーター(WinotoおよびBaltimore, 1989. EMBO J 8:729-733) および免疫グロブリン(Banerjiら, 198

3 . C e l l 3 3 : 7 2 9 - 7 4 0 ; Q u e e n および B a l t i m o r e , 1 9 8 3 . C e l l 3 3 : 7 4 1 - 7 4 8 ) のプロモーター、ニューロン特異的プロモーター (例えば、ニューロフィラメントプロモーター ; B y r n e および R u d d l e , 1 9 8 9 . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 6 : 5 4 7 3 - 5 4 7 7 )、膵臓特異的プロモーター ( E d l u n d ら , 1 9 8 5 . S c i e n c e 2 3 0 : 9 1 2 - 9 1 6 )、および乳腺特異的プロモーター (例えば、ミルク乳清プロモーター ; 米国特許第 4 , 8 7 3 , 3 1 6 号および欧州出願公開第 2 6 4 , 1 6 6 号) が挙げられる。発生的に調節されるプロモーターもまた含まれる (例えば、マウスホックス ( m u r i n e h o x ) プロモーター ( K e s s e l および G r u s s , 1 9 9 0 . S c i e n c e 2 4 9 : 3 7 4 - 3 7 9 ) および - フェトプロテインプロモーター ( C a m p e s および T i l g h m a n , 1 9 8 9 . G e n e s D e v . 3 : 5 3 7 - 5 4 6 ) ) 。

#### 【 0 1 6 1 】

本発明はさらに、アンチセンス方向で発現ベクターにクローニングされた本発明の DNA 分子を含む組換え発現ベクターを提供する。すなわち、その DNA 分子は、ACPLX mRNA に対してアンチセンスである RNA 分子の発現 ( DNA 分子の転写によって) を可能にする様式で調節配列に作動可能に連結される。種々の細胞型におけるアンチセンス RNA 分子の連続的な発現を指向する、アンチセンス方向でクローニングされた核酸に作動可能に連結される調節配列が選択され得る。例えば、アンチセンス RNA の構成的発現、組織特異的発現、または細胞型特異的発現を指向する、ウイルスプロモーターおよび/もしくはエンハンサー、または調節配列が選択され得る。アンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化されたウイルスの形態であり得、ここではアンチセンス核酸は、高効率調節領域の制御下で産生され、その活性は、ベクターが導入される細胞型によって決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の議論については、例えば、Weintraubら、「Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis」、Reviews - Trends in

Genetics、第1巻(1)1986を参照のこと。

【0162】

本発明の別の局面は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で、交換可能に使用される。このような用語は、特定の対象の細胞をいうのみでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫をいうことが理解される。変異または環境的影響のいずれかに起因して、特定の改変が次の世代において生じ得るので、このような子孫は、実際、親の細胞と同一でないかもしれないが、なお、本明細書中で使用されるような用語の範囲内に含まれる。

【0163】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、A C P L Xタンパク質は、細菌細胞(例えば、E . c o l i)、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(C H O)またはC O S細胞)で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0164】

ベクターDNAは、従来的な形質転換技術またはトランスフェクション技術を介して原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、外来性の核酸(例えば、DNA)を宿主細胞に導入するための当該分野で認識される種々の技術をいうことを意図し、これらには、リン酸カルシウム共沈殿または塩化カルシウム共沈殿、D E A Eデキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションするための適切な方法は、S a m b r o o kら(M O L E C U L A R C L O N I N G : A L A B O R A T O R Y M A N U A L . 第2版、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . , 1 9 8 9 )および他の実験室マニュアルに見出され得る。

【0165】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションのために、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、細胞のほんの一部のみが外来DNAをそのゲノムに組み込まれ得ることが知られている。これらの要素を同定および選択するために、選択マーカー（例えば、抗生物質に対する耐性）をコードする遺伝子が、一般的には目的の遺伝子とともに宿主細胞に導入される。種々の選択マーカーには、薬物（例えば、G418、ハイグロマイシン、およびメトトレキサート）に対する耐性を付与するものが含まれる。選択マーカーをコードする核酸は、ACPLXをコードするベクターと同じベクター上で宿主細胞に導入され得るか、あるいは別々のベクター上で導入され得る。導入された核酸で安定にトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって同定され得る（例えば、選択マーカー遺伝子を取り込んだ細胞は生存し、一方他の細胞は死滅する）。

#### 【0166】

本発明の宿主細胞（例えば、培養中の原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞）は、ACPLXタンパク質を産生（すなわち、発現）するために使用され得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用して、ACPLXタンパク質を産生するための方法を提供する。1つの実施形態において、本発明の方法は、ACPLXタンパク質が産生されるような適切な培地中で、本発明の宿主細胞（ここに、ACPLXタンパク質をコードする組換え発現ベクターが導入された）を培養する工程を包含する。別の実施形態において、本発明はさらに、培地または宿主細胞からACPLXタンパク質を単離する工程を包含する。

#### 【0167】

（トランスACPLXジェニック動物）

本発明の宿主細胞はまた、非ヒトトランスジェニック動物を作製するために使用され得る。例えば、1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、ACPLXタンパク質コード配列が導入された、受精した卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、このような宿主細胞は、外因性のACPLX配列がそのゲノムに導入された非ヒトトランスジェニック動物、または内因性のACPLX配列が変更された相同組換え動物を作製するために使用され得る。このような動物は、ACPLXタンパク質の機能および/または活性を研究するため、ならびにACPL

Xタンパク質活性のモジュレーターを同定および/または評価するために有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」とは、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは、ラットまたはマウスのような齧歯類であり、その動物の1つ以上の細胞が、導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例としては、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが挙げられる。導入遺伝子は、細胞（この細胞からトランスジェニック動物が発生する）のゲノムに組み込まれかつ成熟動物のゲノムに残存する、外因性のDNAであり、それによって、トランスジェニック動物の1つ以上の細胞型または組織においてコードされた遺伝子産物の発現を指向する。本明細書中で使用される場合、「相同組換え動物」とは、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはマウスであり、ここで内因性のACPLX遺伝子は、内因性の遺伝子と、その動物の発生の前にその動物の細胞（例えば、その動物の胚細胞）に導入された外因性のDNA分子との間の相同組換えによって変更されている。

【0168】

本発明のトランスジェニック動物は、ACPLXをコードする核酸を、例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって、受精した卵母細胞の雄性前核に導入すること、および卵母細胞が偽妊娠した雌性養育動物（*foster animal*）中で発達することを可能にすることによって作製され得る。配列番号1を含む配列は、非ヒト動物のゲノムに導入遺伝子として導入され得る。あるいは、ヒトのACPLX遺伝子の非ヒトホモログ（例えば、マウスのACPLX遺伝子）は、ヒトのACPLX cDNAに対するハイブリダイゼーションに基づいて単離され得（以下にさらに記載される）、そして導入遺伝子として使用され得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルもまた導入遺伝子中に含まれ得、その導入遺伝子の発現の効率を増大させ得る。組織特異的調節配列（単数または複数）は、特定の細胞に対して、ACPLXタンパク質の発現を指向するように、ACPLX導入遺伝子に作動可能に連結され得る。胚の操作およびマイクロインジェクションを介するトランスジェニック動物（特に、マウスのような動物）を生成するための方法は、当該分野で慣習的になっており、

そして例えば、米国特許第4,736,866号；同第4,870,009号；および同第4,873,191号；ならびにHogan 1986、MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. に記載されている。同様の方法は、他のトランスジェニック動物の作製のために使用される。トランスジェニック初代 (founder) 動物は、そのゲノムにおけるACPLX導入遺伝子の存在および/またはその動物の組織または細胞中のACPLX mRNAの発現に基づいて同定され得る。次いで、トランスジェニック初代動物は、導入遺伝子を有するさらなる動物を繁殖させるために使用され得る。さらに、ACPLXタンパク質をコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物は、さらに、他の導入遺伝子を有する他のトランスジェニック動物に繁殖させ得る。

#### 【0169】

相同組換え動物を作製するために、ACPLX遺伝子の少なくとも一部を含むベクターを調製する。この遺伝子において、欠失、付加、または置換が導入されて、それによってそのACPLX遺伝子が増加されている（例えば、機能的に破壊される）。ACPLX遺伝子はヒト遺伝子（例えば、配列番号1のcDNA）であり得るが、より好ましくは、ヒトのACPLX遺伝子の非ヒトホモログである。例えば、配列番号1のヒトのACPLX遺伝子のマウスホモログは、マウスゲノムにおいて内因性のACPLX遺伝子を変更するのに適切な相同組換えベクターを構築するために使用され得る。1つの実施形態において、そのベクターは、相同組換えに際して、その内因性のACPLX遺伝子が、機能的に破壊されるように設計される（すなわち、機能的タンパク質をもはやコードしない；「ノックアウト」ベクターともいわれる）。

#### 【0170】

あるいは、このベクターは、相同組換えに対して、内因性ACPLX遺伝子が変異されるか、あるいはさもなければ、変更されるが、なお機能的タンパク質をコードするように、設計され得る（例えば、上流の調節領域が変更され、それによって内因性ACPLXタンパク質の発現を変更し得る）。相同組換えベクター

において、ACPLX遺伝子の変更された部分は、ACPLX遺伝子のさらなる核酸によって、その5'末端および3'末端で隣接され、相同組換えが、ベクターによって保有される外因性ACPLX遺伝子と胚性幹細胞中の内因性ACPLX遺伝子との間で起こることを可能にする。さらなる隣接するACPLX核酸は、内因性遺伝子との首尾よい相同組換えのために十分な長さである。典型的に、数キロベースの隣接するDNA(5'末端および3'末端の両方における)が、ベクターに含まれる。例えば、相同組換えベクターの記述についてThomasら(1987)Cell 51:503を参照のこと。このベクターは、(例えば、エレクトロポレーションによって)胚性幹細胞株に導入され、導入されたACPLX遺伝子が内因性ACPLX遺伝子と相同組換えした細胞が、選択される(例えば、Liら(1992)Cell 69:915を参照のこと)。

#### 【0171】

次いで、選択された細胞が、動物(例えば、マウス)の胚盤胞へ注入され、凝集キメラを形成する。例えば、Bradley(1987)のTERATOCA RCINOMAS AND EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH、Robertson編、IRL、Oxford、113頁~152頁を参照のこと。次いで、キメラ胚が、適切な偽妊娠雌性養育動物に移植され得、そしてその胚は分娩に到る。それらの生殖細胞中に相同組換えされたDNAを保有する子孫が、動物を繁殖させるために使用され得、この動物の全ての細胞は、導入遺伝子の生殖系列伝達による、相同組換えされたDNAを含む。相同組換えベクターおよび相同組換え動物を構築するための方法が、さらに以下に記載される; Bradley(1991)Curr. Opin. Biotechnol. 2:823-829; PCT国際公開番号: WO90/11354; WO91/01140; WO92/0968; およびWO/93/04169。

#### 【0172】

別の実施形態において、導入遺伝子の調節された発現を可能にする選択された系を含むトランスジェニック非ヒト動物が産生され得る。このような系の1つの例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系である。c

Cre/loxPリコンビナーゼ系の記述については、例えば、Laksora (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236を参照のこと。リコンビナーゼ系の別の例は、Saccharomyces cerevisiaeのFLPリコンビナーゼ系である。O'Gormanら(1991) Science 251:1351-1355を参照のこと。Cre/loxPリコンビナーゼ系が導入遺伝子の発現を調節するために使用される場合、Creリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含む動物が必要となる。このような動物は、例えば、2種のトランスジェニック動物(一方は選択されたタンパク質をコードする導入遺伝子を含み、他方はリコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含む)を交配することによる「二重の」トランスジェニック動物の構築によって提供され得る。

#### 【0173】

本明細書中に記載されるトランスジェニック非ヒト動物のクローンがまた、Wilmutら(1997) Nature 385:810-813に記載される方法に従って、産生され得る。簡単には、トランスジェニック動物からの細胞(例えば、体細胞)は単離および誘導される、増殖周期から出、そしてG<sub>0</sub>期に入り得る。次いで、静止期の細胞が、例えば、電気パルスの使用により、その静止期の細胞が単離される同種の動物から摘出された卵母細胞へ融合され得る。次いで、この再構築された卵母細胞は培養され、これにより、これは桑実胚または未分化胚芽細胞に発達し、次いで、偽妊娠雌性養育動物に移される。この雌性養育動物から生まれた子孫は、その細胞(例えば、その体細胞)が単離された動物のクローンである。

#### 【0174】

(薬学的組成物)

本発明のACPLX核酸分子、ACPLXタンパク質、および抗ACPLX抗体(これはまた、本明細書中で、「活性化合物」とも呼ばれる)、ならびにそれらの誘導體、フラグメント、アナログ、およびホモログが、投与に適した薬学的組成物に組み込まれ得る。このような組成物は、典型的に、核酸分子、タンパク質または抗体、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。本明細書中で使用さ

れる場合、「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的な投与に適合した、任意および全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤 (delaying agent) などを含むことが意図される。適切なキャリアは、Remington's Pharmaceutical Sciences (当該分野の標準的参考文献) (本明細書中に参考として援用される) の最新版に記載される。このようなキャリアまたは希釈剤の好ましい例としては、水、生理食塩水、finger 溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。リポソームおよび非水性ビヒクル (例えば、不揮発性油) もまた、使用され得る。薬学的に活性な物質におけるこのような媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。任意の従来の媒体または薬剤が活性化合物と不適合である範囲を除いて、組成物におけるその使用が考慮される。補助活性化合物はまた、組成物へ組み込まれ得る。

#### 【0175】

本明細書中に開示される抗体はまた、免疫リポソームとして処方され得る。抗体を含むリポソームは、例えば、Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82:3688 (1985); Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77:4030 (1980); および米国特許第4,485,045号および同4,544,545号に記載される当該分野において公知の方法によって調製される。

#### 【0176】

特に有用なりポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン (PEG-PE) を含む脂質組成物を用いる逆相蒸発法によって生成され得る。リポソームは、規定されたポアサイズのフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームを得る。本発明の抗体のFab'フラグメントは、Martinら、J. Biol. Chem., 257:286-288 (1992) に記載されるように、ジスルフィド相互変換反応を介してリポソームに結合体化され得る。化学療法剤 (例えば、ドキソルビシン) は、必要ならばリポソーム内に含まれる。Gabizonら、

J. National Cancer Inst., 81(19):1484(1989)を参照のこと。

【0177】

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与の経路と適合するように処方される。投与の経路の例には、非経口（例えば、静脈、皮内、皮下）投与、経口（例えば、吸入）投与、経皮（局所的）投与、経粘膜（transmucosal）投与、および直腸投与が挙げられる。非経口適用、皮内適用または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含み得る：注射用水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒のような、滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような、抗菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムのよう、抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸（EDTA）のような、キレート剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩のような、緩衝液、および塩化ナトリウムまたはデキストロースのような、張度の調節のための薬剤。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムのよう、酸または塩基で調整され得る。非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジ、あるいはガラスまたはプラスチックから作製される多用量のバイアル中に入れられ得る。

【0178】

注入使用に適した薬学的組成物は、滅菌水性溶液（ここで、水溶解性）または分散液、および滅菌の注入可能な溶液または分散液の即座の調製のための滅菌粉末を含む。静脈投与について、適切なキャリアには、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL™（BASF、 Parsippany、 N. J.）またはリン酸塩緩衝化生理食塩水（PBS）が挙げられる。全ての場合において、組成物は、滅菌性でなければならず、そして容易な注入性（syringability）が存在する程度に流動性であるべきである。これは、製造および保存の条件下で安定でなければならず、そして、細菌および真菌のような微生物の汚染行為に対して保護されるべきである。このキャリアは、例えば、以下を含む溶媒または分散媒であり得る：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、および液体ポリエチレングリコールなど）ならびにそれ

らの適切な混合物。適切な流動性が、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散液の場合に、要求される粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど）によって達成され得る。多くの場合、組成物中に等張剤（例えば、糖、ポリアルコール（例えば、マンニトール（*manitol*）、ソルビトール）塩化ナトリウム）を含むことが好ましい。注入可能組成物の長時間吸収は、組成物に吸収を遅らせる薬剤（例えば、アルミニウムモノステアレートおよびゼラチン）を含ませることによってもたらされ得る。

#### 【0179】

滅菌注射可能溶液は、必要量のこの活性化化合物（例えば、ACPLXタンパク質あるいは抗ACPLX抗体）を、適切な溶媒中に、上記で列挙される成分の1つまたは組み合わせと共に組み込み、必要な場合、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般的に、分散液は、活性化化合物を、塩基性分散媒および上記で列挙される成分から必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクル中へ組み込むことによって調製される。滅菌注射可能液剤の調製のための滅菌散剤の場合において、調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより、活性成分および既に滅菌濾過されたその液剤からの任意のさらなる所望の成分の散剤を得る。

