(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号

特表2008-508889

(P2008-508889A)

(43)公表日　平成20年3月27日(2008.3.27)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G045
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B024
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B063
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4B064
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	A	4B065

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 52 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-525127 (P2007-525127)
(86)(22)出願日　平成17年8月9日 (2005.8.9)
(85)翻訳文提出日　平成19年4月6日 (2007.4.6)
(86)国際出願番号　PCT/AU2005/001188
(87)国際公開番号　WO2006/015426
(87)国際公開日　平成18年2月16日 (2006.2.16)
(31)優先権主張番号　2004904441
(32)優先日　平成16年8月9日 (2004.8.9)
(33)優先権主張国　オーストラリア(AU)
(31)優先権主張番号　2005902344
(32)優先日　平成17年5月10日 (2005.5.10)
(33)優先権主張国　オーストラリア(AU)

(71)出願人　502386053
バイオノミックス　リミテッド
オーストラリア，　サウス　オーストラリア　５０３１，　セバルトン，　ダルグレイッシュ　ストリート　３１
(74)代理人　100103816
弁理士　風早　信昭
(74)代理人　100120927
弁理士　浅野　典子
(72)発明者　クレミディオティス，　ガブリエル
オーストラリア，　サウス　オーストラリア　５１５９，　フラッグスタッフ　ヒル，　スタート　アプローチ　４９

最終頁に続く

(54)【発明の名称】血管新生関連分子および治療のための組成物および方法

(57)【要約】
ＲＮＡ干渉によって血管新生関連遺伝子の発現を調節する、短い干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子が記載される。前記ｓｉＲＮＡ分子を含む短いヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）分子もまた記載される。これらの分子は、全てまたは特定の遺伝子のイソ型を標的とし得る。血管新生関連障害の治療および診断のための、これらの分子および遺伝子のイソ型の使用もまた記載される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＢＮＯ６９遺伝子から転写されたｍＲＮＡのセグメントの相補体を含む短い干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子であって、前記ｓｉＲＮＡ分子はＲＮＡ干渉によってＢＮＯ６９の発現を調節するｓｉＲＮＡ分子。
【請求項２】
ＢＮＯ６９遺伝子は、配列番号８に示される配列を含む単離された核酸分子によってコードされる請求項１に記載のｓｉＲＮＡ分子。
【請求項３】
ＢＮＯ６９遺伝子は、配列番号１０，１２，１４または１６の１つに示される配列を含む単離された核酸分子によってコードされる請求項１に記載のｓｉＲＮＡ分子。
【請求項４】
配列番号３を含む請求項１～３のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ分子。
【請求項５】
配列番号４を含む請求項１または２に記載のｓｉＲＮＡ分子。
【請求項６】
請求項１に記載のｓｉＲＮＡ分子を含む短いヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）分子。
【請求項７】
リンカー配列およびｓｉＲＮＡ分子の逆向き相補体である配列をさらに含む請求項６に記載のｓｈＲＮＡ分子。
【請求項８】
リンカー配列は、配列番号５に示されるヌクレオチド配列である請求項７に記載のｓｈＲＮＡ分子。
【請求項９】
ＢＮＯ６９遺伝子は、配列番号８に示される配列を含む単離された核酸分子によってコードされる請求項６～８のいずれか一項に記載のｓｈＲＮＡ分子。
【請求項１０】
ＢＮＯ６９遺伝子は、配列番号１０，１２，１４または１６の１つに示される配列を含む単離された核酸分子によってコードされる請求項６～８のいずれか一項に記載のｓｈＲＮＡ分子。
【請求項１１】
配列番号６を含む請求項６～１０のいずれか一項に記載のｓｈＲＮＡ分子。
【請求項１２】
配列番号７を含む請求項６～９のいずれか一項に記載のｓｈＲＮＡ分子。
【請求項１３】
配列番号１または２に示される配列を含む核酸分子。
【請求項１４】
以下のものの一つ以上を含むベクター：
（ａ）請求項１～５のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ分子；
（ｂ）請求項６～１２のいずれか一項に記載のｓｈＲＮＡ分子；または
（ｃ）請求項１３に記載の核酸分子。
【請求項１５】
以下のものの一つ以上、および医薬的に許容され得るキャリアを含む医薬組成物：
（ａ）請求項１～５のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ分子；
（ｂ）請求項６～１２のいずれか一項に記載のｓｈＲＮＡ分子；
（ｃ）請求項１３に記載の核酸分子；または
（ｄ）請求項１４に記載のベクター。
【請求項１６】
ＢＮＯ６９またはその代替的スプライシングイソ型またはその変異体の発現を調節する方法であって、以下の一つ以上のものの有効量を対象に投与することを含む方法：

（ａ）請求項１～５のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ分子；
（ｂ）請求項６～１２のいずれか一項に記載のｓｈＲＮＡ分子；
（ｃ）請求項１３に記載の核酸分子；または
（ｄ）請求項１４に記載のベクター。
【請求項１７】
ｓｉＲＮＡまたはｓｈＲＮＡは送達試薬と共に投与される請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
血管新生に関連した障害を治療する方法であって、以下の一つ以上のものの有効量を対象に投与することを含む方法：
（ａ）請求項１～５のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ分子；
（ｂ）請求項６～１２のいずれか一項に記載のｓｈＲＮＡ分子；
（ｃ）請求項１３に記載の核酸分子；または
（ｄ）請求項１４に記載のベクター。
【請求項１９】
ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、核酸分子またはベクターは以下のものの少なくとも１つとの組合せで対象に投与される請求項１８に記載の方法：
（ａ）血管新生に関連した障害を治療するための医薬剤；または
（ｂ）血管新生に関連した障害を治療するための別の治療方法。
【請求項２０】
障害は、ガン；関節炎を含む炎症性障害；黄斑変性および糖尿病網膜症を含む角膜、網膜または脈絡膜での血管新生；乾癬；心臓血管疾患からなる群から選択される請求項１８または１９に記載の方法。
【請求項２１】
血管新生に関連した障害の治療のための医薬品の製造における、（ａ）請求項１～５のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ、（ｂ）請求項６～１２のいずれか一項に記載のｓｈＲＮＡ、（ｃ）請求項１３に記載の核酸分子、または（ｄ）請求項１４に記載のベクターの使用。
【請求項２２】
障害は、ガン；関節炎を含む炎症性障害；黄斑変性および糖尿病網膜症を含む角膜、網膜または脈絡膜での血管新生；乾癬；心臓血管疾患からなる群から選択される請求項２１に記載の使用。
【請求項２３】
配列番号８、配列番号１２、配列番号１４または配列番号１６のいずれか１つに示される配列を含む単離された核酸分子。
【請求項２４】
配列番号８、配列番号１２、配列番号１４または配列番号１６のいずれか１つに示される配列、あるいは、そのフラグメントを含み、血管新生プロセスにおいて役割を果たすポリペプチドをコードする単離された核酸分子。
【請求項２５】
配列番号８、配列番号１２、配列番号１４または配列番号１６のいずれか１つに示される配列を含む核酸分子に対して少なくとも７０％同一であり、かつ、血管新生プロセスにおいて役割を果たすポリペプチドをコードする単離された核酸分子。
【請求項２６】
少なくとも８５％同一である請求項２５に記載の単離された核酸分子。
【請求項２７】
少なくとも９５％同一である請求項２５に記載の単離された核酸分子。
【請求項２８】
血管新生プロセスにおいて役割を果たすポリペプチドをコードし、かつ、配列番号８，１２，１４または１６のいずれか１つに示されるヌクレオチド配列を含む核酸分子とストリンジェントな条件のもとでハイブリダイズする単離された核酸分子。

【請求項２９】
ガン；関節炎を含む炎症性障害；黄斑変性および糖尿病網膜症を含む角膜、網膜または脈絡膜での血管新生；乾癬；心臓血管疾患を含むがこれらに限定されない血管新生プロセスに関連した疾患において役割を果たすペプチドをコードする請求項２３～２８のいずれか一項に記載の単離された核酸分子。
【請求項３０】
配列番号８、配列番号１２、配列番号１４または配列番号１６に示されるヌクレオチド配列のいずれか１つからなる単離された核酸分子。
【請求項３１】
配列番号９、配列番号１３、配列番号１５または配列番号１７のいずれか１つに示される配列を含む単離されたポリペプチド。
【請求項３２】
配列番号９、配列番号１３、配列番号１５または配列番号１７のいずれか１つに示される配列、あるいは、血管新生プロセスにおいて役割を果たすそのフラグメントを含む単離されたポリペプチド。
【請求項３３】
血管新生プロセスにおいて役割を果たし、かつ、配列番号９、配列番号１３、配列番号１５または配列番号１７に示されるアミノ酸配列と少なくとも７０％の同一性を有する単離されたポリペプチド。
【請求項３４】
少なくとも８５％の配列同一性を有する請求項３３に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項３５】
少なくとも９５％の配列同一性を有する請求項３３に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項３６】
ガン；関節炎を含む炎症性障害；黄斑変性および糖尿病網膜症を含む角膜、網膜または脈絡膜での血管新生；乾癬；心臓血管疾患を含むがこれらに限定されない血管新生プロセスに関連した疾患において役割を果たす請求項３０～３４のいずれか一項に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項３７】
配列番号９、配列番号１３、配列番号１５または配列番号１７に示されるアミノ酸配列のいずれか１つからなる単離されたポリペプチド。
【請求項３８】
請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子を含む発現ベクター。
【請求項３９】
請求項３８に記載の発現ベクターを含む細胞。
【請求項４０】
以下のステップを含むポリペプチドの調製方法：
（ａ）ポリペプチドを産生させるために効果的な条件のもとで請求項３９に記載の細胞を培養し；そして
（ｂ）ポリペプチドを集める。
【請求項４１】
請求項３９に記載の方法によって調製されるポリペプチド。
【請求項４２】
細胞中でポリペプチドの発現または活性を調節することを含む血管新生の調節方法であって、ポリペプチドが請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子によってコードされるか、または請求項３１～３７もしくは請求項４１のいずれか一項に記載のポリペプチドであるか、またはそれらの活性フラグメントである方法。
【請求項４３】
ポリペプチドの発現または活性は以下のものの一つ以上を細胞中に導入することによって調節される請求項４１に記載の方法：

（ａ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子のアンタゴニストまたはアゴニスト；
（ｂ）請求項３１～３７もしくは請求項４１のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドのアンタゴニストまたはアゴニスト；
（ｃ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子に対してアンチセンスである核酸；
（ｄ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子の少なくとも一部分の相補体であり、かつ、前記核酸分子の発現またはレベルを調節することができる核酸分子；
（ｅ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子、またはその活性フラグメントもしくは変異体；
（ｆ）請求項３１～３７もしくは請求項４１のいずれか一項に記載のポリペプチド；または
（ｇ）前記ポリペプチドに特異的に結合することができる抗体。

【請求項４４】

核酸分子相補体が以下の１つ以上のものから選択される請求項４３に記載の方法：
（ａ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子によってコードされるｍＲＮＡとハイブリダイズするＲＮＡ分子；
（ｂ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子によってコードされるｍＲＮＡとハイブリダイズする短い干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）；または
（ｃ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子に対して標的化された触媒作用核酸分子。

【請求項４５】

対象におけるポリペプチドの発現または活性を調節することを含む、対象における血管新生に関連する障害の治療方法であって、ポリペプチドが請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子によってコードされるか、または請求項３１～３７もしくは請求項４１のいずれか一項に記載のポリペプチドであるか、またはそれらの活性フラグメントである方法。

【請求項４６】

ポリペプチドの発現または活性は以下のものの一つ以上を対象中に導入することによって調節される請求項４５に記載の方法：
（ａ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子のアンタゴニストまたはアゴニスト；
（ｂ）請求項３１～３７もしくは請求項４１のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドのアンタゴニストまたはアゴニスト；
（ｃ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子に対してアンチセンスである核酸；
（ｄ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子の少なくとも一部分の相補体であり、かつ、前記核酸分子の発現またはレベルを調節することができる核酸分子；
（ｅ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子、またはその活性フラグメントもしくは変異体；
（ｆ）請求項３１～３７もしくは請求項４１のいずれか一項に記載のポリペプチド；または
（ｇ）前記ポリペプチドに特異的に結合することができる抗体。

【請求項４７】

核酸分子相補体が以下の１つ以上のものから選択される請求項４６に記載の方法：
（ａ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子によってコードされるｍＲＮＡとハイブリダイズするＲＮＡ分子；
（ｂ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子によってコードされるｍＲＮＡとハイブリダイズする短い干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）；または
（ｃ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子に対して標的化された触媒作用

核酸分子。
【請求項４８】
以下のものの少なくとも１つを前記対象に投与することをさらに含む請求項４５～４７のいずれか一項に記載の方法：
（ａ）血管新生に関連した障害を治療するための医薬剤；または
（ｂ）血管新生に関連した障害を治療するための別の治療方法。
【請求項４９】
血管新生に関連する障害は、ガン；関節炎を含む炎症性障害；黄斑変性および糖尿病網膜症を含む角膜、網膜または脈絡膜での血管新生；乾癬；心臓血管疾患からなる群から選択される請求項４２～４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０】
対象における血管新生に関連した障害の治療のための医薬品の製造における、請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子によってコードされるポリペプチド、または請求項３１～３７もしくは請求項４１のいずれか一項に記載のポリペプチド、またはそれらの活性フラグメントの発現または活性の調節剤の使用。
【請求項５１】
ポリペプチドの発現または活性は以下のものの一つ以上を対象中に導入することによって調節される請求項５０に記載の使用：
（ａ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子のアンタゴニストまたはアゴニスト；
（ｂ）請求項３１～３７もしくは請求項４１のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドのアンタゴニストまたはアゴニスト；
（ｃ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子に対してアンチセンスである核酸；
（ｄ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子の少なくとも一部分の相補体であり、かつ、前記核酸分子の発現またはレベルを調節することができる核酸分子；
（ｅ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子、またはその活性フラグメントもしくは変異体；
（ｆ）請求項３１～３７もしくは請求項４１のいずれか一項に記載のポリペプチド；または
（ｇ）前記ポリペプチドに特異的に結合することができる抗体。
【請求項５２】
核酸分子相補体が以下の１つ以上のものから選択される請求項５１に記載の使用：
（ａ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子によってコードされるｍＲＮＡとハイブリダイズするＲＮＡ分子；
（ｂ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子によってコードされるｍＲＮＡとハイブリダイズする短い干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）；または
（ｃ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子に対して標的化された触媒作用核酸分子。
【請求項５３】
障害は、ガン；関節炎を含む炎症性障害；黄斑変性および糖尿病網膜症を含む角膜、網膜または脈絡膜での血管新生；乾癬；心臓血管疾患からなる群から選択される請求項５０～５２のいずれか一項に記載の使用。
【請求項５４】
血管新生に関連した障害の治療のための候補医薬品化合物のスクリーニングのための、請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子、または請求項３１～３７もしくは請求項４１のいずれか一項に記載のポリペプチド、またはそれらの活性フラグメントの使用。
【請求項５５】
血管新生に関連した障害の治療のための候補医薬品化合物のスクリーニングのための、

請求項３９に記載の細胞の使用。
【請求項５６】
障害は、ガン；関節炎を含む炎症性障害；黄斑変性および糖尿病網膜症を含む角膜、網膜または脈絡膜での血管新生；乾癬；心臓血管疾患からなる群から選択される請求項５４または５５に記載の使用。
【請求項５７】
以下のステップを含む、血管新生に関連した障害の治療のための候補医薬品化合物のスクリーニング方法：
（ａ）請求項３１～３７もしくは請求項４１のいずれか一項に記載のポリペプチド、またはそれらの活性フラグメントを準備する；
（ｂ）前記ポリペプチドに候補医薬品化合物を添加する；そして
（ｃ）前記ポリペプチドへの前記候補医薬品化合物の結合を測定する；
ここで、前記ポリペプチドに結合する化合物は候補医薬品化合物である。
【請求項５８】
以下のステップを含む、血管新生に関連した障害の治療のための候補医薬品化合物のスクリーニング方法：
（ａ）請求項３９に記載の細胞を準備する；
（ｂ）前記細胞に候補医薬品化合物を添加する；そして
（ｃ）前記細胞の機能的特性に対する前記候補医薬品化合物の影響を測定する；
ここで、前記細胞の機能的特性を変化させる化合物は候補医薬品化合物である。
【請求項５９】
以下のステップを含む、血管新生に関連した障害の治療のための候補医薬品化合物のスクリーニング方法：
（ａ）請求項３９に記載の細胞を準備する；
（ｂ）前記細胞に候補医薬品化合物を添加する；そして
（ｃ）前記細胞中の発現ベクターの一部である核酸分子の発現に対する前記候補医薬品化合物の影響を測定する；
ここで、前記細胞中の発現ベクターの一部である核酸分子の発現を変化させる化合物は候補医薬品化合物である。
【請求項６０】
以下のステップを含む、血管新生に関連した障害の治療のための候補医薬品化合物のスクリーニング方法：
（ａ）請求項３９に記載の細胞を準備する；
（ｂ）前記細胞に候補医薬品化合物を添加する；そして
（ｃ）前記細胞中の発現ベクターの一部である核酸分子によってコードされるポリペプチドの発現または活性に対する前記候補医薬品化合物の影響を測定する；
ここで、前記細胞中の発現ベクターの一部である核酸分子によってコードされるポリペプチドの発現または活性を変化させる化合物は候補医薬品化合物である。
【請求項６１】
障害は、ガン；関節炎を含む炎症性障害；黄斑変性および糖尿病網膜症を含む角膜、網膜または脈絡膜での血管新生；乾癬；心臓血管疾患からなる群から選択される請求項５７～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２】
請求項３１～３７もしくは請求項４１のいずれか一項に記載の単離されたポリペプチド、またはそれらの活性フラグメントと特異的に免疫学的に反応する抗体。
【請求項６３】
請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子に対して標的化された触媒作用核酸分子。
【請求項６４】
血管新生に関連した障害の診断または予後における、請求項２３～３０のいずれか一項

に記載の核酸分子の使用。
【請求項６５】
血管新生に関連した障害の診断または予後における、請求項３１～３７もしくは請求項４１のいずれか一項に記載のポリペプチド、またはそれらの活性フラグメントの使用。
【請求項６６】
血管新生に関連した障害の診断または予後における、請求項６２に記載の抗体の使用。
【請求項６７】
障害は、ガン；関節炎を含む炎症性障害；黄斑変性および糖尿病網膜症を含む角膜、網膜または脈絡膜での血管新生；乾癬；心臓血管疾患からなる群から選択される請求項６４～６６のいずれか一項に記載の使用。
【請求項６８】
以下のステップを含む、血管新生に関連した障害の診断または予後方法：
（ａ）影響を受けていない対象において、請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子の正常な発現および／または活性についてのプロフィールを確立する；
（ｂ）ＢＮＯ６９の異常な発現および／または活性が疑われるヒトにおいて前記核酸分子の発現および／または活性のレベルを測定する；そして
（ｃ）前記核酸分子の測定された発現および／または活性のレベルを正常な発現および／または活性についてのプロフィールと比較する；
ここで、前記対象における前記核酸分子の発現および／または活性の変化されたレベルは、血管新生に関連した障害の徴候またはそれに対する素因である。
【請求項６９】
ＢＮＯ６９遺伝子またはそのフラグメントから由来するプローブを使用するハイブリダイゼーションアッセイが発現のレベルを測定するために使用される請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
以下のステップを含む、血管新生に関連した障害の診断または予後方法：
（ａ）請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子に対応するＤＮＡを対象から得る；そして
（ｂ）前記対象からのＤＮＡを、対応する野生型核酸分子のＤＮＡと比較する；
ここで、前記対象における変化されたＤＮＡ特性は、血管新生に関連した障害の徴候またはそれに対する素因である。
【請求項７１】
以下のステップを含む、血管新生に関連した障害の診断または予後方法：
（ａ）請求項３１～３７もしくは請求項４１のいずれか一項に記載の野生型ポリペプチドの物理的特性を確立する；
（ｂ）そのポリペプチドの異常性が疑われるヒトからポリペプチドを得る；そして
（ｃ）前記ヒトによって発現されるポリペプチドについて特性を測定し、それを野生型ポリペプチドについての確立された特性と比較する；
ここで、前記対象における変化されたポリペプチド特性は、血管新生に関連した障害の徴候またはそれに対する素因である。
【請求項７２】
障害は、ガン；関節炎を含む炎症性障害；黄斑変性および糖尿病網膜症を含む角膜、網膜または脈絡膜での血管新生；乾癬；心臓血管疾患からなる群から選択される請求項６８～７１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７３】
請求項２３～３０のいずれか一項に記載の単離された核酸分子を含む、遺伝的に改変された非ヒト動物。
【請求項７４】
請求項２３～３０のいずれか一項に記載の核酸分子の破壊を含む、遺伝的に改変された非ヒト動物。

