

(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 - 523723

(P2003 - 523723A)

(43)公表日 平成15年8月12日(2003.8.12)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/395	D 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00			N 4 B 0 2 4
39/395		48/00	4 B 0 5 0
48/00		A 6 1 P 7/00	4 B 0 6 3
		7/02	4 B 0 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全109数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 603356(P2000 - 603356)

(86) (22)出願日 平成12年3月10日(2000.3.10)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月7日(2001.9.7)

(86)国際出願番号 PCT/US00/06518

(87)国際公開番号 W000/053733

(87)国際公開日 平成12年9月14日(2000.9.14)

(31)優先権主張番号 09/266,225

(32)優先日 平成11年3月10日(1999.3.10)

(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 ハイブン ロング ウォーフ ド
ライブ 555

(72)発明者 ナンダバラン , キリシュナン
アメリカ合衆国 コネチカット 06437,
ギルフォード, ビレッジ ボンド ロード
228

(72)発明者 ヤン , メイジャ
アメリカ合衆国 コネチカット 06533,
イースト ライム, キャットバード レー
ン 6

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヘルマンスキー - パドラック症候群タンパク質相互作用タンパク質およびその使用の方法

(57)【要約】

H P S ポリペプチドおよびH P S 相互作用ポリペプチド (H P S I P) を含むポリペプチドの複合体が提供される。H P S I P ポリペプチドとしては、1 4 - 3 - 3 タンパク質、H r s、アトロフィン - 1、D G S - I、核因子N F 9 0、H P I P 1およびヒトH N 1ホモログタンパク質が挙げられる。また、H P I P 1およびヒトH N 1ホモログタンパク質、またその誘導体、フラグメント、およびアナログをコードする核酸が開示される。特定の疾患および障害 (特に、アトピー疾患、自己免疫疾患、神経変性疾患、癌、色素沈着障害、血小板機能不全およびウイルス疾患) を処置および / または予防することにおける効果のための複合体またはタンパク質をスクリーニングする方法もまた、開示される。

	HPS フォワード	HPS リバース
14-3-3 eta	-	+
Hrs	-	+
BMK1 α	-	+
CDK2	-	+
核因子 NF90	-	+
アトロフィン-1	-	+
DGS-1	-	+
HPIP-1 (cg49368.b1, cg49367.h11, cg49424.c10)	+	-
HN1 ホモログ (cgHs2950_0)	+	-
網膜芽細胞腫	-	-
p27(Kip1)	-	-
RGL-2	-	-
ベクターコントロール	-	-

【特許請求の範囲】

【請求項1】 H P S ポリペプチドのH P S I P 結合ドメインおよびH P S I P ポリペプチドのH P S 結合ドメインの精製された複合体であって、ここで該H P S I P ポリペプチドが、14-3-3 eta、Hrs、BMK1 キナーゼ、CDK2、核因子NF90、アトロフィン-1、DGS-1、HP1P1 およびヒトHN1ホモログタンパク質からなる群より選択される、複合体。

【請求項2】 請求項1に記載の複合体であって、前記H P S 結合ドメインは、14-3-3 eta、Hrs、BMK1 キナーゼ、CDK2、核因子NF90、アトロフィン-1、DGS-1、HP1P1およびヒトHN1ホモログタンパク質からなる群より選択されるポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドに存在する、複合体。

【請求項3】 前記H P S I P 結合ドメインが、H P S ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドに存在する、請求項1に記載の複合体。

【請求項4】 前記H P S ポリペプチドが、ヒトH P S ポリペプチドのアミノ酸配列を含む、請求項3に記載の複合体。

【請求項5】 前記H P S 結合ドメインがヒトH P S I P ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドに存在する、請求項1に記載の複合体。

【請求項6】 前記H P S ポリペプチドが、GenBank登録番号U65676において開示されるヌクレオチド配列のヌクレオチド210~1292、1272~2306、または1272~2357によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の複合体。

【請求項7】 前記H P S I P ポリペプチドが、表I第4欄に列挙されるオープンリーディングフレームによりコードされるH P S I P ポリペプチドのアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の複合体。

【請求項8】 前記H P S I P 結合ドメインを含むポリペプチドが、H P S ポリペプチドのフラグメントである、請求項1に記載の複合体。

【請求項9】 H P S 結合ドメインを含むポリペプチドが、H P S I P ポリペプチドのフラグメントである、請求項1に記載の複合体。

【請求項10】 H P S I P 結合ドメインを含むポリペプチドが標識される

、請求項1に記載の複合体。

【請求項11】 HPS結合ドメインを含むポリペプチドが標識される、請求項1に記載の複合体。

【請求項12】 HPSIPポリペプチドの6個以上のアミノ酸に共有結合されたHPSポリペプチドの6個以上のアミノ酸を含むキメラポリペプチドであって、該HPSIPポリペプチドが14-3-3 eta、Hrs、BMK1キナーゼ、CDK2、核因子NF90、アトロフィン-1、DGS-1、HIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質からなる群より選択される、キメラポリペプチド。

【請求項13】 前記HPSポリペプチドのアミノ酸が、HPSIP結合ドメインを含む、請求項12に記載されるキメラポリペプチド。

【請求項14】 前記HPSIPポリペプチドのアミノ酸が、HPS結合ドメインを含む、請求項12に記載のキメラポリペプチド。

【請求項15】 前記HPSIPポリペプチドのアミノ酸が、HPS結合ドメインを含む、請求項13に記載のキメラポリペプチド。

【請求項16】 請求項1に記載の複合体を特異的に結合する抗体。

【請求項17】 請求項16に記載の抗体であって、該抗体は、前記複合体の一部ではないHPSポリペプチドのHPSIP結合ドメイン、または該複合体の一部ではないHPSIPポリペプチドのHPS結合ドメインに対して結合するよりも、請求項1に記載の複合体に対してより大きい親和性で結合する、抗体。

【請求項18】 請求項12に記載のキメラポリペプチドをコードする核酸。

【請求項19】 HIP1ポリペプチドおよびヒトHN1ホモログポリペプチドからなる群より選択される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。

【請求項20】 請求項19に記載の核酸であって、該核酸は前記ポリペプチドのHPS結合ドメインをコードする、核酸。

【請求項21】 請求項19に記載の核酸であって、該核酸は配列番号1または配列番号3のヌクレオチド配列を含む、核酸。

【請求項22】 請求項18または請求項19に記載の核酸を含むベクター。

【請求項23】 請求項21に記載のベクターを含む細胞。

【請求項24】 HPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質からなる群より選択されたポリペプチドのアミノ酸配列を含む、精製されたポリペプチド。

【請求項25】 請求項24に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドがヒトHPIP1またはヒトHN1ホモログポリペプチドのアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項26】 請求項24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および配列番号4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27】 請求項24に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドがHPS結合ドメインを含む、ポリペプチド。

【請求項28】 治療的または予防的有効量の治療剤および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物であって、ここで該治療剤が以下：

請求項1に記載の複合体；

請求項12に記載のキメラポリペプチド；

請求項16に記載の抗体、あるいは該抗体の、フラグメントまたは誘導体；

請求項18または請求項19に記載の核酸；および

請求項23に記載のポリペプチド

からなる群より選択される、薬学的組成物。

【請求項29】 請求項1に記載のHPS-HPSIPポリペプチド複合体を産生する方法であって、該方法は以下：

HPSポリペプチドのHPSIP結合ドメインをコードする核酸およびHPSIPポリペプチドのHPS結合ドメインをコードする核酸を含む、細胞を提供する工程；

該ポリペプチドの発現を可能にする条件下で該細胞を培養する工程であって、その結果、複合体がHPSポリペプチドのHPSIP結合ドメインとHPSIP

ポリペプチドのH P S結合ドメインとの間で形成する工程；および

該複合体を回収する工程、

を包含し、

それによって該H P S - H P S I P複合体を産生する、方法。

【請求項30】 サンプル中のH P Sタンパク質およびH P S I Pタンパク質の複合体の異常なレベルによって特徴付けられる障害の存在またはその障害の素因を診断またはスクリーニングする方法であって、該方法は、以下：

被験体から試験サンプルを調達する工程；

該試験サンプル中の該複合体のレベルを測定する工程；および

該試験サンプル中の該複合体レベルを、H P S関連障害の細胞特性を含まない参照サンプル中の該複合体のレベルと比較する工程、を包含し、

ここで該サンプルのレベルの変化が、該被験体における該障害に対する存在または素因を示す、方法。

【請求項31】 キットであって、H P SおよびH P S I Pの複合体、該複合体に対する抗体、該H P SのRNAおよび該H P S I PのRNAに対してハイブリダイズ可能な核酸プローブ、または該H P Sの遺伝子および該H P S I Pの遺伝子の少なくとも1部分の増幅をプライム可能な核酸プライマーの対からなる群から選択される物質を1つ以上の容器に含み、ここで該H P S I Pが14-3-3 eta、Hrs、BMK1 キナーゼ、CDK2、核因子NF90、アトロフィン-1、DGS-1、HPIP1およびヒトHN1ホモログからなる群から選択される、キット。

【請求項32】 被験体において、請求項1に記載の複合体の異常なレベルに関係する疾患または障害を処置または予防する方法であって、該方法は、このような処置または予防が所望される被験体に、該複合体の機能を調節する治療的有効量の分子を投与する工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(助成金の援助)

本明細書中に開示される本発明は、National Institute of Standards and Technologyによって交付される助成金番号70NANB5H1066の下で米国政府の援助によってなされた。従って、米国政府は、本発明に特定の権利を有する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、一般に、ポリペプチドおよび核酸、およびより詳細には、ヘルマンスキー - パドラック症候群関連HPSポリペプチドと相互作用するポリペプチド、およびHPSポリペプチドおよびHPS相互作用ポリペプチドに関する。

【0003】

(発明の背景)