#### 【0180】

経口組成物は、一般的に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。これらは、ゼラチンカプセルに封入され得るか、または錠剤へと圧縮され得る。経口治療投与の目的のために、この活性化化合物は、賦形剤とともに組み込まれ得、そして錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口組成物はまた、マウスウォッシュとしての使用のために流体キャリアを使用して調製され得、ここで、この流体キャリア中のこの化合物は、経口的に適用され、そしてさっと動かされ、そして吐き出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント材料が、この組成物の一部として含まれ得る。

錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などが、任意の以下の成分または同様の性質を有する化合物を含み得る：結合剤（例えば、微結晶セルロース、ガムトラガントまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、デンプンまたはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギン酸）、プリモゲル（Primogel）、またはコーンスターチ）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはステロート（Sterote））；潤滑剤（glidant）（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味剤（例えば、スクロースまたはサッカリン）；あるいは香味剤（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバー）。

#### 【0181】

吸入による投与について、この化合物は、適切な噴霧剤（例えば、二酸化炭素のような気体）を含む圧縮容器またはディスペンサー、あるいは噴霧器から、エアロゾル噴霧の形態で送達される。

#### 【0182】

全身的投与はまた、経粘膜手段または経皮手段により得る。経粘膜投与または経皮投与について、浸透される障壁に適切な浸透剤が、処方物において使用される。このような浸透剤は、一般的に、当該分野で公知であり、そして、例えば、経粘膜投与については、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻噴霧または坐剤の使用によって達成され得る。経皮投与については、この活性化合物は、当該分野で一般的に公知である軟膏剤、軟膏、ゲル、またはクリーム剤へ処方される。

#### 【0183】

この化合物はまた、直腸送達のための坐剤（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような従来の坐剤ベースと共に）または貯留（retention）浣腸の形態で調製され得る。

#### 【0184】

1つの実施形態において、この活性化合物は、身体からの迅速な排出に対してこの化合物を保護するキャリアを用いて調製され（例えば、制御放出処方物）、これには、移植片およびマイクロカプセル化された送達系が挙げられる。酢酸エチレンビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステ

ル、およびポリ乳酸のような、生分解性で、生体適合性なポリマーが使用され得る。このような処方物の調製のための方法は、当該業者には明らかである。これらの材料はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から市販され、手に入れることができる。リポソーム懸濁剤（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で感染細胞へ標的化されるリポソームを含む）がまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば米国特許第4,522,811号に記載されるような、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

#### 【0185】

投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、投薬単位形態で、経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有益である。本明細書で使用される投薬単位形態は、処置される被験体についての単位投薬量として適切な物理的に個々の単位をいい；各単位は、必要とされる薬学的キャリアと関連して所望の治療的効果を生じるように計算された、所定量の活性化化合物を含む。本発明の投薬単位形態についての詳細は、この活性化化合物、および達成されるべき特定の治療効果に独特の特性、ならびに個体の処置のためのこのような活性化化合物を調合する際に当該分野に固有の制限によって決定されるか、あるいはこれらに直接依存する。

#### 【0186】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、被験体へ、例えば静脈注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照のこと）によって、または定位注射（例えば、Chenら（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057を参照のこと）によって送達され得る。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物には、受容可能な希釈剤中の遺伝子治療ベクターが挙げられ得るか、または遺伝子送達ビヒクルが組み込まれる徐放性マトリックスが挙げられ得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが組換え細胞からインタクトで産生され得（例えば、レトロウイルスベクター）、薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する1以上の細胞を含み得る。

## 【0187】

本発明のタンパク質、ならびに本明細書中に記載されたスクリーニングによって同定された他の分子と特異的に結合する抗体は、薬学的組成物の形態で種々の障害の処置のために投与され得る。このような組成物の調製に関する原理および考察、ならびに組成物の選択の際の手引きは、例えば、以下に提供される：Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 第19版(編集者Alfonso R. Gennaroら) Mack Pub. Co., Easton, Pa: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; ならびにPeptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, 第4巻), 1991, M. Dekker, New York。抗原性タンパク質が細胞内であり、全体の抗体が阻害剤として使用される場合、抗体の細胞内移行が好ましい。しかし、リポソームはまた、抗体、もしくは抗体フラグメントを細胞内へ送達するために使用され得る。抗体フラグメントが使用される場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小の阻害フラグメントが好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列を結合する能力を保持するペプチド分子が設計され得る。このようなペプチドは、化学的に合成され得る、および/または組換えDNA技術によって産生され得る。例えば、Marascoら、1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889 - 7893を参照のこと。本明細書中の処方物はまた、特定の徴候が処置されるために必要なように、1より多い活性化合物、好ましくは互いに不利に働かない相補的活性を有する活性化合物を含み得る。あるいは、またはさらに、組成物は、その機能を増強する薬剤(例えば、細胞傷害性、サントカイン、化学療法剤、または増殖阻害剤)を含み得る。このような分子は、意図される目的について効果的な量で組合わせて適切に存在する。活性成分はまた、コロイド状薬剤送達系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、微

小エマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)においてか、またはマクロエマルジョンにおいて、例えば、コアセルベーション技術または界面の重合によって調製された微小カプセル(それぞれ、例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン微小カプセルおよびポリ-(メチルメタクリレート)微小カプセル)に閉じ込められ得る。

【0188】

インビボ投与のために使用される処方物は、滅菌されなければならない。これは、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

【0189】

徐放性調製物が調製され得る。徐放性調製物の適切な例は、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透過性のマトリクスを含み、このマトリクスは、成形物の形態(例えば、フィルム、または微小カプセル)である。徐放性マトリクスの例としては、以下が挙げられる: ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、もしくはポリ(ビニルアルコール))、ポリラクタイド(poly lactide)(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸およびエチル-L-グルタミン酸のコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー(例えば、LUPRON DEPOT™(乳酸-グリコール酸コポリマーおよびループロリド(leuprolide)酢酸からなる注射可能マイクロスフェア))、ならびにポリ-D-( )-3-ヒドロキシ酪酸。エチレン-酢酸ビニルおよび酪酸-グリコール酸のようなポリマーは、100日を越えてまで分子を放出し得るが、特定のヒドロゲルは、より短い期間にわたってタンパク質を放出する。

【0190】

薬学的組成物は、投与のための指導書とともに容器、パック、またはディスペンサーに含まれ得る。

【0191】

(スクリーニング方法および検出方法)

本発明の単離された核酸分子は、以下にさらに説明されるように、ACPLXタンパク質(例えば、遺伝子治療用途における宿主細胞中の組換え発現ベクター

を介して)を発現するため、ACPLX mRNA(例えば、生物学的サンプルにおいて)またはACPLX遺伝子における遺伝子損傷を検出するため、ならびにACPLX活性を調節するために使用され得る。さらに、ACPLXタンパク質は、ACPLXタンパク質活性または発現を調節する薬物または化合物をスクリーニングするために、ならびにACPLXタンパク質の不十分なもしくは過剰な産生によって、あるいはACPLX野生型タンパク質と比較して減少したもしくは異常な活性を有するACPLXタンパク質形態の産生によって特徴付けられる障害(例えば、ガンまたはプレクランプシア(*preclampsia*)のような増殖性障害あるいは上記1~14節に記載される任意の疾患または障害)を処置するために使用され得る。さらに、本発明の抗ACPLX抗体が、ACPLXタンパク質を検出して単離するため、およびACPLX活性を調節するために使用され得る。

#### 【0192】

本発明は、さらに、本明細書中で記載されるスクリーニングアッセイによって同定される新規の薬剤、および上述のような処置のためのそれらの使用に関する。

#### 【0193】

(スクリーニングアッセイ)

本発明は、調節因子、すなわち、ACPLXタンパク質に結合するか、あるいは例えば、ACPLXタンパク質の発現またはACPLXタンパク質の活性に対して刺激効果または阻害効果を有する、候補または試験化合物または薬剤(例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、小分子または他の薬物)を同定するための方法(本明細書中において「スクリーニングアッセイ」とも称される)を提供する。本発明はまた、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイにおいて同定される化合物を含む。

#### 【0194】

1実施形態において、本発明は、ACPLXタンパク質またはポリペプチド、あるいはその生物学的に活性な部分の膜結合形態に結合するか、または膜結合形態の活性を調節する、候補化合物もしくは試験化合物をスクリーニングするため

のアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数のアプローチの任意のものを使用して得られ得、これには、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間的にアクセス可能な平行固相ライブラリーもしくは溶液相ライブラリー；逆重畳を要する合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーもしくは化合物の小分子ライブラリーに適用可能である。例えば、Lam(1997) Anticancer Drug Des 12:145)を参照のこと。

【0195】

本明細書中で使用される場合、「低分子」とは、約5 kD未満の分子量、最も好ましくは約4 kD未満の分子量を有する組成物をいうように意味される。低分子は、例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣体、糖、脂質または他の有機分子もしくは無機分子であり得る。化学的および/または生物学的混合物（例えば、真菌、細菌または藻類抽出物）のライブラリーは、当該分野で公知であり、そして本発明のアッセイのいずれかを用いてスクリーニングされ得る。

【0196】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば以下に見出され得る：DeWittら(1993) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 90:6909；Erbら(1994) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 91:11422；Zuckermannら(1994) J Med Chem 37:2678；Choら(1993) Science 261:1303；Carrellら(1994) Angew Chem Int Ed Engl 33:2059；Carrellら(1994) Angew Chem Int Ed Engl 33:2061；およびGallopら(1994) J Med Chem 37:1233。

【0197】

化合物のライブラリーは、溶液中で（例えば、Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412~421）、あるいはビーズ上（Lam (1991) *Nature* 354:82~84）、チップ上（Fodor (1993) *Nature* 364:555~556）、細菌（Ladner 米国特許第5,223,409号）、胞子（Ladner 米国特許第5,233,409号）、プラスミド（Cullis (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865~1869）またはファージ上（ScottおよびSmith (1990) *Science* 249:386~390; Devlin (1990) *Science* 249:404~406; Cwirlla (1990) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 87:6378~6382; Felici (1991) *J Mol Biol* 222:301~310; Ladner、米国特許第5,233,409号）において示され得る。

#### 【0198】

1つの実施形態において、アッセイは細胞ベースのアッセイであり、ここで、膜結合形態のACPLXタンパク質、またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上に発現する細胞が、試験化合物と接触され、そしてこの試験化合物が、ACPLXタンパク質に結合する能力が、決定される。例えば、細胞は、哺乳動物起源または酵母細胞であり得る。この試験化合物がACPLXタンパク質に結合する能力の決定は、例えば、その試験化合物を放射性同位体標識または酵素標識とカップリングさせて、その結果、この試験化合物のACPLXタンパク質またはその生物学的に活性な部分に対する結合が、複合体におけるその標識化合物を検出することによって決定され得ることによって達成され得る。例えば、試験化合物は、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、または $^3\text{H}$ で直接的または間接的のいずれかで標識され得、そしてその放射性同位体が、放射線放射の直接の計数により、またはシンチレーション計数により、検出され得る。あるいは、試験化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、そしてこの酵素的標識が、適切な基質の生成物への転換を決定することにより、検出され得る。1つの実施形態において、このアッセイは

、膜結合形態のACPLXタンパク質、またはその生物学的に活性な部分その細胞表面上に発現する細胞を、ACPLXと結合する公知の化合物と接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物に試験化合物を接触させる工程、ならびにこの試験化合物がACPLXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がACPLXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程が、この試験化合物が、公知の化合物と比較して、ACPLXまたはその生物学的に活性な部分と優先的に結合する能力を決定する工程を包含する。

#### 【0199】

別の実施形態において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、これは、膜結合形態のACPLXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上で発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程、ならびにこの試験化合物が、ACPLXタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物が、ACPLXまたはその生物学的に活性な部分の活性を調節する能力の決定は、例えば、ACPLXタンパク質が、ACPLX標的分子に結合またはこれら標的分子と相互作用する能力を決定することによって、達成され得る。本明細書中において使用する場合には、「標的分子」とは、ACPLXタンパク質が自然に結合または相互作用する分子であり、例えば、ACPLXタンパク質を発現する細胞表面上の分子、第二の細胞表面上の分子、細胞外環境中の分子、細胞膜の内部表面と会合する分子、または細胞質分子である。ACPLX標的分子は、非ACPLX分子あるいは本発明のACPLXタンパク質またはポリペプチドである。1つの実施形態において、ACPLX標的分子は、シグナル伝達経路の構成要素であり、これは、細胞膜を通過して細胞内への細胞外シグナル（例えば、化合物が膜結合ACPLX分子に結合することにより発生するシグナル）の伝達を促進する。その標的は、例えば、触媒活性を有する第二の細胞内タンパク質、または下流シグナル分子のACPLXとの会合を容易にするタンパク質であり得る。

#### 【0200】

ACPLXタンパク質がACPLX標的分子に結合するかまたはその標的分子

と相互作用する能力の決定は、直接的結合を決定するための上記方法の1つにより、達成され得る。1つの実施形態において、ACPLXタンパク質がACPLX標的分子に結合するかまたはその標的分子と相互作用する能力の決定は、その標的分子の活性を決定することにより、達成され得る。例えば、この標的分子の活性は、その標的の細胞セカンドメッセンジャー（すなわち、細胞内Ca<sup>2+</sup>、ジアシルグリセロール、IP<sub>3</sub>など）の誘導を検出すること、適切な基質への標的の触媒活性/酵素活性を検出すること、レポーター遺伝子（検出可能なマーカー（例えば、ルシフェラーゼ）をコードする核酸に作動的に連結されたACPLX応答性調節エレメントを含む）の誘導を検出すること、または細胞応答（例えば、細胞生存度、細胞分化、または細胞増殖）を検出することにより、決定され得る。

#### 【0201】

なお別の実施形態において、本発明のアッセイは、無細胞アッセイであり、ACPLXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物に接触させる工程、ならびにその試験化合物がACPLXタンパク質またはその生物学的に活性な部分と結合する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物の、ACPLXタンパク質への結合は、上記のように、直接的または間接的にのいずれかで決定され得る。1つのこのような実施形態において、このアッセイは、ACPLXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、ACPLXを結合する公知の化合物に接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物に接触させる工程、ならびにその試験化合物がACPLXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がACPLXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程は、この試験化合物が、公知の化合物と比較して、ACPLX、またはその生物学的に活性な部分と優先的に相互作用する能力を決定する工程を包含する。

#### 【0202】

さらに別の実施形態において、アッセイは、無細胞アッセイであり、ACPLXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させる工程、ならびにその試験化合物がACPLXタンパク質またはその生物学的に活性な部

分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物がACPLXの活性を調節する能力の決定は、例えば、ACPLXタンパク質が、ACPLX標的分子に結合する能力を、直接的結合の決定のための上記方法の1つによって決定することにより、達成され得る。代替の実施形態において、この試験化合物がACPLXタンパク質の活性を調節する能力の決定は、ACPLXタンパク質が、ACPLX標的分子をさらに調節する能力を決定することにより、達成され得る。例えば、この標的分子の適切な基質に対する触媒活性/酵素活性は、上記のように決定され得る。

#### 【0203】

なお別の実施形態において、無細胞アッセイは、ACPLXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、ACPLXタンパク質を結合する公知の化合物に接触させてアッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、ならびにこの試験化合物がACPLXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がACPLXタンパク質と相互作用する能力の決定は、ACPLXタンパク質が、ACPLX標的分子と優先的に結合するか、またはその標的分子の活性を優先的に調節する能力を決定する工程を包含する。

#### 【0204】

本発明の無細胞アッセイは、ACPLXタンパク質の、可溶性の形態または膜結合形態の両方の使用に受け入れられる。膜結合形態のACPLXタンパク質を含む無細胞アッセイの場合には、ACPLXタンパク質の膜結合形態が溶液中に維持されるように、可溶化剤を利用することが望ましくあり得る。このような可溶化剤の例には、非イオン性界面活性剤が挙げられ、例えば、*n*-オクチルグルコシド、*n*-ドデシルグルコシド、*n*-ドデシルマルトシド、オクタノイル-N-メチルグルカミド、デカノイル-N-メチルグルカミド、Triton（登録商標）X-100、Triton（登録商標）X-114、Thesit（登録商標）、イソトリデシルポリ（エチレングリコールエーテル）<sub>n</sub>（Isotridecyl poly(ethylene glycol ether)<sub>n</sub>）、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート、3-

(3 - コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ - 1 - プロパンスルホネート (3 - (3 - cholamidopropyl)dimethylammonio - 1 - propane sulfonate) (CHAPS)、または3 - (3 - コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホネート (3 - (3 - cholamidopropyl)dimethylammonio - 2 - hydroxy - 1 - propane sulfonate) (CHAPSO)である。