【請求項７５】
血管新生に関連した障害の治療のために有用な候補医薬品化合物のスクリーニングにおける請求項７３または７４に記載の遺伝的に改変された非ヒト動物の使用。
【請求項７６】
障害は、ガン；関節炎を含む炎症性障害；黄斑変性および糖尿病網膜症を含む角膜、網膜または脈絡膜での血管新生；乾癬；心臓血管疾患からなる群から選択される請求項７５に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、血管新生プロセスに関与する単離された核酸分子、および、そのコードされるポリペプチドに関連する。血管新生におけるそれらの関与を考慮して、本発明はまた、血管新生に関連した障害の治療、前血管新生活性および抗血管新生活性についての化合物のスクリーニング、ならびに、血管新生に関連した障害の診断および予後に関する。本発明はまた、本発明の核酸分子に対して標的化されるｓｉＲＮＡ分子、および、血管新生に関連した障害の治療における治療的適用のためのその使用に関連する。
【背景技術】
【０００２】
数多くの先行技術刊行物が、背景情報を記載するために本明細書中では参照されるが、この参照は、これらの文書のいずれかが、オーストラリアまたは任意の他の国において、当該技術での共通する一般的な知識の一部を形成するということを認めるものではないことが明らかに理解される。そのような参考文献の議論では、それらの著者が主張することが述べられており、また、本出願人らは、引用された文書の正確性および妥当性に異議を申し立てる権利を留保する。
【０００３】
血管新生、すなわち、既存の血管からの新しい血管の形成は、胚形成、創傷治癒、腫瘍の成長および転移をはじめとする多くの生理学的プロセスおよび病理学的プロセスにおいて重要な役割を果たしている（Ａｕｇｕｓｔｉｎ、１９９８；Ｈａｎａｈａｎ、１９９７）。従って、血管新生プロセスは、治療的介入のための優れた標的であると見なされている。重要な調節分子の特定では、内皮細胞（ＥＣ）が細胞外マトリックス（ＥＣＭ）成分（例えば、コラーゲン、フィブリノーゲンまたはフィブロネクチンなど）上で培養されるインビトロモデルが、血管新生の要素ではあるが、血管新生について特異的ではない様々な事象（例えば、遊走または増殖など）に関与する標的の特定とともに、主として使用されている。しかしながら、これらの研究における１つの問題は、アッセイが一般には、平坦な環境、すなわち、二次元（２Ｄ）環境で行われ、これに対して、毛細管を形成するためのＥＣの形態形成では、重要な極性誘導の確立を可能にする３Ｄマトリックスが要求されるという事実である。かかる３Ｄアッセイ（アッセイでは、１型コラーゲン、フィブリンまたはマトリゲルのマトリックスが含まれる）の使用では、血管新生における事象の多くが繰り返されており、血管新生における細胞事象および分子的事象の詳細な分析が可能となっている（Ｇａｍｂｌｅ他、１９９３；１９９９；ＢａｙｌｅｓｓおよびＤａｖｉｓ、２００２；Ｍｅｙｅｒ他、１９９７）。血管新生時に変化した遺伝子を明確にするためにこれらのアッセイを使用するデータは、第１に、２Ｄマトリックスに対して３Ｄマトリックスに応答する細胞の間には基本的な違いが存在するという考え、および、第２に、血管新生について特異的な遺伝子が存在し得るという考えを裏付けている。
【０００４】
哺乳動物のＲｈｏファミリーの低分子量ＧＴＰａｓｅが、アクチン細胞骨格の再構成、細胞成長の制御、転写調節および膜輸送をはじめとする多様な細胞機能に関係している（Ｖａｎ　ＡｅｌｓｔおよびＤ’Ｓｏｕｚａ－Ｓｃｈｏｒｅｙ、１９９７）。Ｒｈｏファミリーの低分子量ＧＴＰａｓｅは少なくとも２０のメンバーからなる：Ｒｈｏ（Ａ、Ｂ、Ｃ）、Ｒａｃ（１、２、３）、Ｃｄｃ４２、ＴＣ１０、ＴＣＬ、Ｃｈｐ（１、２）、Ｒｈｏ

Ｇ、Ｒｎｄ（１、２、３）、ＲｈｏＢＴＢ（１、２）、ＲｈｏＤ、ＲｉｆおよびＴＴＦ（Ｅｔｉｅｎｎｅ－ＭａｎｎｅｖｉｌｌｅおよびＨａｌｌ、２００２）。Ｒａｓスーパーファミリーの他のメンバーと同様に、Ｒｈｏタンパク質は、活性なＧＴＰ結合状態と、不活性なＧＤＰ結合状態との間で循環することによって細胞プロセスを制御するための分子スイッチとして作用している。これらのＧＴＰａｓｅの調節は３つの主要なクラスの調節タンパク質を介して生じる。グアニンヌクレオチド交換因子（ＧＥＦ）により、ＧＤＰ－ＧＴＰ交換による活性化が調節され、また、Ｒｈｏタンパク質自体は、何らかの基礎的なＧＴＰａｓｅ活性があるとしてもほとんど活性を示さないので、ＧＴＰａｓｅ活性化タンパク質（ＧＡＰ）により、ＧＤＰ結合状態へのＧＴＰの加水分解が促進され、また、グアニンヌクレオチド解離阻害剤（ＧＤＩ）がタンパク質の不活性なＧＤＰ結合形態を安定化させている（ＭａｃｋａｙおよびＨａｌｌ、１９９８）。これらの調節タンパク質のうちの少なくとも１３４個が現在、明らかにされている（Ｅｔｉｅｎｎｅ－ＭａｎｎｅｖｉｌｌｅおよびＨａｌｌ、２００２）。

【０００５】

現在になって、内皮の形態形成におけるＲｈｏファミリーの機能が解明されつつあり、種々のＲｈｏファミリーメンバーが特定の役割を果たしているようである。ＲｈｏおよびＲａｃは透過性および細胞遊走の調節のために重要である（Ｗｏｊｃｉａｋ－Ｓｔｏｔｈａｒｄ他、２００１；ＮｏｂｅｓおよびＨａｌｌ、１９９９）。Ｒｈｏはまた、ＥＣの付着およびアポトーシスのために重要であり（Ｃｈｒｚａｎｏｗｓｋａ－ＷｏｄｎｉｃｋａおよびＢｕｒｒｉｄｇｅ、１９９６；Ｈｉｐｐｅｎｓｔｉｅｌ他、２００２）、一方、Ｃｄｃ４２およびＲａｃ１が空胞形成およびその後の管腔形成に関係している（ＢａｙｌｅｓｓおよびＤａｖｉｓ、２００２）。ＲｈｏＧＴＰａｓｅの数が限られること、および、ＲｈｏＧＡＰが見かけ上過剰に存在することを考えると、部分的には、ＲｈｏＧＡＰがＲｈｏＧＴＰａｓｅの機能の制御における特異性をもたらし得ることが考えられる。

【発明の開示】

【０００６】

（発明の要約）

血管新生のために不可欠である、ＢＮＯ６９と呼ばれる新規なＲｈｏＧＡＰが、今回、本発明者らの同時係属中の国際特許出願番号ＰＣＴ／ＡＵ０２／０１２８２（その内容は参考として本明細書中に組み込まれる）に記載されるようにクローン化および特徴づけされ、そして、ＢＮＯ６９の阻害のための新規な治療法が考案されている。

【０００７】

拡大しつつある脈管構造を阻害する治療法は、制御されない血管新生関連または高まった血管新生をもたらす血管新生関連障害、あるいは、低下した脈管構造が有益である障害を治療するために望ましい。これらには、ガン；炎症性障害（関節炎を含む）；角膜、網膜または脈絡膜の血管新生（黄斑変性および糖尿病網膜症を含む）；乾癬；心臓血管疾患が含まれるが、これらに限定されない。

【０００８】

この場合、これには、ＢＮＯ６９遺伝子産物の発現および活性を低下させることが伴う。

【０００９】

遺伝子またはタンパク質の機能を阻害することを様々な方法で達成することができる。アンチセンス核酸法は一般には、変化した発現が障害の原因となる遺伝子を不活性化するための１つの方法を表す。具体的には、短い干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子を使用するＲＮＡ干渉。当業者によって理解されるように、ｓｉＲＮＡは、転写されたＲＮＡの特定のセグメントの相補体であり、その結果として、そのセグメントに結合し、そして、結合している状態で、問題としている遺伝子の発現を調節または沈黙させる短いＲＮＡ配列である。

【００１０】

従って、本発明の第１の態様において、ＢＮＯ６９遺伝子から転写されたｍＲＮＡの特

定のセグメントの相補体を含む短い干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子が提供され、この場合、前記ｓｉＲＮＡ分子はＲＮＡ干渉によってＢＮＯ６９の発現を調節する。かかる調節には、ＢＮＯ６９遺伝子の部分的または完全な沈黙化が含まれ得る。ｓｉＲＮＡは、ＢＮＯ６９遺伝子のいずれか１つまたは複数のスプライシングイソ型について、あるいは、その変異体について特異的であり得る。

【００１１】

当業者によって理解されるように、ＢＮＯ６９の発現を調節または沈黙させるために使用されるｓｉＲＮＡ分子は、一本鎖アンチセンス、二本鎖アンチセンス、または、化学的修飾を伴う二本鎖アンチセンスの形態であり得る。

【００１２】

本発明の１つの実施形態において、ｓｉＲＮＡ分子はＢＮＯ６９遺伝子の下記セグメントの相補体を含む：

５’－ＧＴＡＧＴＣＧＴＧＣＣＡＣＣＡＧＴＡＧ－３’（配列番号１）

５’－ＡＧＡＣＴＴＧＧＣＡＴＡＣＴＣＧＣＴＧ－３’（配列番号２）

【００１３】

従って、本発明は、配列番号１または配列番号２の１つに示される配列を含む核酸分子を提供する。

【００１４】

なおさらにさらなる実施形態において、ｓｉＲＮＡ分子は下記配列のいずれかを含む：

５’－ＧＵＡＧＵＣＧＵＧＣＣＡＣＣＡＧＵＡＧ－３’（配列番号３）

５’－ＡＧＡＣＵＵＧＧＣＡＵＡＣＵＣＧＣＵＧ－３’（配列番号４）

【００１５】

さらなる実施形態において、本発明のｓｉＲＮＡ分子は短いヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）分子に組み込まれる。好ましい実施形態において、ｓｈＲＮＡ分子は、ｓｉＲＮＡ分子に対応するヌクレオチド配列、その後に、一般的ヌクレオチドリンカー配列（典型的には、９ヌクレオチドの配列（好都合には、配列番号５によって表されるような配列ＴＴＣＡＡＧＡＧＡを伴う配列））、その後に、ｓｉＲＮＡ分子に対応するヌクレオチド配列の逆向き相補体を含む。宿主細胞のゲノムに組み込まれたとき、ｓｉＲＮＡ分子に対応するヌクレオチド配列は、その逆向き相補体にアニーリングすることによって二本鎖構造を形成する。一般的配列は二本鎖分子の一方の端部においてループを形成する。

【００１６】

１つの実施形態において、ｓｈＲＮＡは下記配列のいずれかを有する：

５’－ＧＡＴＣＣＣＣＧＴＡＧＴＣＧＴＧＣＣＡＣＣＡＧＴＡＧＴＴＣＡＡＧＡＧＡＣＴＡＣＴＧＧＴＧＧＣＡＣＧＡＣＴＡＣＴＴＴＴＴＴＧＧＡＡＡ－３’（配列番号６）

５’－ＧＡＴＣＣＣＣＡＧＡＣＴＴＧＧＣＡＴＡＣＴＣＧＣＴＧＴＴＣＡＡＧＡＧＣＡＧＣＧＡＧＴＡＴＧＣＣＡＡＧＴＣＴＴＴＴＴＴＧＧＡＡＡ－３’（配列番号７）

【００１７】

本発明のｓｉＲＮＡ分子、ｓｈＲＮＡ分子または核酸分子は、ＢＮＯ６９の発現を調節するために使用することができ、あるいは、血管新生に関連した障害、または、低下した脈管構造が有益である障害を治療または防止するために対象に投与することができる。

【００１８】

従って、本発明のさらなる態様において、ＢＮＯ６９またはそのスプライシングイソ型またはその変異体の発現を調節する方法が提供され、この場合、この方法は、ＢＮＯ６９から転写されたｍＲＮＡの特定のセグメントの相補体を含むｓｉＲＮＡ分子、ＢＮＯ６９に対して標的化されるｓｈＲＮＡ分子、または、上記に記載されるような核酸分子の１つまたは複数を対象に投与することを含む。

【００１９】

さらなる態様において、血管新生に関連した障害、または、低下した脈管構造が有益である障害を治療する方法が提供され、この場合、この方法は、ＢＮＯ６９から転写されたｍＲＮＡの特定のセグメントの相補体を含むｓｉＲＮＡ分子、ＢＮＯ６９に対して標的化

されるｓｈＲＮＡ分子、または、上記に記載されるような核酸分子の１つまたは複数を対象に投与することを含む。

【００２０】

本発明のさらなる態様において、血管新生に関連した障害、または、低下した脈管構造が有益である障害を治療するための医薬品の製造における、ＢＮＯ６９から転写されたｍＲＮＡの特定のセグメントの相補体を含むｓｉＲＮＡ分子、ＢＮＯ６９に対して標的化されるｓｈＲＮＡ分子、または、上記に記載されるような核酸分子の１つまたは複数の使用が提供される。

【００２１】

本発明のｓｉＲＮＡ分子、ｓｈＲＮＡ分子または核酸分子は、ＢＮＯ６９またはそのスプライシングイソ型またはその変異体の発現を調節するために使用することができるベクターに、あるいは、血管新生に関連した障害（上記に記載される障害（これらに限定されない）を含む）を治療または防止するために対象に投与することができるベクターにクローン化することができる。

【００２２】

ベクターシステムは、当業者によって理解されるように、起源がプラスミド、コスミドまたはウイルスであり得る。ベクターを細胞または組織に導入するための多くの方法が利用可能であり、これらの方法は、インビボ、インビトロおよびエクスビボでの使用のために同等に好適である。エクスビボ治療のために、ベクターを、患者から採取された幹細胞に導入し、同じ患者に戻す自家移植のためにクローン増殖させることができる。トランスフェクションによる送達、リポソーム注射による送達、または、ポリカチオン性アミノポリマーによる送達を、この分野で広く知られている方法を使用して達成することができる（例えば、Ｇｏｌｄｍａｎ他（１９９７）を参照のこと）。

【００２３】

さらなる態様において、本発明は、本発明のｓｉＲＮＡ分子、ｓｈＲＮＡ分子または核酸分子のいずれかを含むベクターを対象に投与することを含む、ＢＮＯ６９またはそのスプライシングイソ型またはその変異体の発現を調節する方法を提供する。

【００２４】

さらなる態様において、本発明のｓｉＲＮＡ分子、ｓｈＲＮＡ分子または核酸分子のいずれかを含むベクターを対象に投与することを含む、血管新生に関連した障害、または、低下した脈管構造が有益である障害を治療する方法が提供される。

【００２５】

本発明のさらなる態様において、血管新生に関連した障害、または、低下した脈管構造が有益である障害を治療するための医薬品の製造における、本発明のｓｉＲＮＡ分子、ｓｈＲＮＡ分子または核酸分子を含むベクターの使用が提供される。

【００２６】

本発明のｓｉＲＮＡ分子、ｓｈＲＮＡ分子、核酸分子、または、かかる分子を含むベクターはいずれも、これらおよび医薬的に許容され得るキャリアを含有する医薬組成物が本発明の一部を形成するように、本発明の一部を形成する。

【００２７】

上記に記載される治療的方法はいずれも、例えば、哺乳動物を含めて、任意の対象に適用することができる。哺乳動物はヒトであってもよく、あるいは、家畜動物、コンパニオン動物または動物園の動物であってもよい。本発明の医薬組成物はヒトの医学的治療における使用のために好適であることが特に意図される一方で、本発明の医薬組成物はまた、コンパニオン動物（例えば、イヌおよびネコなど）および家畜動物（例えば、ウマ、ウシおよびヒツジなど）または動物園の動物（例えば、非ヒト霊長類、ネコ科動物、イヌ科動物、ウシ科動物および有蹄動物など）の治療を含む獣医学的治療に対しても適用可能である。

【００２８】

ＢＮＯ６９遺伝子のイソ型がいくつか同定されている。本発明のｓｉＲＮＡ分子または

ｓｈＲＮＡ分子はこれらのイソ型のいずれか１つまたは複数に対して標的化することができる。具体的には、イソ型Ｉ、イソ型ＩＩまたはイソ型ＩＩＩのいずれか１つまたは複数を標的化することができる。イソ型Ｉのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が配列番号８および配列番号９によってそれぞれ表される。イソ型ＩＩは、国際特許出願ＰＣＴ／ＡＵ０２／０１２８２においてＢＮＯ６９として特定される分子であり、そのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が配列番号１０および配列番号１１によってそれぞれ表される。イソ型ＩＩＩのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が配列番号１２および配列番号１３によってそれぞれ表される。ＢＮＯ６９のイソ型は、配列同一性を有する共通する領域を互いに有しており、そのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が配列番号１４および配列番号１５によってそれぞれ表される。同一性を有するこの配列には、ＧＡＰドメインが含まれ、そのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が配列番号１６および配列番号１７によってそれぞれ表される。本発明のｓｉＲＮＡ分子またはｓｈＲＮＡ分子は、ＧＡＰドメインを含めて、ＢＮＯ６９のすべてのイソ型が互いに有する共通する領域を標的化することができ、あるいは、１つのイソ型だけに対して特異的に結合することができる。

【００２９】

本発明のさらなる態様において、配列番号８、配列番号１２、配列番号１４または配列番号１６の１つに示される配列を含む単離された核酸分子が提供される。

【００３０】

なおさらに、配列番号８、配列番号１２、配列番号１４または配列番号１６の１つに示される配列、あるいは、そのフラグメントを含み、血管新生プロセスにおいて役割を果たすポリペプチドをコードする単離された核酸分子が提供される。かかるプロセスには、胚形成、月経周期、創傷治癒、腫瘍の血管新生、および、運動により誘導される筋肉肥大が含まれ得るが、これらに限定されない。

【００３１】

加えて、本発明は、配列番号８、配列番号１２、配列番号１４または配列番号１６の１つに示される配列、あるいは、そのフラグメントを含み、血管新生プロセスに関連した疾患において役割を果たす単離された核酸分子が提供される。かかる疾患には、ガン；炎症性障害（関節炎を含む）；角膜、網膜または脈絡膜での血管新生（黄斑変性および糖尿病網膜症を含む）；乾癬；心臓血管疾患が含まれるが、これらに限定されない。有用なフラグメントには、特徴的であり、かつ、以前に同定された遺伝子のいずれとも重複しないフラグメント、既知の配列と重複する特徴的なフラグメント、および、選択的スプライスアクセプター接合点にまたがるフラグメントなどが含まれ得る。

【００３２】

本発明はまた、配列番号８、配列番号１２、配列番号１４または配列番号１６のいずれか１つに対する同一性が少なくとも７０％であり、かつ、血管新生プロセスにおいて役割を果たすポリペプチドをコードする単離された核酸分子を包含する。かかる変化体は、これらの配列に対して、好ましくは少なくとも約８５％の配列同一性を有し、最も好ましくは少なくとも約９５％の配列同一性を有する。

【００３３】

配列同一性は、典型的には、Ａｌｔｓｃｈｕｌ他（１９９７）に記載されるＢＬＡＳＴアルゴリズムをＢＬＯＳＵＭ６２の初期値行列とともに使用して計算される。

【００３４】

本発明はまた、配列番号８、配列番号１２、配列番号１４または配列番号１６のいずれか１つとストリンジェントな条件のもとでハイブリダイゼーションし、かつ、血管新生プロセスにおいて役割を果たしている単離された核酸分子を包含する。

【００３５】

ＰＣＲプローブとのハイブリダイゼーションが企図される。プローブの特異性（プローブが非常に特異的な領域（例えば、５’調節領域）から作製されるか、または、あまり特異的でない領域（例えば、ＧＡＰドメインのような保存されたモチーフ）から作製されるか）、および、ハイブリダイゼーションまたは増幅のストリンジェンシーは、そのプロー

ブにより、天然に存在する配列、対立遺伝子変化体、または関連した配列のみが同定されるかどうかを決定する。

【００３６】

関連した配列を検出するために使用されるプローブは、好ましくは、配列番号８、配列番号１２、配列番号１４または配列番号１６のいずれかに対する少なくとも５０％の配列同一性を有しなければならない。本発明のハイブリダイゼーションプローブはＤＮＡまたはＲＮＡであってもよい。

【００３７】

配列番号８、配列番号１２、配列番号１４または配列番号１６のいずれかに対する特異的なハイブリダイゼーションプローブを作製するための手段には、これらの配列を、ｍＲＮＡプローブを作製するためのベクターにクローン化することが含まれる。様々なそのようなベクターがこの分野では知られており、市販されている。ハイブリダイゼーションプローブは、放射性核種（例えば、^{32}Ｐまたは^{35}Ｓなど）によって、または酵素標識（例えば、アビジン／ビオチンのカップリングシステムを介してプローブにカップリングされるアルカリホスファターゼなど）によって、またはこの分野で知られている他の方法によって標識することができる。

【００３８】

ストリンジェントな条件のもとにおいて、^{32}Ｐ標識プローブとのハイブリダイゼーションが、最も好ましくは、７５０ｍＭ　ＮａＣｌ、７５ｍＭクエン酸三ナトリウム、２％ＳＤＳ、５０％ホルムアミド、１Ｘデンハルト、１０％（ｗ／ｖ）デキストラン硫酸、および１００μｇ／ｍＬの変性サケ精子ＤＮＡにおいて４２℃で行われる。これらの条件に対する様々な有用な変化が当業者には容易に明らかである。ハイブリダイゼーションに続く洗浄工程は、最も好ましくは、１５ｍＭ　ＮａＣｌ、１．５ｍＭクエン酸三ナトリウム、および１％ＳＤＳにおいて６５℃で行われる。これらの条件に対する様々なさらなる変化が当業者には容易に明らかである。

【００３９】

本発明の核酸分子またはそのフラグメントは、天然の供給源から得ることができるヌクレオチド配列を有する。従って、本発明の核酸分子またはそのフラグメントには、天然に存在する正常な対立遺伝子、天然に存在する変異型対立遺伝子、天然に存在する多型対立遺伝子、様々にスプライシングされた転写物、スプライス変化体などが含まれる。天然の供給源には、動物の細胞および組織、体液、組織培養細胞などが含まれる。

【００４０】

本発明の核酸分子はまた、この分野で受け入れられている方法を使用して操作することができ、その結果、遺伝子をコードする配列を様々な目的のために変化させることができる。これらには、遺伝子産物のクローニング、プロセシングおよび／または発現の改変が含まれるが、これらに限定されない。遺伝子フラグメントのＰＣＲ再組み立ておよび合成オリゴヌクレオチドの使用は、本発明の核酸分子を操作することを可能にする。例えば、オリゴヌクレオチド媒介の部位特異的変異誘発により、新しい制限部位を生じさせる変異、グリコシル化パターンを変化させる変異、およびスプライス変化体を産生させる変異などを導入することができる。