ヘルマンスキー - パドラック症候群 (HPS) は、リソソーム関連オルガネラの欠損によって特徴付けられる遺伝障害である。ヒトでは、HPSに罹患した個体は、白皮症、出血障害、肺障害および消化器障害を患う。肺障害は、例えば、進行性の肺線維症を生じて、40年または50年で死に至り得る。

【0004】

HPSにおける肺不全は、いくつかの細胞内オルガネラのうちの1以上における不全から生じると考えられている。これらのオルガネラとしては、例えば、リソソーム、メラノソーム、および血小板が密な顆粒 (platelet-dense granules) が挙げられ得る。HPS患者における機能的なメラノサイトは、数が量的に減少し、そして/または質的に異常である。これは、組織 (例えば、皮膚および毛髪) の白皮症を生じると考えられている。

【0005】

HPSと関連する出血障害は、出血時間の延長を含み得る。HPSと関連する出血時間の延長は、貯蔵オルガネラである血小板が密な顆粒 (これは、ADP放出および血小板の凝集に必要である) の欠損に起因すると考えられている。

【0006】

HPS患者と関連する肺障害および消化器障害（例えば、線維症および肉芽腫性大腸炎）は、細網内皮細胞、骨髄マクロファージ、肺マクロファージ、胃腸管粘膜細胞、および他の細胞型のリソソーム中のセロイド脂褐素の蓄積から生じると考えられている。

【0007】

HPSを担う遺伝子は、罹患されたHPSファミリーであることが同定された。HPS遺伝子は、Puerto Rican、Swiss、IrishおよびJapaneseのHPS患者のDNAにおいて変更されることが報告されている。HPSポリペプチドのアミノ酸配列は、これが複数の細胞質オルガネラの成分であるようである膜貫通タンパク質であることを示唆する。

【0008】

マウスでは、蒼白な耳（pale ear）（ep）の遺伝子座での劣性変異が、ヒトHPSのマウスホモログであると報告されている。ep変異を保有するマウスは、メラノソームおよび血小板が密な顆粒において、ヒトHPS患者と同様の不全を示す。

【0009】

（発明の要旨）

本発明は、特定のタンパク質がヘルマンスキー - パドラック症候群（HPS）タンパク質に結合し、そしてこのヘルマンスキー - パドラック症候群（HPS）タンパク質と複合体を形成するという発見に部分的に基づく。従って、本発明は、HPSタンパク質を認識しかつこれと相互作用するアミノ酸に結合された（すなわち、このタンパク質と複合体化した）HPSタンパク質を含むタンパク質複合体を開示する。HPSタンパク質と複合体を形成するタンパク質は、本明細書中以降、HPSタンパク質相互作用タンパク質について「HPSタンパク質 - IP」と命名され；そしてHPSタンパク質およびHPSタンパク質 - IPの複合体を形成するタンパク質は、本明細書中以降、「HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体」として命名される。本明細書中で使用される場合、「HPSIP」または「HPSIPポリペプチド」としては、14-3-3 et al、

Hrs、BMK1 キナーゼ、CDK2、核因子NF90、アトロフィン(atrophin)-1、DGS-1、HIP1、またはヒトHN1ホモログポリペプチドが挙げられる。

【0010】

いくつかの実施形態において、本発明は、HIP1およびヒトHN1ホモログとの、HPS複合体、ならびにHPSタンパク質の誘導体の複合体、フラグメントおよび/またはアナログ、ならびにこれらの前述のHPSタンパク質-IPの誘導体、フラグメントおよび/またはアナログに関する。

【0011】

本発明はさらに、HPSタンパク質またはその誘導体、フラグメントおよび/もしくはアナログと相互作用するタンパク質についてスクリーニングする方法を開示する。好ましくは、スクリーニング方法は、酵母ツーハイブリッドアッセイ系、またはそのバリエーションである。

【0012】

本発明はさらに、ヒトHIP1（および他の種のホモログ）ならびにヒトHN1ホモログ、ならびにその誘導体、フラグメントおよびアナログのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を開示する。特定のヌクレオチド配列に相補的である（すなわち、ハイブリダイズする能力を有する）核酸（すなわち、前述の配列の逆相補体(inverse complement)）もまた、提供される。逆相補体は、コード鎖に対して逆方向であり、その結果、逆相補体がこの核酸鎖にミスマッチすることなくハイブリダイズする、相補配列を有する核酸配列である。従って、例えば、コード核酸鎖が、コード鎖とハイブリダイズ可能な鎖との間にミスマッチを有さない核酸配列にハイブリダイズ可能である場合、ハイブリダイズ可能な鎖の逆相補体は、コード鎖に同一である。

【0013】

本発明はまた、生物学的活性を保有する、HIP1およびヒトHN1ホモログの誘導体、フラグメントおよび/またはアナログを開示する（すなわち、それらは、野生型HIP1またはヒトHN1ホモログタンパク質の1以上の既知の機能活性を示し得る）。このような生物学的活性としては、以下が挙げられるが

これらに限定されない：(i) HPSタンパク質に結合する能力、またはHPSタンパク質との相互作用に対して競合する能力；(ii) 抗原性（すなわち、それぞれ抗HP1P1抗体または抗ヒトHN1ホモログ抗体への結合について、HP1P1またはヒトHN1ホモログに結合する能力、またはそれらと競合する能力）、ならびに(iii) 免疫原性（すなわち、HP1P1およびヒトHN1ホモログタンパク質に特異的であり、かつこれらに結合する抗体を生成する能力）。

【0014】

HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体ならびにHP1P1タンパク質およびヒトHN1ホモログタンパク質、ならびにこれらの個々のタンパク質および/またはタンパク質複合体の誘導体およびアナログの産生のための方法は（例えば、組換え手段によって）もまた、開示される。上記と同じものを含む薬学的組成物もまた、本明細書中で提供される。

【0015】

本発明はさらに、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体の活性を調節する（すなわち、阻害するか、または増強する）ための方法、ならびにHP1P1およびヒトHN1ホモログタンパク質を調節する方法を開示する。これらの複合体の個々のタンパク質成分は、種々の細胞機能（例えば、生理学的プロセス（例えば、小胞輸送、タンパク質輸送、色素沈着調節、および血小板形成）ならびに病理学的プロセス（例えば、眼・皮膚白皮症、血小板機能不全、神経変性疾患および肺繊維症）を含む）に關与している。

【0016】

本発明はまた、特定のタンパク質またはタンパク質複合体をスクリーニングするための方法を開示する。この方法は、以下：(i) HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、HP1P1タンパク質およびヒトHN1ホモログタンパク質、ならびにHPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体の誘導体およびアナログについてスクリーニングする工程；(ii) HP1P1 mRNAおよびヒトHN1ホモログmRNAについてスクリーニングする工程、ならびに(iii) HP1P1タンパク質およびヒトHN1ホモログを、細胞機能、特にH

PSタンパク質および/またはHPSタンパク質-IPが関与する細胞機能を変化させるそれらの能力についてスクリーニングする工程、を含む。

【0017】

本発明はさらに、以下に基づく、診断および予後のスクリーニング方法、ならびに治療用組成物および予防用組成物を開示する：(i) HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体(複合体の形成に関与する個々のタンパク質をコードする核酸を含む)および(ii) HPIP1タンパク質およびそれらをコードする核酸。本発明の治療用組成物としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：(i) HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体(ここで上記複合体のうちの1つまたは両方のメンバーがHPSタンパク質および/またはEPSタンパク質-IPの誘導体、フラグメントまたはアナログである)；(ii) HPIP1タンパク質およびヒトHN1ホモログ、ならびにそれらの誘導体、フラグメントまたはアナログ；(iii) このタンパク質、またはその誘導体、フラグメントもしくはアナログに対する抗体、ならびに(iv) 前述のタンパク質、またはそれらの誘導体、フラグメントもしくはアナログをコードする核酸。治療用化合物はまた、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP成分ならびにHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質の両方をコードするヌクレオチド配列に特異的なアンチセンス核酸の生成を含む。さらに、診断キット、予後キット、およびスクリーニングキットもまた、本明細書中に開示される。

【0018】

さらなる局面において、本発明は、コードされたHPSおよびHPS-IPタンパク質が発現され、そして互いに結合するように、キメラHPS-HPSIPポリペプチドを発現する核酸を含む組換え細胞を増殖させ、次いでこの発現された複合体を回収することによって、HPSタンパク質とHPS-IPタンパク質との複合体を産生する方法を含む。

【0019】

また、これらのタンパク質のうち的一方または両方をコードする核酸を含む組換え細胞を、コードされたタンパク質の発現を可能にする条件下で増殖させ、そしてこの発現されたタンパク質を回収することによって、HPIP1またはヒト

HN1ホモログタンパク質を産生する方法が、本発明に含まれる。

【0020】

本発明はさらに、HPSタンパク質および本明細書中に開示されたHPS-IPタンパク質の複合体の異常なレベルによって特徴付けられる疾患または障害の発症を、診断する方法、またはこの発症の存在をスクリーニングする方法もしくはこの発症に対する素因についてスクリーニングする方法を提供する。この方法は、被験体に由来するサンプル中の、1以上の複合体のレベルを測定する工程（例えば、この複合体中の1以上のポリペプチドのレベルを測定することによる）、またはこの複合体のポリペプチドのメンバーをコードするRNAを測定する工程、あるいはこの複合体の機能活性を測定する工程、を包含する。疾患もしくは障害、または疾患もしくは障害の発症に対する素因を有さない類似するサンプル中に見出される、複合体、HPSおよびHPS-IPをコードするRNA、またはこの複合体の機能活性のレベルに対する、サンプル中の複合体、HPSおよびHPS-IPをコードするRNA、またはこの複合体の機能活性のレベルにおける増加または減少は、疾患もしくは障害、またはこの疾患もしくは障害の発症に対する素因の存在を示す。