#### 【0205】

本発明の上記アッセイ方法の1つより多い実施形態において、ACPLXタンパク質またはその標的分子のいずれかを固定して、そのタンパク質の一方または両方の非複合形態からの複合形態の分離を促進し、そしてそのアッセイの自動化に適用させることが、望ましくあり得る。試験化合物の、ACPLXタンパク質への結合、または候補化合物の存在下および非存在下での、ACPLXタンパク質の標的分子との相互作用は、これらの反応物を収容するために適切な任意の容器内で、達成され得る。このような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。1実施形態において、そのタンパク質の一方または両方がマトリックスに結合することを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が、提供され得る。例えば、GST - ACPLX融合タンパク質またはGST標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ (Sigma Chemical, St. Louis, MO) またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され得、次いでこれらは、試験化合物と合わせられるか、あるいは試験化合物および吸着されない標的タンパク質、またはACPLXタンパク質のいずれかと合わせられ、そしてこの混合物が、複合体形成に貢献する条件下 (例えば、塩およびpHに関して生理学的条件) でインキュベートされる。インキュベーションに続いて、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して、結合していないあらゆる成分を除去し、ビーズの場合にはマトリックスを固定し、例えば上記のように、複合体を直接的または間接的のいずれかで決定する。あるいは、複合体がマトリックスから解離され得、そしてACPLXタンパク質の結合レベルまたは活性レベルを、標準的な技術を使

用して決定し得る。

#### 【0206】

タンパク質をマトリックスに固定するための他の技術がまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、ACPLXタンパク質、またはその標的分子のいずれかが、ビオチンとストレプトアビジンとの結合を利用して、固定され得る。ビオチニル化ACPLXタンパク質、または標的分子は、当該分野において周知の技術を使用して、ビオチン-NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) から調製され得 (例えば、ビオチニル化キット、Pierce Chemicals、Rockford、Ill.)、そしてストレプトアビジンで被覆した96ウェルのプレート (Pierce Chemical) のウェルに固定され得る。あるいは、ACPLXタンパク質、または標的分子と反応性であるがACPLXタンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体が、そのプレートのウェルに誘導体化され得、そして結合していない標的またはACPLXタンパク質が、抗体の結合によってウェル内にトラップされ得る。このような複合体を検出するための方法には、GST固定複合体に関しての上記のものに加えて、ACPLXタンパク質または標的分子と反応性の抗体を使用する、複合体の免疫検出、ならびにACPLXタンパク質、または標的分子に関する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

#### 【0207】

別の実施形態において、ACPLXタンパク質発現のモジュレーターは、細胞を候補化合物と接触させ、そして細胞中のACPLX mRNAまたはタンパク質の発現を決定する方法において同定される。候補化合物の存在下でのACPLX mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、候補化合物の非存在下でのACPLX mRNAまたはタンパク質の発現レベルと比較される。次いで、候補化合物は、この比較に基づいて、ACPLX mRNAまたはタンパク質発現のモジュレーターとして同定され得る。例えば、ACPLX mRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下より、その存在下における方が大きい (すなわち、統計的に有意に大きい) 場合、この候補化合物は、ACPLX mRNAまたはタンパク質の発現の刺激物質として同定される。あるいは、ACPLX

mRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下よりその存在下の方が少ない(統計的に有意に少ない)場合、この候補化合物は、ACPLX mRNAまたはタンパク質の発現のインヒビターとして同定される。細胞中のACPLX mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、ACPLX mRNAまたはタンパク質を検出するために本明細書中に記載の方法によって決定され得る。

#### 【0208】

本発明のなお別の局面において、ACPLXタンパク質は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイにおいて「ベイトタンパク質」として使用されて(例えば、米国特許第5,283,317号; Zervosら(1993) Cell 72:223-232; Maduraら、1993 J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartelら、1993 Biotechniques 14:920-924; Iwabuchiら、1993 Oncogene 8:1693-1696; および Brent WO94/10300を参照のこと)、ACPLX(「ACPLX結合タンパク質」または「ACPLX-bp」)に結合するか、またはこれと相互作用し、そしてACPLX活性を調節する他のタンパク質を同定し得る。このようなACPLX結合タンパク質はまた、例えば、ACPLX経路の上流または下流エレメントとしてACPLXタンパク質によるシグナル伝達に関与するようである。

#### 【0209】

ツーハイブリッドシステムは、分離可能なDNA結合ドメインおよび活性化ドメインからなる、大部分の転写因子のモジュールの性質に基づく。簡潔には、このアッセイは、2つの異なるDNA構築物を利用する。一方の構築物においては、ACPLXをコードする遺伝子が公知の転写因子(例えば、GAL-4)のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他方の構築物においては、DNA配列のライブラリー由来の、未同定タンパク質(「プレイ」または「サンプル」)をコードするDNA配列が、公知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合される。「ベイト」および「プレイ」タンパク質がインビボで相互作用して、ACPLX依存性複合体を形成し得る場合、この転写因子のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインは、非常に近くにある。近位にあることに

より、転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結されたレポーター遺伝子（例えば、L a c Z）の転写を可能にする。レポーター遺伝子の発現が検出され得、そして機能的転写因子を含む細胞コロニーは、単離され得、そしてA C P L Xと相互作用するタンパク質をコードするクローニングされた遺伝子を得るために使用され得る。

#### 【0210】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規な薬剤および本明細書中に記載されるような処置のためのこの薬剤の使用に関する。

#### 【0211】

（検出アッセイ）

本明細書中で同定されるc D N A配列の一部分またはフラグメント（および対応する完全な遺伝子配列）は、ポリヌクレオチド試薬として多くの方法で使用され得る。例えば（限定はされない）、これらの配列を使用して、（i）微量の生物学的サンプルから個体を同定し得る（組織型決定）；および（ii）生物学的サンプルの法医学的識別を助け得る。これらの適用のうちいくつかは、以下の節において記載される。

#### 【0212】

（組織型決定（t i s s u e t y p i n g））

本発明のA C P L X配列は、わずかな生物学的サンプルから個体を識別するために使用され得る。この技術において、個体のゲノムD N Aは、1つ以上の制限酵素で消化され、そして同定のために独特のバンドを生成するためにサザンプロット上でプローブされる。本発明の配列は、R F L P（米国特許第5,272,057号に記載の「制限フラグメント長多型」）のためのさらなるD N Aマーカーとして有用である。

#### 【0213】

さらに、本発明の配列を用いて、個体のゲノムの選択された部分について実際の塩基ごとにD N A配列を決定する代替的技術を提供し得る。従って、本明細書中に記載のA C P L X配列を用いて、配列の5'末端および3'末端から2つのP C Rプライマーを調製し得る。次いで、これらのプライマーを使用して、個体

のDNAを増幅し得、引き続いて、配列決定し得る。

【0214】

このように調製された個体由来の対応するDNA配列のパネルは、各個体が、対立遺伝子差異に起因するこのようなDNA配列の独特のセットを有するので、唯一の個体識別を提供し得る。本発明の配列は、個体由来および組織由来の配列のこのような識別を得るために使用され得る。本発明のACPLX配列は、ヒトゲノムの部分を独特に表す。対立遺伝子変異は、これらの配列のコード領域においてある程度生じ、そして非コード領域においてより大きな程度に生じる。個々のヒト間での対立遺伝子変異は、各500塩基につき約1回の頻度で生じると見積もられる。対立遺伝子変異の多さは、制限フラグメント長多型(RFLP)を含む単一ヌクレオチド多型(SNP)に起因する。

【0215】

本明細書中で記載の配列の各々は、ある程度、標準物質(これに対して個体からのDNAが識別の目的で比較され得る)として使用され得る。より多くの多型が非コード領域で生じるので、個体を区別するために、それほど多くの配列が必要であるわけではない。非コード配列は、おそらく10~1,000プライマーのパネルを用いてポジティブな個体識別を不自由なく提供し得る。これらのプライマーは、各々が100塩基の増幅された非コード配列を生じる。推定コード配列(例えば、配列番号1、3、5、7または9における配列)が使用される場合、ポジティブな個体識別に関するプライマーのより適切な数は、500~2,000である。

【0216】

(予測医療)

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイ、薬物ゲノム(pharmacogenomics)およびモニタリング臨床試験が、予後(予測)の目的に使用され、これによって個体を予防的に処置する、予測医療の分野に関する。従って、本発明の1つの局面は、ACPLXタンパク質および/または核酸の発現、ならびにACPLXの活性を、生物学的サンプル(例えば、血液、血清、細胞、組織)の関連で決定し、これによって、異常なACPLXの発現または活性に関連

して、個体が疾患または障害に罹患するかどうか、あるいは障害を発症するリスクがあるかどうかを決定する。本発明はまた、個体が、A C P L Xのタンパク質、核酸の発現または活性と関連した障害を発症するリスクがあるかどうかを決定するための予後的（または予測的）アッセイを提供する。例えば、A C P L X遺伝子における変異が、生物学的サンプルにおいてアッセイされ得る。このようなアッセイは、予後的または予測的な目的に使用され得、これによってA C P L Xのタンパク質、核酸の発現または生物学的活性によって特徴付けられるかまたはそれに関連した障害の発病の前に個体を予防的に処置する。

#### 【0217】

本発明の別の局面は、個体におけるA C P L Xタンパク質、核酸の発現または活性を決定するための方法を提供し、これによって、その個体についての適切な治療的または予防的因子（本明細書において「薬物ゲノム」とよばれる）を選択する。薬物ゲノムは、個体の遺伝型（例えば、特定の因子に対して応答する個体の能力を決定するために試験された個体の遺伝型）に基づいた、個体の治療的または予防的処置のための因子（例えば、薬物）の選択を可能にする。

#### 【0218】

本発明のなお別の局面は、臨床試験におけるA C P L Xの発現または活性に対する因子（例えば、薬剤、化合物）の影響をモニタリングすることに関する。

#### 【0219】

これらおよび他の因子は、以下の節でさらに詳細に記載される。

#### 【0220】

（診断アッセイ）

生物学的サンプルにおけるA C P L Xの存在または非存在を検出するための例示的な方法は、試験被験体から生物学的サンプルを得る工程、およびその生物学的サンプルをA C P L Xタンパク質またはA C P L Xタンパク質をコードする核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）を検出し得る化合物もしくは薬剤とを接触させ、その結果、A C P L Xの存在が、その生物学的サンプルにおいて検出される、工程を包含する。A C P L XのmRNAまたはゲノムDNAを検出するための薬剤は、A C P L XのmRNAまたはゲノムDNAにハイブリダイズし得る

、標識された核酸プローブである。この核酸プローブは、例えば、全長のACPLX核酸（例えば、配列番号1またはその部分の核酸（例えば、少なくとも、15、30、50、100、250もしくは500ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、そしてストリンジェントな条件下でACPLXのmRNAまたはゲノムDNAと特異的にハイブリダイズするに十分である核酸））であり得る。本発明の診断アッセイにおける使用のための他の適切なプローブは本明細書中に記載される。

#### 【0221】

ACPLXタンパク質を検出するための1つの薬剤は、ACPLXと結合し得る抗体、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。本発明のタンパク質に対する抗体は、タンパク質の局在および/または定量化に関連する、当該分野で公知の方法において使用され得る（例えば、適切な生理学的サンプル内のタンパク質のレベルの測定における使用のため、診断方法における使用のため、タンパク質の画像化における使用のためなど）。所定の実施形態では、タンパク質に対する抗体または抗原結合ドメインを含むその誘導体、フラグメント、アナログまたはホモログは、薬理的に活性な組成物として使用される。

#### 【0222】

本発明のタンパク質に特異的な抗体は、標準技術（例えば、免疫親和性クロマトグラフィまたは免疫沈降）によって、タンパク質を単離するために用いられ得る。このような抗体は、細胞からの天然のタンパク質抗原の精製および宿主細胞において発現される組換え的に産生された抗原の精製を容易にし得る。さらに、抗原タンパク質の発現の量およびパターンを評価するために、このような抗体を用いて（例えば、細胞の溶解液または細胞上清における）抗原タンパク質を検出し得る。このタンパク質に対する抗体は、例えば、所定の処置レジメンの有効性を決定するために、臨床試験の手順の一部として組織におけるタンパク質レベルを診断的にモニターするために用いられ得る。検出は、抗体を検出可能物質にカップリングする（すなわち、物理的に連結する）ことにより容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサ

ピペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子団複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン(dichlorotriazinylamine)フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ、そして、適切な放射性物質の例としては $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^3\text{H}$ が挙げられる。

### 【0223】

抗体は、ポリクローナルであり得るか、またはより好ましくはモノクローナル抗体であり得る。インタクトな抗体またはそのフラグメント(例えば、Fabまたは $\text{F}(\text{ab}')_2$ )が使用され得る。用語「標識(された)」とは、プローブまたは抗体に関して、検出可能な物質をそのプローブもしくは抗体にカップリングさせる(すなわち、物理的に連結する)ことによって、そのプローブまたは抗体を直接標識すること、ならびに、直接標識される別の試薬との反応性によって、そのプローブもしくは抗体を間接的に標識をすることを包含することが意図される。間接的な標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を用いる一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出され得るようにビオチンを用いるDNAプローブの末端標識が挙げられる。用語「生物学的サンプル」とは、被験体から単離された、組織、細胞および生物学的流体ならびに被験体に存在する組織、細胞および流体を含むことが意図される。すなわち、本発明の検出方法を用いて、生物学的サンプル中のACPLXのmRNA、タンパク質またはゲノムDNAを、インビトロおよびインビボで検出し得る。例えば、ACPLX mRNAの検出のためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。ACPLXタンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ウェスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光が挙げられ

る。ACPLXゲノムDNAを検出するためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、ACPLXタンパク質の検出のためのインビボ技術としては、標識された抗ACPLX抗体を被験体に導入することが挙げられる。例えば、その抗体は、放射性マーカを用いて標識され得る。この被験体における放射性マーカの存在および位置は、標準的な画像化技術によって検出され得る。

#### 【0224】

1つの実施形態において、この生物学的サンプルは、その試験被験体からのタンパク質分子を含む。あるいは、その生物学的サンプルは、その試験被験体からのmRNA分子またはその試験被験体からのゲノムDNA分子を含み得る。好ましい生物学的サンプルは、被験体から従来的手段によって単離された末梢血白血球サンプルである。

#### 【0225】

1つの実施形態において、本発明の方法はさらに、コントロール被験体からコントロール生物学的サンプルを得る工程、そのコントロールサンプルを、ACPLXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムを検出し得る化合物または薬剤と接触させ、その結果、ACPLXのタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在がその生物学的サンプルにおいて検出される、工程、およびそのコントロールサンプルにおけるACPLXのタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在と、その試験サンプルにおけるACPLXのタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在とを比較する工程を包含する。

#### 【0226】

本発明はまた、生物学的サンプルにおけるACPLXの存在を検出するためのキットを包含する。例えば、このキットは、以下を備え得る：生物学的サンプルにおいてACPLXのタンパク質またはmRNAを検出し得る、標識された化合物または薬剤；そのサンプルにおいてACPLXの量を決定するための手段；およびそのサンプルにおけるACPLXの量を標準と比較するための手段。この化合物または薬剤は、適切な容器内にパッケージングされ得る。このキットは、さらに、ACPLXタンパク質または核酸を検出するためにキットを用いるための

説明書を備え得る。

【0227】

( 予後アッセイ )

本明細書において記載された診断方法をさらに利用して、ACPLXの異常発現または異常活性に関連した疾患もしくは障害を有するか、またはその発症の危険性を有する被験体を同定し得る。例えば、本明細書に記載されるアッセイ(例えば、上述の診断アッセイまたは下記のアッセイ)を利用して、ACPLXのタンパク質、核酸の発現または活性に関連する障害を有するかまたはその発症の危険性を有する被験体を同定し得る。あるいは、この予後アッセイを利用して、疾患または障害を有するかまたはその発症の危険性を有する被験体を同定し得る。従って、本発明は、ACPLXの異常発現または異常活性に関連する疾患もしくは障害を同定するための方法を提供する。ここで、試験サンプルは、被験体から得られ、そしてACPLXのタンパク質または核酸(例えば、mRNA、ゲノムDNA)が検出され、ここで、ACPLXのタンパク質または核酸の存在は、ACPLXの異常発現または異常活性に関連する疾患または障害を有するかまたはその発症の危険性を有する被験体についての診断指標である。本明細書において使用される場合「試験サンプル」とは、目的の被験体から得られた生物学的サンプルをいう。例えば、試験サンプルは、生物学的流体(例えば、血清)、細胞サンプル、または組織であり得る。

【0228】

さらに、本明細書に記載される予後アッセイを使用して、被験体に薬剤(例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬物候補)を投与してACPLXの異常発現または異常活性に関連する疾患または障害を処置し得るか否かを、決定し得る。例えば、このような方法を使用して、被験体が障害のための薬剤で有効に処置され得るか否かを決定し得る。従って、本発明は、ACPLXの異常発現または異常活性に関連する障害についての薬剤を用いて、被験体が有効に処置され得るか否かを決定するための方法を提供する。ここで、試験サンプルが得られ、そしてACPLXのタンパク質または核酸が検出される(例えば、ここで、ACPLXのタンパク