【００４１】

遺伝暗号の縮重性の結果として、本発明の核酸分子を表す数多くの核酸配列（この場合、いくつかが、天然に存在する配列に対する最小限の類似性を有し得る）がもたらされ得る。従って、本発明は、可能なコドン選択に基づく組合せを選択することによって作製され得るポリヌクレオチド配列のあらゆる可能な変化体を包含する。これらの組合せは、天然に存在する核酸分子のポリヌクレオチド配列に適用されるような標準的なトリプレット遺伝暗号に従って行われ、従って、そのような変化体はすべてが、具体的に開示されていると見なされなければならない。

【００４２】

本発明の核酸分子は典型的にはＤＮＡ分子であり、センス鎖およびアンチセンス鎖の両

方で、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、合成形態および混合ポリマーを包含し、そして、当業者によって理解されるように、化学的または生化学的に修飾することができ、あるいは、非天然型ヌクレオチド塩基または誘導体化されたヌクレオチド塩基を含有することができる。そのような修飾には、標識、メチル化、インターカレーター、アルキル化体および修飾された連結が含まれる。場合により、天然に存在する分子のコドン使用とは実質的に異なるコドン使用を有する、本発明の核酸分子を表すヌクレオチド配列を作製することは好都合であり得る。例えば、コドンを、宿主が特定のコドンを利用する頻度と一致させて、特定の原核生物宿主または真核生物宿主におけるコードされるペプチドの発現速度を増大させるために選択することができる。ヌクレオチド配列を、そのコードされるアミノ酸配列を変化させることなく変化させるための他の理由には、天然に存在する分子から産生される転写物よりも望ましい性質（例えば、そのような転写物よりも大きい半減期など）を有するＲＮＡ転写物の産生が含まれる。

【００４３】

本発明はまた、すべてが合成化学による本発明の核酸分子の製造を包含する。合成配列は、好適な宿主における挿入されたコード配列の転写制御および翻訳制御のための必要なエレメントを含有する発現ベクターおよび細胞システムに挿入することができる。これらのエレメントには、調節配列、プロモーター、５’非翻訳領域および３’非翻訳領域、ならびに、ヌクレオチド配列のより効率的な翻訳を可能にする特異的な開始シグナル（例えば、ＡＴＧ開始コドンおよびＫｏｚａｋコンセンサス配列など）が含まれ得る。その開始コドンおよび上流の調節配列を含む完全なコード配列が適切な発現ベクターに挿入される場合、さらなる制御シグナルが必要とされないことがある。しかしながら、コード配列のみまたはそのフラグメントが挿入される場合、上記に記載されるような外因性の翻訳制御シグナルをベクターによって提供しなければならない。そのようなシグナルは、天然および合成の両方で様々な起源のものであり得る。発現効率は、使用される特定の宿主細胞システムについて適切なエンハンサーを含むことによって高めることができる（Ｓｃｈａｒｆ他、１９９４）。

【００４４】

本発明はまた、本明細書中に記載される配列の相補体である核酸分子を包含する。

【００４５】

本発明は、精製されたポリペプチドまたはタンパク質の調製を可能にする。これを行うために、宿主細胞を、上記に記載されるような核酸分子でトランスフェクションすることができる。典型的には、前記宿主細胞は、本発明による核酸分子を含む発現ベクターでトランスフェクションされる。様々な発現ベクター／宿主システムを利用して、配列を含有し、発現させることができる。これらには、微生物、例えば、プラスミドまたはコスミドのＤＮＡ発現ベクターで形質転換された細菌など；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞システム；あるいは、マウスまたは他の動物またはヒトの組織細胞システムが含まれるが、これらに限定されない。哺乳動物細胞もまた、本発明の核酸分子によりコードされるポリペプチドを、プラスミド、コスミドおよびウイルスシステム（例えば、ワクシニアウイルス発現システムなど）を含む様々な発現ベクターを使用して発現させるために使用することができる。本発明は、用いられる宿主細胞またはベクターによって限定されない。

【００４６】

本発明の核酸分子またはその変化体は、哺乳動物システムにおける組換えタンパク質の長期間にわたる産生を可能にするために細胞株において安定的に発現させることができる。本発明の核酸配列を、ウイルス複製起点および／または内因性の発現エレメント、および、同じベクターまたは別個のベクターにおける選択マーカー遺伝子を含有し得る発現ベクターを使用して細胞株に形質転換することができる。選択マーカーにより、選択因子に対する耐性が付与され、その存在により、導入された配列を首尾よく発現する細胞の成長および回収が可能になる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンを、細胞タイプに対して適切な組織培養技術を使用して拡大することができる。

【００４７】
形質転換された細胞により産生されるタンパク質は、使用される配列および／またはベクターに依存して、分泌され得るか、または細胞内に保持され得る。当業者によって理解されるように、タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターは、原核生物または真核生物の細胞膜を通過するタンパク質の分泌を行わせるシグナル配列を含有するように設計することができる。
【００４８】
また、宿主細胞株は、挿入された配列の発現を調節するか、または、発現したタンパク質を所望の様式でプロセシングするその能力のために選ぶことができる。ポリペプチドのそのような修飾には、アセチル化、グリコシル化、リン酸化およびアシル化が含まれるが、これらに限定されない。タンパク質の「プレプロ」形態の翻訳後切断もまた、タンパク質の標的化、折り畳みおよび／または活性を規定するために使用することができる。翻訳後活性のための特定の細胞装置および特徴的な機構を有する種々の宿主細胞（例えば、ＣＨＯ細胞またはＨｅＬａ細胞）をＡｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から入手することができ、また、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセシングを確実にするために選ぶことができる。
【００４９】
本発明のさらに別の局面によれば、上記に記載されるような本発明の核酸分子を含む発現ベクターが提供される。
【００５０】
本発明のさらに別の局面によれば、上記に記載されるような本発明の核酸分子を含む細胞が提供される。好ましくは、この細胞は真核細胞である。
【００５１】
多量のタンパク質が、例えば、抗体製造などのために必要とされるとき、高レベルの発現を行わせるベクターを使用することができる（例えば、Ｔ５またはＴ７の誘導可能なバクテリオファージプロモーターを含有するベクターなど）。本発明はまた、タンパク質の重要な機能的ドメインを含有する融合タンパク質を作製および単離する際における上記の発現システムの使用を包含する。これらの融合タンパク質は、適切な抗体の作製だけでなく、結合研究、構造研究および機能研究のために使用される。
【００５２】
タンパク質を融合タンパク質として発現および精製するために、本発明の適切なポリヌクレオチド配列は、別のペプチド（例えば、グルタチオンスクシニルトランスフェラーゼ）をコードするヌクレオチド配列を含有するベクターに挿入される。融合タンパク質は原核生物細胞または真核生物細胞から発現および回収される。その後、融合タンパク質は、融合ベクター配列に基づくアフィニティークロマトグラフィーによって精製することができ、続いて、関連したタンパク質を融合タンパク質の酵素切断によって得ることができる。
【００５３】
本発明のポリペプチドのフラグメントはまた、固相技術を使用する直接的なペプチド合成によって作製することができる。自動化された合成を、ＡＢＩ４３１Ａペプチド合成機（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ）を使用することによって達成することができる。ポリペプチドの様々なフラグメントを別々に合成することができ、その後、組み合わせて全長の分子を作製することができる。
【００５４】
本発明のさらなる態様において、配列番号９、配列番号１３、配列番号１５または配列番号１７の１つに示される配列を含む単離されたポリペプチドが提供される。
【００５５】
本発明はまた、血管新生プロセスにおいて役割を果たしている、配列番号９、配列番号１３、配列番号１５または配列番号１７のうちの１つに示される配列を含む、単離されたポリペプチドまたはそれらのフラグメントを提供する。そのようなプロセスには、胚形成

、月経周期、創傷修復、腫瘍の血管新生、および運動により誘導される筋肉肥大が含まれ得るが、これらに限定されない。

【００５６】

加えて、本発明は、血管新生プロセスに関連する疾患において役割を果たしている、配列番号９、配列番号１３、配列番号１５または配列番号１７のうちの１つに示される、単離されたポリペプチドを提供する。疾患には、がん；炎症性障害（関節炎を含む）；角膜、網膜または脈絡膜の血管新生（黄斑変性および糖尿病網膜症を含む）；乾癬；心臓血管疾患が含まれるが、これらに限定されない。

【００５７】

本発明はまた、配列番号９、配列番号１３、配列番号１５または配列番号１７のいずれか１つに対して少なくとも７０％（好ましくは８５％、より好ましくは９５％）の同一性を有し、かつ、血管新生プロセスにおいて役割を果たしている単離されたポリペプチドを包含する。

【００５８】

配列同一性は、典型的には、Ａｌｔｓｃｈｕｌ他（１９９７）に記載されるＢＬＡＳＴアルゴリズムをＢＬＯＳＵＭ６２の初期値行列とともに使用して計算される。

【００５９】

本発明のさらなる局面において、上記に記載されるようなポリペプチドを調製する方法が提供され、この方法は下記の工程を含む：

（１）上記に記載されるような細胞を、ポリペプチドを産生させるために効果的な条件のもとで培養する工程；および

（２）ポリペプチドを集める工程。

【００６０】

本発明のさらに別の局面によれば、上記に記載されるプロセスの産物であるポリペプチドが提供される。

【００６１】

実質的に精製されたタンパク質またはそのフラグメントはその後、二次構造および三次構造を明らかにするために、さらなる生化学的分析において使用することができる。そのような方法論はこの分野で知られており、これには、タンパク質の結晶のＸ線結晶学、または核磁気共鳴（ＮＭＲ）による方法が含まれるが、これらに限定されない。構造の決定により、タンパク質と相互作用するか、またはタンパク質の電荷配置を変化させるか、または他のタンパク質と電荷相互作用するか、あるいは、細胞におけるその機能を変化させるための医薬品の合理的設計が可能になる。

【００６２】

本発明はＢＮＯ６９（血管新生に関与する遺伝子）のイソ型を提供しており、従って、本発明では、血管新生を調節するための様々な方法が可能となる。

【００６３】

血管新生は数多くの病理学的プロセスにおいて非常に重要であるので、従って、本発明はまた、血管新生に関連した障害を治療するための治療的方法を提供し、また、ＢＮＯ６９の発現および／または機能における異常に関連する血管新生関連障害の診断または予後を提供する。

【００６４】

かかる障害の例には、ガン；炎症性障害（関節炎を含む）；角膜、網膜または脈絡膜での血管新生（黄斑変性および糖尿病網膜症を含む）；乾癬；心臓血管疾患が含まれるが、これらに限定されない。

【００６５】

（治療的適用）

本発明の別の態様によれば、本発明のポリペプチドの発現または活性を調節することを含む、上記に記載されるような血管新生に関連した障害を治療する方法が提供される。

【００６６】

さらなる態様において、本発明は、本発明の核酸分子またはポリペプチドの選択的なアンタゴニストまたはアゴニストを対象に投与することを含む、上記に記載されるような血管新生に関連した障害を治療する方法が提供される。

【００６７】

本発明のさらに別の局面において、上記に記載されるような血管新生関連障害を治療するための医薬品の製造における本発明の核酸分子またはポリペプチドの選択的なアンタゴニストまたはアゴニストの使用が提供される。

【００６８】

制御されない血管新生または増強された血管新生をもたらす血管新生関連障害（これには、がん；炎症性障害（関節炎を含む）；角膜、網膜または脈絡膜の血管新生（黄斑変性および糖尿病網膜症を含む）；乾癬；心臓血管疾患が含まれるが、これらに限定されない）を治療するためには、拡大しつつある脈管構造を阻害する治療が望ましい。これは、本発明の核酸分子またはポリペプチドの阻害を伴う。

【００６９】

阻害された血管新生または低下した血管新生によって特徴づけられる血管新生関連障害（これには、虚血性四肢疾患および冠状動脈疾患が含まれるが、これらに限定されない）を治療するためには、血管拡張を強化または促進する治療が望ましい。これは、本発明の核酸分子またはポリペプチドの強化、刺激または再活性化を伴う。

【００７０】

（遺伝子またはタンパク質の機能を阻害すること）

遺伝子またはタンパク質の機能を阻害することを様々な方法で達成することができる。上で言及したように、アンチセンス核酸方法論は、障害の原因となっている遺伝子を不活性化するための１つの方法を表す。アンチセンス法または遺伝子標的化サイレンシング法では、アンチセンスオリゴヌクレオチドの使用、アンチセンスＲＮＡの注入、アンチセンスＲＮＡ発現ベクターのトランスフェクション、および、上記に記載されるＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）または短い干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）の使用（これらに限定されない）を含むことができる。なおさらに、触媒作用核酸分子（例えば、ＤＮＡザイムおよびリボザイムなど）を遺伝子サイレンシングのために使用することができる（ＢｒｅａｋｅｒおよびＪｏｙｃｅ、１９９４；ＨａｓｅｌｏｆｆおよびＧｅｒｌａｃｈ、１９８８）。これらの分子は、従来のアンチセンス法の場合のようにその標的ｍＲＮＡ分子に単に結合するのではなく、その標的ｍＲＮＡ分子を切断することによって機能する。

【００７１】

本発明の１つの局面において、単離された核酸分子（これは、上記に記載される核酸分子のいずれか１つの相補体である）を、対象に投与することができる。典型的には、相補体が、血管新生関連障害を治療または防止するために対象に投与される。さらなる局面において、相補体は、本発明の核酸分子によってコードされるｍＲＮＡとハイブリダイゼーションするＲＮＡ分子、本発明の核酸分子によってコードされるｍＲＮＡとハイブリダイゼーションする短い干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、または本発明の核酸分子に対して標的化される触媒作用核酸分子である。

【００７２】

本発明のさらなる局面において、本発明の核酸分子の相補体であり、かつ、本発明の核酸分子によってコードされるｍＲＮＡとハイブリダイゼーションするＲＮＡ分子または短い干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）をコードする単離された核酸分子の、血管新生関連障害を治療するための医薬品の製造における使用が提供される。

【００７３】

典型的には、関連した核酸分子のいずれか１つをコードするポリヌクレオチドの相補体を発現するベクターを、血管新生関連障害（これには、上記に記載される障害が含まれるが、これらに限定されない）を治療または防止するために対象に投与することができる。ベクターを細胞または組織に導入するための多くの方法を利用することができ、これらは、インビボ、インビトロおよびエクスビボでの使用のために等しく好適である。エクスビ

ボ治療において、ベクターを、患者から採取され、自家移植のためにクローン拡大されて、その同じ患者に戻される幹細胞に導入することができる。トランスフェクションによる送達、リポソーム注入による送達、またはポリカチオン性アミノポリマーによる送達を、この分野で広く知られている方法を使用して達成することができる（例えば、Ｇｏｌｄｍａｎ他（１９９７）を参照のこと）。

【００７４】

さらなる局面において、本発明による精製されたタンパク質を、本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を作製するために使用することができる。これらの抗体は、アンタゴニストとして直接的に使用することができ、あるいは、ポリペプチドを発現する細胞または組織に薬学的薬剤（例えば、細胞傷害性薬剤など）を運ぶための標的化機構または送達機構として間接的に使用することができる。そのような抗体には、当業者によって理解されるように、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体および単鎖抗体が含まれ得るが、これらに限定されない。

【００７５】

抗体を製造するために、様々な宿主（これには、ウサギ、ラット、ヤギ、マウス、ヒトなどが含まれる）を、本発明のタンパク質を用いた注射、あるいは、免疫原的性質を有するその任意のフラグメントまたはオリゴペプチドを用いた注射によって免疫化することができる。様々なアジュバントを、免疫学的応答を増大させるために使用することができ、これらには、フロイントのアジュバント、鉱物ゲル（例えば、水酸化アルミニウムなど）および表面活性物質（例えば、リゾレシチンなど）が含まれるが、これらに限定されない。ヒトにおいて使用されるアジュバントには、ＢＣＧ（カルメット・ゲラン菌）およびコリネバクテリウム・パルブム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｐａｒｖｕｍ）が含まれる。

【００７６】

ポリペプチドに対する抗体を誘導するために使用されるオリゴペプチド、ペプチドまたはフラグメントは、少なくとも約５個のアミノ酸（より好ましくは少なくとも約１０個のアミノ酸）からなるアミノ酸配列を有することが好ましい。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたはフラグメントは、ポリペプチドのアミノ酸配列の一部分と同一であること、また、小さい天然に存在する分子の完全なアミノ酸配列を含有することもまた好ましい。これらのタンパク質に由来するアミノ酸の短い領域を別のタンパク質（例えば、ＫＬＨなど）の領域と融合することができ、そのようなキメラな分子に対する抗体を作製することができる。

【００７７】

本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を、培養における連続した細胞株による抗体分子の作製を規定する任意の技術を使用して調製することができる。これらには、ハイブリドーマ技術、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術およびＥＢＶハイブリドーマ技術が含まれるが、これらに限定されない（例えば、ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５）；Ｋｏｚｂｏｒ他（１９８５）；Ｃｏｔｅ他（１９８３）；Ｃｏｌｅ他（１９８４）を参照のこと）。

【００７８】

作製されたモノクローナル抗体には、マウス由来抗体、ヒト化抗体および完全なヒト抗体が含まれ得るが、これらに限定されない。例えば、抗体は、抗原投与刺激に応答して特異的なヒト抗体を産生するように操作されている遺伝子組換えマウスから得られる。この技術の一例において、ヒトの重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座のエレメントが、内因性の重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座の標的化された破壊を含有する胚性幹細胞株に由来するマウスの系統に導入される。これらの遺伝子組換えマウスは、ヒトの抗原に対して特異的なヒト抗体を合成することができ、また、ヒト抗体を分泌するハイブリドーマを作製するために使用することができる。ヒト抗体を遺伝子組換えマウスから得るための方法が、例えば、Ｌｏｎｂｅｒｇ他（１９９４）；Ｇｒｅｅｎ他（１９９４）；Ｔａｙｌｏｒ他（１９９４）に記載される。

【００７９】
抗体はまた、文献に開示されるように、リンパ球集団におけるインビボ産生を誘導することによって、あるいは、免疫グロブリンライブラリーまたは非常に特異的な結合性試薬のパネルをスクリーニングすることによって作製することができる（例えば、Ｏｒｌａｎｄｉ他（１９８９）；Ｗｉｎｔｅｒ他（１９９１）を参照のこと）。
【００８０】
本発明のポリペプチドに対する特異的な結合部位を含有する抗体フラグメントもまた作製することができる。例えば、そのようなフラグメントには、抗体分子のペプシン消化によって作製されるＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント、および、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得られるＦａｂフラグメントが含まれる。あるいは、Ｆａｂ発現ライブラリーを、所望の特異性を有するモノクローナルＦａｂフラグメントの迅速かつ容易な同定を可能にするために構築することができる（例えば、Ｈｕｓｅ他（１９８９）を参照のこと）。
【００８１】
様々な免疫アッセイを、所望の特異性を有する抗体を同定するためのスクリーニングに使用することができる。明らかにされた特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかを使用する競合的結合アッセイまたは免疫放射アッセイのための数々のプロトコルがこの分野では広く知られている。そのような免疫アッセイは、典型的には、タンパク質とその特異的な抗体との複合体形成の測定を伴う。妨害しない２つのエピトープに対する反応性を有するモノクローナル抗体を利用する２部位のモノクローナル型免疫アッセイが好ましいが、競合的結合アッセイもまた用いることができる。
【００８２】
さらなる局面において、アンタゴニストには、ペプチド、リン酸化ペプチド、または小さい有機化合物もしくは無機化合物が含まれ得る。これらのアンタゴニストは本発明の核酸分子またはポリペプチドの機能を妨げ、その結果、必要な治療的効果を提供するはずである。
【００８３】
治療的適用のために好適なペプチド、リン酸化ペプチド、または小さい有機化合物もしくは無機化合物は、下記に記載されるような薬物スクリーニング適用において本発明の核酸分子およびポリペプチドを使用して同定することができる。
【００８４】
（遺伝子またはタンパク質の機能を高めること）
遺伝子またはタンパク質の機能を強化、刺激または再活性化することを様々な方法で達成することができる。本発明の１つの局面において、上記に記載されるような単離された核酸分子の、対象への投与を開始することができる。典型的には、本発明の核酸分子を、血管新生関連障害を治療または防止するために対象に投与することができる。
【００８５】
さらなる局面において、血管新生関連障害を治療するための医薬品の製造における、上記に記載されるような単離された核酸分子の使用が提供される。
【００８６】
典型的には、本発明のポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは誘導体を発現することができるベクターを、上記に記載される様々な障害（これらに限定されない）を含む障害を治療または防止するために対象に投与することができる。形質導入用のレトロウイルスベクターが、多くの場合、それらの大きな感染効率ならびに安定な組込みおよび発現のために、体細胞遺伝子治療のために使用される。本発明の核酸分子またはその一部分をレトロウイルスベクターにクローン化することができ、発現を、その内因性のプロモーターから、またはレトロウイルスの長末端反復から、または目的とする標的細胞タイプについて特異的なプロモーターから行わせることができる。他のウイルスベクターを使用することができ、これらには、この分野で知られているように、トリ起源、マウス起源およびヒト起源のアデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス、パポバウイルス

、レンチウイルスおよびレトロウイルスが含まれる。

【００８７】

遺伝子治療は、確立された方法に従って行われ得る（例えば、Ｆｒｉｅｄｍａｎ、１９９１；Ｃｕｌｖｅｒ、１９９６参照）。発現制御エレメントに連結され、細胞の内部において複製することができる本発明の核酸分子を含有するベクターが調製される。あるいは、ベクターは複製欠陥であり得るし、また、遺伝子治療における複製および使用のためにヘルパー細胞を必要とし得る。