【0021】

また、1以上の容器中に、HPSおよびHPS-IPの複合体、この複合体に対する抗体、HPSのRNAおよびHPS-IPのRNAにハイブリダイズし得る核酸プローブ、またはHPSの遺伝子およびHPS-IPの遺伝子の少なくとも一部の増幅をプライムし得る核酸プライマーの対を含むキットが、本発明に含まれる。

【0022】

さらなる局面において、本発明は、被験体において、HPSおよびHPS-IPの複合体の異常なレベルに關与する疾患または障害を処置または予防する方法を含む。この方法は、このような処置または予防が所望される被験体に、複合体の機能を調節する治療有効量の分子を投与する工程を包含する。

【0023】

疾患または障害は、減少したレベルの複合体、ならびにHPSおよびHPS-

IPの複合体の機能を促進する分子を含む。この分子は、例えば、HPSおよびHPS-IPの複合体；HPSおよびHPS-IPの複合体の誘導体またはアナログ（この複合体は、野生型複合体よりも安定または活性である）；HPSタンパク質およびHPS-IPタンパク質をコードする核酸、ならびに野生型複合体よりも安定または活性である複合体を形成するHPSおよびHPS-IPの誘導体またはアナログをコードする核酸、であり得る。

【0024】

あるいは、疾患または障害は、複合体の増加したレベルに關与し得、そして分子は、この複合体の機能を阻害する。分子は、例えば、複合体またはその結合領域を含むそのフラグメントもしくは誘導体に対する抗体；HPSアンチセンス核酸およびHPS-IPアンチセンス核酸；ならびに異種配列がHPS遺伝子およびHPS-IP遺伝子の生物学的活性を不活性化するように、ヌクレオチド配列が挿入されているHPS遺伝子およびHPS-IP遺伝子の少なくとも一部を含み、ここでHPS遺伝子およびHPS-IP遺伝子の一部が、ゲノムHPSおよびHPS-IP遺伝子との相同組換えを促進するように異種配列に隣接している、核酸、であり得る。

【0025】

他の実施形態において、疾患または障害は、減少したレベルのHPS-IPに關する。この場合において、分子は、HPS-IPの機能を促進し、そして例えば、HPS-IPタンパク質、HPSを結合するに活性であるHPS-IPの誘導体またはアナログ、HPS-IPタンパク質をコードする核酸、あるいはHPSを結合するに活性であるHPS-IPの誘導体またはアナログをコードする核酸であり得る。

【0026】

他の実施形態において、疾患または障害は、増加したレベルのHPS-IPに關する。投与された分子は、HPS-IP機能を阻害し、そして例えば、抗HSP-IP抗体またはその結合領域を含むそのフラグメントもしくは誘導体、HPS-IPアンチセンス核酸、または異種ヌクレオチド配列が挿入されているHPS-IP遺伝子の少なくとも一部を含む核酸であり得る。異種配列は、HPS-

I P 遺伝子の部分がゲノム H P S - I P 遺伝子との相同組換えを促進するように異種配列に隣接している H P S - I P 遺伝子の生物学的活性を不活性化する。

【0027】

さらなる局面において、本発明は、疾患または障害の処置または予防における活性について複合体の活性のモジュレーターを同定するために、H P S および H P S - I P と化合物との精製された複合体をスクリーニングするための方法を含む。この方法は、疾患または障害のインジケータをインビボで阻害する培養細胞と、複合体、誘導体またはモジュレーターとを接触させる工程、およびこの複合体、誘導体またはモジュレーターと接触された細胞におけるインジケータのレベルと、接触していない細胞におけるインジケータ (i n d i c a t o r) のレベルとを比較する工程、を包含する。接触された細胞におけるより低い活性は、複合体、誘導体またはモジュレーターが疾患または障害の処置または予防における活性を有することを示す。代表的な疾患および障害としては、例えば、色素沈着障害、血小板機能不全、神経変性疾患および線維性肺疾患が挙げられる。

【0028】

いくつかの実施形態において、方法は、疾患または障害の症状を示す動物を試験するために、あるいは疾患または障害の症状を発症する素因のある動物を試験するために、H S P - H S P I P 複合体、誘導体またはモジュレーターを投与する工程を包含する。次いで、複合体、誘導体またはモジュレーターの投与後の疾患または障害の症状が、測定される。疾患もしくは障害の症状の重篤度における減少、またはこの疾患もしくは障害の症状の予防は、この複合体、誘導体またはモジュレーターが疾患または障害の処置または予防における活性を有することを示す。代表的な疾患および障害としては、例えば、色素沈着障害、血小板機能不全、神経変性疾患および線維性肺疾患が挙げられる。

【0029】

また、H P S - H P S I P 複合体の活性のモジュレーターである化合物を同定する方法が、本発明に含まれる。方法は、H P S および H P S - I P の精製された複合体と、試験化合物または因子とを接触させる工程、ならびにこの化合物または因子の存在下で、あるいはこの化合物または因子を接触させた後に、複合体

の活性を試験する工程、を包含する。化合物または因子との接触後の複合体の活性の変化は、因子がH P S - H P S I P 複合体の活性のモジュレーターであることを示す。

【0030】

H P S - H P S I P の形成を（直接的または間接的に）調節する分子についてスクリーニングする方法の1つの実施形態は、複合体の形成を可能にする条件下で分子の存在下で、H P S およびH P S - I P タンパク質から形成された複合体のレベルを測定する工程；ならびにこの複合体のレベルと、この分子の非存在下で形成された複合体のレベルとを比較する工程を包含する。この分子の非存在下でのより低いまたは高いレベルの複合体は、この分子が複合体の形成を調節することを示す。

【0031】

本発明はさらに、内因性H P S 遺伝子および内因性H P S I P 遺伝子の両方が動物またはその祖先の相同組換えまたは挿入変異誘発によって欠失または不活性化されている組換え非ヒト動物を含む。いくつかの場合、組換え非ヒト動物は、ネイティブなH P S 遺伝子プロモーターまたはネイティブなH P S - I P 遺伝子プロモーターではないプロモーターの制御下であるH P S - I P 遺伝子を含む。例えば、組換え非ヒト動物は、トランスジーン（例えば、キメラH P S - H P S I P ポリペプチドをコードする核酸配列）を含み得る。

【0032】

また、H P S、H P S をコードする核酸、H P S を免疫特異的に結合する抗体、またはその結合ドメインを含む抗体のフラグメントもしくは誘導體と細胞とを、H S I P ポリペプチドのレベルを調節するに十分な量で接触させることによって、細胞中のH P S I P ポリペプチドの活性またはレベルを調節する方法が、本発明に含まれる。

【0033】

また、複合体の形成を調節する分子と細胞とを接触させて、H P S およびH S P I P ポリペプチドの複合体の活性またはレベルを調節する方法が、本発明に含まれる。

【0034】

さらなる実施形態において、本発明は、H P SもしくはH P S I Pポリペプチド、またはH P SおよびH P S I Pの複合体の活性を調節する分子を同定するための方法を含む。この方法は、1以上のポリペプチドの存在下で1以上の候補分子とH P Sとを接触させる工程、ならびにH P Sとタンパク質との間で形成する複合体の量を測定する工程を包含する。候補分子の非存在下で形成する量に対する、形成する複合体の量における増加または減少は、この分子がH P Sおよびそのタンパク質の活性またはH P Sおよびそのタンパク質の複合体の活性を調節することを示す。

【0035】

いくつかの実施形態において、方法は、H P S遺伝子、H P S I Pトランスジェーン、またはこの両方を含む組換え非ヒト動物に候補分子を投与して、そしてトランスジェニック哺乳動物の細胞において、H P S活性もしくはH P I S P活性またはその両方の活性を測定することによって行われる。

【0036】

あるいは、方法は、H P Sタンパク質またはH P S I Pタンパク質を発現している細胞においてインビトロで行われ得る。

【0037】

別の局面において、本発明は、生物学的活性についてH P Sの誘導体またはアナログをスクリーニングするための方法を含む。この方法は、H P Sの誘導体またはアナログとH P S I Pポリペプチドとを接触させる工程、ならびにH P Sおよびタンパク質の誘導体またはアナログの間の複合体の形成を検出する工程を包含する。複合体の形成は、H P Sの誘導体またはアナログが生物学的活性を有することを示す。

【0038】

また、H S I Pポリペプチドの誘導体またはアナログを、H S Pポリペプチドと複合体を形成するその能力についてスクリーニングするための方法が、本発明によって提供される。この方法は、タンパク質の誘導体またはアナログとH P Sとを接触させる工程、ならびにこのタンパク質の誘導体またはアナログとH P S

との間の複合体の形成を検出する工程を包含する。複合体の形成はタンパク質の誘導体またはアナログが生物学的活性を有することを示す。

【0039】

さらなる局面において、本発明は、被験体中のHPSタンパク質およびHPS-IPタンパク質の複合体の異常なレベルによって特徴付けられる疾患または障害の処置の効率をモニターする方法を提供する。この方法は、被験体に由来するサンプルにおいて、複合体のレベル、HPSタンパク質およびHPS-IPタンパク質をコードするRNAのレベル、またはこの複合体の機能活性のレベルを測定する工程を包含する。サンプルは、処置の投与後に被験体から採取され、そして以下：(i) 処置の投与前に被験体から採取されたサンプルにおけるレベル、または(ii) 疾患または障害の前処置段階と関連する標準レベルに比較される。処置の投与前に採取されたサンプルにおける、複合体のレベル、HPSおよびHPS-IPをコードするRNAのレベル、またはこの複合体の機能活性のレベル(すなわち標準レベル)に対する、処置の投与後に採取されたサンプルにおける、複合体のレベル、HPSおよびHPS-IPをコードするRNAのレベル、またはこの複合体の機能活性のレベルにおける変化、または変化の欠落は、投与が疾患または障害の処置に効果的であるか否かを示す。