質または核酸の存在は、この薬剤が投与されてACPLXの異常発現または異常活性に関連する障害が処置され得る被験体についての、診断指標である)。

#### 【0229】

本発明の方法はまた、ACPLX遺伝子における遺伝的損傷を検出し、それによって、その損傷遺伝子を有する被験体が異常な細胞増殖および/または分化によって特徴付けられる障害についての危険性を有するか否かを決定するためにも使用され得る。種々の実施形態において、この方法は、その被験体からの細胞のサンプルにおいて、ACPLXタンパク質をコードする遺伝子の統合性に影響を与える少なくとも1つの変更によって特徴付けられる遺伝的損傷の存在または非存在、あるいはACPLX遺伝子の誤発現を検出する工程を包含する。例えば、そのような遺伝的損傷は、以下の少なくとも1つの存在を確認することによって検出され得る：(i) ACPLX遺伝子からの1つ以上のヌクレオチドの欠失；(ii) ACPLX遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加；(iii) ACPLX遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換、(iv) ACPLX遺伝子の染色体再配置；(v) ACPLX遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルにおける変更、(vi) ACPLX遺伝子の異常改変(例えば、ゲノムDNAのメチル化パターンの異常改変)、(vii) ACPLX遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、(viii) ACPLXタンパク質の非野生型レベル、(ix) ACPLX遺伝子の対立遺伝子の欠失、ならびに(x) ACPLXタンパク質の不適切な翻訳後修飾。本明細書において記載されるように、当該分野において、ACPLX遺伝子における損傷を検出するために使用され得る、多数の公知のアッセイ技術が存在する。好ましい生物学的サンプルは、従来手段によって被験体から単離された末梢血白血球サンプルである。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプルが使用され得、これには、例えば、頬粘膜細胞が挙げられる。

#### 【0230】

特定の実施形態において、損傷の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(例えば、米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号を参照のこと)(例えば、アンカーPCRまたはRACE PCR)、あるいは、連

結連鎖反応(LCR)(例えば、Landegranら、1988、Science 241:1077-1080;およびNakazawaら、1994、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:360-364を参照のこと)におけるプローブ/プライマーの使用を包含する。後者は、ACPLX遺伝子における点変異を検出するために特に有用であり得る)(Abravayaら、1995、Nucl Acids Res 23:675-682を参照のこと)。この方法は、患者から細胞のサンプルを収集する工程、核酸(例えば、ゲノム、mRNAまたはその両方)をそのサンプルの細胞から単離する工程、ACPLXの遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーとその核酸サンプルとを、ACPLX遺伝子(存在する場合)のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じるような条件下で接触させる工程、ならびに増幅産物の存在もしくは非存在を検出する工程、またはその増幅産物のサイズを検出する工程およびその長さをコントロールサンプルと比較する工程を包含し得る。PCRおよび/またはLCRは、本明細書中に記載される変異を検出するために使用される技術のいずれかとともに予備的増幅工程として使用されることが望ましくあり得ることが予想される。

#### 【0231】

代替的な増幅方法としては、以下が挙げられる:当業者に周知な技術を用いた、その増幅された分子の検出の前の、自己維持配列複製(Guatelliら、1990、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-1878を参照のこと)、転写増幅系(Kwohら、1989、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173-1177を参照のこと);Qレプリカーゼ(Lizardiら、1988、BioTechnology 6:1197を参照のこと)、または他の任意の核酸増幅方法。これらの検出スキームは、核酸分子が非常に極少数で存在する場合に、そのような核酸分子の検出のために特に有用である。

#### 【0232】

代替の実施形態において、サンプル細胞からのACPLX遺伝子における変異は、制限酵素切断パターンにおける変更によって同定され得る。例えば、サンプ

ルおよびコントロールのDNAが単離され、増幅され(必要に応じて)、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼを用いて消化され、そしてフラグメント長の大きさがゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルDNAとコントロールDNAとの間のフラグメント長の大きさにおける差異は、そのサンプルDNAにおける変異を示す。さらに、配列特異的なリボザイムの使用(例えば、米国特許第5,493,531号を参照のこと)を使用して、リボザイム切断部位の発生または喪失によって特異的な変異の存在についてスコア付けし得る。

#### 【0233】

他の実施形態において、ACPLXにおける遺伝子変異は、サンプル核酸およびコントロール核酸(例えば、DNAまたはRNA)を、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイに対してハイブリダイズさせることによって同定され得る(例えば、Croninら、1996.Human Mutation 7:244-255;Kozalら、1996.Nat.Med.2:753-759を参照のこと)。例えば、ACPLXにおける遺伝子変異は、Croninら(前出)に記載されるように光生成DNAプローブを含む二次元アレイにおいて同定され得る。手短には、プローブの第一ハイブリダイゼーションアレイを用いて、サンプルおよびコントロールにおける長いストレッチのDNAにわたって走査し、連続的に重複するプローブの線形アレイを作成することによって、その配列間の塩基変化を同定し得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。この工程に第二のハイブリダイゼーションアレイが続き、これは、検出される全ての改変体または変異に相補的な、より小さな特化されたプローブアレイを用いることによる特定の変異の特徴付けを可能にする。各変異アレイは、一方が野生型遺伝子に対して相補的であり、そして他方が変異遺伝子に対して相補である並行プローブセットから構成される。

#### 【0234】

なお別の実施形態において、当該分野で公知の種々の配列決定反応のいずれかを使用して、ACPLX遺伝子を直接配列決定し得、そしてサンプルACPLX配列と対応する野生型(コントロール)配列とを比較することによって、変異を検出し得る。配列決定反応の例としては、MaxamおよびGilbert,1

977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560または Sanger, 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463によって開発された技術に基づくものが挙げられる。診断アッセイを実施する場合、種々の自動化配列決定手順のいずれかを利用し得ることもまた意図される(例えば、Naeveら, 1995. Biotechniques 19:448を参照のこと)。これらには、質量分析法による配列決定法(例えば、PCT国際公開番号WO 94/16101; Cohenら, 1996. Adv. Chromatography 36:127-162; および Griffinら, 1993. Appl. Biochem. Biotechnol. 38:147-159を参照のこと)が含まれる。

#### 【0235】

ACPLX遺伝子における変異を検出するための他の方法としては、切断剤からの保護を使用して、RNA/RNAもしくはRNA/DNAのヘテロ二重鎖に基づくミスマッチ塩基を検出する方法が挙げられる(例えば、Myersら, 1985. Science 230:1242を参照のこと)。一般に、「ミスマッチ切断」の当該分野の技術は、野生型のACPLX配列を含む(標識された)RNAまたはDNAを、組織サンプルから得られた潜在的な変異体RNAまたはDNAとハイブリダイズさせることによって形成されるヘテロ二重鎖を提供する工程によって始まる。この二本鎖の二重鎖を、二重鎖の一本鎖領域(例えば、そのコントロールとサンプルの鎖との間の塩基対ミスマッチに起因して存在するもの)を切断する薬剤を用いて処理する。例えば、RNA/DNA二重鎖を、RNaseを用いて処理し得、そしてDNA/DNAハイブリッドを、そのミスマッチ領域を酵素的に消化することに対して、S<sub>1</sub>ヌクレアーゼを用いて処理し得る。他の実施形態において、DNA/DNAまたはRNA/DNAのいずれかの二重鎖を、ミスマッチ領域を消化するために、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウム、およびピペリジンを用いて処理し得る。そのミスマッチ領域の消化後、次いで、得られた物質を変性ポリアクリルアミドゲル上で、大きさにより分離して、変異の部位を決定する。例えば、Cottonら, 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397; Saleebaら, 1

992. *Methods Enzymol.* 217: 286-295を参照のこと。1つの実施形態において、コントロールのDNAまたはRNAは、検出のために標識され得る。

【0236】

なお別の実施形態において、ミスマッチ切断反応は、二本鎖DNAにおけるミスマッチ塩基対を認識する1つ以上のタンパク質（いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素）を、細胞のサンプルから得られたACPLX cDNAにおける点変異を検出およびマッピングするために規定された系において使用する。例えば、*E. coli*のmutY酵素は、G/AミスマッチでAを切断し、そしてHeLa細胞からのチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチでTを切断する。例えば、Hsuら, 1994. *Carcinogenesis* 15: 1657~1662を参照のこと。例示的な実施形態に従って、ACPLX配列（例えば、野生型ACPLX配列）に基づくプローブは、試験細胞由来のcDNAまたは他のDNA産物にハイブリダイズされる。二重鎖は、DNAミスマッチ修復酵素を用いて処理され、そしてその切断産物（もしあれば）は、電気泳動プロトコルなどから検出され得る。例えば、米国特許第5,459,039号を参照のこと。

【0237】

他の実施形態において、電気泳動の移動度における変化は、ACPLX遺伝子における変異を同定するために使用される。例えば、一本鎖コンホメーション多型(SSCP)は、変異体と野生型核酸との間の電気泳動の移動度における差異を検出するために使用され得る。例えば、Oritaら, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 86: 2766; Cotton, 1993. *Mutat. Res.* 285: 125-144; Hayashi, 1992. *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9: 73~79を参照のこと。サンプルおよびコントロールACPLX核酸の一本鎖DNAフラグメントは、変性され、そして再生される。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従って変化し、電気泳動の移動度において得られる変化は、1つの塩基変化の検出さえも可能にする。DNAフラグメントは、標識され得るか、または標識されたプローブを用い

て検出され得る。アッセイの感度は、二次構造が配列中の変化に対してより感受的である(DNAよりもむしろ)RNAを使用することによって増強され得る。

1つの実施形態において、本発明の方法は、ヘテロ二重鎖分析を利用して、電気泳動の移動度における変化に基づいて二本鎖のヘテロ二重鎖分子を分離する。例えば、Keenら, 1991. Trends Genet. 7:5を参照のこと。

#### 【0238】

なお別の実施形態において、一定勾配の変性剤を含有するポリアクリルアミドゲルにおける変異体または野生型フラグメントの移動は、変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)を使用してアッセイされる。例えば、Myersら, 1985. Nature 313:495を参照のこと。DGGEが分析の方法として使用される場合、DNAは、例えば、PCRにより約40bpの高融解GCリッチDNAのGCランプを付加することによって、完全には変性されないことを確実にするように改変される。さらなる実施形態において、温度勾配は、コントロールおよびサンプルDNAの移動度における差異を同定するために、変性剤勾配の代わりに使用される。例えば、RosenbaumおよびReissner, 1987. Biophys. Chem. 265:12753を参照のこと。

#### 【0239】

点変異を検出するための他の技術の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーは、既知の変異が中心的に配置されるように調製され得、次いで、完全なマッチが見出される場合にのみハイブリダイゼーションを許容する条件下で標的DNAにハイブリダイズされる。例えば、Saikiら(1986) Nature 324:163); Saikiら, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230を参照のこと。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、このオリゴヌクレオチドがハイブリダイズ膜に付着され、そして標識された標的DNAとハイブリダイズされる場合に、PCR増幅された標的DNAまたは多くの異なる変異にハイブリダイズされる。

## 【0240】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、本発明と合わせて使用され得る。特異的増幅についてのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心において（その結果、増幅は、差次的ハイブリダイゼーションに依存する）（例えば、Gibbsら, 1989. *Nucl. Acids Res.* 17: 2437-2448）か、あるいは適切な条件下でミスマッチが妨げられ得るかまたはポリメラーゼ伸長を減少し得る、1つのプライマーの3'の最末端で、目的の変異を保有し得る（例えば、Prossner, 1993. *Tibtech.* 11: 238）。さらに、切断に基づく検出を行うために、変異領域に新規な制限部位を導入することが、望ましくあり得る。例えば、Gaspariniら, 1992. *Mol. Cell Probes* 6: 1を参照のこと。特定の実施形態において、増幅はまた、増幅用Taqリガーゼを使用して実施され得ることが予測される。例えば、Barany, 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 189を参照のこと。このような場合において、連結は、5'配列の3'末端に完全なマッチが存在する場合にのみ生じ、増幅の存在または非存在を探索することによって、特定の部位における既知の変異の存在を検出することを可能にする。

## 【0241】

本明細書中に記載される方法は、例えば、本明細書中に記載される少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を含む、予めパッケージングされた診断キットを利用することによって実施され得、これは、例えば、ACPLX遺伝子と関連する疾患または疾病の症状または家族病歴を示す患者を診断するための臨床的設定において簡便に使用され得る。

## 【0242】

さらに、ACPLXが発現される任意の細胞型または組織（好ましくは、末梢白血球）は、本明細書中に記載される予後アッセイにおいて利用され得る。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプル（例えば、頬粘膜細胞を含む）が、使用され得る。

## 【0243】

## (薬理ゲノム学 (Pharmacogenomics))

ACPLX活性(例えば、ACPLX遺伝子発現)に対する刺激性または阻害性の影響を有する因子、すなわちモジュレーターは、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定されるように、異常なACPLX活性と関連する障害(例えば、癌)、または免疫障害を処置(予防的または治療的に)するために個体に投与され得る。このような処置と合わせて、個体の薬理ゲノム学(すなわち、個体の遺伝子型と外来化合物または薬物に対するその個体の応答との間の関係についての研究)が、考慮され得る。治療剤の代謝における差異は、薬理的に活性な薬物の用量と血中濃度との間の関係を変更することによって、重篤な毒性または治療の失敗を導き得る。従って、個体の薬理ゲノム学は、個体の遺伝子型の考慮に基づく予防的または治療的処置のために有効な薬剤(例えば、薬物)の選択を許容する。このような薬理ゲノム学は、さらに、適切な投薬量および治療レジメンを決定するために使用され得る。従って、ACPLXタンパク質の活性、ACPLX核酸の発現、あるいは個体におけるACPLX遺伝子の変異含量が決定されて、それによって個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。

## 【0244】

薬理ゲノム学は、罹患された人における変更された薬物の性質および異常な作用に起因して、薬物に反応する臨床的に有意な遺伝性変更を扱う。例えば、Eichelbaum、1996、Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. , 23:983~985; Linder、1997、Clin. Chem. , 43:254~266を参照のこと。一般に、2つの型の薬理ゲノム学状態が、区別され得る。薬物が身体に作用する方法を変更する1つの因子として伝達される遺伝的状态(変更された薬物作用)、または身体が薬物に作用する方法を変更する1つの因子として伝達される遺伝的状态(変更された薬物代謝)。これらの薬理ゲノム学状態は、稀な欠損としてか、または多型としてのいずれかで生じ得る。例えば、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)欠損は、一般的な遺伝性酵素病であり、この主な臨床的合併症は、酸化剤薬物(抗マラリア剤、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン)の摂取およびソラマメの消

費後の溶血である。

【0245】

例示的な実施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度および持続期間の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素（例えば、N - アセチルトランスフェラーゼ2 (NAT2) およびシトクロムP450酵素CYP2D6およびCYP2C19)の遺伝的多型の発見は、幾人かの患者が予期される薬物効果を得ないか、または標準的かつ安全な用量の薬物を摂取した後に過大な薬物応答および深刻な毒性を示すことに関しての説明を提供した。これらの多型は、集団において2つの表現型（高い代謝能を持つ人 (extensive metabolizer) (EM) および低い代謝能を持つ人 (poor metabolizer) (PM)）で表現される。PMの有病率は、異なる集団の間で異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は高度に多型であり、そしていくらかの変異がPMにおいて同定されており、この全ては機能的CYP2D6の非存在に至る。CYP2D6およびCYP2C19の低い代謝能を持つ人は、彼らが標準的な用量を受けの場合に、かなり頻繁に過大な薬物応答および副作用を経験する。代謝産物が活性な治療剤の一部である場合、そのCYP2D6形成代謝産物であるモルヒネによって媒介されるコデインの鎮痛効果について実証されるように、PMは治療的応答を示さない。他の極端なものは、標準的な用量に応答しない、いわゆる超迅速な代謝能を持つ人である。最近、超迅速な代謝の基準となる分子は、CYP2D6遺伝子増幅に起因していることが同定されている。

【0246】

従って、ACPLXのタンパク質の活性、ACPLXの核酸の発現、あるいは個体におけるACPLXの遺伝子の変異内容を決定して、それによって、その個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。さらに、薬理ゲノム学の研究を使用して、個体の薬物応答性の表現型の同定に対して薬物代謝酵素をコードする多型対立遺伝子の遺伝子型を適用し得る。この知見は、用量または薬物選択に適用される場合、有害な反応または治療の失敗を回避し得、従って、被験体をACPLXの調節因子（例えば、本明細書中に記載される例示的なスクリーニングアッセイの1つによって同定される調節因子）を用いて処置する場

合に治療的または予防的効率を増強し得る。

【0247】

(臨床試験中の効果のモニタリング)

A C P L Xの発現または活性(例えば、異常な細胞増殖および/または分化を調節する能力)に対する薬剤(例えば、薬物、化合物)の影響をモニタリングすることは、基本的な薬物スクリーニングのみではなく、臨床試験にも適用され得る。例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイによって決定される、A C P L X遺伝子発現、タンパク質レベルを増加するため、またはA C P L X活性をアップレギュレートする薬剤の効力は、減少したA C P L X遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートしたA C P L Xの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。あるいは、スクリーニングアッセイによって決定される、A C P L X遺伝子発現、タンパク質レベルを減少、またはA C P L Xの活性をダウンレギュレートする薬剤の効力は、増加したA C P L X遺伝子発現、タンパク質レベル、またはアップレギュレートしたA C P L Xの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。このような臨床試験において、A C P L Xの発現または活性、および好ましくは、例えば、細胞増殖または免疫障害に關与するような他の遺伝子が、「リードアウト(読み出し)(read out)」、すなわち、特定の細胞の免疫応答性のマーカーとして使用され得る。