【００８８】

インビトロでの感染の非ウイルス方法を使用する遺伝子移入もまた使用することができる。これらの方法では、ＤＮＡの直接的な注入、リン酸カルシウムの存在下でのネイクドＤＮＡの取込み、エレクトロポレーション、プロトプラスト融合またはリポソーム送達を含む。遺伝子移入はまた、ヒト人工染色体の一部としての送達によって、または受容体媒介による遺伝子移入によって達成することができる。これは、特定の細胞表面受容体に結合して、エンドサイトーシスおよび哺乳動物細胞内へのＤＮＡの移動を誘導する標的化分子にＤＮＡを連結することを伴う。１つのそのような技術では、ポリ－Ｌ－リシンを使用して、アシアロ糖タンパク質がＤＮＡに連結される。アデノウイルスはまた、リソソームを乱し、従って、ＤＮＡが分解を回避し、核に移動することを可能にするために複合体に加えられる。これらの粒子の注入は、静脈内注入により、肝細胞内への遺伝子移入をもたらしている。

【００８９】

さらにさらなる局面において、血管新生関連障害を治療する方法が提供され、この方法は、上記に記載されるようなポリペプチドまたはそのアゴニストを、そのような治療を必要としている対象に投与することを含む。

【００９０】

別の局面において、本発明は、血管新生関連障害を治療するための医薬品の製造における上記に記載されるようなポリペプチドまたはそのアゴニストの使用を提供する。そのような障害の例が上記に記載されている。

【００９１】

さらなる局面において、好適なアゴニストにはまた、本発明のポリペプチドの機能を模倣することができるペプチド、リン酸化ペプチド、または小さい有機化合物もしくは無機化合物が含まれ得るか、あるいは、機能を正常なレベルに回復することができる、本発明のポリペプチドに特異的な抗体が含まれ得る。

【００９２】

治療的適用のために好適なペプチド、リン酸化ペプチド、または小さい有機化合物もしくは無機化合物は、下記に記載されるような薬物スクリーニング適用において本発明の核酸およびポリペプチドを使用して同定することができる。

【００９３】

さらなる実施形態において、本発明のアゴニスト、アンタゴニスト、相補的配列、ｓｉＲＮＡ分子、ｓｈＲＮＡ分子、核酸分子、ポリペプチド、抗体またはベクターは、他の適切な医薬剤または治療剤、または治療方法との組み合わせで投与することができる。適切な薬剤および治療方法の選択は、従来の薬学原理に従って当業者によって行うことができる。治療剤と治療方法の組合せは、上記に記載される様々な障害の治療または防止を達成するために相乗的に作用することができる。この方法を使用して、それぞれの医薬剤のより低い投薬量を用いた治療効力を可能にすることができ、従って、これにより、有害な副作用に対する潜在的可能性を低下させることができる。

【００９４】

上記に記載される治療方法はどれも、例えば、哺乳動物（例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル、および最も好ましくはヒトなど）を含む、任意の対象に適用することができる。

【００９５】

（血管新生の調節）
本発明のさらなる局面において、血管新生関連障害の治療のために使用される上記に記載される方法はどれも、細胞を含む任意のシステムにおける血管新生の調節のために使用することができる。これらのシステムには、インビトロアッセイシステム（例えば、Ｍａｔｒｉｇｅｌアッセイ、増殖アッセイ、遊走アッセイ、コラーゲンアッセイ、ウシ毛細血管内皮細胞アッセイなど）、インビボアッセイシステム（例えば、インビボＭａｔｒｉｇｅｌ型アッセイ、ニワトリ漿尿膜アッセイ、単離された器官、組織または細胞など）、動物モデル（例えば、インビボ血管新生アッセイ、腫瘍血管新生モデルなど）、または治療を必要としている宿主（例えば、以前に記載されたような血管新生関連障害に罹患している宿主）が含まれ得るが、これらに限定されない。

【００９６】
（薬物スクリーニング）
本発明のさらに別の局面によれば、本発明の核酸分子、ならびに本発明のポリペプチドまたはそのフラグメント、および、これらを発現する細胞は、血管新生関連障害を治療するための様々な技術における候補の薬学的化合物のスクリーニングのために有用である。

【００９７】
なおさらに、本発明は、ハイスループットスクリーニング技術が用いられる使用を提供する。

【００９８】
本発明の核酸分子およびポリペプチドと相互作用する分子が特定されている。なお、さらに、ＢＮＯ６９の推定されるＧＡＰ活性が除かれるＢＮＯ６９の変異体が特定されている。具体的には、配列番号１１のＡｒｇ８２が置換される変異体であり、より具体的には、Ａｒｇ８２がＡｌａによって置換される変異体（従って、Ｒ８２Ａ変異体）である。従って、本発明のさらに別の態様では、本発明のポリペプチドだけでなく、これらをコードする核酸分子、ならびに、これらを発現する細胞および動物は、血管新生に関連した障害を治療するための様々な技術における候補となる医薬用化合物のスクリーニングのために有用である。

【００９９】
本発明に従ってスクリーニングすることができる化合物には、ペプチド（例えば、可溶性ペプチドなど）、リン酸化ペプチド、および小さい有機分子または無機分子（例えば、天然産物または合成された化学ライブラリーおよびペプチド模倣体など）が含まれるが、これに限定されない。

【０１００】
１つの実施形態において、スクリーニングアッセイは、競合的結合アッセイにおいて、本発明のポリペプチドまたはそのフラグメントを発現する組換え核酸分子で安定的に形質転換される真核生物宿主細胞または原核生物宿主細胞を利用する細胞型アッセイを含むことができる。結合アッセイでは、ポリペプチドまたはそのフラグメントと、試験されている化合物との間での複合体の形成について測定されるか、あるいは、試験されている化合物がどの程度、ポリペプチドまたはそのフラグメントと、その相互作用体またはリガンドとの間での複合体の形成を妨害するかが測定される。

【０１０１】
Ｒｈｏ、ＲａｃおよびＣｄｃ４２の活性に対するＢＮＯ６９ノックダウンの影響が、細胞タイプに依存して異なることを考えると、例えば、ＢＮＯ６９はＲｈｏファミリーの多数のメンバーと細胞特異的な様式で相互作用することができる。ＢＮＯ６９ノックダウンは内皮細胞においてＲｈｏ活性を増大させるが、活性ＲａｃまたはＣｄｃ４２での変化を全く生じさせない。これは、ＢＮＯ６９発現の阻害により、Ｒａｃ活性の増大がもたらされるＮＩＨ３Ｔ３細胞における結果とは対照的である。このことは、ＢＮＯ６９のＧＡＰドメインがＲｈｏファミリーの多数のメンバーと細胞特異的な様式で結合できることを示唆している。従って、ＢＮＯ６９の相互作用因子は、内皮細胞でのようにＲｈｏＧＴＰａｓｅであるかもしれず、または、ＮＩＨ３Ｔ３細胞でのようにＲａｃＧＴＰａｓｅである

可能性がある。さらに、ＢＮＯ６９がその一部である経路の破壊（本発明によるｓｉＲＮＡの導入による破壊、あるいは、ＧＡＰ活性が本発明に従って低下または除去される変異型ＢＮＯ６９を導入するための操作による破壊）は、その経路における他のタンパク質の発現を変化させ、このことは、その経路におけるさらなる薬物標的の特定を可能にする。従って、本発明のポリペプチドに対する相互作用因子は、ＲｈｏファミリーのＲｈｏ、Ｒａｃ、Ｃｄｃ４２または他のメンバー、あるいは、ＢＮＯ６９がその一部である経路における他のタンパク質であり得る。

【０１０２】

非細胞型アッセイもまた、本発明のポリペプチドとその相互作用体との間での結合を妨げる化合物を同定するために使用することができる。そのようなアッセイがこの分野では知られており、これらには、例えば、ＡｌｐｈａＳｃｒｅｅｎ技術（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、ＭＡ、米国）が含まれる。この適用は、各相互作用パートナーが抗体を介して別個のビーズに結合するようなビーズの使用に依拠する。各パートナーの相互作用はビーズを近寄らせ、その結果、レーザー励起により、数多くの化学反応が開始され、最終的には、光シグナルを放出する蛍光団を生じさせるようにする。ポリペプチドとその相互作用体との結合を妨げる候補化合物は、その関与化合物の同定および単離を可能にする光放出の喪失をもたらす。

【０１０３】

ハイスループット薬物スクリーニング技術ではまた、国際特許出願公開ＷＯ８４／０３５６４に記載されるような方法を用いることができる。固体基質上で合成された小さいペプチド試験化合物を、ポリペプチドの結合および洗浄によってアッセイすることができる。その後、結合したポリペプチドが、この分野で広く知られている方法によって検出される。この技術の変法において、精製されたポリペプチドを、相互作用する試験化合物を同定するために、プレートに直接コーティングすることができる。

【０１０４】

薬物スクリーニングのためのさらなる方法では、本発明の核酸分子に変異を有する宿主真核生物細胞株の使用を伴う。宿主細胞株はまた、ポリペプチドレベルにおいて欠陥を有する。他の細胞株を、本発明の核酸分子の発現を調節（すなわち、過剰発現、過小発現またはスイッチオフ）することができる場合には使用することができる。宿主細胞株または宿主細胞は様々な薬物化合物の存在下で成長させられ、宿主細胞の成長速度が測定されて、その化合物が欠陥細胞の成長を調節することができるかどうかが明らかにされる。

【０１０５】

本発明のポリペプチドはまた、コンビナトリアルライブラリー技術の結果として開発された化合物をスクリーニングするために使用することができる。これにより、非常に多数の異なる物質を、ポリペプチドの活性を調節するそれらの能力について試験するための方法が提供される。ポリペプチド機能の調節因子として同定された物質は、現実にはペプチドまたは非ペプチドであり得る。非ペプチドの「小分子」は、多くの場合、多くのインビボ薬学的適用のために好ましい。また、そのような物質の模擬体または模倣体は薬学的使用のために設計することができる。既知の薬学的に活性な化合物（「リード」化合物）に基づく模倣体の設計は、新規な医薬品を開発するための一般的な方法である。これは、元の活性な化合物が合成困難であるか、または合成することに費用がかかる場合、あるいは、元の活性な化合物が不適当な投与方法をもたらす場合、望ましいことが多い。模倣体の設計では、標的の特性を決定することにおいて重要である元の活性な化合物の特定の部分が同定される。化合物の活性な領域に構成するこれらの部分または残基はそのファーマコフォアとして知られている。ファーマコフォア構造が見出されると、ファーマコフォア構造は、Ｘ線回折データおよびＮＭＲを含む様々な供給源からのデータを使用してその物理的性質に従ってモデル化される。その場合、ファーマコフォアを模擬する化学基が付加され得るテンプレート分子が選択される。その選択は、模倣体が容易に合成され、薬理学的に許容され得ることが考えられ、インビボで分解せず、かつ、リード化合物の生物学的活性を保持するように行うことができる。さらなる最適化または修飾を、インビボまたは臨

床での検査のために有用である１つまたは複数の最終的な模倣体を選択するために行うことができる。

【０１０６】

標的特異的な抗体を単離し、その後、その結晶構造を解明することもまた可能である。原理的には、この方法は、その後の薬物設計が上記のように基づき得るファーマコフォアをもたらす。機能的かつ薬理学的に活性な抗体に対する抗イディオタイプ抗体（抗ｉｄ）を作製することによってタンパク質の結晶学を完全に回避することが可能となる場合がある。鏡像の鏡像として、抗ｉｄの結合部位は元の結合部位のアナログであることが予想される。その後、抗ｉｄは、化学的または生物学的に作製されたペプチドバンクからペプチドを単離するために使用することができる。

【０１０７】

薬物スクリーニングのための別の代わりの方法は、構造に基づく合理的薬物設計に依拠する。本発明のポリペプチドの三次元構造の決定、または、これらのポリペプチドを取り込むことができるタンパク質複合体の三次元構造の決定は、生物学的に活性なリード化合物を同定するための、構造に基づく薬物設計を可能にする。

【０１０８】

三次元構造モデルは、数多くの適用（それらのいくつかは実験的モデル（例えば、Ｘ線結晶学およびＮＭＲなど）を含む）によって作製することができ、かつ／または、構造データベース（例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａｂａｎｋ（ＰＤＢ）など）からの情報を使用するインシリコ研究から作製することができる。また、三次元構造モデルは、ポリペプチドの一次配列に基づく数多くの知られているタンパク質構造予測技術（例えば、ＳＹＢＹＬ－Ｔｒｉｐｏｓ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）、デノボタンパク質構造設計プログラム（例えば、ＭＯＤＥＬＥＲ－ＭＳＩ　Ｉｎｃ．（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）またはＭＯＥ－Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ　Ｇｒｏｕｐ（Ｍｏｎｔｒｅａｌ、カナダ））、またはアブイニシオ法（例えば、米国特許第５３３１５７３号および同第５５７９２５０号を参照のこと）を使用して決定することができる。

【０１０９】

ポリペプチドまたはポリペプチド複合体の三次元構造が決定されると、構造に基づく薬物発見技術を、これらの三次元構造に基づく生物学的に活性な化合物を設計するために用いることができる。様々なそのような技術がこの分野では知られており、これらには、ＤＯＣＫ（カリフォルニア大学、Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ）またはＡＵＴＯＤＯＣＫ（Ｓｃｒｉｐｐｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）などの例が含まれる。コンピュータ計算によるドッキングプロトコルにより、予測されたタンパク質モデルに基づいてタンパク質活性のために重要であると考えられる１つまたは複数の活性な部位が特定される。その後、分子データベース（例えば、Ａｖａｉｌａｂｌｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ　Ｄｉｒｅｃｔｏｒｙ（ＡＣＤ）など）が、タンパク質モデルを補足する分子についてスクリーニングされる。

【０１１０】

これらの方法などの方法を使用して、潜在的な臨床的薬物候補を同定することができ、かつ、典型的な「ウェットラボ」薬物スクリーニング方法論に関連する時間および費用を減少するために、コンピュータ計算によりランク付けすることができる。

【０１１１】

上記のスクリーニング方法から同定された化合物は、これらおよび薬学的に許容され得るキャリアを含有する薬学的組成物がそうであるように本発明の一部を形成する。

【０１１２】

（薬学的調製物）

上記に示されるようなスクリーニングアッセイから同定された化合物、ならびに本発明のｓｉＲＮＡ分子およびｓｈＲＮＡ分子は、血管新生に伴う障害を治療または改善するために、治療効果的な用量で患者に投与することができる。治療効果的な用量は、障害の症状の改善を生じさせるために十分な化合物、ｓｉＲＮＡ分子またはｓｈＲＮＡ分子の量を

示す。

【０１１３】

そのような化合物または分子の毒性および治療効力を細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手法によって明らかにすることができる。これらの研究から得られたデータは、その後、ヒトにおける使用のための投薬量範囲の制定において使用することができる。

【０１１４】

本発明に従って使用される医薬組成物は、広く知られている１つまたは複数の生理学的に許容され得るキャリア、賦形剤または安定化剤を使用して従来の様式で配合することができる。許容され得るキャリア、賦形剤または安定化剤は、用いられる投薬量および濃度において非毒性であり、これらには、緩衝剤、例えば、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸など；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約１０残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなど；結合性薬剤、これには、親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドンなど）が含まれる；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシンなど；単糖、二糖および他の炭水化物、これらには、グルコース、マンノースまたはデキストリンが含まれる；キレート化剤、例えば、ＥＤＴＡなど；糖アルコール、例えば、マンニトールまたはソルビトールなど；塩形成対イオン、例えば、ナトリウムなど；および／または非イオン性界面活性剤、例えば、Ｔｗｅｅｎ、Ｐｌｕｒｏｎｉｃｓまたはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などが含まれる。

【０１１５】

本発明に従って使用される医薬組成物の配合は、提案された投与経路に基づく。投与経路には、吸入投与、吹き込み投与（口または鼻のいずれかを介して）、経口投与、口内投与、直腸投与または非経口投与が含まれ得るが、これらに限定されない。

【０１１６】

（診断および予後での適用）

本発明の核酸分子およびポリペプチドは、血管新生に関連した障害、または、かかる障害に対する素因の診断および予後を可能にする。かかる障害の例には、ガン；炎症性障害（関節炎を含む）；角膜、網膜または脈絡膜での血管新生（黄斑変性および糖尿病網膜症を含む）；乾癬；心臓血管疾患が含まれるが、これらに限定されない。診断または予後は、適切な治療的介入を開始するために、疾患状態の重篤度、タイプまたは段階を明らかにするために使用することができる。

【０１１７】

本発明の別の実施形態において、診断または予後を可能にし得る核酸分子には、本発明の核酸分子に対応するポリヌクレオチド（例えば、オリゴヌクレオチド）、ゲノムＤＮＡ、ならびに相補的なＲＮＡ分子およびＤＮＡ分子が含まれる。ポリヌクレオチドは、本発明の核酸分子における異常な発現または変異が疾患と相関し得る生検組織における遺伝子発現を検出および定量するために使用することができる。診断または予後のために使用されるゲノムＤＮＡは、身体の細胞（例えば、血液、組織生検、手術標本または剖検材料に存在する細胞など）から得ることができる。ＤＮＡは、検出するために単離され、そのまま使用することができ、または、分析の前にポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって増幅することができる。同様に、ＲＮＡまたはｃＤＮＡもまた、ＰＣＲ増幅とともに、またはＰＣＲ増幅を伴うことなく使用することができる。特定の核酸分子を検出するために、直接的なヌクレオチド配列決定、逆転写酵素ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）、特異的なオリゴヌクレオチドを使用するハイブリダイゼーション、制限酵素消化およびマッピング、ＰＣＲマッピング、ＲＮＡｓｅ保護、ならびに様々な他の方法を用いることができる。特定の核酸分子に対して特異的なオリゴヌクレオチドを化学合成し、放射能または非放射能により標識して、膜もしくは他の固体支持体に固定化された個々のサンプルに対して、または溶液中においてハイブリダイゼーションすることができる。その後、特定の核酸分子の存在、非存在または過剰な発現を、オートラジオグラフィー、蛍光測定法または比色測定など

の方法を使用して可視化することができる。

【０１１８】

特定の局面において、上記に記載の、本発明の核酸分子に対応するポリヌクレオチドは、関連する障害（特に、前述の障害）の存在を検出するハイブリダイゼーションアッセイにおいて有用であり得る。ポリヌクレオチドは標準的な方法によって標識して、患者から得られた体液サンプルまたは組織サンプルに、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件のもとで加えることができる。好適なインキュベーション期間の後、サンプルは洗浄され、シグナルが定量され、標準値と比較される。患者サンプルにおけるシグナル量がコントロールサンプルとの比較において著しく変化している場合、サンプルにおける核酸分子の変化したレベルの存在は、関連する障害の存在を示している。そのようなアッセイはまた、動物研究において、臨床試験において特定の治療的療法の効力を評価するために、または、個々の患者の治療をモニターするために使用することができる。

【０１１９】

本発明の核酸分子における変異に関連する血管新生関連障害の診断または予後のための基礎を提供するために、核酸分子のヌクレオチド配列を、患者が変異型遺伝子を発現しているかどうかを明らかにするために、正常な組織と病的組織との間で比較することができる。

【０１２０】

本発明の核酸分子の異常な発現に関連する障害の診断または予後のための基礎を提供するために、発現についての正常または標準的なプロフィールが明らかにされる。これは、正常な対象（動物またはヒトのいずれか）から採取された体液または細胞抽出物を、本発明の核酸分子と、ハイブリダイゼーションまたは増幅のために好適な条件のもとで一緒にすることによって達成することができる。標準的なハイブリダイゼーションを、正常な対象から得られた値を、既知量の実質的に精製されたポリヌクレオチドが使用される実験からの値と比較することによって定量することができる。本発明の核酸分子の発現についての正常または標準的なプロフィールを同定するための別の方法は定量的ＲＴ－ＰＣＲ研究による。正常な個体の身体の細胞から単離されたＲＮＡ（特に、内皮細胞から単離されたＲＮＡ）が逆転写され、核酸分子について特異的なオリゴヌクレオチドを使用するリアルタイムＰＣＲが、遺伝子の正常な発現レベルを明らかにするために行われる。これらの例の両方において得られた標準値を、障害について症状を示す患者に由来するサンプルから得られた値と比較することができる。標準値からのずれが、障害の存在を明らかにするために使用される。

【０１２１】

障害の存在が明らかにされ、治療プロトコルが開始されると、ハイブリダイゼーションアッセイまたは定量的ＲＴ－ＰＣＲ研究を、患者における発現レベルが、正常な対象において観測されるレベルに近づき始めているかどうかを明らかにするために定期的に繰り返すことができる。連続したアッセイから得られる結果は、数日から数ヶ月に及ぶ期間にわたって治療の効力を示すために使用することができる。

【０１２２】

本発明のさらなる局面によれば、血管新生関連障害の診断または予後における、あるいは、そのような障害に対する素因における、上記に記載されるような本発明のポリペプチドの使用が提供される。

【０１２３】

診断アッセイまたは予後アッセイが本発明のポリペプチドに基づくことになるとき、様々な方法が可能である。例えば、診断または予後を、正常なポリペプチドおよび変異型ポリペプチドの電気泳動移動度の違いをモニターすることによって達成することができる。そのような方法は、電荷置換が存在する変異体、または、挿入、欠失もしくは置換が、生じたポリペプチドの電気泳動移動における著しい変化をもたらしている変異体を同定する際には特に有用である。あるいは、診断または予後は、正常なポリペプチドおよび変異型ポリペプチドのタンパク質分解的切断パターンの違い、様々なアミノ酸残基のモル比の違

いに基づくことができ、または、ポリペプチドの変化した機能を明らかにする機能的アッセイによることができる。

【０１２４】

別の局面において、本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を、血管新生関連障害の診断または予後のために使用することができ、あるいは、本発明のポリペプチド、またはアゴニスト、アンタゴニスト、またはその阻害剤で治療されている患者をモニターするためのアッセイにおいて使用することができる。診断目的または予後目的のために有用な抗体は、治療剤について上記に記載されたのと同じ様式で調製することができる。診断アッセイまたは予後アッセイには、ヒト体液におけるか、または、細胞もしくは組織の抽出物における関連したポリペプチドを検出するために抗体および標識を利用する方法が含まれ得る。抗体は、修飾を伴って、または修飾を伴うことなく使用することができ、また、レポーター分子の共有結合的結合または非共有結合的結合によって標識することができる。