【0040】

また、被験体(例えば、ヒト)のHPS症候群に関連する障害を処置または予防する方法が、本発明によって提供される。この方法は、このような処置または予防が所望される被験体に、HPSおよびHPS-IPタンパク質の複合体の機能を調節する治療有効量の分子を投与する工程を包含する。HPS症候群関連障害は、例えば、色素沈着障害、血小板機能不全、神経変性疾患、肺疾患(線維肺疾患を含む)であり得る。

【0041】

HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体またはHPIP1タンパク質の生物学的活性のモジュレーター(例えば、アゴニスト、アンタゴニストおよびインヒビター)のスクリーニングに関連する動物モデルおよび方法もまた、本発明において提供される。同様に、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP

複合体の形成を阻害するか、または増加させる分子の同定に関連する方法もまた、開示される。

【0042】

他に定義されない限り、本明細書中に使用される全ての技術および科学用語は本発明が属する当業者によって一般的に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同様のまたはこれに等価な方法および材料が本発明の実施および試験に使用され得るが、適切な方法および材料が以下に詳細に記載される。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、それらの全体において参考として援用される。矛盾する場合には、本明細書（定義を含む）が管理する。さらに、材料、方法および実施例は、例示するのみであり、そして限定することが意図されない。

【0043】

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

【0044】

（発明の詳細な説明）

本発明は、相互作用ポリペプチドを同定するための酵母ベースの系を使用する、ヘルマンスキー - パドラック症候群（HPS）タンパク質（本明細書中以降、「HPSタンパク質相互作用タンパク質」または「HPSIPS」と命名される）と相互作用する種々のタンパク質の同定に基づく。HPSタンパク質相互作用タンパク質は、生理学的条件下で、HPSタンパク質と複合体を形成することが実証された。本明細書中以降、HPSタンパク質とHPSタンパク質 - IPとの複合体は、「HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体」と命名される。この相互作用によるこれらのHPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体は、HPSタンパク質およびその関連する結合パートナーの機能活性の調節に関与する。

【0045】

HPS患者は、いくつかの深刻な医学的状態（眼・皮膚白皮症、出血体質、およびセロイド沈着を含む）（しばしば、重篤な線維性肺疾患および肉芽腫性大腸

炎により付随される)を患うことが報告されている。しかし、これらのHPS関連症候群の認識にもかかわらず、治効性治療介入は、現在、この疾患に対して存在しない。現在、症候性処置が提供され得る。困難性の1つの潜在的な領域は、HPSタンパク質と他の細胞タンパク質との相互作用に関する理解の欠落に関する。これらの潜在的な相互作用の解明は、HPSおよびその関連疾患の診断アッセイおよび/または治療様式をその後を開発するための手段を提供し得る。

【0046】

本明細書中に開示されるHPSIPは、シグナル伝達プロセスに関するタンパク質およびタンパク質輸送に関するタンパク質(14-3-3 eta、Hrs、BMK1、CDK2、NF90)、神経変性障害および発生障害に関するタンパク質(アトロフィン-1、DGS-1)ならびに以前に特徴付けられていない新規なタンパク質(HPIP1、HN1ホモログ)に区別され得る。表Iは、本明細書中に開示されるHPS相互作用タンパク質およびそれらの相互作用ドメインの概説を提供する。

【0047】

((A)シグナル伝達プロセスおよびタンパク質輸送に関するタンパク質)

((i)14-3-3 eta)

14-3-3タンパク質etaアイソフォーム(GenBank登録番号X80536; Ichimura-Ohshimaら、1992、J. Neurosci. Res. 31:600~605)のcaHPSoxy末端領域(ヌクレオチド764で開始する)は、HPSタンパク質と相互作用することが見出された。タンパク質の高度に保存された14-3-3ファミリーは、広範な範囲の生物および組織に見出され、そして多くの多様な生物学的機能(シグナル伝達、エキソサイトーシスおよび細胞周期の調節を含む)に関与している。14-3-3タンパク質は、シグナル伝達、細胞周期の調節および/または腫瘍形成に関する、広範な範囲の細胞ポリペプチドおよびウイルスポリペプチドに関連することが実証されており、それらが細胞増殖の調節に関与することを示唆する。例えば、Aitken, 1995, Trends Biochem. Sci. 20:95~97を参照のこと。例えば、etaアイソフォームは、いくつかのキナーゼと

相互作用し、このことは、細胞内シグナル伝達カスケードおよび細胞タンパク質のネットワークに14-3-3 etaタンパク質を関連付ける。

【0048】

さらに、透過性の腎傍クロム親和性細胞におけるカルシウム依存性エキソサイトーシスは、いくつかのタンパク質（例えば、14-3-3タンパク質（例えば、Morgan & Burgoyne, 1992, Nature 355: 833~836を参照のこと）； -SNAPタンパク質（例えば、Morgan & Burgoyne, 1995, EMBO J. 14: 323~239を参照のこと）；およびプロテインキナーゼC（例えば、Morgan & Burgoyne, 1992, Nature 355: 833~836を参照のこと）を含む）によって媒介されることが実証されている。さらに、14-3-3タンパク質は、エキソサイトーシス小胞について分泌小胞のアベイラビリティーの増大を可能にするように皮質アクチン障壁（cortical actin-barrier）を認識することによって透過性細胞におけるカテコールアミンの放出を増強し得る。例えば、Roth & Burgoyne, 1995, FEBS Letters 374: 77~81を参照のこと。

【0049】

タンパク質の14-3-3ファミリー（etaアイソフォームを含む）は、脳組織においてトリプトファンおよびトリプトファンヒドロキシラーゼ（これは、カテコールアミンおよびセロトニン神経伝達物質生合成における律速段階の1つである）を活性化する（例えば、Banikら、1997、J. Biol. Chem. 272; 26219~26225を参照のこと）。14-3-3タンパク質は、アルツハイマー病において観察される神経細線維もつれ内に示されている。この付随は、タンパク質の過剰リン酸化を引き起こすMAPキナーゼシグナル伝達に対する14-3-3タンパク質の影響に起因し得る。このタンパク質の過剰リン酸化は、アルツハイマー病の犠牲者の脳中に観察される対になったヘリックス状フィラメントの形成を生じると考えられている。例えば、Layfieldら、1996, Neurosci. Lett. 209: 57~60を参照のこと。さらに、14-3-3タンパク質はまた、クロイツェフェルト-ヤコブ

病を患う患者の脳脊髄液中に示されている。例えば、Rosenmannら、1997, *Neurology* 49:593~595を参照のこと。

【0050】

これらのデータは、タンパク質の14-3-3ファミリー(etaアイソフォームを含む)が神経変性障害に関与することを示唆する。さらに、14-3-3 etaは、シグナル伝達、細胞周期の調節および腫瘍形成における役割を果たす。

【0051】

((ii) Hrsタンパク質)

HPSタンパク質と相互作用することが見出された別のタンパク質は、Hrs(肝細胞増殖因子により調節されるチロシンキナーゼ基質)タンパク質(GenBank登録番号D84064; Luら, 1998. *Gene* 213:125~135)である。Hrsは、構造的に保存された推定ジンクフィンガー結合ドメインおよびいくつかのプロリンに富む領域を有する115Kdal細胞質タンパク質である。例えば、Komada & Kitamura, 1995, *Mol. Cell. Biol.* 15:6213~6221を参照のこと。Hrsタンパク質内のチロシン残基のリン酸化は、細胞を上皮増殖因子または血小板由来増殖因子で処理することによって誘導され得る。従って、Hrsは、これらの前述の増殖因子の細胞内シグナル伝達経路において役割を果たすようである。

【0052】

Hrsは、ラットHrs-2(ATPase触媒活性を有する酵素)と80%の相同性を示す。Hrs-2は、SNAP-25(小胞輸送(すなわち、小胞ドッキングおよび融合)に関与する原形質膜タンパク質)と相互作用する脳タンパク質として特徴付けられた。シナプス小胞ドッキングおよびカルシウム依存性エキソサイトーシスは、種々のシナプス小胞膜タンパク質(例えば、VAMPおよびシナプトガミン(synaptogamin)とそれらの原形質膜に局在化した対応物(例えば、SNAP-25およびシntaxin))との特異的な相互作用を必要とする。Solingerら、1993、*Cell* 75:409~418を参照のこと。次いで、Hrs-2は、用量依存性の様式

で分泌を有意に阻害するように機能し、従ってエキソサイトーシスのモジュレーターであり得ることが実証された。詳細には、Hrs-2のSNAP-25への結合は、シナプス伝達を支持するに必要とされる濃度で、カルシウムによって阻害される。従って、Hrs-2（および相同なヒトタンパク質Hrs）は、小胞輸送タンパク質複合体（例えば、SNAP-25）のカルシウム依存性調節およびヌクレオチド依存性調節を通じて、分泌プロセスのレギュレーターとして作用し得る。例えば、Beanら、1997 Nature 385:826~829を参照のこと。

【0053】

((iii) BMK1 キナーゼ)

BMK1 キナーゼ (Genbank登録番号U29725) のcaHPSoxy末端領域 (ヌクレオチド2431で開始する) は、HPSタンパク質と相互作用することが見出された。マイトジェン活性化プロテインキナーゼBMK1は、細胞周期を介する増殖および進行に必要とされる異なるシグナル伝達経路の一部である (例えば、Leeら、1995、Biochem. Biophys. Res. Comm. 213(2):715~724を参照のこと)。

【0054】

((iv) CDK2)

別のHPSタンパク質-IPは、細胞周期レギュレーターであるCDK2 (GenBank登録番号X61622; Allege & Spottswood, 1991, ENBO J. 10:2653~2659) である。哺乳動物細胞周期において、G1期からDNA複製期への移行は、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) によって調節される。CDKの活性化は、サイクリンと逆リン酸化反応との結び付きによって制御される。調節のさらなるレベルは、CDKのインヒビターによって提供される。CDK2は、例えば、扁平上皮細胞癌、小細胞癌、および多数の細胞癌の大部分に発現される。より高いCDK2キナーゼ活性は、細胞周期の進行の促進、および腫瘍細胞の拘束されない増殖のために重要である。