【0248】

限定ではなく、例として、A C P L Xを含む遺伝子(これは、A C P L X活性(例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイにおいて同定される)を調節する薬剤(例えば、化合物、薬物または低分子)を用いる処置によって、細胞内で調節される)が、同定され得る。従って、細胞性増殖障害に対する薬剤の効果を研究するために、例えば、臨床試験において、細胞が単離され得、そしてRNAが調製され得、そしてA C P L Xおよびこの障害に關与する他の遺伝子の発現のレベルについて分析され得る。遺伝子発現のレベル(すなわち、遺伝子発現パターン)は、本明細書中に記載されるように、ノーザンブロット分析もしくはRT-PCRによるか、あるいは産生されるタンパク質の量を測定

することによるか、本明細書中に記載されるような方法の1つによるか、あるいはA C P L Xまたは他の遺伝子の活性のレベルを測定することによって、定量され得る。この様式で、この遺伝子発現パターンは、この薬剤に対する細胞の生理学的応答の指標であるマーカーとして作用し得る。従って、この応答状態は、この薬剤を用いる個体の処置の前、および処置の間の種々の時点で、決定され得る。

#### 【0249】

1つの実施形態において、本発明は、薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、低分子、または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される他の薬物候補物）を用いる、被験体の処置の効力をモニタリングするための方法を提供し、これは、以下の工程を包含する：(i) 薬剤の投与の前に、被験体から投与前サンプルを得る工程；(ii) この投与前サンプルにおいて、A C P L Xタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現のレベルを検出する工程；(iii) この被験体から1つ以上の投与後サンプルを得る工程；(iv) この投与後サンプルにおいて、A C P L Xタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルを検出する工程；(v) この投与前サンプルにおけるA C P L Xタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルを、この投与後サンプルにおけるA C P L Xタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルと比較する工程；ならびに(vi) 従って、この被験体に対する薬剤の投与を変更する工程。例えば、この薬剤の増加した投与は、検出されるよりも高いレベルにA C P L Xの発現または活性を増加することが（すなわち、この薬剤の効力を増加すること）望ましくあり得る。あるいは、この薬剤の減少した投与は、検出されるよりも低いレベルにA C P L Xの発現または活性を減少することが（すなわち、この薬剤の効力を減少すること）望ましくあり得る。

#### 【0250】

（処置方法）

本発明は、異常なA C P L Xの発現または活性に関連する障害の危険性のある（または感受性）か、またはこの障害を有する被験体を処置する予防的および治

療的の両方の方法を提供する。これらの治療方法は、以下により詳細に議論される。

#### 【0251】

(疾患および障害)

(その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して)増加したレベルまたは生物学的活性によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を拮抗する(すなわち、低減または阻害する)治療剤を用いて処置され得る。活性を拮抗する治療剤は、治療的または予防的な様式で、投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:(i)上記ペプチド、またはそのアナログ、誘導体、フラグメントもしくはホモログ;(ii)上記ペプチドに対する抗体;(iii)上記ペプチドをコードする核酸;(iv)相同組換えによって上記ペプチドの内因性機能を「ロックアウトする」ために利用される、アンチセンス核酸および「機能不全性」である(すなわち、上記ペプチドに対するコード配列のコード配列内の異種挿入に起因する)核酸の投与(例えば、Capecchi、1989、Science 244:1288~1292を参照のこと);または(v)上記ペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用を変化させる、調節因子(すなわち、インヒビター、アゴニストおよびアンタゴニスト(本発明のさらなるペプチド模倣物または本発明のペプチドに対して特異的な抗体を含む))。

#### 【0252】

(その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して)減少したレベルまたは生物学的活性によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を増加させる(すなわち、活性に対するアゴニストである)治療剤を用いて処置され得る。活性をアップレギュレートする治療剤は、治療的または予防的な様式で、投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:上記ペプチド、またはそのアナログ、誘導体、フラグメントもしくはホモログ;あるいはバイオアベイラビリティを増加させるアゴニスト。

#### 【0253】

増加したレベルまたは減少したレベルは、ペプチドおよび/またはRNAを定

量することによって、容易に検出され得る。この定量は、患者の組織サンプルを（例えば、生検組織から）入手し、そしてそのサンプルを、その発現したペプチド（または上記ペプチドのmRNA）のRNAレベルまたはペプチドレベル、構造および/または活性をインビトロでアッセイすることによる。当該分野において周知の方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：イムノアッセイ（例えば、ウェスタンブロット分析、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動が後に続く免疫沈降、免疫細胞化学などによる）および/またはmRNAの発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、ノーザンアッセイ、ドットブロット、インサイチュハイブリダイゼーションなど）。

#### 【0254】

（予防的方法）

1つの局面において、本発明は、被験体において異常なACPLXの発現または活性と関連する疾患または状態を、ACPLXの発現または少なくとも1つのACPLX活性を調節する薬剤をこの被験体に投与することによって予防するための方法を提供する。異常なACPLXの発現または活性によって引き起こされるかまたはこれらに起因する、疾患にかかる危険がある被験体は、例えば、本明細書中に記載の診断アッセイまたは予後アッセイのいずれか、またはそれらの組み合わせによって、同定され得る。予防薬剤の投与は、疾患または障害が予防されるか、あるいはその進行を遅らせられるように、このACPLX異常の特徴である症状の発現の前に行い得る。このACPLX異常の型に依存して、例えば、ACPLXアゴニスト薬剤またはACPLXアンタゴニスト薬剤が、その被験体を処置するために使用され得る。その適切な薬剤は、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。本発明の予防方法は、以下の小区分において、さらに議論される。

#### 【0255】

（治療方法）

本発明の別の局面は、治療目的のためにACPLXの発現または活性を調節する方法に関する。本発明の調節方法は、細胞を、その細胞に関するACPLXタ

ンパク質活性の活性のうちの1つ以上を調節する薬剤と接触させる工程を包含する。ACP L Xタンパク質活性を調節する薬剤は、核酸またはタンパク質、ACP L Xタンパク質の天然に存在する同族リガンド、ペプチド、ACP L Xペプチド模倣物、または他の低分子のような、本明細書中に記載されるような薬剤であり得る。1つの実施形態において、この薬剤は、ACP L Xタンパク質活性のうちの1つ以上を刺激する。このような刺激薬剤の例としては、活性なACP L Xタンパク質、およびその細胞に導入されたACP L Xをコードする核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、この薬剤は、ACP L Xタンパク質活性のうちの1つ以上を阻害する。このような阻害薬剤の例としては、アンチセンスACP L X核酸分子、および抗ACP L X抗体が挙げられる。これらの調節方法は、インビトロで（例えば、その薬剤とともにその細胞を培養することによって）、あるいはインビボで（例えば、被験体にその薬剤を投与することによって）実施され得る。このように、本発明は、ACP L Xのタンパク質または核酸分子の、異常な発現または異常な活性によって特徴付けられる、疾患または障害に罹患した個体を処置する方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、ACP L Xの発現または活性を調節する（例えば、アップレギュレートまたはダウンレギュレートする）薬剤（例えば、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイによって同定される薬剤）あるいはそのような薬剤の組み合わせを投与する工程を包含する。別の実施形態において、この方法は、ACP L Xのタンパク質または核酸分子を、低減したかまたは異常な、ACP L Xの発現または活性を補償するための治療として、投与する工程を包含する。

#### 【0256】

ACP L X活性の刺激は、ACP L Xが異常にダウンレギュレートされている状況、および/またはACP L X活性の増加が有益な効果を有するようである状況において、望ましい。このような状況の1つの例は、被験体が、異常な細胞増殖および/または細胞分化によって特徴付けられる障害（例えば、癌または免疫関連障害）を有する場合である。このような状況の別の例は、被験体が妊娠性疾患（例えば、子かん前症）を有する場合である。

#### 【0257】

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体および完全ヒト抗体を含む本発明の抗体は、治療因子として使用され得る。このような因子は、一般に、被験体における疾患または病理学を処置または防止するために使用される。抗体の調製物、好ましくはその標的抗原に対して高い特異性および高い親和性を有するものが、被験体に投与され、そして一般に、この標的との結合に起因する効果を有する。このような効果は、所定の抗体分子と問題のその標的抗原との間の相互作用の特異的な特性に依存して、1種類または2種類であり得る。第一の例において、抗体の投与は、標的の天然に結合する内因性リガンドとの結合を排除または阻害し得る。この場合において、抗体は、標的に結合して、そして天然に存在するリガンドの結合部位をマスクする。ここで、このリガンドは、エフェクター分子として働く。従って、レセプターは、リガンドに応答性のシグナル伝達経路を媒介する。

#### 【0258】

あるいは、この効果は、抗体が標的分子上のエフェクター結合部位に結合することによって生理学的結果を誘発するというものであり得る。この場合、標的（疾患または病理学において存在しないかもしれないかまたは欠損し得る内因性リガンドを有するレセプター）は、代理のエフェクターリガンドとして抗体を結合し、レセプターベースのシグナル伝達事象をレセプターによって開始する。

#### 【0259】

本発明の抗体の治療的有効量は、一般に治療目的に達する必要のある量に関する。上記のように、これは、抗体とそのリガンド抗原との間の結合相互作用であり得、これは、特定の場合には標的の機能を干渉し、他の場合には生理学的応答を促進する。投与されるために必要とされる量はさらに、その特異的抗原に対する抗体の結合親和性に依存し、投与された抗体が投与される他の被験体の空隙率（free volume）から除去される速度にも依存する。本発明の抗体または抗体フラグメントの治療的に有効な投薬についての一般的範囲は、非限定的な例として、約0.1mg/kg体重～約50mg/kg体重であり得る。一般の投薬頻度は、例えば、1日2回～週に1回の範囲であり得る。

#### 【0260】

(治療剤の生物学的効果の決定)

本発明の種々の実施形態において、適切なインビトロアッセイまたはインビボアッセイを実施して、特定の治療剤の効果およびその投与が罹患組織の処置を示すか否かを決定する。

【0261】

種々の特定の実施形態において、インビトロアッセイが患者の障害に關与する代表的な細胞型で行われ、所定の治療剤がこの細胞型に対して所望の効果を発揮するか否かを決定し得る。治療における使用のための化合物は、ヒト被験体において試験する前に適切な動物モデル系において試験され得る。これらの動物モデル系としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなど。同様に、インビボ試験については、当該分野で公知の任意の動物モデル系が、ヒト被験体に対する投与の前に使用され得る。

【0262】

本発明はさらに、以下の非限定的実施例を使用して例示される。

【0263】

(実施例1．ALCLPX核酸(「AL035460A」)の分子クローニング)

公知のカルボキシペプチダーゼに関するポリペプチド(配列番号2(SEQ ID NO:2))をコードする図1に示されるヌクレオチド配列(配列番号1)を、ヒトゲノムDNAの種々の領域をアセンブリすることによって同定した。このアセンブリされた配列を、AL035460Aと名付けた。

【0264】

SIGNALP分泌シグナル予想アルゴリズムは、AL035460Aによってコードされるポリペプチド(配列番号2)が残基20と21との間にシグナルペプチダーゼ切断部位を有することを予想した。従って、コードされるAL035460Aタンパク質の成熟形態に対応する予想されたORFがクローニングされた。

【0265】

オリゴヌクレオチドプライマーを、このタンパク質に対応するDNAセグメントをPCRを使用して増幅するために設計した。順方向プライマーは、BglII制限部位を含み、そして逆方向プライマーは、インフレームでXhoI制限部位を含んだ。以下のPCRプライマーを使用した：

AL035460A順方向：

【0266】

【化1】

CTCGTCAGATCTGCGCCCAGGAACTCGGTGCTGGGCCTCG

(配列番号3)、および

AL035460A逆方向：

【0267】

【化2】

CTCGTCCTCGAGATCCTTCTGTCCCCTTAGCCGCTCC

(配列番号4)。

【0268】

PCR反応を、50 $\mu$ l容量において、合計5ngのヒト心臓cDNAテンプレート、それぞれ1 $\mu$ MのAL035460A順方向プライマーおよびAL035460A逆方向プライマー、5 $\mu$ モルのdNTP(Clontech Laboratories, Palo Alto CA)および1 $\mu$ lの50 $\times$ Advantage-HF2ポリメラーゼ(Clontech Laboratories)を使用して実施した。以下のPCR反応条件を使用した：

- a) 96 3分間
- b) 96 30秒間変性
- c) 70 30秒間、プライマーアニーリング
- d) 72 4分間伸長

工程 ( b ) ~ ( d ) を 1 0 回繰り返す。工程 c ) の温度を 1 / サイクルだけ減少する

e ) 9 6 3 0 秒間変性

f ) 6 0 3 0 秒間アニーリング

g ) 7 2 4 分間伸長

工程 ( e ) ~ ( g ) を 2 5 回繰り返す

h ) 7 2 1 0 分間の最終伸長。

【 0 2 6 9 】

約 2 . 2 k b p の推定されたサイズを有する P C R 産物を、アガロースゲルから単離し、p C R 2 . 1 ベクター ( I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A ) に連結した。クローン化した挿入物を、ベクター特異的 M 1 3 順方向 ( - 4 0 ) プライマーおよび M 1 3 逆方向プライマー、ならびにイカの遺伝子特異的プライマーを使用して配列決定した :

【 0 2 7 0 】

【化3】

AL035460A S1:	AGCCGGCTTGAGGCATCCAGC (SEQ ID NO:5),
AL035460A S2:	GCTGGATGCCTCAAGCCGGCT (SEQ ID NO:6),
AL035460A S3:	CCAGAACTCCAGTGCTGAAC (SEQ ID NO:7),
AL035460A S4:	GTTCAGCACTGGAGTTTCTGG (SEQ ID NO:8),
AL035460A S5:	CAAGCCTGGGGAGCATGAGCTG (SEQ ID NO:9),
AL035460A S6:	CAGCTCATGCTCCCCAGGCTTG (SEQ ID NO:10),
AL035460A S7:	CAGGACGATGGGAAGGTGCC (SEQ ID NO:11),
AL035460A S8:	GGGCACCTTCCCATCGTCCTG (SEQ ID NO:12),
AL035460A S9:	AGCATGAATGACTTCAGCTAC (SEQ ID NO:13),
AL035460A S10:	GTAGCTGAAGTCATTCATGCT (SEQ ID NO:14),
AL035460A S11:	GAGCTTGGGATTGCTGACGCT (SEQ ID NO:15),
および	
AL035460A S12:	GCGTCAGCAATCCCAAGCTC (SEQ ID NO:16).