【０１２５】

ポリペプチドについて特異的な抗体の使用に基づいてポリペプチドを測定するための様々なアッセイがこの分野では知られており、これらのアッセイは、変化した発現レベルまたは異常な発現レベルを診断するための基礎を提供する。発現についての正常値または標準値が、正常な哺乳動物対象（好ましくはヒト）から採取された体液または細胞抽出物を、ポリペプチドに対する抗体と、複合体形成のために好適な条件のもとで一緒にすることによって明らかにされる。標準の複合体形成の量は、この分野で知られている様々な方法によって定量することができる。例には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）、免疫蛍光、フローサイトメトリー、組織学、電子顕微鏡観察、インシチュアッセイ、免疫沈殿、ウエスタンブロットなどが含まれるが、これらに限定されない、例えば、ＥＬＩＳＡ技術を使用する場合、抗体に結合している酵素は、例えば、分光光度法的手段、蛍光測定法的手段または可視的手段によって検出することができる化学成分をもたらすような様式で、適切な基質（好ましくは、発色性基質）と反応する。検出はまた、抗体または抗体フラグメントが放射能標識されるＲＩＡなどの他のアッセイを使用することによって達成することができる。抗体を蛍光化合物で標識することもまた可能である。蛍光標識された抗体が特定の波長の光にさらされる場合、その存在を蛍光により検出することができる。抗体はまた、抗体を化学発光化合物にカップリングすることによって検出可能に標識することができる。その場合、化学発光標識された抗体の存在は、化学反応の経過時に生じる発光の存在を検出することによって明らかにされる。

【０１２６】

生検組織に由来する対象サンプル、コントロールサンプルおよび疾患サンプルにおいて発現しているタンパク質の量が標準値と比較される。標準値と対象値との間におけるずれにより、疾患の診断または予後を行うためのパラメーターが明らかにされる。

【０１２７】

個体が疾患に関して診断または予後予測されると、効果的な治療を、上記に記載されるように開始することができる。制御されない血管新生または増強された血管新生によって特徴づけられる血管新生関連疾患の治療では、拡大しつつある脈管構造を阻害する必要がある。これは、本発明の核酸分子またはポリペプチドを阻害することを伴う。

【０１２８】

阻害された血管新生または低下した血管新生によって特徴づけられる血管新生関連疾患の治療では、血管の拡大を強化または促進する方法が望ましい。これは、本発明の核酸分子またはポリペプチドの発現の強化、刺激または再活性化によって達成される。

【０１２９】

（マイクロアレイ）

さらなる実施形態において、本明細書中に記載される核酸分子のいずれかに由来する完全なｃＤＮＡ、オリゴヌクレオチドまたはより長いフラグメントはマイクロアレイにおけるプローブとして使用することができる。マイクロアレイは、非常に多数の遺伝子の発現

レベルを同時にモニターするために、また、遺伝的な変化体、変異および多型を同定するために使用することができる。この情報は、遺伝子機能を明らかにするために、血管新生関連障害の遺伝的基礎を理解するために、血管新生関連障害の診断または予後を行うために、また、治療剤を開発し、その活性をモニターするために使用することができる。マイクロアレイは、この分野で知られている方法を使用して調製し、使用し、かつ分析することができる（例えば、Ｓｃｈｅｎａ他（１９９６）；Ｈｅｌｌｅｒ他（１９９７）を参照のこと）。

【０１３０】

（形質転換された宿主）

本発明はまた、本発明の核酸分子を含む遺伝子改変（ノックアウト、ノックインおよび遺伝子組換え）された非ヒト動物モデルの作製を規定する。これらの動物は、核酸分子の機能の研究のために、血管新生遺伝子のプロセスを研究するために、これらの分子に関連づけられるような血管新生疾患の機構を研究するために、血管新生関連障害を治療するための候補の薬学的化合物をスクリーニングするために、コードされるポリペプチドまたは変異型ポリペプチドを発現する外植された哺乳動物細胞培養物を作製するために、また、潜在的な治療的介入を評価するために使用される。

【０１３１】

本発明の動物モデルにおける使用のために好適である動物種には、ラット、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ブタおよび非ヒト霊長類（例えば、サルおよびチンパンジーなど）が含まれるが、これらに限定されない。最初の研究のためには、遺伝子改変されたマウスおよびラットが、これらの動物のノックイン、ノックアウトまたは遺伝子組換え体を作製することが比較的容易であること、それらの管理の容易さ、およびそれらのより短い寿命のために、非常に望ましい。特定の研究のためには、遺伝子組換えされた酵母または無脊椎動物が、それらは迅速なスクリーニングを可能にし、かつ、はるかにより容易な取り扱いを提供するため、好適かつ好ましい場合がある。より長い期間の研究のためには、非ヒト霊長類が、ヒトとのそれらの類似性のために所望されることがある。

【０１３２】

本発明の核酸分子に基づく動物モデルを作製するために、いくつかの方法を用いることができる。これらには、相同的な動物遺伝子における特定の変異の作製、相同組換えによる野生型ヒト遺伝子および／またはヒト化動物遺伝子の挿入、野生型または変異型または人工的なプロモーターエレメントを使用するゲノムまたはミニ遺伝子のｃＤＮＡ構築物としての変異型ヒト遺伝子（１個または複数個）の挿入、あるいは、相同組換えによる内因性遺伝子の人為的に改変されたフラグメントの挿入が含まれるが、これらに限定されない。これらの改変では、変異型停止コドンの挿入、ＤＮＡ配列の欠失、または、Ｃｒｅリコンビナーゼなどの酵素によって認識される組換えエレメント（ｌｏｘ　ｐ部位）を含むことが含まれる。

【０１３３】

遺伝子機能の獲得をインビボで研究するための遺伝子組換えマウスを作製するために、本発明の核酸分子を、卵母細胞顕微注入などの標準的な技術を使用してマウスの生殖系列に挿入することができる。遺伝子機能の獲得は、核酸分子およびそのコードされるポリペプチド産物の過剰発現、または、調べられている核酸分子の変異の遺伝的相補を意味することができる。卵母細胞注入のために、１コピーまたは数コピーの野生型核酸分子または変異型核酸分子を受精直後のマウス卵母細胞の前核に挿入することができる。その後、この卵母細胞は偽妊娠里親に再移植される。生きて生まれたマウスは、その後、核酸分子の存在についての尾ＤＮＡの分析を使用して、組み込み体についてスクリーニングすることができる。導入遺伝子は、ＹＡＣ、ＢＡＣ、ＰＡＣまたは他の染色体ＤＮＡフラグメントとして注入された完全なゲノム配列、天然のプロモーターまたは異種のプロモーターのいずれかを有するｃＤＮＡ、あるいは、コード領域、および最適な発現のために必要であることが見出されている他のエレメントのすべてを含有するミニ遺伝子のいずれかであり得

る。

【０１３４】

ノックアウトマウスまたはノックインマウスを作製するために、マウスの胚性幹細胞（ＥＳ細胞）における相同組換えによる遺伝子標的化を適用することができる。ノックアウトマウスは、遺伝子機能の喪失をインビボで研究するために作製され、一方、ノックインマウスは機能の獲得の研究を可能にするか、または、特定の変異の影響を研究することを可能にする。ノックインマウスは遺伝子組換えマウスに類似しており、しかしながら、組み込み部位およびコピー数が前者では規定される。

【０１３５】

ノックアウトマウスの作製のために、遺伝子標的化ベクターを、マウスゲノムにおける関連した核酸分子のタンパク質コード配列が破壊（ノックアウト）されるように設計することができる。本発明のノックアウト動物は本発明の関連した核酸分子の機能的破壊を含み、その結果、その遺伝子が生物学的に活性な産物を発現しないようにされる。それは、核酸分子によってコードされる少なくとも１つの機能的活性における実質的な欠損であり得る。核酸分子によってコードされるポリペプチドの発現が実質的に存在しない（すなわち、本質的には検出できないほどの量が作製される）か、または、ポリペプチド産物の一部分のみが産生された場合などでは活性において不十分であり得る。対照的に、ノックインマウスを、関連した核酸分子を含有する遺伝子標的化ベクターがマウスゲノムにおける規定された遺伝的遺伝子座に組み込まれ得ることによって作製することができる。両方の適用のために、相同組換えが、相同的なＤＮＡ配列を認識し、それらを二重交差により交換する特異的なＤＮＡ修復酵素によって触媒される。

【０１３６】

遺伝子標的化ベクターは通常、エレクトロポレーションを使用してＥＳ細胞に導入される。その後、ＥＳ細胞の組み込み体が、標的化ベクター上に存在する抗生物質耐性遺伝子によって単離され、続いて、検討中の核酸分子が目的の遺伝子座に組み込まれているそのようなＥＳ細胞クローンを同定するために遺伝子型決定される。その後、適切なＥＳ細胞が、新規なマウス系統を作製するために生殖系列を介して伝達される。

【０１３７】

遺伝子除去が早期の胚致死性をもたらす場合、条件的遺伝子標的化を用いることができる。これは、遺伝子を時間的および空間的に制御された様式で欠失することを可能にする。上記のように、適切なＥＳ細胞が、新規なマウス系統を作製するために生殖系列を介して伝達され、しかしながら、関連する核酸分子の実際の欠失は、組織特異的な様式または時間制御された様式で成体マウスにおいて行われる。条件的遺伝子標的化は、最も一般的には、ｃｒｅ／ｌｏｘ系の使用によって達成される。酵素ｃｒｅは３４塩基対のｌｏｘＰ配列を認識することができ、その結果、ｌｏｘＰ隣接（またはフロクス（ｆｌｏｘｅｄ））ＤＮＡがｃｒｅによって認識および切り出されるようになる。遺伝子組換えマウスにおける組織特異的なｃｒｅ発現は、遺伝子標的化されたフロクスマウスをｃｒｅ遺伝子組換えマウスと交配することによって組織特異的なノックアウトマウスの作製を可能にする。ノックアウトを、「欠失体」マウスを使用して、または、誘導可能なｃｒｅ遺伝子を有する遺伝子組換えマウス（例えば、テトラサイクリン誘導可能なｃｒｅ遺伝子を有する遺伝子組換えマウスなど）を使用してどの組織でも行うことができ（Ｓｃｈｗｅｎｋ他、１９９５）、あるいは、ノックアウトを、例えば、ＣＤ１９－ｃｒｅマウスの使用によって組織特異的にすることができる（Ｒｉｃｋｅｒｔ他、１９９７）。

【０１３８】

本発明のさらに別の局面において、候補医薬品化合物をスクリーニングするための遺伝子改変された非ヒト動物の使用が提供される。

【０１３９】

本出願の請求項および本発明の説明では、文脈が、用語または必要な関係を表すために別途要求する場合を除き、表現「含む（“ｃｏｍｐｒｉｓｅ”）」または変化形（例えば、“ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ”または“ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ”など）は、包含的意味で、す

なわち、本発明の様々な実施形態においてさらなる特徴の存在または付加を排除するためではなく、述べられた特徴が存在することを具体的に述べるために使用される。

【０１４０】

（図面の簡単な説明）

図１は、ｄｂｅｓｔにおける代表的なＥＳＴ配列のインシリコ分析によって特定されたＢＮＯ６９スプライシングイソ型を示す概略図である。

図２は、ヒトの様々な正常組織サンプルおよび腫瘍組織サンプルにおけるＢＮＯ６９のイソ型Ｉおよびイソ型ＩＩのリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ発現分析を示すグラフである。ＢＮＯ６９のイソ型ＩＩＩはＨＵＶＥＣにおいて優先的な発現を示す。

図３は、Ｒｈｏ、ＲａｃおよびＣｄｃ４２の活性に対するＨＵＶＥＣにおけるＢＮＯ６９ノックダウンの影響を示す。ＢＮＯ６９は、ＨＵＶＥＣにおいて、ＲａｃおよびＣｄｃ４２に対してではなく、Ｒｈｏに対して活性を有する。ＨＵＶＥＣを、空ベクター（ＥＶ）、ＢＮＯ６９ＲおよびＢＮＯ６９変異体（Ｒ８２Ａ）によりアデノウイルス感染させ、血清非存在下で２０時間インキュベーションした。細胞を溶解し、活性Ｒｈｏ－ＧＴＰ、Ｒａｃ－ＧＴＰおよびＣｄｃ－ＧＴＰの検出についてアッセイし、空ベクター（ＥＶ）と比較したときの平均増加倍数を示す。それぞれの結果は少なくとも４回の独立した実験を表す。

図４は、活性ＲａｃについてのＮＩＨ３Ｔ３細胞におけるＢＮＯ６９ノックダウンの影響を示す。ＢＮＯ６９はＮＩＨ３Ｔ３細胞においてＲａｃに対する活性を有する。

図５は、ＢＮＯ６９はストレスファイバー形成を調節することを示す写真である。ＨＵＶＥＣを、フィブロネクチン上への置床の２４時間前に、空ベクター（ＥＶ）（Ａ）またはＢＮＯ６９Ｒ（Ｂ＆Ｃ）によりアデノウイルス感染させ、あるいは、空ベクター（Ｄ）またはＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡ（配列番号３）（Ｅ）によりレトロウイルス感染させた。ＢＮＯ６９Ｒ感染ＨＵＶＥＣをＣ３エキソ酵素（３０μｇ／ｍｌ）の非存在下（Ｂ）または存在下（Ｃ）で３２時間処理し、ローダミン－ファロイジンにより染色した。レトロウイルス感染ＨＵＶＥＣ（空ベクターおよびＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡ）をＦＩＴＣ－ファロイジンにより染色し、核をＤＡＰＩにより染色した。

図６は、ＢＮＯ６９．３（配列番号３）ｓｉＲＮＡにより媒介されるＨＵＶＥＣにおけるＢＮＯ６９発現ノックダウンのリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ分析を示すグラフである。ｓｈＲＮＡ感染細胞におけるＢＮＯ６９のｍＲＮＡ発現が、ベクターコントロールを感染させたＨＵＶＥＣにおけるこの遺伝子の発現の百分率として表される。ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡはＢＮＯ６９の全ｍＲＮＡ発現を約５０％沈黙させた。

図７は、ＢＮＯ６９のｍＲＮＡ発現を沈黙させることにより、ＨＵＶＥＣの管形成が阻害されることを示す写真である。ＢＮＯ６９．３（配列番号３）ｓｉＲＮＡまたはベクターコントロールを感染させたＨＵＶＥＣをＭａｔｒｉｇｅｌに２４時間置床した。ベクターコントロール感染細胞は管構造を形成したが、ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡを感染させたＨＵＶＥＣは管を形成することができなかった。

図８は、ＢＮＯ６９の発現を沈黙させることにより、ＨＵＶＥＣの拡大が培養においてもたらされることを示す写真である。ＢＮＯ６９．３（配列番号３）ｓｉＲＮＡ感染細胞およびベクターコントロール感染細胞の像が示される。

図９は、ＢＮＯ６９の発現を沈黙させることにより、ＨＵＶＥＣの増殖が阻害されることを示すグラフである。ＢＮＯ６９．３（配列番号３）ｓｉＲＮＡまたはベクターコントロールを感染させたＨＵＶＥＣを完全培地で７２時間培養し、細胞数を、ＭＴＴアッセイを使用して測定した。ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡを感染させた細胞は、ベクターコントロールを感染させた細胞と比較して、かなり低下した成長を示した。

図１０は、ＢＮＯ６９の発現を沈黙させることにより、ＨＵＶＥＣの遊走が阻害されることを示す写真およびグラフである。ＢＮＯ６９．３（配列番号３）ｓｉＲＮＡまたはベクターコントロールを感染させたＨＵＶＥＣを、２４時間、フィブロネクチンに向かって遊走させた。ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡを感染させた細胞は、ベクターコントロールを感染させた細胞と比較したとき、かなり低下した遊走活性を示した。

図１１は、増殖誘導のシグナル伝達を示すグラフである。ＢＮＯ６９．３（配列番号３）ｓｉＲＮＡまたはベクターコントロールを感染させたＨＵＶＥＣを、前血管新生増殖因子（ＶＥＧＦおよびｂＦＧＦ）の存在下または非存在下、基礎培地で培養した。これらの増殖因子はベクター感染細胞において増殖の増大を誘導したが、ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡを感染させた細胞では増殖を活性化することができなかった。

図１２は、様々な腫瘍細胞株サンプルにおけるＢＮＯ６９のイソ型Ｉおよびイソ型ＩＩＩのリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ発現分析を示すグラフである。

図１３は、様々な腫瘍細胞株における増殖に対するＢＮＯ６９．３（配列番号３）ｓｉＲＮＡの影響の分析を示すグラフである。

図１４は、様々な腫瘍細胞株における増殖に対するＢＮＯ６９．４（配列番号４）ｓｉＲＮＡの影響の分析を示すグラフである。

図１５は、様々な腫瘍細胞株における遊走に対するＢＮＯ６９．３（配列番号３）ｓｉＲＮＡおよびＢＮＯ６９．４（配列番号４）ｓｉＲＮＡの影響の分析を示すグラフである。

図１６は、ヌードマウスにおけるＭＤＡ－ＭＢ－２３１同所性異種移植片に対するＢＮＯ６９．３（配列番号３）ｓｉＲＮＡの影響の分析を示すグラフである。

図１７は、ヌードマウスにおけるＭＤＡ－ＭＢ－２３１同所性異種移植片に対するＢＮＯ６９．４（配列番号４）ｓｉＲＮＡの影響の分析を示すグラフである。

【実施例】

【０１４１】

ＢＮＯ６９イソ型の同定および機能分析

材料および方法

内皮細胞の培養および感染

ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）をＣｌｏｎｅｔｉｃｓ（ｃｃ－２５１９）から購入し、ＥＧＭ－２Ｂｕｌｌｅｔキット（Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ、ｃｃ－３１６２）で培養した。細胞を最大で６回の継代まで毎週、継代培養した。

【０１４２】

腫瘍細胞および細胞培養

ＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳腺ガン細胞株をＡＴＣＣ（Ｃａｔ．ＨＢＴ－２６）から得て、１０％のウシ胎児血清（ＦＢＳ；ＪＲＨ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（Ｇｉｂｃｏ、Ｃａｔ．１５６３０－０８０）、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム（Ｇｉｂｃｏ、Ｃａｔ．１１３６０－０７０）および１％のペニシリン／ストレプトマイシン／グルタミン（ＰＳＧ；Ｇｉｂｃｏ、Ｃａｔ．１０３７８－０１６）が補充されたＲＰＭＩ培地（Ｇｉｂｃｏ、Ｃａｔ．２１８７０－０７６）で培養した。培地を２日～３日毎に新しい培地により取り換え、週に１回、１：４の継代培養比で３ヶ月まで継代培養した。Ｕ－８７ＭＧ脳神経膠芽細胞腫細胞株をＡＴＣＣ（Ｃａｔ．ＨＴＢ－１４）から得て、１０％のウシ胎児血清（ＦＢＳ；ＪＲＨ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（Ｇｉｂｃｏ、Ｃａｔ．１５６３０－０８０）、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム（Ｇｉｂｃｏ、Ｃａｔ．１１３６０－０７０）、０．１ｍＭの非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ；Ｇｉｂｃｏ、Ｃａｔ．１１１４０－０５）および１％のペニシリン／ストレプトマイシン／グルタミン（ＰＳＧ；Ｇｉｂｃｏ、Ｃａｔ．１０３７８－０１６）が補充されたＥＭＥＭ培地（イーグル最少必須培地、ＭｕｌｔｉＣｅｌ、Ｃａｔ．１１－０５０－０５００Ｖ）で培養した。培地を２日～３日毎に新しい培地により取り換え、週に１回、１：５の継代培養比で３ヶ月まで継代培養した。使用されたすべての腫瘍細胞（細胞株の完全な詳細については図１２を参照のこと）を５％CO_2／空気において３７℃で加湿インキュベーターにおいて維持した。

【０１４３】

組換えＢＮＯ６９クローンの作製

ＨＵＶＥＣのＲＮＡを単離し、ｃＤＮＡを逆転写によって作製した。プライマーを、ＢＮＯ６９の５’側のｃＤＮＡフラグメントおよび３’側のｃＤＮＡフラグメントを増幅す

るために設計した。両方のＰＣＲ生成物をｐＧＥＭ－Ｔｅａｓｙベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ）にクローン化し、配列決定によって確認し、共通する内部のＢａｍＨＩ部位を介して連結した。ＢＮＯ６９変異体（Ｒ８２Ａ）を作製するために、ＢＮＯ６９イソ型ＩＩの８２位におけるアルギニンのコドン（ＣＧＡ）を、ＰＣＲ変異誘発法を使用してアラニン（ＧＣＡ）に変化させた。ＢＮＯ６９またはＲ８２Ａ変異体のｃＤＮＡをｐＧＥＭ－ＴｅａｓｙからＮｏｔＩにより切り出し、シャトルベクターｐＡｄＴｒａｃｋ－ＣＭＶ（Ｑｂｉｏｇｅｎｅ）に（ＢＮＯ６９について両方の向きで）サブクローン化した。５’－ＦＬＡＧタグ化ＢＮＯ６９をＰＣＲによって作製し、ｐＡｄＴｒａｃｋ－ＣＭＶのＥｃｏＲＶ部位にクローン化した。組換えアデノウイルスを、ｐＡｄＥａｓｙシステム（Ｑｂｉｏｇｅｎｅ）を使用して作製した。ウイルス力価を、ＴＣＩＤ$_{50}$法を使用して決定し、ウイルス粒子数をＯＤ６００ｎｍで定量した。