。

【0055】

((v) 核因子NF-90)

核因子NF90 (GenBank登録番号U10324; 例えば、Kaoら、1994、J. Biol. Chem. 269:20691~20699を参照のこと)のcaHPSoxy末端領域(ヌクレオチド1930で開始する)は、HPSタンパク質と相互作用することが見出された。活性化T細胞(NFAT)の核因子は、T細胞活性化の後に分泌されるリンホカインインターロイキン-2(IL-2)の遺伝子発現を調節することが示されている。例えば、Marcoulatoら、1998、J. Interferon Cytokine Res. 18:351~355を参照のこと。NFATの90および45Kdalサブユニット(すなわち、NF90およびNF45)は、IL-2プロモーターの抗原レセプター応答エレメントに特異的に結合する。NFATは、薬物であるシクロスポリンおよびFK-506のT細胞刺激シグナルおよび免疫抑制活性の両方の核標的である; 一方、NF90およびNF45は、インビトロでのDNA依存性プロテインキナーゼ(DNA-PK)に対する基質である。さらに、組換えNF90は、DNA-PKのサブユニットとDNAとの間の複合体の形成を促進することが見出されている。例えば、Luら、1998、J. Biol. Chem. 273:2136~2145を参照のこと。

【0056】

((B) 神経変性障害および発生障害タンパク質)

((i) アトロフィン-1)

アトロフィン-1 (GenBank登録番号U23851; Margolisら、1996、Brain Res. Mol. Brain Res. 36:219~226)のcaHPSoxy末端領域(ヌクレオチド2649で開始する)は、HPSタンパク質と相互作用することが見出された。アトロフィン-1の正確な機能は、未知であるが、アトロフィン-1は、稀で進行性の致死的な常染色体優勢な神経学的障害である歯状核赤核淡蒼球萎縮症(dentatorubral pallidoluysian atrophy)(DRPLA; スミス病)に関与する遺伝子によってコードされるタンパク質である。DRPLAは、特に、大脳歯状核におけるニューロン変性によって特徴付けられる。臨床的な症

状としては、ミオクローヌステんかん、大脳失調症、舞蹈病アテトーシスおよび痴呆の種々の組合せが挙げられる。DRPLAは、アミノ酸であるグルタミンをコードするCAGの3個のヌクレオチド反復の伸長から生じることが示されている。DRPLA遺伝子産物は、インサイチュハイブリダイゼーションによるとニューロンの細胞質内に主に局在しており（例えば、Yazawaら、1995, Nat. Genet. 10:99~103）、そして大脳領域および小脳領域にわたって広範に広がっている（例えば、Knightら、1997, J. Neurol. Sci. 146:19~26を参照のこと）。

【0057】

複数のWWドメインを含むアトロフィン-1相互作用タンパク質(AIP)が、同定された（例えば、Woodら、1998, Mol. Cell. Neurosci. 11:149~60を参照のこと）。これらのタンパク質のうちの2つは、多数のタンパク質間相互作用モジュールを含むマルチドメインタンパク質である。他の3つのAIPは、高度に相同性であり、各々は、ユビキチンリガーゼに特徴的な4つのWWドメインおよびHECTドメインを有する。

【0058】

((ii) デイ-ジョージ(DiGeorge)症候群(DGS)-Iタンパク質)

本明細書中に開示されるさらなるHPSタンパク質-IPは、デイ-ジョージ症候群(DGS)-Iタンパク質(GenBank登録番号L77566;例えば、Gongら、1996, Hum. Mol. Genet. 5:789~800を参照のこと)である。4000人の子供のうち1人が、第22染色体欠失症候群(デイ-ジョージ症候群)に罹患して誕生し、これは、子供において最も一般的な遺伝子異常のうちの1つである。デイ-ジョージ症候群に罹患した患者は、染色体領域22q11.2の欠失を有する。DGS-I遺伝子は、476アミノ酸残基からなるタンパク質をコードする第22染色体のDGSに重要な領域に局在している。DGSに関連する臨床的症狀としては、心筋不全、胸腺発育不全、異常な顔面特徴、免疫不全、口蓋裂および血中低カルシウムが挙げられる。

【0059】

(C)新規遺伝子によってコードされるHPS タンパク質 - I P

(i) H P I P 1

これまで特徴づけされていない1つの遺伝子である、H P I P 1と称するものが、H P S相互作用ポリペプチドであると同定された。

【0060】

(ii) ヒトHN1ホモログ

これまで特徴付けされていない別のヒト遺伝子(HN1ホモログと称する)が、マウス遺伝子HN-1に対するヒトホモログであると同定された(Tangら、1997.Mamm.Genome 8:695-6を参照のこと)。マウスHn1は、多くの胎児および成体の組織において発現する。最高レベルの発現は、造血細胞において見出される)(10日齢の卵黄嚢、血液島由来の循環赤芽球、13日齢の胎児性肝臓、成体骨髄および脾臓を含む)。その発現はまた、17日齢胎児脳において非常に高く、他方、成体脳における発現は、かなり低い。マウスHN-1のヒトホモログについてのヌクレオチドおよびアミノ酸の配列が本発明において開示される。

【0061】

本発明は、HPSポリペプチドのHPSIP結合ドメインおよび本明細書において開示されるHPSIPポリペプチドのHPS結合ドメインを含むポリペプチドの複合体を包含する。これらの複合体は、例えば、HPSタンパク質 - I P、その誘導体、アナログおよびフラグメントを伴う、HPSタンパク質の誘導体、アナログおよびフラグメントを包含し得る。1つの実施形態において、そのような複合体は、抗HPSタンパク質・HPSタンパク質 - I P抗体を結合する。具体的には、ヒトHPSタンパク質と、ヒトHPSタンパク質 - I Pタンパク質との複合体が開示される。

【0062】

本発明はまた、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - I P複合体を生成および/または単離する方法を提供する。特定の実施形態において、本発明は、組換えDNA技術を使用して、HPSタンパク質およびその結合パートナー(または、その複合体の一方もしくは両方のメンバーのフラグメント、誘導体もしくはホ

モログ)の両方を発現する方法を提供する。ここで、両方の結合パートナーは1つの異種プロモーター(すなわち、その特定の複合体成分をコードするネイティブ遺伝子に天然に随伴しないプロモーター)の制御下にあるか、または各々は別の異種プロモーターの制御下にあるかのいずれかである。

【0063】

本発明はまた、それぞれ、部分的なHP/IP1遺伝子およびヒトHN1ホモログ遺伝子のヌクレオチド配列、ならびにそのそれぞれのコードされるアミノ酸配列を提供する。本発明は、さらに、HP/IP1タンパク質のカルボキシル末端領域、およびHN1ホモログタンパク質(それらの誘導体、フラグメント、ホモログ、またはアナログ)、ならびにHP/IP1タンパク質およびHN1ホモログタンパク質またはその誘導体をコードする核酸に関する。本発明は、さらに、多くの異なる種、好ましくは、脊椎動物、そしてより好ましくは哺乳動物からの、HP/IP1タンパク質およびHN1ホモログタンパク質、ならびにこれら上記タンパク質をコードする核酸配列を提供する。例えば、1つの実施形態において、HP/IP1タンパク質およびHN1ホモログタンパク質および遺伝子は、ヒト起源である。上記のタンパク質およびその誘導体、フラグメント、ホモログまたはアナログの産生を開示する方法もまた、本発明において提供される。

【0064】

本発明はさらに、HP/IP1およびヒトHN1ホモログの誘導体またはアナログに関し、これらは、生物学的に活性であり、すなわち、全長(野生型)HP/IP1およびヒトHN1ホモログタンパク質に関連する、1つ以上の公知の機能的活性を有する。そのような生物学的活性としては以下が挙げられるがそれらに限定されない:(i)HP/Sタンパク質に結合、またはそれとの相互作用と競合する能力;(ii)抗原性(すなわち、HP/IP1およびヒトHN1ホモログと、結合するか、または、それぞれ、抗HP/IP1および抗ヒトHN1ホモログ抗体に結合することについて、競合する能力;ならびに(iii)免疫原性(すなわち、それぞれ、HP/IP1タンパク質およびHN1ホモログについて特異的であり、そして結合する抗体を生成する能力)。

【0065】

HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体ならびに/あるいはHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質の異常レベルと関連する疾患および障害についての、診断および予後に関連する方法、ならびにそれについてのスクリーニングに關与するこれらの方法が提供される。本発明はまた、以下と関連する疾患または障害を処置または予防することに関連する方法を提供する：(i)異常レベルのHPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体；(ii)異常レベルのHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質、または(iii)異常生物学的活性レベルの、その複合体の1つ以上の成分。これらの方法は好ましくは、以下を包含する：(i)HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体を投与する工程；(ii)HPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質を投与する工程、または(iii)HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体形成または活性のモジュレーター（例えば、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、非複合体化HPSタンパク質、またはその結合パートナーもしくはそのフラグメント（好ましくは、複合体形成に直接關与するHPSタンパク質またはHPSタンパク質-IPの部分を含むフラグメント））に結合する抗体、を投与する工程。本明細書において開示される方法はまた、以下を包含するがそれに限定されない：(i)HPSタンパク質またはHPSタンパク質-IPの変異体であって、結合親和性を増加または減少させるもの；(ii)タンパク質複合体形成の低分子インヒビターまたはエンハンサーあるいは(iii)タンパク質複合体を安定化または中和のいずれかをさせる抗体。

【0066】

治療剤または診断剤における使用のための生物学的活性を定量的に評価するために、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、HPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質、またはモジュレーター（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）の検出することに関連する方法もまた提供される。

【0067】

((1)HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体ならびにHPIP1およびヒトHN1ホモログのタンパク質)