挿入物の配列を、予想された A L 0 3 5 4 6 0 A 成熟タンパク質 ( 残基 2 1 ~ 7 3 4 ) についてコードするオープンリーディングフレームとして確認した。こ

のクローンを、pCR2.1-AL035460と名付けた。

【0271】

(実施例2. 哺乳動物発現ベクターpCEP4/Secの構築)

哺乳動物細胞へのACPLX配列の発現を試験するために、pCEP4/Secと名付けたベクターを構築した。

【0272】

pCEP4/Secベクターを、pcDNA3.1-V5His (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) から構築した。以下のオリゴヌクレオチドプライマーを設計して、発現ベクターpcDNA3.1-V5His発現ベクターからのフラグメントを増幅した。

【0273】

pSec-V5-His順方向

【0274】

【化4】

CTCGTCCTCGAGGGTAAGCCTATCCCTAAC

(配列番号17) および

pSec-V5-His逆方向

【0275】

【化5】

CTCGTCGGGCCCTGATCAGCGGGTTTAAAC

(配列番号18)

PCR産物を、XhoIおよびApaIで消化し、そしてIg リーダー配列 (Invitrogen, Carlsbad CA) を保有する、XhoI/ApaI消化したpSecTag2Bベクターに連結した。得られたベクターの正確な構造 (インフレームでIg- リーダーおよびV5-His6を含むpSec

cV5His)を、DNA配列分析により確認した。ベクターpSecV5Hisを、PmeIおよびNheIで消化して、正確なフレームで上記エレメントを保持するフラグメントを提供した。このPmeI-NheIフラグメントを、BamHI/KlenowおよびNheIで処理したベクターpCEP4(Invitrogen, Carlsbad, CA)に連結した。得られたベクターはpCEP4/Secと命名され、そしてPCMVおよび/またはPT7プロモーターの制御下に、インフレームでIgリーダー、目的のクローンの挿入部位、ならびにV5およびHis6を含む。pCEP4/Secは、任意のタンパク質をIg鎖シグナルペプチドに融合することによって、異種タンパク質発現および分泌を可能にする発現ベクターである。発現タンパク質の検出および精製は、C末端におけるV5エピトープタグおよび6xHisタグ(Invitrogen, Carlsbad, CA)の存在により補助される。

#### 【0276】

(実施例3: ヒト胚腎臓293細胞における、AL035460Aの発現)

ヒトAL035460A配列を含む2.1kbのBglII-XhoIフラグメントを、pCR2.1-AL035460A(実施例2)から単離し、そしてベクターpCEP4/Secにサブクローン化して(実施例3)、発現ベクターpCEP4/Sec-AL035460を生成した。pCEP4/Sec-AL035460Aベクターを、製造者の指示書(Gibco/BRL, Rockville, MD)に従って、Lipofectamine Plus試薬を使用して、293細胞にトランスフェクトした。この細胞ペレットおよび上清を、トランスフェクション72時間後回収し、そして抗V5抗体を用いるウェスタンブロットティング(還元条件)によりAL035460A発現について試験した。hAL035460の成熟フラグメントについて予想された分子量は、プライマーによってコードされる4アミノ酸を含んで、80132kDaである。図6は、hAL035460Aの単量体形態が293細胞によって分泌される125kDaの優勢なバンドとして発現されることを示す。AL035460Aの成熟フラグメントは、6つの潜在的N-グリコシル化部位を予測する。予想された分子量と観察された値との間の矛盾は、このタンパク質のグリコシル化に帰する。さらに

、いくつかのより大きい分子量バンドは、分泌されたAL035460Aタンパク質のオリゴマー化を示す。

【0277】

(実施例4 . クローンAL035460Aを使用する発現分析)

クローンAL035460Aに対して相同な配列の発現を、Perkin-Elmer Biosystems ABI PRISM (登録商標) 7700 配列検出システムにおいて実施されるリアルタイムの定量的PCR (TAQMAN (登録商標)) により、41正常サンプルおよび55腫瘍サンプルにおいて評価した。表BBにおいて、以下の省略形が使用される：

ca . = 癌腫、

\* = 転移から確立された

met = 転移

s cell var = 小細胞改変体

non - s = non - sm = 非小

squam = 扁平 (squamous)

pl . eff = pl effusion = 胸水

glio = 神経膠腫

astro = 星状細胞腫

neuro = 神経芽腫。

【0278】

(表III . 発現分析において使用される組織サンプル)

【0279】

【表3】

番号	組織サンプル	番号	組織サンプル
1	内皮細胞	49	腎臓癌
2	内皮細胞(処置した)	50	腎臓癌
3	脾臓	51	腎臓癌
4	脾臓癌	52	腎臓癌
	CAPAN2	53	腎臓癌
5	脂肪	54	腎臓癌
6	副腎	55	肝臓
7	甲状腺	56	肝臓 (胎児)
8	唾液腺	57	肝臓癌 肝細胞芽球
9	脳下垂体		HepG2
10	脳 (胎児)	58	肺
11	脳 (全体)	59	肺 (胎児)
12	脳 (扁桃)	60	肺癌 (小細胞)
13	脳 (小脳)	61	肺癌 (小細胞)
14	脳 (海馬)	62	肺癌 (小細胞 var.)
15	脳 (視床下部)	63	肺癌 (大細胞)
16	脳 (黒質)	64	肺癌 (非小細胞)
17	脳 (視床)	65	肺癌 (非小細胞)
18	脊髄	66	肺癌 (非小細胞)
19	CNS癌 (グリア/アストロ)	67	肺癌 (非小細胞)
20	CNS癌 (グリア/アストロ)	68	肺癌 (扁平)
21	CNS癌 (アストロ)	69	肺癌 (扁平)
22	CNS癌* (神経:met)	70	乳腺
23	CNS癌 (アストロ)	71	乳房癌* (胸水)
24	CNS癌 (アストロ)	72	乳房癌* (胸水)
25	CNS癌 (グリア)	73	乳房癌* (胸水)
26	CNS癌 (グリア)	74	乳房 ca.
27	CNS癌 (グリア)	75	乳房 ca.
28	心臓	76	卵巣
29	骨格菌	77	卵巣癌
30	骨髄	78	卵巣癌
31	胸腺	79	卵巣癌
32	脾臓	80	卵巣癌
33	リンパ節	81	卵巣癌
34	結腸(上行)	82	卵巣癌* (腹水)
35	胃	83	子宮筋層
36	小腸	84	子宮
37	結腸癌	85	胎盤
	SW480	86	胎盤
38	結腸癌* (SW480 met)	87	胎盤癌* (骨met)
39	結腸癌		PC-3
	HT29	88	精巣
40	結腸癌	89	黒色腫
	HCT-116	90	黒色腫* (met)
41	結腸癌	91	黒色腫
	CaCo-2	92	黒色腫
42	結腸癌	93	黒色腫
	HCT-15	94	黒色腫* (met)
43	結腸癌	95	黒色腫
	HCC-2998	96	黒色腫
44	胃癌* (肝臓 met)		UACC-257
45	膀胱		
46	気管		
47	腎臓		
48	腎臓 (胎児)		

96個のRNAサンプルを、分析した。発現を参照RNAと比較した。特に、サンプルを、 $\beta$ -アクチンおよびGAPDHに対して正規化した。RNA(約50ngの総RNAまたは約1ngのポリA+RNA)を、製造業者のプロトコールに従って、TAQMAN(登録商標)逆転写試薬キット(PE Biosystems, Foster City, CA; カタログ番号N808-0234)

およびランダムヘキサマーを使用してcDNAに転換した。反応を20 $\mu$ lにおいて実施し、そして30分間、48 $^{\circ}$ Cにおいてインキュベートした。次いで、cDNA(5 $\mu$ l)を、製造業者のプロトコールに従って、 $\beta$ -アクチンおよびGAPDH(TAQMAN(登録商標)アッセイ試薬(PE Biosystems;それぞれ、カタログ番号4310881Eおよび4310884E)ならびにTAQMAN(登録商標)ユニバーサルPCR Master Mix(PE Biosystems;カタログ番号4304447)を使用するTAQMAN(登録商標)反応のために別個のプレートに移した。反応を、以下のパラメータを使用して25 $\mu$ lにおいて実施した:50 $^{\circ}$ Cにて2分;95 $^{\circ}$ Cにて10分;95 $^{\circ}$ Cにて15秒/60 $^{\circ}$ Cにて1分(40サイクル)。結果は、対数スケールを使用してCT値(所定のサンプルが蛍光の閾値レベルを越えるサイクル)として記録され、2つのサンプルの間のRNA濃度における差異がCTの二乗として表された。 $\beta$ -アクチンおよびGAPDHについて得られる平均CT値を使用して、RNAサンプルを正規化した。最高のCT値を生成するRNAサンプルは、さらなる希釈を必要としないが、全ての他のサンプルをそれらの $\beta$ -アクチン/GAPDH平均CT値に従って、このサンプルに対して希釈した。

#### 【0280】

正規化されたRNA(5 $\mu$ l)をcDNAに転換し、そして製造業者の指示に従って、One Step RT-PCR Master Mix Reagents(PE Biosystems;カタログ番号4309169)および遺伝子特異的プライマーを使用するTAQMAN(登録商標)によって分析した。プローブおよびプライマーを、入力として、クローンAL035460Aの配列を使用するPerkin Elmer Biosystem's Primer Express Softwareパッケージ(Apple ComputerのMacintosh Power PC用バージョンI)に従って、アッセイについて設計した。2セットのプライマー(順方向および逆方向)ならびにプローブを作製し、以下に示した。

#### 【0281】

セットAg86は、配列267-342を標的化する

## 【0282】

## 【化6】

Ag86 (F): 5'-GTCTGGAGTCCCTGCGAGTTT-3' (SEQ ID NO:19)

Ag86 (R): 5'-CGGTGTGGTCCAAGACCAA-3' (SEQ ID NO:20)

Ag86 (P): TET-5'-CTTGAGGCATCCAGCAGCCAGTCC-3'-TAMRA (SEQ ID NO:21)

セットAg86bは、配列271-346を標的化する

## 【0283】

## 【化7】

AG 86(b) (F): 5'-GAGTCCCTGCGAGTTTCAGATAG-3' (SEQ ID NO:22)

AG 86(b) (R): 5'-GTCCTCGGTGTGGTCCAAGA-3' (SEQ ID NO:23)

AG 86(b) (P): TET-5'-TGAGGCATCCAGCAGCCAGTCCTTT-3'-TAMRA (SEQ ID NO:24)

デフォルト設定を反応条件に使用し、そしてプライマーを選択する前に以下のパラメータを設定した：プライマー濃度 = 250 nM、プライマー融解温度 ( $T_m$ ) 範囲 = 58 ~ 60、プライマー最適  $T_m$  = 59、最大プライマー差 = 2、プローブは、5' Gを有さず、プローブ  $T_m$  は、プライマー  $T_m$  よりも10高くなければならない、アンプリコンサイズは、75 bp ~ 100 bpである。選択されたプローブおよびプライマー（下記を参照のこと）を、Synthegen (Houston, TX, USA) によって合成した。プローブを、HPLCにより二重精製して、結合していない色素を取り除き、そして質量分析法により評価して、それぞれ、プローブの5'末端および3'末端へのレポーター色素および消光色素の結合を確認した。これらの最終濃度は、以下の通りであった：順方向プライマーおよび逆方向プライマーは、各々900 nM、ならびにプローブは、200 nM。

## 【0284】

PCR条件：各組織および各細胞株由来の正規化RNAを、96ウェルPCR

プレート(Perkin Elmer Biosystems)の各ウェルにスポットした。2つのプローブ(ALCLPXプローブで多重化されたALCLPLX特異的プローブおよび別の遺伝子特異的プローブ)をPCRカクテル、PE Biosystems 7700用の1 x TaqMan™ PCR Master Mixを使用して、5mM MgCl<sub>2</sub>, dNTPs(1:1:1:2比率のdA, G, C, U)、0.25 U/ml AmpliTaq Gold™(PE Biosystems)、および0.4 U/μl RNaseインヒビター、ならびに0.25 U/μl 逆転写酵素と共にセットアップした。逆転写を、48 °Cで30分間実施し、次いで、以下のような増幅/PCRサイクルを実施した: 95 °Cで10分間、次いで、95 °Cで15秒間、60 °Cで1分間を40サイクル。

**【0285】**

プローブセットAg 86についての結果を、図6A~Cに示す。最高の発現は、正常組織の胎児腎臓、乳腺、胎盤および子宮筋層において見出された。プローブセットAg 86bの使用は、同一の組織ならびに脂肪において高発現レベルを、そして他の正常組織において中程度のレベルを検出した(図7A~C)。

**【0286】**

クローンAL035460Aについて、このクローンにおける位置588漢63を検出する、以下のプライマーおよびプローブを使用した:

**【0287】**

**【化8】**

Ag 2(F): 5'-GTGCTGCTGCTCTACAATAACCA-3' (SEQ ID NO:25)

Ag 2(R): 5'-GTTTCTGCAGCTGGGCCAT-3' (SEQ ID NO:26)

Ag 2(P):-FAM-5'-TGGACCGGTGCGCCTTCGAT-3'-TAMRA (SEQ ID NO:27)

これらの結果を、図7A~7Cに示す。クローンAL035460Aの高発現を、試験した正常脳組織のほとんどにおいて見出した。さらに、低レベルの発現を、多くの他の正常組織および特定の癌組織において見出す。

**【0288】**

## (実施例5 . AL035460による腫瘍増殖の抑制)

乳癌細胞株および卵巣腫瘍細胞株を、誘導性プロモーターの制御下でAL035460A遺伝子でトランスフェクトする。使用され得る細胞株としては、以下が挙げられる：乳房癌(胸水)MCF-7、乳房癌(胸水)MDA-MB-231、乳房癌(胸水)T46D、乳房癌BT-549、乳房癌MDA-N、卵巣癌OVCAR-3、卵巣癌OVCAR-4、卵巣癌OVCAR-5、卵巣癌OVCAR-8、卵巣癌IGROV-1および、卵巣癌(腹水)SK-OV-3。これらの細胞株は、AL035460Aの減少した発現を示す。安定的な形質導入体を、例えば、pCDM8(Seed(1987)Nature 329:840)またはpMT2PC(Kaufmanら、(1987)EMBO J 6:187-195)へのAL035460A遺伝子の組み込みに基づく方法を使用して作製する。誘導性プロモーターを、Saez Eら(Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. Curr Opin Biotechnol 1997年10月; 8(5):608-16)に総説されたプロモーターの中から選択し得る。真核生物細胞についての他の適切な発現系については、例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989の第16章および第17章に記載される。哺乳動物細胞の適切な遺伝子形質転換はまた、Sawada M.およびKamatagi T.(Genetically engineer cells stably expressing cytochrome P450 and their application to mutagen assays. Mutat Res. 1998年8月; 411(1):19-43)ならびにDeCruz EEら(The basis for somatic gene therapy of cancer. J Exp Ther Oncol. 1996年3月; 1(2):73-83)によって記載される。トランスフェクションを、例えば、

リポソーム媒介トランスフェクション (Schenborn E. T. および Oler J. Methods Mol Biol. 2000; 130: 155 - 64)、DEAEデキストラントランスフェクション (Schenborn E. T. および Goiffon V. Methods Mol Biol. 2000; 130: 147 - 53)、またはリン酸カルシウムトランスフェクション (Schenborn E. T. および Goiffon V. Methods Mol Biol. 2000; 130: 135 - 45) によってもたらされ得る。

【0289】

細胞をトランスフェクトした後、細胞増殖に対するAL035460A遺伝子産物の効果を、誘導後に評価する。インビトロ増殖およびインビボ増殖の両方を、モニターし、そして空ベクターでトランスフェクトした腫瘍細胞の増殖と比較する。トランスフェクトされた細胞がAL035460Aの発現後にインビトロおよびインビボの両方での増殖速度における減少を示すことが予想される。

【0290】

(他の実施形態)

本発明は、その詳細な説明とともに記載されてきたが、前述の説明は例示であって、本発明の範囲を限定することを意図するのではない。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲の範囲により規定される。他の局面、利点および改変は、上記の特許請求の範囲の範囲内にある。

【0291】

【図面の簡単な説明】

【0292】

【図1】

図1は、本発明のACPLXポリペプチドをコードするヌクレオチド配列(配列番号1)の表示である。

【0293】

【図2】

図2は、図1に示されるヌクレオチド配列によりコードされるACPLXポリ

ペプチド配列（配列番号2）の表示である。

【0294】

【図3】

図3Aおよび図3Bは、マウスAEBP1ポリペプチド（配列番号\_\_）（「Q61281」）、ヒトAEBP1ポリペプチド（配列番号\_\_）（「Q14113」）、マウス大動脈カルボキシペプチダーゼ様-2ポリペプチド（配列番号\_\_）（「O88442」）、マウスカルボキシペプチダーゼX2ポリペプチド（配列番号\_\_）（「O54860」）および本発明のACPLXポリペプチド（配列番号2）（「ALO35460\_\_GENESCAN\_\_predicted\_\_pep」）のアミノ酸配列の比較である。

【0295】

【図4】

図4は、マウスCPPX1ポリペプチド（AF077738）およびACPLXポリペプチド（配列番号2）（「ALO35460\_\_GENESCAN\_\_predicted\_\_pep」）のアミノ酸配列中の同一の領域および保存的アミノ酸置換の領域を示す比較である。