【０１４４】

遺伝子移入実験のために、細胞を８０％のコンフルエンスに成長させ、これに、類似するレベルのＧＦＰ発現をもたらす量のｐＡｄＥａｓｙ空ベクター（ＥＶ）、ｐＡｄＥａｓｙ－ＢＮＯ６９アンチセンス（ＢＮＯ６９Ｒ）、ｐＡｄＥａｓｙ－ＢＮＯ６９センス（ＢＮＯ６９Ｆ）またはｐＡｄＥａｓｙ－ＢＮＯ６９Ｒ８２Ａ（Ｒ８２Ａ）変異体のウイルス粒子を感染させた。

【０１４５】

ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡ配列およびＢＮＯ６９．４ｓｉＲＮＡ配列を発現するレトロウイルスベクターの作製

ｐＭＳＣＶｐｕｒｏ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を、短いヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）を生成させるレトロウイルスベクターを作製するために改変した。これを行うために、ｐＭＳＣＶｐｕｒｏの３’ＬＴＲをＸｂａＩ／ＮｈｅＩフラグメントの除去によって不活性化した。その後、Ｈ１－ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩのプロモーターカセットをベクターの多重クローニング部位（ＭＣＳ）に挿入した。ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡ配列（配列番号３）またはＢＮＯ６９．４ｓｉＲＮＡ配列（配列番号４）を改変ｐＭＳＣＶｐｕｒｏベクターに短いヘアピン配列形式でクローン化した。このｓｈＲＮＡ形式は、ｓｉＲＮＡ配列、その後に、一般的な９ヌクレオチドの配列、その後に、ｓｉＲＮＡの逆向き相補体を含む。ＢＮＯ６９．３およびＢＮＯ６９．４に対応するｓｈＲＮＡ配列が配列番号６および配列番号７によってそれぞれ表される。宿主細胞のゲノムに組み込まれたとき、ｓｉＲＮＡは、その逆向き相補体にアニーリングすることによって二本鎖構造を形成する。９ヌクレオチドの一般的配列はループを二本鎖分子の一方の端部で形成する。陰性コントロールには、ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡおよびＢＮＯ６９．４ｓｉＲＮＡに関して類似するＧＣ含有量を含有するので、配列５’－ＡＧＧＣＡＴＣＡＧＣＧＧＡＣＣＴＣＡＴ－３’（配列番号１８）、または、ベクターのみの構築物が含まれた。

【０１４６】

レトロウイルス粒子の作製

２９３Ｔ細胞（ＡＴＣＣ、Ｃａｔ．ＣＲＬ－１１２６８）を、１０％ＦＣＳが補充され、抗生物質を含まないＲＰＭＩ培地においてトランスフェクションの１８時間前～２４時間前に１．７×１０^{7}細胞／Ｔ１７５フラスコの密度で置床した。細胞を、ＬＦ２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）試薬を使用して、２８μｇのレトロウイルスベクター（ＤＮＡ）、２３μｇのｐＶＰａｃｋ　ＶＳＶ－Ｇ、２３μｇのＰＶＰａｃｋ　ＧＰと同時トランスフェクションした。トランスフェクションされた細胞を５％ＣＯ$_{2}$において３７℃で一晩インキュベーションした。翌日、ＤＮＡ／ＬＦ２０００複合体を含有する培地を除き、１０％のＦＣＳ、１ＭのＨＥＰＥＳおよび１％のＰＳＧが補充されたＲＰＭＩにより取り換えた。ウイルス含有上清をトランスフェクション後４８時間～７２時間で集め、細胞破片をペレット化するために遠心分離し、その後、無菌の０．４５μｍのフィルターを使用してろ過した。ウイルスを小分けし、－８０℃で貯蔵した。ウイルス力価を、連続希釈でのウイルス上清を利用して、ＮＩＨ－３Ｔ３細胞に感染させ、その後、ＮＩＨ－３Ｔ３細胞をピューロマイシン選択下で７日間培養して測定した。

【０１４７】
ＨＵＶＥ細胞のレトロウイルス感染
ＨＵＶＥ細胞を６ウエルプレートのウエルあたり１．３×１０^{5}細胞の密度でＥＧＭ－２完全培地において置床した。５００μｌのウイルス上清を５００μｌのＥＧＭ－２完全培地と一緒にした。ポリブレンを８μｇ／ｍｌの最終濃度に加えた。細胞をウイルス混合物とともに３７℃および５％CO_2でインキュベーションした。３時間のインキュベーションの後、さらに１．０ｍｌのＥＧＭ－２培地を加え、細胞をさらに２４時間インキュベーションした。続いて、細胞を、ピューロマイシン（０．３５μｇ／ｍｌの最終濃度）を含有するＥＧＭ－２完全培地でインキュベーションした。細胞を、ピューロマイシンにより処理された未感染の細胞が死滅し、感染した耐性細胞がコンフルエンスに成長するまでインキュベーションした。ピューロマイシンを含有する培地を、ピューロマイシンを補充し、かつ、細胞破片を除くために、４８時間毎に取り替えた。耐性細胞がコンフルエンスに成長したら（選択開始後、約４日～５日）、細胞を、その使用前にＰＢＳで洗浄し、トリプシン処理した。

【０１４８】
腫瘍細胞のレトロウイルス感染
腫瘍細胞（それぞれの細胞株について）を、前記に記載されたような補充されたＲＰＭＩ培地において感染の１８時間前～２４時間前に２×１０^{6}細胞／Ｔ１７５フラスコの密度で置床した。感染時に、培地をフラスコから吸引し、ウイルス上清を、ポリブレンを８μｇ／ｍｌの最終濃度で含有する合計で１５ｍｌの補充されたＲＰＭＩ培地において１：１０のｍ．ｏ．ｉに加えた。細胞を、５％CO_2／空気での加湿条件において３７℃で４時間、ウイルス混合物とインキュベーションした。このインキュベーションの後、さらに２５ｍｌの培地を各フラスコに加え、細胞をさらに２４時間インキュベーションした。続いて、新鮮な培地を、さらに２４時間細胞に加え、その後、細胞をピューロマイシンにより処理された未感染の細胞が死滅し、感染した耐性細胞がコンフルエンスに成長するまでピューロマイシン選択（０．６μｇ／ｍｌ）下で成長させた。ピューロマイシンを含有する培地を、ピューロマイシンを補充し、かつ、細胞破片をも除くために、４８時間毎に取り替えた。耐性細胞が選択されたら（選択開始後４日～５日）、細胞をＰＢＳで洗浄し、トリプシン処理し、そして、動物への注入の前に、カルシウムおよびマグネシウムを含まないダルベッコＰＢＳ（ＳＩＧＭＡ、Ｃａｔ．Ｄ８６６２）に再懸濁し、あるいは、下記に概略されるような増殖アッセイまたは遊走アッセイのために置床した。細胞には、行われた実験に依存して、下記のウイルス粒子を感染させた：ｐＭＳＣＶｐｕｒｏベクター単独（ＤＮＡ挿入なし）、ｐＭＳＣＶｐｕｒｏ－ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡまたはｐＭＳＣＶｐｕｒｏ－ＢＮＯ６９．４ｓｉＲＮＡ。さらに未処理の細胞を培養し、各実験に対する別のコントロール群として寄与する感染細胞と同じ日に集めた。

【０１４９】
ＨＵＶＥ細胞における発現分析
リアルタイムＲＴ－ＰＣＲを利用して、発現分析を行った。総ＲＮＡを、オンカラムＤＮａｓｅ処理を含めて、ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉキット（Ｑｉａｇｅｎ）を製造者の説明書に従って使用してＨＵＶＥ細胞から単離した。総ＲＮＡを、品質および純度を調べるために、臭化エチジウムを含有する１．２％ＴＢＥアガロースゲルで可視化した。総ＲＮＡ濃度を分光光度計でA_{260}によって求めた。総ＲＮＡ（１ｕｇ／ｍｌ）を、Ｍ－ＭＬＶ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を製造者の使用説明書に従って使用して逆転写した。リアルタイムＲＴ－ＰＣＲをＲｏｔｏｒＧｅｎｅ（商標）２０００（Ｃｏｒｂｅｔｔ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）で行った。反応ではＡｍｐｌｉＴａｑ　Ｇｏｌｄ酵素（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用し、反応は製造者の説明書に従った。サイクル処理条件は、典型的には、９４℃で１２分間、その後、９４℃で１５秒間、５７℃で１５秒間および７２℃で２０秒間の３５サイクルであった。すべてのデータをハウスキーピング遺伝子のＰＯＬＲ２Ｋ（ＲＮＡポリメラーゼＩＩ）の発現に対して正規化した。

【０１５０】

腫瘍細胞における発現分析

リアルタイムＲＴ－ＰＣＲを利用して、発現分析を行った。総ＲＮＡを、オンカラムＤＮａｓｅ処理を含めて、ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉキット（Ｑｉａｇｅｎ）を製造者の説明書に従って使用してすべての細胞株から単離した。総ＲＮＡを、品質および純度を調べるために、臭化エチジウムを含有する１．２％ＴＢＥアガロースゲルで可視化した。総ＲＮＡ濃度を分光光度計でＡ２６０によって求めた。総ＲＮＡ（１μｇ／ｍｌ）を、Ｍ－ＭＬＶ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を製造者の説明書に従って使用して逆転写した。リアルタイムＲＴ－ＰＣＲをＲｏｔｏｒＧｅｎｅ（商標）２０００（Ｃｏｒｂｅｔｔ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）で行った。反応ではＡｍｐｌｉＴａｑ　Ｇｏｌｄ酵素（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用し、反応は製造者の使用説明書に従った。サイクル処理条件は、典型的には、９４℃で１２分間、その後、９４℃で１５秒間、５７℃で１５秒間および７２℃で２０秒間の３５サイクルであったが、ある程度の最適化が、選択されたプライマー対には必要であった。すべてのデータをハウスキーピング遺伝子のＰＯＬＲ２Ｋ（ＲＮＡポリメラーゼＩＩ）の発現に対して正規化した。

【０１５１】

増殖アッセイ－ＨＵＶＥ細胞

感染細胞を、ＥＢＭ＋０．５％ＦＢＳにおいて１０００細胞／ウエルで、三連で９６ウエルプレートに置床した。細胞を３７℃および５％CO_2で一晩培養した。増殖を、血管新生増殖因子のＶＥＧＦ（１０ｎｇ／ｍｌ）およびｂＦＧＦ（１０ｎｇ／ｍｌ）、または、陰性コントロールとしてのＥＢＭ＋０．５％ＦＢＳ単独の添加によって誘導した。培地を４８時間毎に取り替え、ＭＴＴアッセイを様々な時点で行った。簡単に記載すると、２０μｌのＭＴＴ試薬を、１００μｌのＥＢＭ＋０．５％ＦＢＳを含有する細胞に加え、３７℃で２時間インキュベーションした。吸光度を４９２ｎｍで測定した。

【０１５２】

増殖アッセイ－腫瘍細胞

短期間アッセイ（接種後９６時間までの時点）については、感染細胞を、２００μｌの補充されたＲＰＭＩ培地（上記に記載される通り）において１０００細胞／ウエルで、三連で９６ウエルプレートに置床した。ＭＴＴアッセイを細胞接種後２４時間の時点から９６時間までで行った。（異種移植片実験に関連する）長期間アッセイについては、感染細胞を、２００μｌの補充されたＲＰＭＩ培地（上記に記載される通り）において２００細胞／ウエルで、三連で９６ウエルプレートに置床した。培地を７日毎に取り替え、ＭＴＴアッセイを、それぞれの異種移植片実験について下記で指定されるようなそれぞれの測定時点で行った。増殖アッセイを行うために、下記の工程を行った：最初に培地をウエルから吸引し、１００μｌの新鮮な培地を加え、続いて、２０μｌのＭＴＴ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｃａｔ．Ｇ３５８１）を加えた。細胞を３７℃で２時間インキュベーションした。吸光度を４９２ｎｍで測定した。

【０１５３】

Ｍａｔｒｉｇｅｌアッセイ－ＨＵＶＥ細胞

感染ＨＵＶＥＣを２．５×10^4細胞／ウエルで９６ウエルプレートに置床した。ウエルをＥＧＭ－２培地における５０ｕｌのＭａｔｒｉｇｅｌ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）により事前に被覆した。ＨＵＶＥＣを３７℃での５％CO_2における２２時間のインキュベーションによって管を形成させた。

【０１５４】

遊走アッセイ－ＨＵＶＥ細胞

遊走アッセイを、８μｍの細孔サイズのフィルターを伴うＮｅｕｒｏｐｒｏｂｅ　ＣｈｅｍｏＴＸ９６ウエルプレートにおいて行った。フィルターの下面側を４０μｌの５ｕｇ／ｍｌのフィブロネクチン（または、ＭＤＡ－ＭＢ２３１のアッセイについてはＮＩＨ３Ｔ３馴化培地）により被覆し、ＲＴで１時間インキュベーションした。ＨＵＶＥＣを集め、ＭＣＤＢ１３１培地＋０．１％ＢＳＡで洗浄した。５×10^4個の細胞を４０μｌの培地においてウエルあたり接種し、３７℃で２４時間インキュベーションした。フィルター

の上面側の細胞を１％クリスタルバイオレット／２０％メタノールにより固定処理／染色した。染色を１００ｕｌの３３％酢酸の添加によって定量し、吸光度を５４０ｎｍで読み取った。

【０１５５】

遊走アッセイ－腫瘍細胞

遊走アッセイを、８ｕｍの細孔サイズのフィルターを伴うＮｅｕｒｏｐｒｏｂｅ ＣｈｅｍｏＴＸ９６ウエルプレートにおいて行った。細胞を集め、培地＋０．１％ＢＳＡで洗浄した。５×１０^{4}個の細胞を４０μｌの培地においてウエルあたり接種し、３７℃で１２時間インキュベーションした。下部チャンバーをＮＩＨ３Ｔ３馴化培地で満たした。１２時間のインキュベーション期間の後、走化性フィルターの下面側の細胞を１％クリスタルバイオレット／２０％メタノールにより固定処理／染色した。染色を１００μｌの３３％酢酸の添加によって定量し、吸光度を５４０ｎｍで読み取った。それぞれの走化性メンブランの下面側の画像ファイルを、ＣＣＤ Ｏｐｔｒｏｎｉｃｓ高分解能カメラを伴うＯｌｙｍｐｕｓ ＢＸ５１顕微鏡において４×対物レンズを使用して捕捉した。すべてのサンプルを三重に調べた。

【０１５６】

Ｆ－アクチン染色

内皮細胞をフィブロネクチン被覆のＬＡＢ－ＴＥＫ（商標）チャンバースライド（Ｎａｌｇｅ、Ｎｕｎｃ Ｉｎｔ．）に置床した。細胞をＣ３エキソ酵素（３０μｇ／ｍｌ）の存在下または非存在下で３２時間成長させ、その後、Ｃ３エキソ酵素の存在下または非存在下でまた、一晩、血清飢餓状態にした。アンチセンスＢＮＯ６９を含有するアデノウイルスを感染させた細胞をローダミン－ファロイジン（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ Ｉｎｃ．）により染色し、一方、ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡを含有するレトロウイルスを感染させた細胞をＦＩＴＣ－ファロイジン（Ｓｉｇｍａ）により染色し、核をＤＡＰＩ（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｉｎｃ．）により染色した。アクチンフィラメントを、落射蛍光顕微鏡を使用して観察した。

【０１５７】

Ｒｈｏ、ＲａｃおよびＣｄｃ４２のＧＴＰ活性アッセイ

細胞を一晩にわたって血清枯渇させた（ＥＢＭ、Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ）。Ｒｈｏ、ＲａｃおよびＣｄｃ４２の活性を、ＥＺ－Ｄｅｔｅｃｔ（商標） Ｒｈｏ，Ｒａｃ ｏｒ Ｃｄｃ４２活性化キット（Ｐｉｅｒｃｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を使用して測定した。活性なタンパク質を、ＲｈｏまたはＲａｃまたはＣｄｃ４２に対するモノクローナル抗体を使用するウエスタンブロッティングによって検出した。

【０１５８】

Ｒａｃ－ＧＴＰ活性アッセイ

アンチセンスＢＮＯ６９を含有するレトロウイルス（ＢＮＯ６９Ｒ）または空ベクター（ＥＶ）により形質導入されたＮＩＨ３Ｔ３細胞株を一晩にわたって血清飢餓状態にし、溶解した。活性ＲａｃＧＴＰを、（ｐ２１活性化キナーゼ由来の）ｐ２１結合ドメインのＧＳＴ融合タンパク質およびグルタチオン－セファロースに結合することによって破壊した。セファロース結合画分および総細胞溶解物をウエスタンブロットし、抗Ｒａｃ抗体によりプローブした。

【０１５９】

軟寒天アッセイ

細胞（５×１０^{5}個）をＤＭＥＭ培地／０．３％アガロースの懸濁物に入れ、ＤＭＥＭ培地／０．７％アガロースにより事前に被覆されたプレートにおいて、ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡまたはベクターのみのコントロールのいずれかの存在下、３７℃／５％CO_2で２週間にわたって培養した。

【０１６０】

無胸腺ヌードマウス

メスの無胸腺ＢＡＬＢ／ｃ－ｎｕ／ｎｕマウスをこの研究のために使用した。マウスは

６週齢～８週齢であり、ＡＲＣ Ｗｅｓｔｅｒｎ Ａｕｓｔｒａｌｉａから購入し、数日間順応させた。すべての動物を無菌条件下で収容し、Ｆｌｉｎｄｅｒｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ ＳＡおよびＮＨ＆ＭＲＣのガイドライン、ならびに、科学的目的の動物の管理および使用のためのオーストラリア実施規定に従って世話した。

【０１６１】

同所性腫瘍モデル

未処理のＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞、または、以前に記載されたように感染させ、ピューロマイシン選択されたＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞をそれぞれのメス無胸腺マウスに注射した。各マウスに、５０μｌのダルベッコＰＢＳにおける2×10^{6}個の細胞を乳房脂肪体のすぐ上方で、右側前肢の下方に皮下注射した。各マウス群を別個のケージに収容し、約５週間にわたって週に３回、腫瘍の成長を、デジタルカリパスを使用して測定し、また、動物を健康状態について調べた。腫瘍の体積を、長さ×幅×高さの積として計算した。実験終了時、マウスを屠殺し、腫瘍を切除し、写真撮影し、その後、ＯＣＴコンパウンド（Ｔｉｓｓｕｅ－Ｔｅｋ；Ｓａｋｕｒａ）において液体窒素で冷凍し、切片化するまで－８０℃で保存した。

【０１６２】

組織学

すべてのマウスからの凍結された腫瘍を、クライオスタットを使用して切断した。１０μｍ厚の切片を切断した。切片を続いて固定処理し、ビオチンコンジュゲート化ラット抗α－マウスＣＤ３１一次抗体（１：２００の希釈度、Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）で４時間染色し、その後、Ｅｘｔｒａ Ａｖｉｄｉｎ（１：８０の希釈度、ＳＩＧＭＡ、Ｃａｔ．Ｅ－４８８９）と２０分間インキュベーションした。さらなる染色を、Ｆａｓｔ Ｒｅｄ（ＳＩＧＭＡ ＦＡＳＴ（登録商標） Ｆａｓｔ Ｒｅｄ ＴＲ／Ｎａｐｔｈｏｌ ＡＳ－ＭＸ、Ｃａｔ．Ｆ－４６４８）との１０分間のインキュベーション、その後、Ｍａｙｅｒ’ｓ Ｈａｅｍａｔｏｘｙｌｉｎ（ＳＩＧＭＡ、Ｃａｔ．ＭＨＳ－１）との５分間のインキュベーションの最終工程により行った。スライド片を固定し、切片をＯｌｙｍｐｕｓ ＢＸ５１顕微鏡で観察した。切片を写真撮影し（５視野／切片）、毛細管を表す領域を捉え、画像分析ソフトウエア（ＩｍａｇｅＪ）によって分析した。

【０１６３】

統計学的分析－腫瘍細胞および異種移植片モデル

増殖データおよび遊走データは平均±ＳＤとして表され、分析を、各処理群（ｐＭＳＣＶ－ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡまたはｐＭＳＣＶ－ＢＮＯ６９．４ｓｉＲＮＡ）とコントロール群（ｐＭＳＣＶｐｕｒｏベクター単独）との間での差を明らかにするためにアンペアード両側ｔ検定を利用して行う。異種移植片データは平均±ＳＥＭとして示される。分散分析（ＡＮＯＶＡ）を、事後検定としてチューキーの検定を用いてそれぞれの時での群間の差を明らかにするために行った。すべての統計学的分析ではＧｒａｐｈＰａｄ ＰＲＩＳＭソフトウエア（バージョン４；ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｉｎｃ．）を利用した。$p<0.05$の値を、統計学的に有意であると見なした。

【０１６４】

結果／考察

ＢＮＯ６９イソ型の同定およびそのＧＡＰ活性の分析

血管新生時における調節された遺伝子の同定により、治療用薬物開発のための新規な標的の特徴づけがもたらされ得る。この目的のために、本発明者らは、形態学的事象および経時的な変化が十分に特徴づけられているインビトロ血管新生のモデルを利用している（Ｇａｍｂｌｅ他、１９９９；Ｍｅｙｅｒ他、１９９７）。ヒト臍帯静脈内皮細胞は、増殖因子、ＰＭＡ、および、インテグリン（α２β１）に対する抗体の存在下での３Ｄコラーゲンゲルに置床されたとき、２４時間にわたって毛細管を作製するように誘導される。重要な時点（すなわち、０時間、０．５時間、３時間、６時間および２４時間）でのこの細胞の単離、および、ＰＣＲに基づく抑制サブトラクティブハイブリダイゼーション法を利用することにより、調節された遺伝子の単離が可能であった。