本発明は、H P S ポリペプチドのH P S I P 結合ドメインとH P S I P ポリペプチドのH P S 結合ドメインとの複合体を提供する。

【0068】

「H P S I P 結合ドメイン」とは、アミノ酸領域が存在するH P S ポリペプチドがH P S I P ポリペプチドに特異的に結合することが可能になるに十分なアミノ酸の領域を意味する。コードされたH P S I P 結合ポリペプチドは、全長H P S ポリペプチドに由来し得るか、またはH P S ポリペプチドの誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログまたはパラログに由来し得る。好ましくは、この誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログ、またはパラログは、以下の属性の1つ以上を有する：(i) 機能的に活性である（すなわち、全長野生型H P S に関連する1つ以上の機能的活性を示し得ること）；(i i) H P S I P タンパク質に結合する能力を有する；(i i i) 免疫原性である、または(i v) 抗原性である。

【0069】

いくつかの実施形態において、H P S ポリペプチドのフラグメントは、少なくとも10、20、30、40、または50のアミノ酸残基（好ましくは、35以下、100以下または900以下のアミノ酸残基）のH P S ポリペプチドを含む。コードされたH P S ポリペプチドの誘導体またはアナログは、例えば、以下のときに、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%または95%のアミノ酸同一性の、種々の実施形態におけるH P S に対して実質的に騒動である領域を包含する分子：(i) 同一なサイズのアミノ酸配列と比較するとき；(i i) そのアラインメントが、当該分野において公知のコンピュータ相同性プログラムによって行われるアラインメントされた配列と比較されるとき、または(i i i) 以下に議論されるように、コード核酸がストリンジェント、中程度にストリンジェント、または非ストリンジェントな条件下でそのH P S タンパク質をコードする配列とハイブリダイズし得るとき。

【0070】

従って、いくつかの実施形態において、そのコードされたH P S I P 結合ドメインは、タンパク質受託番号U 6 5 6 7 6 を有するアミノ酸配列を含むポリペプ

チドに対して、少なくとも90%同一である配列を含む、HPSポリペプチドに由来する。いくつかの実施形態において、そのドメインは、U65676のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、少なくとも95%、98%、または99%さえ同一であるHPSポリペプチドに由来する。

【0071】

「HPS結合ドメイン」とは、アミノ酸領域が存在するHPSIPポリペプチドがHPSポリペプチドに特異的に結合することを可能にするに十分なアミノ酸の領域を意味する。コードされるHPS結合ポリペプチドは、全長のHPSIPポリペプチド、またはHPSIPポリペプチドの誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはパラログに由来し得る。好ましくは、この誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログ、またはパラログは、1つ以上の以下の属性を有する：(i)機能的に活性である(すなわち、全長野生型HPSIPに関連する1つ以上の機能的活性を示し得ること)；(ii)HPSタンパク質に結合する能力を有する；(iii)免疫原性である、または(iv)抗原性である。

【0072】

いくつかの実施形態において、HPS結合ドメインは、HPSIPポリペプチドのフラグメントであるポリペプチド中に存在する。このフラグメントは、少なくとも10、20、30、40、または50のアミノ酸残基(好ましくは、35以下、100以下または900以下のアミノ酸残基)のHPSポリペプチドを含む。コードされたHPSIPポリペプチドの誘導体またはアナログは、例えば、以下のときに、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%または95%のアミノ酸同一性の、種々の実施形態におけるHPSに対して実質的に騒動である領域を包含する分子：(i)同一なサイズのアミノ酸配列と比較するとき；(ii)そのアラインメントが、当該分野において公知のコンピュータ相同性プログラムによって行われるアラインメントされた配列と比較されるとき、または(iii)以下に議論されるように、コード核酸がストリンジェント、中程度にストリンジェント、または非ストリンジェントな条件下でそのHPSIPタンパク質をコードする配列とハイブリダイズし得るとき。

【0073】

従って、いくつかの実施形態において、そのコードされたH P S結合ドメインは、表Iに示されるH P S I Pタンパク質受託番号を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して、少なくとも90%同一である配列を含む、H P S I Pポリペプチドに由来する。いくつかの実施形態において、そのドメインは、参照されたアミノ酸配列を含むポリペプチドと、少なくとも95%、98%、または99%さえ同一であるH P Sポリペプチドに由来する。

【0074】

H P S結合ドメインを提供するH P S I Pポリペプチドは、は、例えば、14-3-3 eta, Hrs, BMK1 キナーゼ CDK2, 核因子NF90、アトロフィン-1、DGS-1:HPIP1またはヒトHUIホモログタンパク質であり得る。H P S結合領域を含むH P S I Pポリペプチドの例は、表I第4欄(「H P S - I PのORF」と称される)に示されるものである。いくつかの実施形態において、H P S結合ドメインは、そのポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドにおいて存在する。すなわち、その複合体におけるH P S T Pポリペプチドは、全長H P S T Pポリペプチド(例えば、ヒトまたは齧歯類(ラットまたはマウス)のH P S I Pポリペプチド)で有り得る。あるいは、H P S I Pポリペプチドは、本明細書に記載されるH P S T Pポリペプチドのフラグメント、ホモログ、またはアナログであり得る。

【0075】

いくつかの実施形態において、H P S T P結合ドメインは、H P Sポリペプチドの完全アミノ酸配列を含むポリペプチド中に存在する。すなわち、そのH P Sポリペプチドは、全長ポリペプチド(例えば、ヒトまたは齧歯類(ラットまたはマウス)のH P Sポリペプチド)であり得る。いくつかの実施形態において、H P S I P結合ドメインは、受託番号U65676を有するペプチドを含むH P Sポリペプチドに存在する。これは、例えば、以下のヌクレオチドによってコードされるポリペプチドである:表I第2欄に示されるように1272-2306; 1271-2357; 91-1292; 1272-2306。いくつかの実施形態において、H P S I P結合ドメインを含むH P Sポリペプチドは、H P Sポリペプチドのフラグメント、ホモログまたはアナログである。

【0076】

所望される場合、HSPIP結合ドメインを提供するポリペプチドまたはHPS結合ドメインを提供するポリペプチド、あるいはその両方は、標識、すなわち、1つ以上の検出可能な物質へと付着され得る。標識は、ポリペプチドを標識するために任意の当該分野において認識される方法を用いて実施され得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、置換基、蛍光物質、化学発光物質、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、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な置換基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フルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフォコエリトリン；発光物質としては、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アロキシンが挙げられ；そして適切な放射性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が挙げられる。

【0077】

従って、本発明はまた、以下を含む複合体に関する：(i) HPSタンパク質-I Pと相互作用するHPSタンパク質の誘導体、フラグメントおよびアナログ；(ii) HPSタンパク質-I Pと相互作用するHPSタンパク質；および(iii) HPSタンパク質-I Pの誘導体、フラグメントおよびアナログと相互作用する、HPSの誘導体、フラグメント、およびアナログ。従って、本発明は、HPSタンパク質・HPSタンパク質-I P複合体、HPIP1およびヒトHIN1ホモログタンパク質、ならびにその種々の誘導体、フラグメントおよびアナログの、細胞機能（特に、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-I Pが相関付けられている細胞機能）を変更する能力についてスクリーニングのための方法を提供する。そのような機能としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：生理学的プロセス（例えば、ベシクル輸送、タンパク質トラフィッキング、色素沈着調節、および血小板機能）および病理学的プロセス（例えば、

眼・皮膚白皮症、血小板機能不全、神経変性疾患および線維性肺疾患)。

【0078】

細胞機能を変更する能力に加えて、これらのタンパク質複合体の他の機能としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：抗HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体抗体への結合、および当該分野において記載される他の活性。例えば、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IPの誘導体またはアナログであって、所望の免疫原性または抗原性を有するものは、免疫アッセイにおいて、免疫のため、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体活性などのために使用され得る。HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体の誘導体またはアナログであって、目的の特性（例えば、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体における関与）を保持または増強、あるいは欠如または阻害するものは、それぞれ、そのような特性および生理学的相関のインデューサーまたはインヒビターとして使用され得る。特定の実施形態は、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質 - IPタンパク質のフラグメントのHPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体に関する。このフラグメントは、そのようなフラグメントがHPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複体内に包含されるときに、抗HPSタンパク質、抗HPSタンパク質 - IP抗体によって、あるいはHPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体について特異的な抗体によって結合され得る。

【0079】

本発明に含まれるのはまた、例えば、ペプチド結合でHPSIPポリペプチドの領域へと共有結合したHPSポリペプチドの領域を含むキメラポリペプチドである。好ましくは、各々HPSおよびHPSIPのポリペプチドから少なくとも6つのアミノ酸がこのキメラポリペプチドに含まれる。HPSIPポリペプチドは、例えば、14-3-3 eta, Hrs, BMKI キナーゼ、CDK2、核因子NF90、アトロフィン - 1、DGS - 1、HIP1またはヒトHN1ホモログタンパク質の1つ以上であり得る。いくつかの実施形態において、HPSポリペプチドに由来するアミノ酸は、HPSIP結合ドメインを含む。他の実施形態において、このHPSIPポリペプチドに由来するアミノ酸は、HPS結

合ドメインまたは領域を包含する。

【0080】

本発明はさらにHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質、ならびにそれらの誘導体、ホモログおよびアナログに関する。HPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質の、ネイティブタンパク質、フラグメント、誘導体またはアナログは、以下を含む、種々の供給源に由来し得る：例えば、ヒト、マウス、ラット、ブタ、ウシ、イヌ、サル、ハエ、カエル、または植物。