【0296】

【図5】

図5は、293細胞によるACPLXポリペプチドの発現を示すウェスタンブロットの表示である。

【0297】

【図6】

図6A～6Cは、種々の細胞型および組織におけるACPL核酸の相対的発現を示すヒストグラムである。

【0298】

【図7】

図7A～7Cは、プローブセットAG86bを使用する種々の組織における本発明のACPLX核酸の相対的発現を示すヒストグラムである。

## 【図1】

本発明の大動脈カルボキシラセ"様タンパク質をコードする配列に  
含むヌクレオチド配列

GCGGGGGCAGGAAGGGGGCGGGGGGCTCGGCGCACTCGGCAGGAAGAGACCGACCCGCC  
 ACCCGCCGTAGCCCGCGCGCCCTGGCACTCAATCCCCGCCATGTGGGGGGCTCCTGCTCG  
 CCCTGGCCGCTTCGCGCCGCGGCTCGGCGGGCTCTGGGGGGCGCCAGGAACCTCGGTGC  
 TGGGCTCGCGCAGCCCGGACCACCAAGGTCCCAGGCTCGACCCCGCCCTGCATAGCA  
 GCCCAGCACAGCCGCGGAGACAGCTAACGGGACCTCAGAACAGCATGTCCGGATT  
 CGAGTCATCAAGAAGAAAAAGTCAATTATGAAGAAGCGGAAGAAGCTAACTCTAACTCG  
 CCCCACCCCACTGGTGACTGCCGGGCCCTTGTGACCCCACTCCAGCAGGGACCCTCGA  
 CCCCCTGAGAAACAAGAAACAGGCTGTCTCTTTGGGTCTGGAGTCCCTGCGAGTTTC  
 AGATAGCCGGCTTGAGGCATCCAGCAGCCAGTCTTTGGTCTTGGACCACACCGAGGACG  
 GCTCAACATTCAGTCAGGCTGGAGGACGGCGATCTATATGATGGAGCCTGGTGTGCTGA  
 GGAGCAGGACGCCGATCCATGGTTTCAGGTGGACGCTGGGCACCCCAACCGCTTCTCGGG  
 TGTTATCACACAGGGCAGGAACCTGTCTGGAGGTATGACTGGGTACATCATAACAAGT  
 CCAAGTTCAGCAATGACAGTCGGACCTGGTGGGAAGTAGGAACCACAGCAGTGGGATGG  
 ACGCAGTATTTCTGCCAATTCAGACCCAGAACTCCAGTGCTGAACCTCCTGCCGGAGC  
 CCCAGGTGGCCCGCTTCATTCGCTGCTGCCCCAGACCTGGCTCCAGGGAGGCGCGCCTTG  
 CCTCGGGCAGAGATCCTGGCCTGCCAGTCTCAGACCCCAATGACCTATTCCTTGAGGCC  
 CCTGCGTCGGGATCCTCTGACCCCTAGACTTTCAGCATCACAATTACAAGGCCATGAGGA  
 AGCTGATGAAGCAGGTACAAGAGCAATGCCCAACATCACCCGCATCTACAGCATTGGGA  
 AGAGCTACCAGGCGCTGAAGCTGTATGTGATGGAAATGTCGGACAAGCCTGGGGAGCAT  
 GAGCTGGGGAGCCTGAGGTGCGCTACGTGGCTGGCATGCATGGGAACGAGCCCTGGG  
 GCGGGAGTTGCTTCTGCTCCTGATGCAGTTCTGTGCCATGAGTTCCTGCGAGGGAAACCA  
 CGGGTGACCCGGCTGCTCTGAGATGCGCATTACCTGCTGCCCTCCATGAACCTGATG  
 GCTATGAGATCGCCTACCACGGGGTTCAGAGCTGGTGGGCTGGGCCGAGGGCCGCTGGA  
 ACAACCAGAGCATCGATCTTAACCATAATTTGCTGACCTCAACACACCACTGTGGGAAG  
 CACAGGACGATGGGAAGGTGCCCCACATCGTCCCAACCATCACCTGCCATTGCCCACT  
 ACTACACCCCTGCCAATGCCACCGTGGCTCCTGAAACGCGGGCAGTAATCAAGTGGATGA  
 AGCGGATCCCTTTGTGCTAAGTGCCAACCTCCACGGGGGTGAGCTCGTGGTGTCTACCC  
 ATTCGACATGACTCGCACCCCGTGGGCTGCCCGCGAGCTCACGCCCACACCAGATGATGC  
 TGTGTTTCGCTGGCTCAGCACTGTCTATGCTGGCAGTAATCTGGCCATGCAGGACACCAGC  
 CGCCGACCCCTGCCACAGCCAGGACTTCTCCGTGCACGGCAACATCATCAACGGGGCTGAC  
 TGGCACACGGTCCCCGGGAGCATGAATGACTTCAGCTACCTACACACCAACTGCTTTGAG  
 GTCACTGTGGAGCTGTCTGTGACAAGTTCCTCAGGAGAAATGAATTGCCCCAGGAGTGG  
 GAGAACAACAAAGACGCCCTCCTCACCTACCTGGAGCAGGTGCGCATGGGCATTGCAGGA  
 GTGGTGAGGGACAAGGACACGGAGCTTGGGATTGCTGACGCTGTATTGCCGTGGATGGG  
 ATTAACCATGACGTGACCACGGCGTGGGGCGGGGATTATTGGCGTCTGTGACCCAGGG  
 GACTACATGGTGACTGCCAGTGCCGAGGGCTACCATTAGTGACACGGAACCTGTCCGGTC  
 ACCTTTGAAGAGGGCCCTTCCCCTGCAATTTCTGTGCTCACCAGACTCCCAAACAGAGG  
 CTGCGCGAGCTGCTGGCAGCTGGGGCCAAGGTGCCCCCGACCTTCGACGGCGCCTGGAG  
 CGGCTAAGGGGACAGAAGGATTGATACCTGCGGTTAAGAGCCCTAGGGCAGGCTGGAC  
 CTGTCAAGACGGGAAGGGGAAGAGTAGAGAGGGAGGGACAAA

## 【図2】

図1に示されるコード配列に、コードされるタンパク質配列

MWGLLLALAAFAPAVGPALGAPRNSVLGLAQPGTTKVPGSTPALHSSPAQPPAETAN  
 GTSEQHVIRIVIKKKKVVIMKKRKKLTLTRPTPLVTAGPLVTPTPAGTLDPAEKQETGC  
 PPLGLESLRVSDSRLEASSQSFGGLGPHRGRLNIQSGLEDGDLYDGAWCAEEQDA  
 DPWFQVDAGHPTRFSGVITQGRNSVWRYDWVTSYKVQFSNDSRTWWGSRNHSS  
 GMDAVFPANSDPETPVLNLLPEPQVARFIRLLPQTWLQGGAPCLRAEILACPVS  
 PNDLFLEAPASGSSDPLDFQHNYKAMRKLKQVQEQCPNITRIYSIGKSYQGLKLYME  
LLPSMNP DGYELAYHRGSELVGV AEGRWNNOSIDLNHN FADLNTPLWEA ODDGKVP  
HIVPNHHLPLPTY YTLNATVAPETRAVIKWMKRIPVLSANLHGGELVVSYP DFMTR  
TPWAARELTPD DAVFRWLSTVYAGSNLAMODTSRRPCHSODFSVHGNI INGADW  
HTVPGSMNDFS YLHTNCFEVTVELSCDKFPHENELPOEWENNKDALLTYLEOVR MGI  
AGVVRDKDTELGIADAVIAVDGINHDVTTAWGGDYWRLLTPGDY MVTASAEGYHS  
VTRNCRVTFEEGPFPCNFVLT KTPKQRLRELLAAGAKVPPDLRRRLERLRGQKD

【図3】

本発明のタンパク質の ClustalW 整列

```

Q61281      MAPVETASLLCGLLALLTLCPEDNPQTVLTDDEIEEFLQDPLSELETQSPPREDDVVEVQP
Q88442
Q14113
Q54860
AL035460_GENS CAN_predicted_pap

Q61281      LPEPTQRPKSKAGQKQADVEVPEKNKDKENKDKKDKGPKATKPLIGSIRPTKPKREK
Q88442
Q14113
Q54860
AL035460_GENS CAN_predicted_pap

Q61281      FPKATEKPKKPKPKATKPKPKPKPKATKPKPKPKPKPKATKPKSAQKKFSTVAPLETDLRLI
Q88442
Q14113
Q54860
AL035460_GENS CAN_predicted_pap

Q61281      PSPSNPSAQELPQKRDTPFNHAWQQQGEETQVEAKQPKPEPEEETEMPTLDYHDQIEKED
Q88442
Q14113
Q54860
AL035460_GENS CAN_predicted_pap

Q61281      YEDLEYIRQKQRPPTPSRRALWPERDEEKTEKPEEKEVEPPLKDLPPDYGDSTYVIPH
Q88442
Q14113
Q54860
AL035460_GENS CAN_predicted_pap

Q61281      PALALALALVAVALAGVRAQGAAPFEDDYYSQELWRAGRYTQHPKDEPEPELPSMKEED
Q88442
Q14113
Q54860
AL035460_GENS CAN_predicted_pap

Q61281      YDDLDTYYPFHDPKPDVQVEDEEIEEIEEIEEIEEIEEIEEIEEIEEIEEIEEIEEIEEIEE
Q88442
Q14113
Q54860
AL035460_GENS CAN_predicted_pap

Q61281      QKELLENWAPVEKIKGPPKESKELKELKELKELKELKELKELKELKELKELKELKELKELKEL
Q88442
Q14113
Q54860
AL035460_GENS CAN_predicted_pap

Q61281      DGAWCAEDDSQIQWIEVDIRRTFTFTGVIHQGDSSIHDDFVTFEFGVSHDSQITWVWT
Q88442
Q14113
Q54860
AL035460_GENS CAN_predicted_pap

Q61281      NGYEEMTFGRVDKDTVLSELPEDVVAARFIRIYPLTWNPSLCMELEVLGCPMVE
Q88442
Q14113
Q54860
AL035460_GENS CAN_predicted_pap

Q61281      VYSYVAQHEWVITDLDFFNHSYKMRQLMVAHEECPITITVSLGSSRGLKIYAMEI
Q88442
Q14113
Q54860
AL035460_GENS CAN_predicted_pap

Q61281      SDIPGHEHGEPEFEYTAGHGENEVLGRELLELLQVYLCQEVYRGNPVEVQVQDTRIMH
Q88442
Q14113
Q54860
AL035460_GENS CAN_predicted_pap

Q61281      WPSLHPDGYEVAAGMGSEFGNVALGLWTEEGFDIFEDFDLHNSVLWAFEGHNDYVNF
Q88442
Q14113
Q54860
AL035460_GENS CAN_predicted_pap

Q61281      NNLPFPERVYSPDATVSTEVAAIISWMEKHPFVLGAILNGGEEVSYVDIARTPDEQI
Q88442
Q14113
Q54860
AL035460_GENS CAN_predicted_pap

Q61281      LAGNLAARGEDDGVSEADETDHAIFRWLAISEASAHITMTEPVRGCGAQDVISGME
Q88442
Q14113
Q54860
AL035460_GENS CAN_predicted_pap

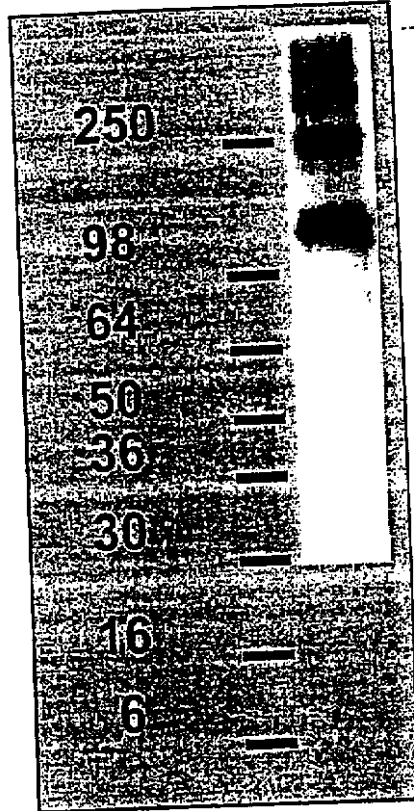
```



【図5】

293細胞により分泌されたhAL035460A 72hの  
ウェスタンブロット SDS-PAGE

TRADOCs:1385945.1(TP#H01!.DOC)



【図6】

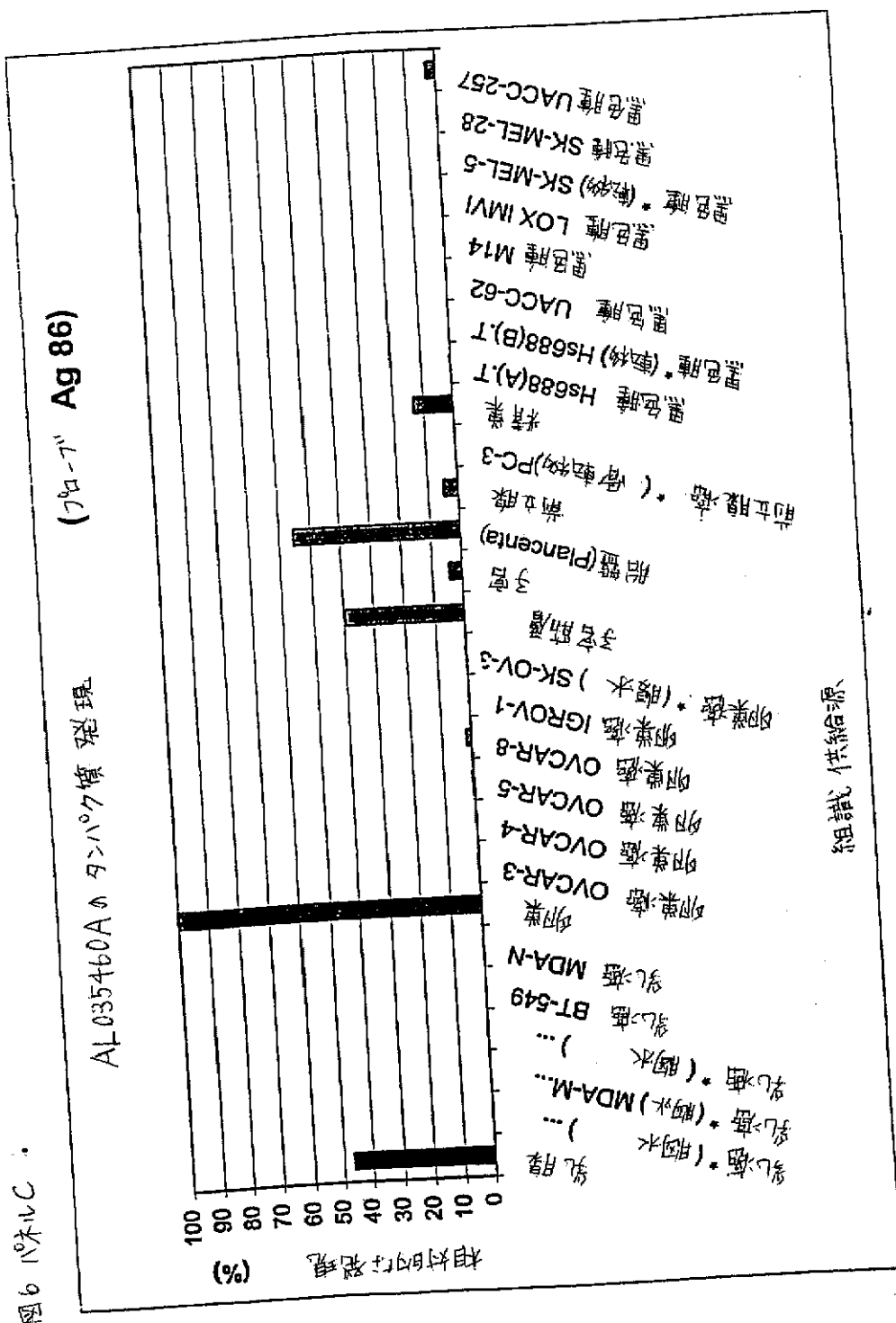
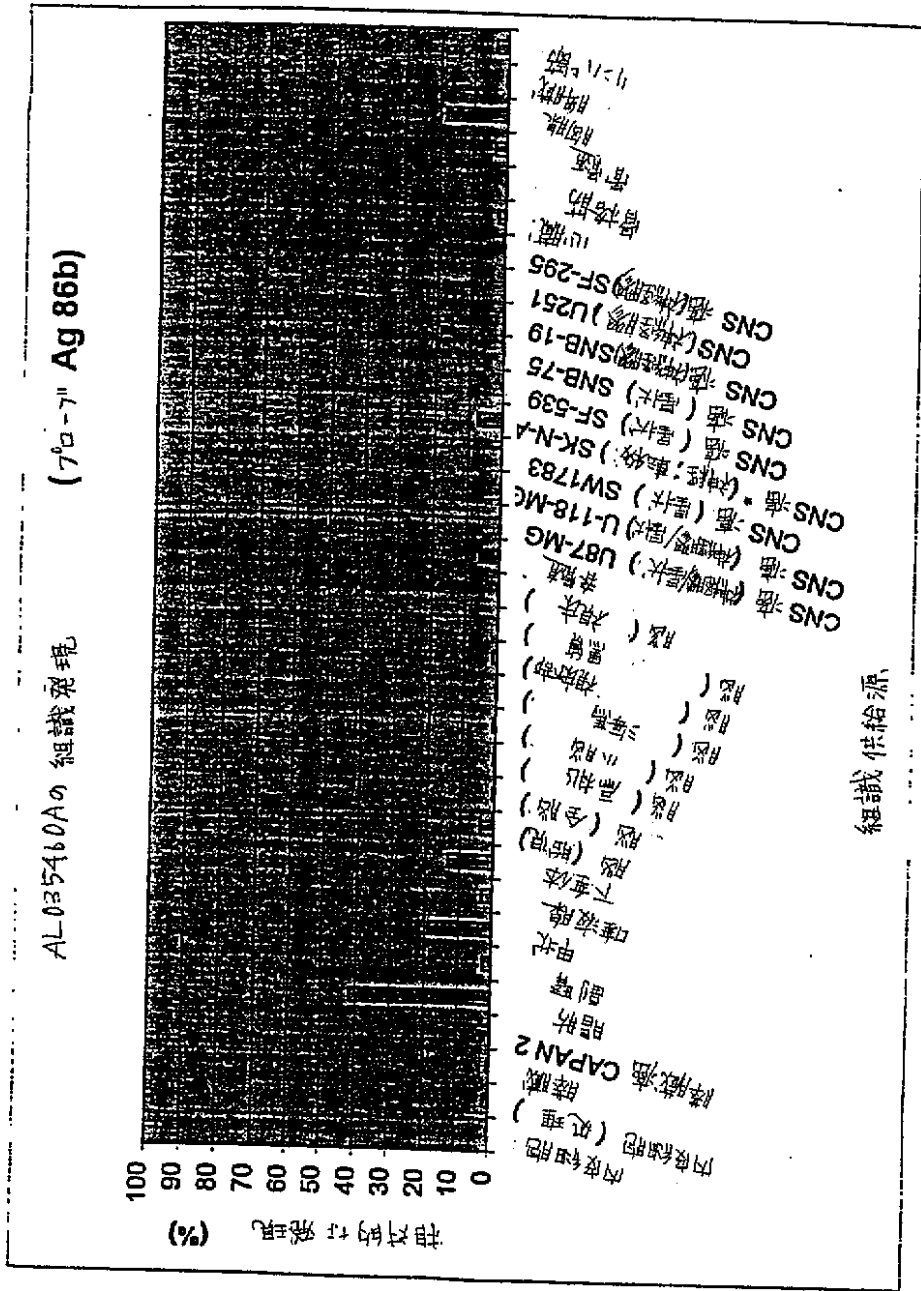


図6 NALC

【図7】

DRAFT REGULAR APPLICATION Cura 81

図7. ハロセルA.