【０１６５】
このような遺伝子の１つが、この遺伝子がＧＡＰ活性を有し得ることを示唆するＧＴＰａｓｅ活性化タンパク質（ＧＡＰ）ドメインを含有する新規なタンパク質をコードするＢＮＯ６９であった。ＢＬＡＳＴ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｒｅ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ－ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／）を使用してｄｂｅｓｔデータベースから検索されたＢＮＯ６９に対応するＥＳＴ配列のインシリコ分析により、選択的エキソンスプライシング事象の生成物を構成すると考えられる３つの主要なＢＮＯ６９ｍＲＮＡ転写物を集めることができた（図１）。本発明者らは、これらのイソ型の存在を確認するためにリアルタイムＰＣＲ分析を行った。本発明者らのデータは、優勢に発現しているイソ型がＩおよびＩＩＩであることを示している。イソ型Ｉは、ＨＵＶＥＣにおいて低レベルで発現することが見出され、しかしながら、対照的に、イソ型ＩＩＩはＨＵＶＥＣにおける優先的な発現を示した（図２）。３つのすべてのイソ型がＧＡＰドメインを含有していた。

【０１６６】
ＢＮＯ６９のＧＡＰドメインを他のＧＡＰタンパク質のＧＡＰドメインと比較することにより、他の知られているＲｈｏＧＡＰ含有タンパク質（例えば、Ｂｃｒ、Ｎ－チメリン、ｐ５０ＲｈｏＧＡＰおよびｐ１９０ＲｈｏＧＡＰなど）に対するかなりの相同性が明らかにされた。この相同性領域は約１６０個のアミノ酸残基を含み、ＧＡＰドメインの構造的一体性のために非常に重要な１０個の残基、ＧＡＰ活性に対して触媒的に非常に重要な３つの残基（ｐ５０ＲｈｏＧＡＰのドメインに関してＡｒｇ８５、Ａｓｎ１８８およびＬｙｓ１７２）、および、ＧＴＰの加水分解を促進させる５つの残基（Ｇｙｌ８２、Ｌｅｕ１３２、Ｌｅｕ１７８、Ｍｅｔ１９０およびＡｓｎ１９４）が含まれる（Ｒｉｔｔｉｎｇｅｒ他、１９９７；Ｂａｒｒｅｔｔ他、１９９７；Ｍｕｓａｃｃｈｉｏ他、１９９６）。ＢＮＯ６９タンパク質は、ＧＡＰドメインの構造的一体性に関与する１０個の残基のうちの９個を有し、ＬｅｕからＩｌｅへの１つの保存的変化を有する。３個すべての触媒作用アミノ酸および５個中４個のＧＴＰ加水分解促進残基が同一であり、ＬｅｕからＶａｌへの１つの保存的変化を有する。この高度に保存された同一性は、ＢＮＯ６９がＧＡＰ活性を有し得ることを示唆している。

【０１６７】
この仮説を調べるために、ＢＮＯ６９のアンチセンス構築物（ＢＮＯ６９Ｒ）を発現するアデノウイルスを、Ｒｈｏ、ＲａｃおよびＣｄｃ４２の活性に対するＢＮＯ６９ノックダウンの影響を調べるために内皮細胞に送達した。図３における結果は、ＢＮＯ６９Ｒにより、Ｒｈｏ活性が、空ベクター（ＥＶ）感染細胞と比較して、内皮細胞では増大したことを示している。行った５回の実験では、ＢＮＯ６９ＲによるＲｈｏ活性における３．１±０．５倍の増大が認められた。ＢＮＯ６９Ｒによる、活性ＲａｃまたはＣｄｃ４２における変化は見られなかった（両方の場合において１．１±０．３倍の増大）。このことから、ＢＮＯ６９タンパク質は、ＲａｃまたはＣｄｃ４２に対してではなく、Ｒｈｏに対して内皮細胞において特異性を有する活性ＲｈｏＧＡＰドメインを含有することが確認される。このことは、ＮＩＨ３Ｔ３細胞で観測された結果（図４）とは対照的であり、ＮＩＨ３Ｔ３細胞では、アンチセンスＢＮＯ６９（ＢＮＯ６９Ｒ）を発現するレトロウイルスベクターを使用するＢＮＯ６９発現の阻害により、Ｒａｃ活性の約３倍の増大がもたらされている。このことは、ＢＮＯ６９のＧＡＰドメインはＲｈｏファミリーの多数のメンバーに細胞特異的な様式で結合できることを示唆している。

【０１６８】
タンパク質構造分析から、ｐ５０ＲｈｏＧＡＰにおけるＡｒｇ８５に対応する高度に保存されたＡｒｇ残基が、Ｒｈｏ標的タンパク質に結合し、かつ、Ｒｈｏ結合ＧＴＰの加水分解を増大させるために非常に重要である（Ｒｉｔｔｉｎｇｅｒ他、１９９７；Ｂａｒｒｅｔｔ他、１９９７；Ｍｕｓａｃｃｈｉｏ他、１９９６）。このアミノ酸残基はＢＮＯ６９におけるＡｒｇ８２（ＢＮＯ６９イソ型ＩＩの番号づけに基づく）に対応しており、本発明者らはこの残基をＡｌａに変異させた（Ｒ８２Ａ）。この変異体の内皮細胞における

発現は、Ｒｈｏ活性の２．６±０．７倍の増大（ｎ＝４回の実験）を示した（図３）。このことは、この変異がＢＮＯ６９のＧＡＰ活性を除去し、かつ、優性ネガティブ形態を生じさせることと一致しており、さらに、ＢＮＯ６９が実際にＲｈｏＧＡＰファミリーのメンバーであることを確認している。

【０１６９】

内皮細胞におけるＲｈｏ活性と一致して、ＢＮＯ６９Ｒ感染内皮細胞およびＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡ感染内皮細胞は、最小限のストレスファイバー（刺激されていない内皮細胞に特徴的である）を伴う古典的な皮質性アクチンタイプの形態学を示した空ベクターコントロール細胞と比較して、増大したストレスファイバー形成を示した（図５Ａおよび図５Ｄ）。対照的に、ＢＮＯ６９Ｒ感染内皮細胞およびＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡ感染内皮細胞は、優勢な厚いＦ－アクチン束（ストレスファイバー）を、平行するアレイでアラインメントされて示した（それぞれ、図５Ｂおよび図５Ｅ）。ストレスファイバー形成の影響がＲｈｏによって媒介されたことを確認するために、ＢＮＯ６９Ｒ感染ＨＵＶＥＣをＲｈｏ特異的阻害剤のＣ３トランスフェラーゼにより処理し、その後、Ｆ－アクチンについて染色した。Ｃ３トランスフェラーゼの存在下では、ストレスファイバー形成がなくなった（図５Ｃ）。このことは、ストレスファイバーが、Ｒｈｏにおける変化により、ＢＮＯ６９Ｒ感染細胞において誘導されることを示唆している。

【０１７０】

ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡはＨＵＶＥ細胞の機能を阻害する

血管新生プロセスにおけるＢＮＯ６９の役割および内皮細胞の機能についてのＢＮＯ６９の役割を明らかにするために、ＢＮＯ６９遺伝子発現のｓｉＲＮＡ媒介による沈黙化の影響の研究を行った。最初に、ＨＵＶＥＣに、ＢＮＯ６９に対して特異的な様々な短いヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）配列を発現するレトロウイルスを感染させた。その後、ＢＮＯ６９のｍＲＮＡレベルを定量的リアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって求め、ベクターのみのコントロールを感染させた細胞におけるＢＮＯ６９レベルと比較した。ＲＮＡポリメラーゼの発現をデータ正規化のために使用した。これらの研究では、ＢＮＯ６９ｍＲＮＡの発現を沈黙させることにおけるｓｈＲＮＡプローブの効率が評価された。ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡはＢＮＯ６９の発現を約５０％沈黙させ（図６）、これをその後の実験では使用した。これらの研究では、内皮細胞の機能に対する変化を調べるためのシステム、例えば、細胞増殖の変化、細胞遊走の変化、および、毛細管形成に対する影響（これらはすべてが血管新生プロセスの不可欠な特徴である）などを明らかにするためのシステムが組み込まれた。

【０１７１】

これらの実験では、ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡを感染させたＨＵＶＥＣは、Ｍａｔｒｉｇｅｌ上で培養されたとき、毛細管を形成することができないことが明らかにされた。図７に示され得るように、ベクターのみを感染させた細胞は管構造を形成し（右パネル）、一方、ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡを感染させた細胞は管を形成することができなかった（左パネル）。加えて、ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡ感染細胞は、図８（右パネル）に示されるように、ベクターのみを感染させた細胞（左パネル）と比較して拡大していた。ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡ感染細胞はまた、その増殖能（図９）および遊走能（図１０）を失っていた。ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡにより媒介される沈黙化の抗増殖作用からＨＵＶＥＣを救済する前血管新生性増殖因子（ＶＥＧＦおよびｂＦＧＦ）の能力もまた評価した。図１１に示され得るように、ＢＮＯ６９．３を感染させたＨＵＶＥＣは、培養培地におけるこれらの増殖因子の存在にもかかわらず、増殖することが依然としてできないままであった。この観測結果は、ＶＥＧＦおよびｂＦＧＦのシグナル伝達経路が収束するところでＢＮＯ６９が機能することを示唆している。このことは、ＶＥＧＦおよびｂＦＧＦのような血管新生性刺激因子の産生の間で切り換える腫瘍の明らかにされた能力を考えると、重要である。結果として、腫瘍は、これらの２つのシグナル伝達経路のいずれかを標的化する任意の薬剤に対する抵抗性を発達させる能力を有する。しかしながら、ＢＮＯ６９を標的とする薬物は、腫瘍はこれら２つの血管新生性刺激因子の間を切り換えることができるこ

とを明らかにすると考えられる。

【０１７２】

ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡおよびＢＮＯ６９．４ｓｉＲＮＡは腫瘍細胞の成長および遊走を阻害する

腫瘍細胞株におけるＢＮＯ６９イソ型の発現（図１２）により、本発明者らは、腫瘍細胞の成長におけるこの遺伝子の役割を調べることが駆り立てられた。数多くの腫瘍細胞株に、ＢＮＯ６９のイソ型Ｉおよびイソ型ＩＩＩの両方を沈黙させるＲＮＡｉ分子（ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡ）、または、ＢＮＯ６９イソ型Ｉのみを沈黙させるＲＮＡｉ分子（ＢＮＯ６９．４ｓｉＲＮＡ）を産生するウイルスを感染させた。これらの細胞株は、乳房および脳を含む種々の腫瘍タイプを代表している（図１２）。

【０１７３】

感染させた細胞株を、検討中のｓｈＲＮＡ分子を発現する細胞について濃縮するために、ピューロマイシンに対する耐性（ｓｈＲＮＡ分子をコードする配列を含有するウイルスベクターによって発現されるマーカー）について選択した。４日間の選択を行った後、細胞を９６ウエルプレートに移し、４８時間培養し、その成長をこの培養期間の後で評価した。ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡを感染させたすべてのガン細胞タイプは、低下した成長速度を示し（図１３）、これに対して、ガンタイプの一部のみが、ＢＮＯ６９．４ｓｉＲＮＡの影響に対する応答における低下した成長を示しただけであった（図１４）。

【０１７４】

さらに、本発明者らは、遊走する腫瘍細胞の能力に対するＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡおよびＢＮＯ６９．４ｓｉＲＮＡの考えられる影響を調べた。遊走挙動は腫瘍細胞挙動の顕著な特徴の１つであり、また、腫瘍転移の基礎である。ＢＮＯ６９の潜在的なＧＡＰ機能は、遊走挙動が、細胞の形状および運動を制御するシグナル伝達経路に関係することを示していると考えられる。従って、この遺伝子を標的とすることにより、細胞遊走が妨げられ得ると仮定することは無理のないことである。ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡを感染させた乳ガン細胞株（ＭＤＡ－ＭＢ－２３１およびＭＤＡ－ＭＢ－４６８）ならびにＵ－８７脳神経膠芽細胞腫細胞株は著しい低下した遊走速度を示し、これに対して、ガンタイプの一部のみが、ＢＮＯ６９．４の影響に対する応答における著しい低下した遊走を示しただけであった（図１５）。

【０１７５】

ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡおよびＢＮＯ６９．４ｓｉＲＮＡはマウスにおいて充実性乳腫瘍の成長を阻害する

ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡおよびＢＮＯ６９．４ｓｉＲＮＡがインビトロで腫瘍細胞の成長および遊走の潜在的能力を抑えるという観測結果により、本発明者らは、動物での充実性腫瘍の成長におけるこれらの分子の影響を調べることが駆り立てられた。乳ガン細胞（ＭＤＡ－ＭＢ－２３１）に、ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡおよびＢＮＯ６９．４ｓｉＲＮＡをコードするウイルスベクターを感染させた。検討中のｓｈＲＮＡ分子を発現する細胞について濃縮するためにピューロマイシンにおける４日間の選択の後、細胞を免疫低下マウス（ｎｕ／ｎｕマウス）の乳房脂肪体に注射した。ｓｈＲＮＡコード配列を含まないウイルスベクターを感染させた細胞をコントロールとして使用した。実験は、群あたり５匹のマウスからなる３つの群を含んだ。腫瘍の成長を、腫瘍サイズの測定を２日～３日毎に行うことによって３４日間にわたってモニターした。得られたデータは、ＢＮＯ６９．３が、腫瘍をマウス体内で形成することにおけるＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞の能力を劇的に抑えていることを示している。ベクターコントロールを感染させた細胞から生じている腫瘍との比較では、ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡの影響の結果としての腫瘍成長における９４％までの低下が示された（図１６）。

【０１７６】

ＢＮＯ６９．４ｓｉＲＮＡをコードするベクターによるＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞の感染は、ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡに関して見られる程度と同じ程度ではないが、ヌードマウスにおける充実性腫瘍の成長の統計学的に有意な遅延をもたらした（図１７）。

【０１７７】

まとめると、これらの結果は、ＢＮＯ６９が腫瘍細胞の成長および腫瘍の血管新生の両方において役割を果たし得ることを示している。従って、血管新生に関連した障害の治療におけるＢＮＯ６９に対するｓｉＲＮＡ（特に、ＢＮＯ６９．３ｓｉＲＮＡおよび／またはＢＮＯ６９．４ｓｉＲＮＡ）の使用では、腫瘍細胞および内皮細胞の両方を標的とすることが包含される。

参考文献

以下の文献の内容は参照として本願明細書中に組入れられる

Altschul, SF. et al. (1997). *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

Augustin, HG. (1998). Trends Pharmacol. Sci. 19: 216-222.

Barrett, T., Xiao, B., Dodson, EJ., Dodson, G., Ludbrook, SB., Nurmahomed, K., Gamblin, SJ., Musacchio, A., Smerdon, SJ., and Eccleston, JF. (1997). Nature 385: 458-461.

Bayless, KJ. and Davis, GE., (2002). J. Cell Sci. 115: 1123-1136.

Breaker, RR. and Joyce, GF. (1995). *Chem. Biol.* 2: 655-600.

Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K. (1996). J. Cell Biol. 133: 1403-1415.

Cole, SP. et al. (1984). *Mol. Cell Biol.* 62: 109-120.

Cote, RJ. et al. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030.

Culver, K. (1996). Gene Therapy : A Primer for Physicians. Second Edition. (Mary Ann Liebert).

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Nature 420: 629-635.

Friedman, T. (1991). In Therapy for Genetic Diseases. (T Friedman (Ed) Oxford University Press. pp 105-121.

Gamble, JR., Matthias, LJ., Meyer, G., Kaur, P., Russ, G., Faull, R., Berndt, MC., and Vadas, MA. (1993). J. Cell Biol. 121: 931-943.

Gamble, J., Meyer, G., Noack, L., Furze, J., Matthias, L., Kovach, N., Harlant, J., and Vadas, M. (1999). Endothelium 7: 23-34.

Goldman, CK. et al. (1997). *Nature Biotechnology* 15: 462-466.

Green, LL. et al. (1994). *Nature Genet.* 7: 13-21.

Hanahan, D. (1997). Science 277: 48-50.

Haseloff, J. and Gerlach, WL. (1988). *Nature* 334: 585-591.

Heller, RA. et al. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2150-2155.

Hippenstiel, S., Schmeck, B., N'Guessan, PD., Seybold, J., Krull, M., Preissner, K., Eichel-Streiber, CV., and Suttorp, N. (2002). Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 283: L830-L838.

Huse, WD. et al. (1989). *Science* 246: 1275-1281.

Kohler, G. and Milstein, C. (1975). *Nature* 256: 495-497.

Kozbor, D. et al. (1985). *J. Immunol. Methods* 81:31-42.

Lonberg, N. et al. (1994). *Nature* 368: 856-859.

Mackay, DJ., and Hall, A. (1998). J. Biol. Chem. 273: 20685-20688.

Meyer, GT., Matthias, LJ., Noack, L., Vadas, MA. and Gamble, JR., (1997). Anat. Rec. 249: 327-340.

Musacchio, A., Cantley, LC., and Harrison, SC. (1996). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 14373-14378.

Nobes, CD., and Hall, A. (1999). J. Cell Biol. 144: 1235-1244.

Orlandi, R. et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3833-3837.

Rickert, RC. et al. (1997). *Nucleic Acids Res.* 25: 1317-1318.

Rittinger, K., Walker, PA., Eccleston, JF., Smerdon, SJ., and Gamblin, SJ. (1997). Nature 389: 758-762.

Scharf, D. et al. (1994). *Results Probl. Cell Differ.* 20: 125-162.

Schena, M. et al. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10614-10619.

Schwenk, F. et al. (1995). *Nucleic Acids Res.* 23: 5080-5081.

Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997). Genes Dev. 11: 2295-2322.

Winter, G. et al. (1991). *Nature* 349: 293-299.

Wojciak-Stothard, B., Potempa, S., Eichholtz, T., and Ridley, A. J. (2001). J. Cell Sci. 114: 1343-1355.

【図面の簡単な説明】

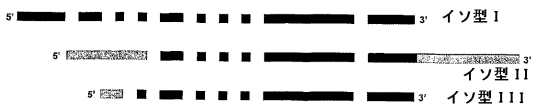
【０１７８】

【図１】ｄｂｅｓｔにおける代表的なＥＳＴ配列のインシリコ分析によって特定されたＢＮＯ６９スプライシングイソ型を示す概略図である。

【図２】ヒトの様々な正常組織サンプルおよび腫瘍組織サンプルにおけるＢＮＯ６９のイソ型Ｉおよびイソ型ＩＩのリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ発現分析を示すグラフである。
【図３】Ｒｈｏ、ＲａｃおよびＣｄｃ４２の活性に対するＨＵＶＥＣにおけるＢＮＯ６９ノックダウンの影響を示す。
【図４】活性ＲａｃについてのＮＩＨ３Ｔ３細胞におけるＢＮＯ６９ノックダウンの影響を示す。
【図５】ＢＮＯ６９はストレスファイバー形成を調節することを示す写真である。
【図６】ＢＮＯ６９．３（配列番号３）ｓｉＲＮＡにより媒介されるＨＵＶＥＣにおけるＢＮＯ６９発現ノックダウンのリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ分析を示すグラフである。
【図７】ＢＮＯ６９のｍＲＮＡ発現を沈黙させることにより、ＨＵＶＥＣの管形成が阻害されることを示す写真である。
【図８】ＢＮＯ６９の発現を沈黙させることにより、ＨＵＶＥＣの拡大が培養においてもたらされることを示す写真である。
【図９】ＢＮＯ６９の発現を沈黙させることにより、ＨＵＶＥＣの増殖が阻害されることを示すグラフである。
【図１０】ＢＮＯ６９の発現を沈黙させることにより、ＨＵＶＥＣの遊走が阻害されることを示す写真およびグラフである。
【図１１】増殖誘導のシグナル伝達を示すグラフである。
【図１２】様々な腫瘍細胞株サンプルにおけるＢＮＯ６９のイソ型Ｉおよびイソ型ＩＩＩのリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ発現分析を示すグラフである。
【図１３】様々な腫瘍細胞株における増殖に対するＢＮＯ６９．３（配列番号３）ｓｉＲＮＡの影響の分析を示すグラフである。
【図１４】様々な腫瘍細胞株における増殖に対するＢＮＯ６９．４（配列番号４）ｓｉＲＮＡの影響の分析を示すグラフである。
【図１５】様々な腫瘍細胞株における遊走に対するＢＮＯ６９．３（配列番号３）ｓｉＲＮＡおよびＢＮＯ６９．４（配列番号４）ｓｉＲＮＡの影響の分析を示すグラフである。
【図１６】ヌードマウスにおけるＭＤＡ－ＭＢ－２３１同所性異種移植片に対するＢＮＯ６９．３（配列番号３）ｓｉＲＮＡの影響の分析を示すグラフである。
【図１７】ヌードマウスにおけるＭＤＡ－ＭＢ－２３１同所性異種移植片に対するＢＮＯ６９．４（配列番号４）ｓｉＲＮＡの影響の分析を示すグラフである。
【配列表フリーテキスト】
【０１７９】
配列番号１は、ＢＮＯ６９のイソ型Ｉヌクレオチドｃ１８５９～ｃ１８７７の配列である。
配列番号２は、ＢＮＯ６９のイソ型Ｉヌクレオチドｃ１０１～ｃ１１９の配列である。
配列番号３、４、および１８は、ｓｉＲＮＡ分子の配列である。
配列番号５は、リンカー配列である。
配列番号６および７は、ｓｈＲＮＡ分子の配列である。