【0081】

ヒトHPSタンパク質、14-3-3 eta、Hrs、BMK1 キナーゼ、CDK2、核因子NF90、アトロフィン-1およびDGS-1をコードするHPSヌクレオチド配列は公知である。HPSタンパク質およびHPSタンパク質-IPをコードする核酸は、当該分野において公知の任意の方法によって入手され得る（例えば、cDNAまたはゲノムのライブラリーから、その遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドを用いてクローニングすることによってその配列の3'および5'の末端にハイブリダイズし得る合成プライマーを用いるPCR増幅による）。ホモログ（すなわち、ヒト以外の種に由来する、HPSタンパク質またはHPSタンパク質-IPをコードする核酸）または他の関連する配列（例えば、パラログ）は、低い、中程度、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条件下で、プローブとして特定のヒトヌクレオチド配列のすべてまたは一部を使用すること、および続いてクローニングすることによって、入手され得る。

【0082】

HPSタンパク質およびHPSタンパク質-IPは、単独または複合体中のいずれかで、タンパク質精製およびインビトロ転写/翻訳について当該分野において周知の方法によって入手され得る。1つ以上の上記のタンパク質の発現は、適切な発現ベクター（すなわち、挿入されたタンパク質をコードする配列の転写および翻訳について必要なエレメントを有するベクター）中へと目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列のすべてまたは一部を含む核酸の挿入によって容易にされ得る。さらに、必要な転写および翻訳のシグナルもまた、HPSタン

パク質、任意のH P Sタンパク質 - I P遺伝子、またはそれらの隣接領域についてのネイティブプロモータによって供給され得る。種々の宿主ベクター系を利用して、このタンパク質コード配列を発現し得る。これらとしては以下が挙げられるがそれらに限定されない：(i) ウイルスに感染した哺乳動物系（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルスなど）；(i i) ウイルスに感染した昆虫細胞系（例えば、バキュロウイルス）；(i i i) 酵母ベクターを含む酵母、あるいは(i v) 以下で形質転換された細菌：バクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNA。これらのベクターの関連する発現エレメントは、その強度および特異性において変動する。

【0083】

1つの実施形態において、H P Sタンパク質 - H P Sタンパク質 - I P複合体は、同じプロモーターまたは2つの別個のプロモーターのいずれかの制御下で、H P Sタンパク質配列全体およびH P Sタンパク質 - I Pコード配列を同じ細胞内で発現することによって得られる。別の実施形態において、H P Sタンパク質の誘導体、フラグメントまたはホモログおよび/またはH P Sタンパク質 - I Pの誘導体、フラグメントまたはホモログは、組換え発現される。好ましくは、H P Sタンパク質の誘導体、フラグメント、またはホモログ、あるいはH P Sタンパク質 - I Pタンパク質の誘導体、フラグメントまたはホモログは、結合アッセイによって同定された結合パートナーと複合体を形成し（例えば、改変された酵母ツーハイブリッド系）、そしてより好ましくは、抗H P Sタンパク質・H P Sタンパク質 - I P複合体抗体とも結合する複合体を形成する。

【0084】

DNAフラグメントをベクターに挿入するために、当該分野において公知の任意の方法が利用されて、タンパク質コード配列のみならず適切な転写/翻訳制御シグナルをも有するキメラ遺伝子を含む発現ベクターを構築し得る。これらの方法は、以下を含み得る：インビトロ組換えDNAおよび合成技術、ならびにi) インビボ組換え（遺伝子組換え）。H P Sタンパク質およびH P Sタンパク質 - I Pをコードするヌクレオチド配列の発現は、第二のヌクレオチド配列によって調節され得、その結果、その遺伝子またはその遺伝子のフラグメントが、目的の

組換えDNA分子で形質転換された宿主において発現される。

【0085】

そのタンパク質の発現は、当該分野で公知のプロモーター - エンハンサーによって制御され得る。利用され得るプロモーターとしては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：(i) SV40初期プロモーター（例えば、Bernoisおよび Chambon, 1981. Nature 290:304-310を参照のこと）；(ii) ラウス肉腫ウイルスの3'末端の長末端反復に含まれるプロモーター（例えば、Yamamotoら, 1980. Cell 22:787-797を参照のこと）；(iii) 単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（例えば、Wagnerら, 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445を参照のこと）；(iv) メタロチオネイン遺伝子の調節配列（(Brinsterら, 1982. Nature 296:39-42を参照のこと））；(v) 原核生物発現ベクター（例えば、ラクタマーゼプロモーター（例えば、Villa-Kamaroffら, 1978. Proc. natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731を参照のこと）またはtacプロモーター（例えば、DeBoerら, 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-95を参照のこと））；(vi) オパリンシンセターゼプロモーター（例えば、Herrar-Estrellaら, 1984. Nature 303:209-213を参照のこと）またはカリフラワーモザイクウイルス35SRNAプロモーター（例えば、Gardnerら, 1981. NUC. Acids Res. 9:2871-2879を参照のこと）を含む植物発現ベクター；(vii) 光合成酵素リブローズビスホスフェートカルボキシラーゼ (caHPSoxylase)（例えば、Herrar-Estrellaら, 1984. Nature 310-115-120を参照のこと）；(viii) 酵母および他の真菌からのプロモーターエレメント（例えば、GalAプロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、アルカリホスファターゼプロモーター）ならびに(ix) 組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されてきている動物転写調節領域（例えば、膵臓腺房

細胞において活性であるエラストラーゼI遺伝子制御領域)(例えば、Swiftら、1984. Cell 38:639-646を参照のこと)。

【0086】

本発明の1つの実施形態において、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-IPまたはそれらのフラグメント、誘導体もしくはホモログをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結したプロモーター、1つ以上の複製起点、および必要に応じて1つ以上の選択マーカー(例えば、抗生物質耐性遺伝子)を含むベクターが利用される。別の実施形態において、HPSタンパク質およびHPSタンパク質-IPのコード配列またはその部分を、一緒にかまたは別個に含む発現ベクターが市販のpGEXベクター(グルタチオンSトランスフェラーゼ発現ベクター; Promega Corp.; Madison, WI)の1つのEcoRI制限部位への上記遺伝子配列のサブクローニングによって作製される。例えば、Smith & Johnson, 1988. Gene 7:31-40を参照のこと。これは、正確な読み枠で遺伝子産物を発現することを可能にする。

【0087】

目的の核酸配列を含む発現ベクターは、以下の3つの一般的方法によって同定され得る:(i)核酸ハイブリダイゼーション;(ii)マーカー遺伝子機能の存在または非存在;ならびに(iii)挿入された配列の発現。第一の方法において、HPSタンパク質またはHPSタンパク質-IPの配列は、挿入された配列に対して相同および相補的である配列を有するプローブとの核酸ハイブリダイゼーションによって検出される。第二の方法において、組換えベクター/宿主系は、そのベクターへの目的の配列の挿入によって引き起こされる特定のマーカー機能(例えば、抗HPSタンパク質抗体、抗HPSIP抗体、または抗HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体抗体への結合;抗生物質への耐性、バキュロウイルスにおける閉塞体(occlusion body)の形成など)の存在または非存在に基づいて、同定および選択され得る。第三の方法において、組換え発現ベクターは、組換えベクターによって発現された、HPSタンパク質またはHPSタンパク質-IP産物についてアッセイすることによって同定さ

れ得る。そのようなアッセイは、インビトロアッセイ系における相互作用種の、例えば、物理的特性または機能的特性（例えば、H P S タンパク質・H P S タンパク質 - I P 複合体の形成、またはその他に対して特異的な抗体への免疫活性）に基づき得る。

【0088】

一旦組換えタンパク質分子が同定され、そしてその複合体または個々のタンパク質が単離されると、当該分野において多数の方法を使用してそれらを増殖／増幅させ得る。さらに、挿入された配列の発現を調節するように働くか、または特定の所望の様式で発現されたタンパク質を改変またはプロセッシングする宿主細胞株が選択され得る。特定のプロモーターに由来する発現は、特定のインデューサーの存在下で上昇し得、従って遺伝子操作されたH P S タンパク質および／またはI P S タンパク質 - I P の発現を制御し得る。さらに、異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳および翻訳後のプロセッシングおよび改変（修飾）（例えば、グリコシル化、リン酸化など）について特徴および特定の機構を有する。

【0089】

他の実施形態において、H P S タンパク質および／またはH P S タンパク質 - I P、あるいはそれらのフラグメント、ホモログまたは誘導体は、ペプチド結合を介して異なるタンパク質の異種タンパク質配列に結合したペプチドを含む、融合またはキメラタンパク質産物として発現され得る。そのようなキメラ産物は、当該分野において周知の方法によって、互いに適切な読み枠で所望のアミノ酸をコードする適切な核酸配列を連結すること、ならびに適切な宿主中のキメラ産物を発現することによって生成され得る。あるいは、そのようなキメラ産物は、タンパク質合成技術によって生成され得る（例えば、ペプチド合成器の使用による）。ここで、任意の異種タンパク質をコードする配列に融合されたH P S タンパク質および／またはH P S タンパク質 - I P を含むキメラ遺伝子が構築され得る。特定の実施形態は、H P S タンパク質および／またはH P S タンパク質 - I P の少なくとも6アミノ酸のフラグメントを含むキメラタンパク質に関する。

【0090】

本明細書に開示された1つの実施形態において、H P S タンパク質およびH P

Sタンパク質 - IPの相互作用ドメインおよび/または、必要に応じて異種官能性試薬（例えば、その2つのドメインの間のペプチドリナー）を含む融合タンパク質が生成される。ここで、その異種官能性試薬の使用は、HPSタンパク質およびHPSタンパク質 - IPの結合ドメインの相互作用を促進する。これらの融合タンパク質は、相互作用の熱力学的安定性が所望される場合（例えば、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体に対して特異的な抗体の生成の場合）に特に有用であり得る。さらに、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質 - IPの誘導体は、そのそれぞれの配列を、保存的置換、付加または欠失であって機能的に等価な分子を提供するものの使用によって変更することによって生成され得る。ヌクレオチドコード配列の縮重性に起因して、他のDNA配列であって、HPSタンパク質またはHPSタンパク質 - IP遺伝子と実質的に同じアミノ酸配列をコードするものもまた、本発明の実施において使用され得る。本発明の特定の実施形態において、HPSタンパク質またはHPSタンパク質 - IPの少なくとも6つの（連続する）のアミノ酸からなるタンパク質が提供される。他の実施形態において、そのフラグメントは、HPSタンパク質またはHPSタンパク質 - IPの少なくとも約10、20、30、40または50の連続するアミノ酸からなる。