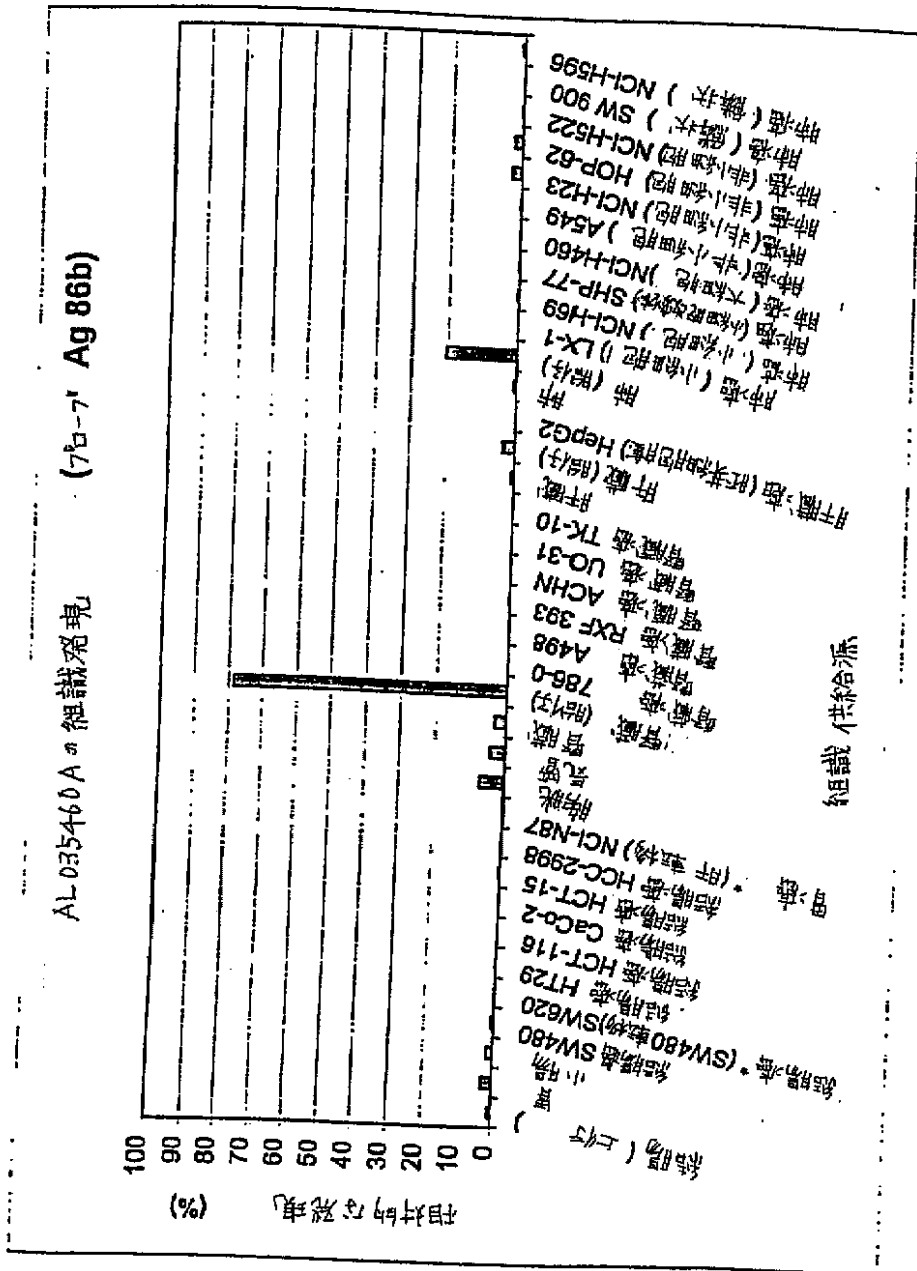


【図7】

〔図7の続き〕①

DRAFT REGULAR APPLICATION Cura 81

図7. パネルB



【図7】

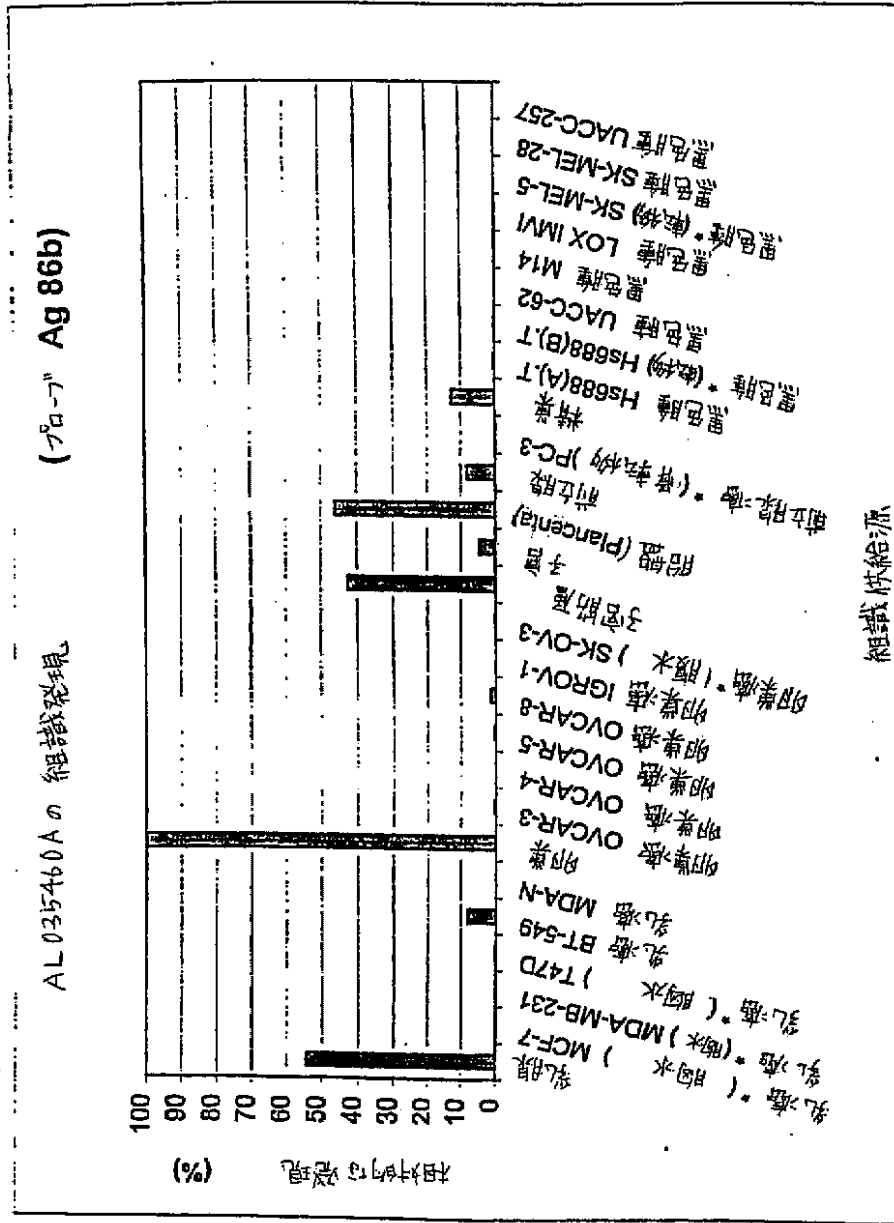
〔図7〕の続き②

DRAFT REGULAR APPLICATION CURT 81

図7.10.10.10.10

TRADOC:1337388.1(SNX\_01.DOC)

AL035460Aの組織発現 (プロト Ag 86b)



組織発現

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No PCT/US 00/28364					
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/57 C12N9/48 C12N5/10 C07K16/40 C12N15/11 C12Q1/37 C12Q1/68 A61K38/48 A61K31/70 A61K39/395 A01K67/027 C12N15/00					
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) IPC 7 C12N C12Q A61K A01K C07K					
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBL, BIOSIS, STRAND, WPI Data					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	WO 98 39446 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 11 September 1998 (1998-09-11) page 12 -page 13 SEQ ID NO 17, 140, 84 and 207 claims				1-42
X	LEI YINGHONG ET AL: "Identification of mouse CPX-1, a novel member of the metallocarboxypeptidase gene family with highest similarity to CPX-2." DNA AND CELL BIOLOGY, vol. 18, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 175-185, XP002172642 ISSN: 1044-5498 the whole document				1-20,22
-/--					
<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			"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 document 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 23 July 2001			Date of mailing of the international search report 26.07.01		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer Van der Schaal, C		

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/28364
-------------------------------------------------

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS [Online]            BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,            PHILADELPHIA, PA, US;            October 1998 (1998-10)            XIN XIAONAN ET AL: "Identification of            mouse CPX-2, a novel member of the            metalloproteinase gene family: cDNA            cloning, mRNA distribution, and protein            expression and characterization."            Database accession no. PREV199900008285            XP002172643            abstract            &amp; DNA AND CELL BIOLOGY,            vol. 17, no. 10, October 1998 (1998-10),            pages 897-909,            ISSN: 1044-5498</p>	1-20,22
P,X	<p>---            DATABASE EMBL [Online]            Accession no Q9NUB5, Sequence ID Q9NUB5,            1 October 2000 (2000-10-01)            SMITH M: "Ortholog of mouse            metalloproteinase"            XP002172644            abstract</p>	1-20,22
P,X	<p>---            WO 00 58473 A (CURAGEN CORP ;LEACH MARTIN            (US); SHIMKETS RICHARD A (US))            5 October 2000 (2000-10-05)            SEQ ID NO 3727            claims</p>	1-42
E	<p>---            WO 01 10903 A (INCYTE GENOMICS INC            ;AZIMZAI YALDA (US); YUE HENRY (US);            BANDMAN O) 15 February 2001 (2001-02-15)            SEQ ID NO 27 and 54            claims</p>	1-42
E	<p>---            EP 1 067 182 A (HELIX RES INST)            10 January 2001 (2001-01-10)            SEQ ID NO 253, 254, 335, 336, 492 and 506            claims</p> <p>-----</p>	1-17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 00/28364**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.  Claims Nos.:  
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:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## Continuation of Box I.1

Although claims 23-28 42 are directed to a method of treatment of the human/animal body, and although claims 38 and 39 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No  
PCT/US 00/28364

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9839446 A	11-09-1998	AU 6545398 A	22-09-1998
		EP 0972029 A	19-01-2000
		EP 0972030 A	19-01-2000
		WO 9839448 A	11-09-1998
WO 0058473 A	05-10-2000	AU 3774500 A	16-10-2000
WO 0110903 A	15-02-2001	AU 6536200 A	05-03-2001
EP 1067182 A	10-01-2001	AU 5849300 A	30-01-2001
		AU 5849400 A	30-01-2001
		AU 5849500 A	30-01-2001
		AU 5850500 A	30-01-2001
		WO 0104312 A	18-01-2001
		WO 0104299 A	18-01-2001
		WO 0104300 A	18-01-2001
		WO 0104301 A	18-01-2001

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 K 39/395		A 6 1 P 9/00	4 B 0 6 5
48/00		9/10	1 0 1 4 C 0 8 4
A 6 1 P 9/00		9/12	4 C 0 8 5
9/10	1 0 1	35/00	4 C 0 8 6
9/12		C 0 7 K 16/40	4 C 0 8 7
35/00		C 1 2 N 1/02	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/40		1/15	
C 1 2 N 1/02		1/19	
1/15		1/21	
1/19		9/64	Z
1/21		C 1 2 Q 1/02	
5/10		1/68	A
9/64		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02		33/50	Z
1/68		33/53	D
G 0 1 N 33/15			M
33/50		33/566	
33/53		C 1 2 P 21/08	
33/566		C 1 2 N 15/00	Z N A A
// C 1 2 P 21/08		5/00	A
(31)優先権主張番号	6 0 / 2 2 4 , 0 8 6	A 6 1 K 37/02	
(32)優先日	平成12年8月9日(2000.8.9)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(31)優先権主張番号	0 9 / 6 4 1 , 7 4 1		
(32)優先日	平成12年8月18日(2000.8.18)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		

Fターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12  
DA13 DA14 DA36 FB02 FB03  
4B024 AA01 AA11 BA14 CA04 DA02  
EA04 GA11 HA12  
4B050 CC03 DD11 LL01 LL03  
4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ42 QQ52  
QR55 QR59 QR62 QR77 QR80  
QS24 QS25 QS28 QS34  
4B064 AG27 CA19 CA20 CC24 CE12  
DA01 DA13  
4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14  
CA33 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA35  
CA53 CA56 CA59 DC22 MA52  
MA55 MA66 NA14 ZA361  
ZA421 ZA451 ZB261 ZC781  
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 CC05  
DD22 DD23 DD86 EE01 EE06  
FF24  
4C086 AA01 AA03 EA16 MA04 MA52  
MA55 MA66 NA14 ZA36 ZA42  
ZA45 ZB26 ZC78  
4C087 AA01 AA03 BB65 BC83 MA52  
MA55 MA66 NA14 ZA36 ZA42  
ZA45 ZB26  
4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 DA89  
EA20 EA50 FA71 FA72 FA74  
GA26

专利名称(译)	主动脉羧肽酶样蛋白和编码相同的核酸		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003511076A</a>	公开(公告)日	2003-03-25
申请号	JP2001530493	申请日	2000-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	CURAGEN CORP		
申请(专利权)人(译)	Kyurajen公司		
[标]发明人	クインケリーイー		
发明人	クイン, ケリー イー.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/711 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/40 C12N1/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/48 C12N9/64 C12N15/09 C12N15/57 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/47 A01K2217/05 A61K38/00 A61K39/00 A61K48/00 C12N9/48		
FI分类号	A61K31/711 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P9/00 A61P9/10.101 A61P9/12 A61P35/00 C07K16/40 C12N1/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/64.Z C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/CA33 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA35 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/DC22 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA361 4C084/ZA421 4C084/ZA451 4C084/ZB261 4C084/ZC781 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/CC05 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/DD86 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF24 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA04 4C086/MA52 4C086/MA55 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA36 4C086/ZA42 4C086/ZA45 4C086/ZB26 4C086/ZC78 4C087/AA01 4C087/AA03 4C087/BB65 4C087/BC83 4C087/MA52 4C087/MA55 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZA36 4C087/ZA42 4C087/ZA45 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	60/159613 1999-10-14 US 60/175534 2000-01-11 US 60/224086 2000-08-09 US 09/641741 2000-08-18 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

公开了编码与主动脉羧肽酶相关的多肽的核酸，由这些核酸编码的多肽以及使用这些核酸和多肽的方法。在一实施方案中，ACPLX蛋白具有SEQ ID NO：2所示的氨基酸序列。在其他实施方案中，ACPLX蛋白与SEQ ID NO：2基本上同源，并且由于天然等位基因变体或诱变而在氨基酸序列上不同，如下文详细讨论的。，保留SEQ ID NO：2蛋白质的功能活性。

遺伝子番号	Total	ジスロイジン	Ca	1 <sup>st</sup> CP	2 <sup>nd</sup> CP	Zn
Hu_CBPA	POOR					
Hu_CBPA2	POOR					
Hu_CBPB	POOR					
Hu_CBPB2 (U)	POOR					
Hu_CBPB (E)	50%	5%	77%	74%	67%	Y
Hu_CBPM	POOR	0%	46%	66%	59%	Y
Hu_CBPD	POOR	12%	77%	54%	43%	Y
Hu_CBPN	POOR	16%	15%	74%	62%	N
Hu_CBPZ	POOR	13%	69%	54%	48%	Y
Hu_AEBP1	53%	52%	92%	71%	54%	N
Hu_ACPLX(sgm1)	53%	51%	92%	71%	54%	N
Ms_AEBP1	54%	40%	85%	70%	54%	N
Ms_ACPLX	54%	53%	85%	70%	48%	N
Ms_CPX2	58%	58%	85%	71%	57%	N
Ms_CPX1	86%	87%	92%	95%	91%	Y
Ms_CBPB (E)	POOR	5%	77%	74%	65%	Y