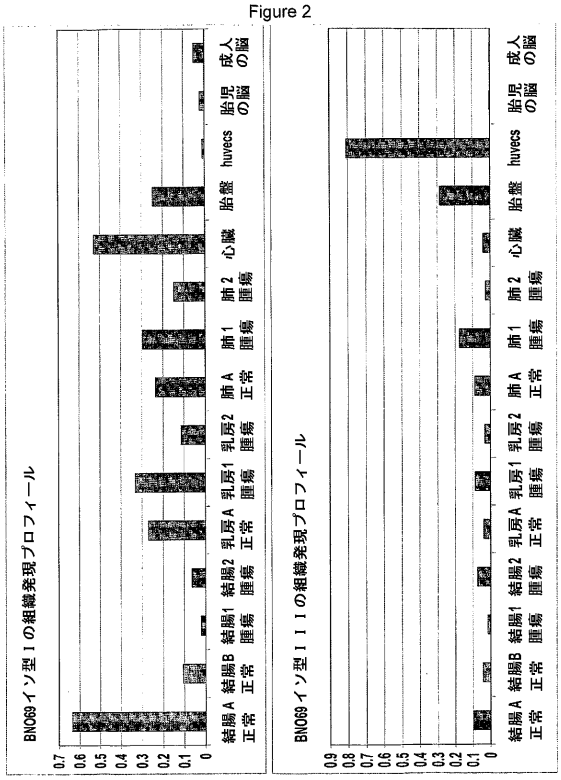
【図１】

Figure 1



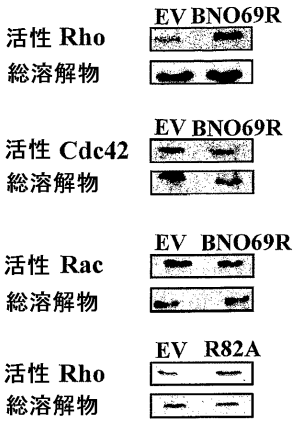
【図２】

Figure 2



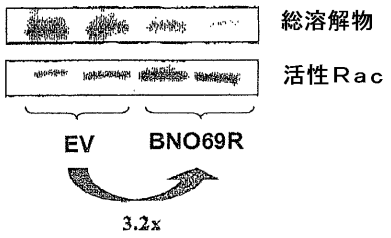
【図３】

Figure 3



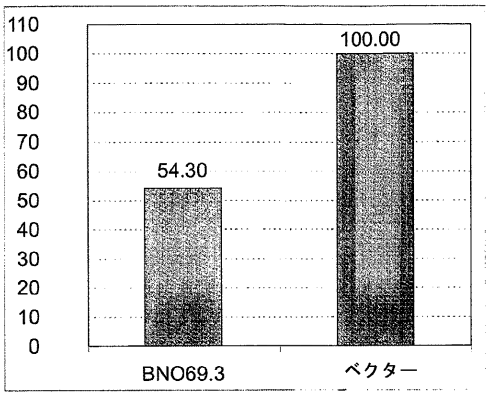
【図４】

Figure 4



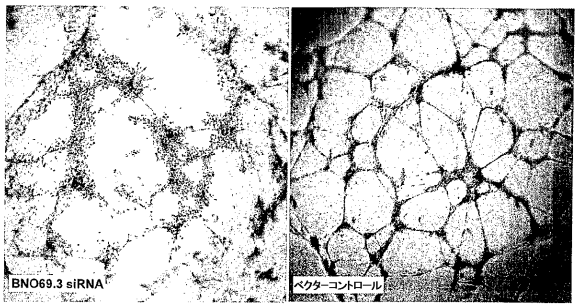
【図６】

Figure 6



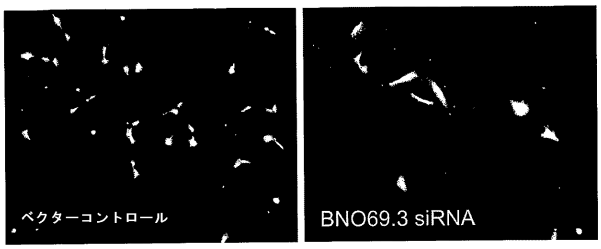
【図７】

Figure 7



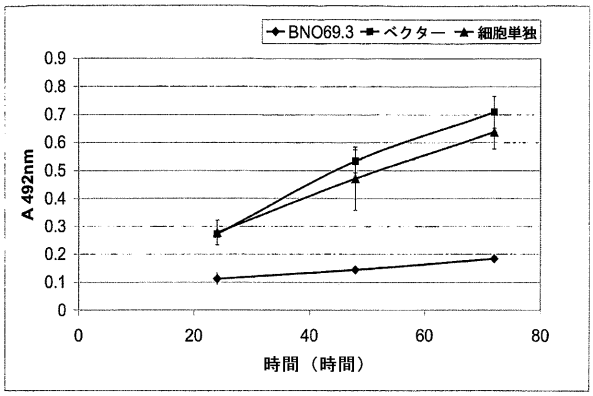
【図８】

Figure 8



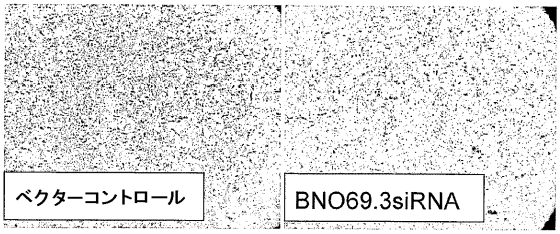
【図９】

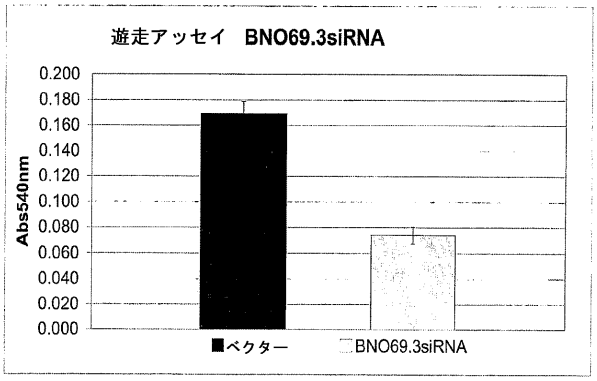
Figure 9



【図１０】

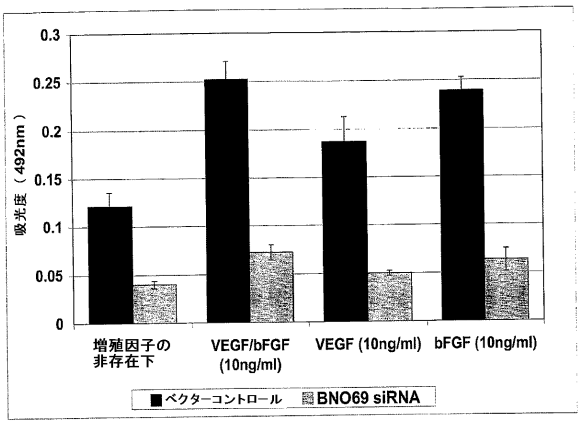
Figure 10





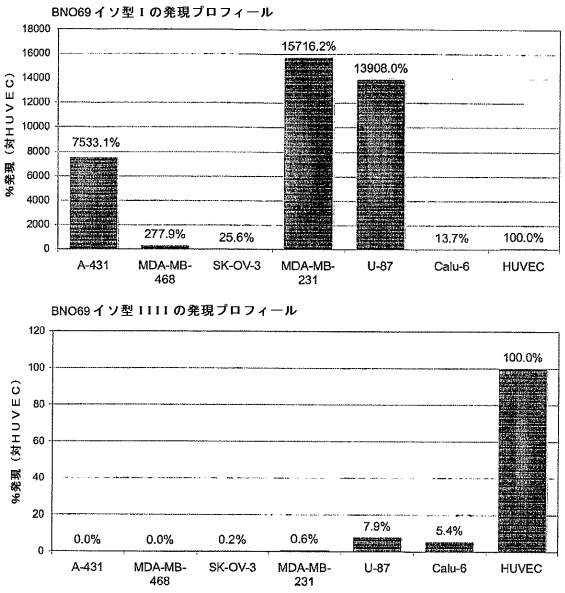
【図１１】

Figure 11



【図１２】

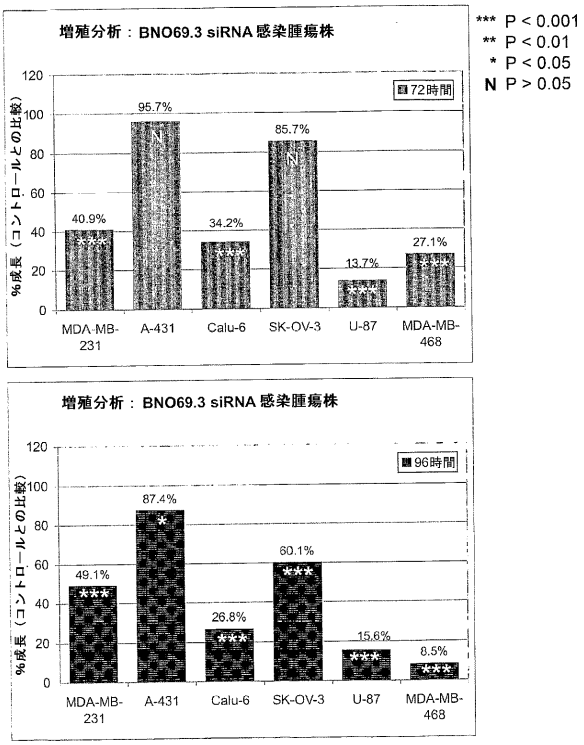
Figure 12



細胞タイプ	ATCC 番号	説明	培地	補充物
MDA-MB-231	HTB-26	乳腺；腺ガン 転移部位から得られたもの；胸膜滲出	RPMI-1640:	10% ウシ胎児血清 PSG
A-431	CRL-1555	皮膚；類表皮ガン 充実性腫瘍単離体	DMEM-F12	10% ウシ胎児血清 PSG
Calu-6	HTB-56	未分化組織タイプ、おそらくは肺；未分化ガン	EMEM	10% ウシ胎児血清 PSG NEAA
SK-OV-3	HTB-77	卵巣；腹水腺ガン 転移部位から得られたもの	DMEM-F12	10% ウシ胎児血清 PSG
U-87 MG	HTB-14	脳星状膠細胞腫；神経膠芽細胞腫 充実性腫瘍単離体	EMEM	10% ウシ胎児血清 PSG, NEAA, ピルビン酸ナトリウム
MDA-MB-468	HTB-132	乳腺；腺ガン 転移部位から得られたもの；胸膜滲出	RPMI-1640:	10% ウシ胎児血清 PSG

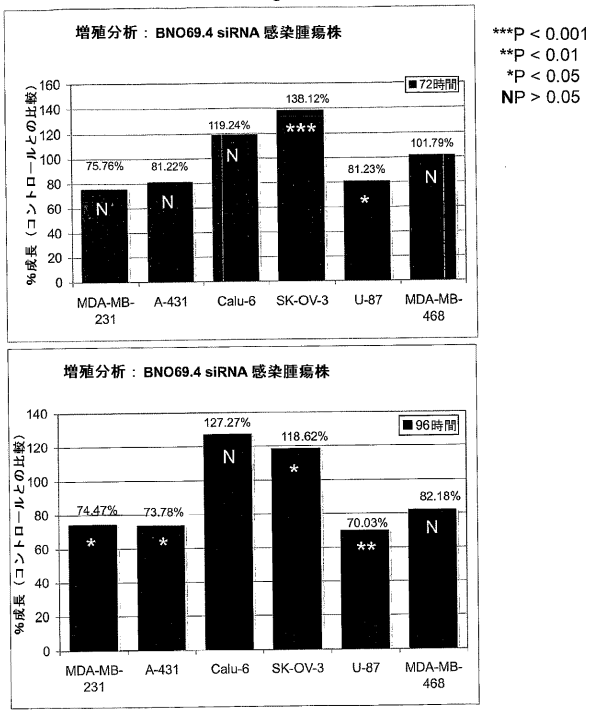
【図１３】

Figure 13



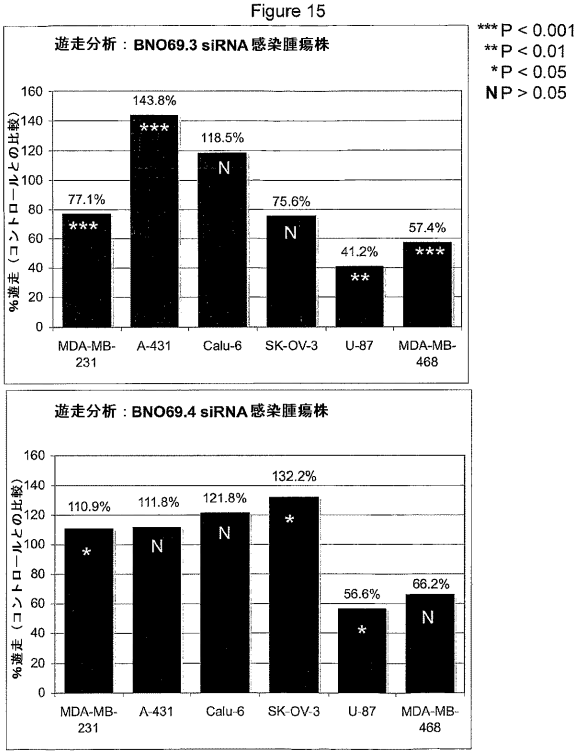
【図１４】

Figure 14



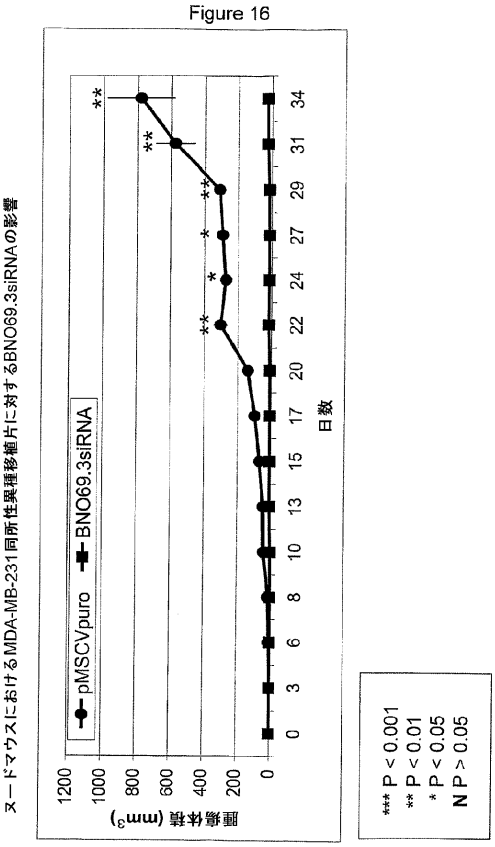
【図１５】

Figure 15



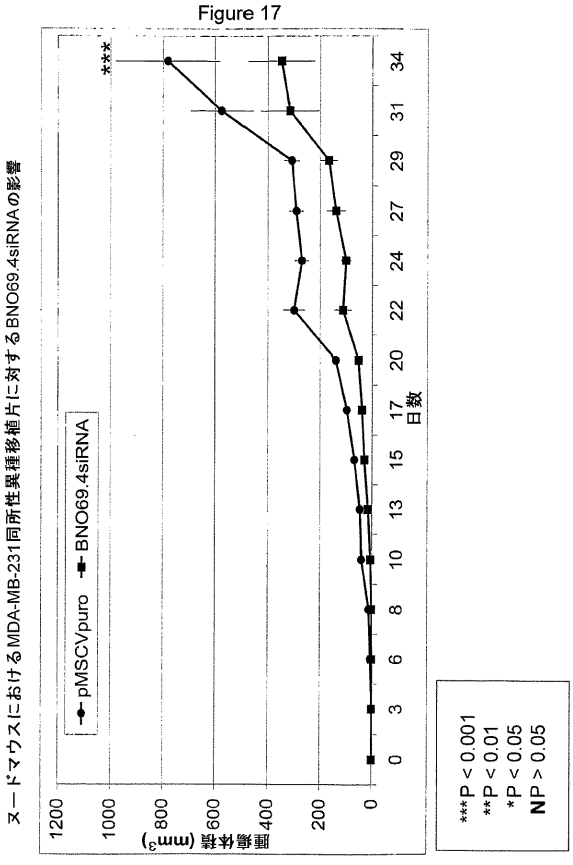
【図１６】

Figure 16



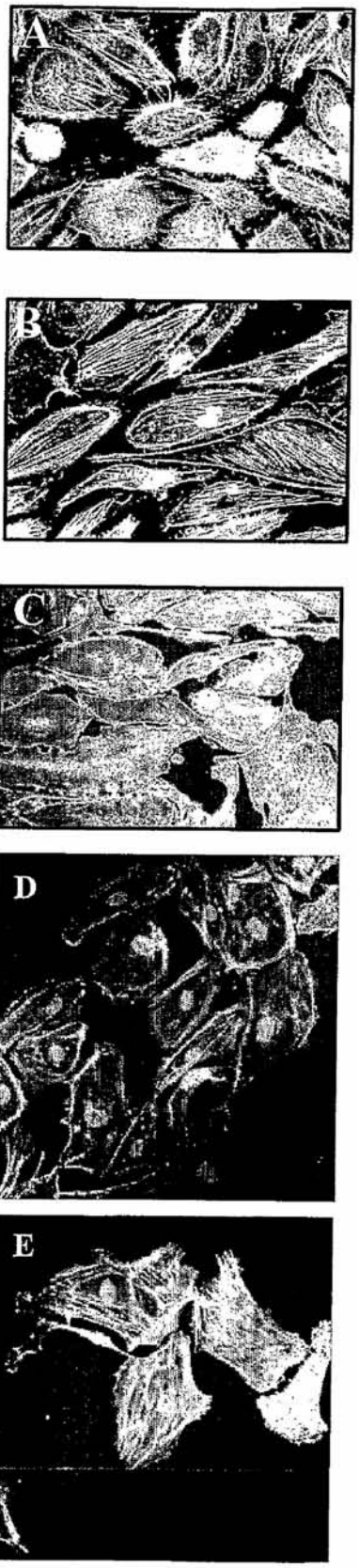
【図１７】

Figure 17



【図５】

Figure 5



【配列表】

2008508889000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2005/001188

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. [7]: C12N 15/11

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)

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 practicable, search terms used)
DGENE, GENBANK, EMBL: Sequence IDs 14 and 15 siRNA, shRNA, angiogenesis\

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/0027285 A (BIONOMICS LTD) 3 April 2003 Whole document	1-76
X	Wiemann et al (2001) "Towards a catalog of human genes and proteins: sequencing and analysis of 500 novel complete protein coding human cDNAs" *Genome Res.* 11, pp 422-435. Whole document.	13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 September 2005	10 OCT 2005
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929	Authorized officer **PHILIPPA WYRDEMAN** Telephone No : (02) 6283 2554

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/AU2005/001188

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report	Patent Family Member					
WO 2003/0027285	AU	2002951032	EP	1430126	US	2005112574
	JP	2005505274	CA	2461372		

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

END OF ANNEX

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｐ	*21/02*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ	４Ｃ０８４
Ｃ０７Ｋ	*14/47*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/47		４Ｃ０８５
Ｃ０７Ｋ	*16/18*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/18		４Ｃ０８６
Ｃ１２Ｑ	*1/02*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/02		４Ｈ０４５
Ｃ１２Ｑ	*1/68*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/68	Ａ	
Ａ０１Ｋ	*67/027*	*(2006.01)*	Ａ０１Ｋ	67/027		
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ	*45/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		
Ａ６１Ｋ	*31/7105*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105		
Ａ６１Ｋ	*38/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/02		
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
Ａ６１Ｐ	*19/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02		
Ａ６１Ｐ	*9/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		
Ａ６１Ｐ	*27/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10		
Ａ６１Ｐ	*17/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02		
Ａ６１Ｐ	*9/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/06		
Ｇ０１Ｎ	*33/50*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00		
Ｇ０１Ｎ	*33/53*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ	*33/15*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ	
			Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｍ	
			Ｇ０１Ｎ	33/15	Ｚ	

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

(72)発明者 ラヴラノス, ティナ, クリスティン
オーストラリア, サウス オーストラリア ５０４３, アスコット パーク, ウォルスリー テラス １４, ユニット １
(72)発明者 レスク, アナベル, フランセス
オーストラリア, サウス オーストラリア ５０６３, ハイゲート, バーンハム ストリート ３６エー

Ｆターム(参考) 2G045 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03 FB04
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09 CA11 DA03 EA02 HA17
4B063 QA18 QA19 QQ20 QQ43 QR32 QR55 QR77 QR80 QS05 QS34 QX02
4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA13 AA19 BA01 BA03 BA08 BA22 CA18 CA62 MA02 NA14 ZA33 ZA36 ZA89 ZA96 ZB11 ZB26
4C085 AA13 AA14 BB11 CC22 CC23 EE01 EE03

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA33 ZA36 ZA89
ZA96 ZB11 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA23 EA28 EA50
FA74

专利名称(译)	血管生成相关分子和组合物以及治疗方法		
公开(公告)号	JP2008508889A	公开(公告)日	2008-03-27
申请号	JP2007525127	申请日	2005-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	生态学有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物卢武铉搭配有限公司		
[标]发明人	クレミディオティスガブリエル ラヴラノスティナクリスティン レスクアナベルフランセス		
发明人	クレミディオティス, ガブリエル ラヴラノス, ティナ, クリスティン レスク, アナベル, フランセス		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/68 A01K67/027 A61K48/00 A61K45/00 A61K31/7105 A61K38/00 A61K39/395 A61P43/00 A61P35/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P9/10 A61P27/02 A61P17/06 A61P9/00 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/15 C12N15/113		
CPC分类号	A61P17/06 A61P19/02 A61P27/02 A61P29/00 C07K14/4706 C12N15/113 C12N2310/111 C12N2310/14 C12N2310/53		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/02.C C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/68.A A01K67/027 A61K48/00 A61K45/00 A61K31/7105 A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P43/00.105 A61P35/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P9/10 A61P27/02 A61P17/06 A61P9/00 G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB04 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA03 4B024/EA02 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ20 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA03 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/CA62 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA33 4C084/ZA36 4C084/ZA89 4C084/ZA96 4C084/ZB11 4C084/ZB26 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE03 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZB11 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA23 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	Kazehaya信明 浅野纪子		
优先权	2004904441 2004-08-09 AU 2005902344 2005-05-10 AU		
其他公开文献	JP4825802B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了通过RNA干扰调节血管生成相关基因表达的短干扰RNA（siRNA）分子。 还描述了包含所述siRNA分子的短发夹RNA（shRNA）分子。 这些分子可以靶向基因的所有或特定同工型。 还描述了这些分子和基因同工型在治疗和诊断与血管生成相关的疾病中的用途。