【0091】

本発明のHPSタンパク質またはHPSタンパク質 - IP誘導体およびアナログ、当該分野において公知の種々の方法によって生成され得る。その産生を生じる操作は、遺伝子またはタンパク質のいずれかのレベルにおいて生じ得る。例えば、クローニングされたHPSタンパク質またはHPSタンパク質 - IP遺伝子配列は、当該分野で公知の多数の任意の戦略によって改変され得る（例えば、例えば、Sambrook、ら、1989、Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkを参照のこと）。次いで、この配列を、制限エンドヌクレアーゼを用いて適切な部位で切断し得、単離し得、そしてインビトロで連結し得る。さらに、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質 - IPをコ

ードするヌクレオチド配列は、インビトロまたはインビボで変異され得、以下のようにし得る：(i) 翻訳開始および/もしくは末端配列を作製ならびに/または破壊、あるいは(ii) コード領域において改変を作製および/または新たな制限エンドヌクレアーゼ部位を作製または既存のものを破壊して、さらに、インビトロ改変を容易にする。当該分野において公知の変異誘発のための任意の技術が使用され得る。これには、例えば、化学変異誘発およびインビトロ部位特異的変異誘発(例えば、Hutchinsonら、1978. J. Biol. Chem. 253:6551-6558を参照のこと); TABTMLinkers (Pharmacia; Uppsala Sweden)の使用などが含まれる。

【0092】

一旦HPSタンパク質および/あるいはHPSタンパク質-IP、またはそのフラグメントもしくは誘導体を発現する組換え細胞が同定されると、その個々の遺伝子産物または複合体は単離および分析され得る。これは、そのタンパク質または複合体の物理的および/または機能的な特性に基づくアッセイの使用によって容易になる。そのアッセイとしては、例えば、その産物の放射性標識に続いてのゲル電気泳動分析、イムノアッセイ、マーカー標識産物への架橋などが挙げられる。

【0093】

HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、HPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質は、当該分野において公知の標準的な方法によって単離および精製され得る(天然供給源またはその複合体またはタンパク質を発現する組換え宿主細胞から)。その方法としては、以下が挙げられる：(i) カラムクロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー、ゲル排除、逆相高圧(逆相HPLC)、急速タンパク質液体(FPLC)など)；(ii) 示差的遠心分離；(iii) タンパク質の精製のために利用される示差的可溶性または他の任意の標準的な技術。さらに、生物学的機能性は、当該分野において公知の任意の適切なアッセイを用いて評価され得る。あるいは、一旦HPSタンパク質-IPまたはその誘導体が同定されると、そのタンパク質のアミノ酸配列は、それ

がコードされたキメラ遺伝子のヌクレオチド配列から推定され得る。結果として、そのタンパク質（またはその誘導体）は、当該分野において公知の標準的な化学的方法によって合成され得る。例えば、Hunkapillerら, 1984 . Nature 310: 105 - 111を参照のこと。

【0094】

HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質 - IP配列の操作は、タンパク質レベルにおいて行われ得る。本発明の範囲内に含まれるのは、HPSタンパク質、HPSタンパク質 - IPまたはそれらのフラグメント、誘導体もしくはアナログの複合体の誘導体であって、翻訳の間またはその後示差的に改変されたもの（例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基での誘導体化、タンパク質切断、抗体分子もしくは他の細胞リガンドへの連結など）である。任意の多数の化学的改変が以下を含む公知の技術によって実施され得る：例えば、臭化シアノゲンでの特定の化学的切断、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、NaBH₄、アセチル化、ホルミル化、酸化、還元、ツニカマイシン存在下での代謝合成など。

【0095】

特定の実施形態において、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質 - IPの配列は、蛍光標識を含むように改変される。別の特定の実施形態において、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質 - IPは、ヘテロ官能性試薬を含むように改変される。これを使用して、そのタンパク質を、その複合体の他のメンバーまたは他のHPS - HPSタンパク質 - IPへと架橋され得る。さらに、HPSタンパク質、HPSタンパク質 - IPのアナログおよび誘導体、またはそれらのアナログおよび誘導体は、化学的に合成され得る。例えば、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質 - IPの一部に対応するペプチドであって、所望のドメインを含むかもしくは所望インビトロ活性を媒介するもの（例えば、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体形成）は、ペプチド合成器の使用によって合成され得る。さらに、そのようなことが所望される場合、非古典的なアミノ酸または化学的アミノ酸アナログが、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質 - IPへの置換または付加として導入され得る。

【0096】

標準的な配列決定技術に加えて、H P S タンパク質・H P S タンパク質 - I P の複合体またはH P I P 1 およびヒトH N 1 ホモログタンパク質は、親水性分析によって分析され得る。例えば、Hopp & Woods, 1981. Proc., Natl. Acad. Sci. USA 78:3824-3828を参照のこと。二次構造分析をもまた行って、H P S タンパク質および/またはH P S タンパク質 - I P の領域であって、特定の構造を推定するものを同定し得る。例えば、Chou & Fasman, 1974. Biochemistry 13:222-223を参照のこと。操作、翻訳、二次構造予測、親水性および疎水性のプロファイル、オープンリーディングフレーム予測およびプロットティング、ならびに配列相同性の決定はすべて、現在当該分野において利用可能なコンピュータソフトウェアプログラムを用いて達成され得る。構造分析の他の方法としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：X線結晶学（例えば、Engstrom, 1974. Biochem. Exp. Biol. 11:7-13を参照のこと）；質量分析およびガスクロマトグラフィー（例えば、Methods in Protein Science, J. vile and Sons, New York, 1997を参照のこと）；そしてコンピュータモデリング（例えば、Fletterick & Zoller, 編 1986. Computer Graphics and Molecular Current Communications in Molecular, Biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NYを参照のこと）もまた使用され得る。

【0097】

((2) H P I P 1 およびヒトH N 1 ホモログタンパク質をコードする遺伝子の同定および単離)

本発明は、H P I P 1 およびヒトH I N 1 ホモログタンパク質ヲコードするヌクレオチド配列を開示する。特定の実施形態において、H P I P 1 およびヒトH N 1 ホモログ核酸配列は、それぞれ配列番号1および3またはその部分、あるい

は全体またはその部分で、HPHP1およびヒトHN1ホモログタンパク質（例えば、それぞれ配列番号2および4のアミノ酸またはその部分を含むタンパク質）を含む。本発明はまた、HPHP1およびヒトHN1ホモログ配列の少なくとも8ヌクレオチド（すなわち、ハイブリダイズ可能な部分）からなる精製された核酸を提供する。他の実施形態において、その核酸は、HPHP1およびヒトHN1ホモログ遺伝子配列の、少なくとも約25ヌクレオチド、50ヌクレオチド、100ヌクレオチド、150ヌクレオチド、または200ヌクレオチド（連続）、あるいは全長HPHP1およびヒトHN1ホモログ遺伝子配列からなる。さらに別の実施形態において、その核酸は、35ヌクレオチド、200ヌクレオチドまたは500ヌクレオチドよりも短い長さである。その核酸は、一本鎖または二本鎖であり得る。

【0098】

本発明はまた、上記の核酸配列にハイブリダイズ可能または相補的な核酸に関する。特に、本発明は、上記の配列に対してハイブリダイズ可能な核酸に対して逆相補体を提供する。より詳細には、核酸の鎖の逆相補体は、その鎖の逆の方向に走る相補的配列を有し、その結果、その逆相補体は、その核酸鎖に対して mismatches なくハイブリダイズする。1つの実施形態において、HPHP1およびヒトHN1ホモログ遺伝子の、少なくとも約10ヌクレオチド、25ヌクレオチド、50ヌクレオチド、100ヌクレオチドもしくは200ヌクレオチドまたはそのコード領域全体に対して相補的な配列を含む（特に、その逆相補体である）核酸が生成される。

【0099】

1つの実施形態において、HPHP1およびヒトHN1ホモログ核酸配列（例えば、それぞれ配列番号1および4に示される配列を有するもの）、またはHPHP1およびヒトHN1ホモログタンパク質誘導体をコードする核酸（またはその相補体）に対して、低ストリンジェント条件下でハイブリダイズ可能な核酸が開示される。例示のためでありそして限定ではなく、低ストリンジェンシー、中程度のストリンジェンシーまたは高ストリンジェンシーの条件を用いる手順は、以下に記載されるとおりであり得る：例えば、Shilo & Weinbe

rg 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6789-6792。低ストリンジェンシー、中程度のストリジェンシー、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションの条件（例えば、種をまたぐハイブリダイゼーションについて使用されるような）は、当該分野において周知であり、そして利用され得る。

【0100】

HP I P 1およびヒトHN 1ホモログタンパク質、またはHP I P 1およびヒトHN 1ホモログアンチセンス核酸の誘導体およびアナログをコードする核酸分子もまた、さらに開示される。「HP I P 1およびヒトHN 1ホモログタンパク質のフラグメントまたは部分をコードする核酸」とは、HP I P 1およびヒトHN 1ホモログタンパク質の示されるフラグメントまたは部分のみをコードする核酸を意味し、連続配列としてHP I P 1およびヒトHN 1ホモログの他の連続部分はいはない。

【0101】

所定のヌクレオチド配列内には、潜在的なオープンリーディングフレーム（ORF）がNCBI BLAST ORF Finderコンピュータプログラムを用いて同定され得る。このプログラムは現在、市販されている。すべての公知のタンパク質翻訳産物が少なくとも60アミノ酸以上の長さを有する（例えば、Creighton, 1992. Proteins. 第2版、W. H. Freeman and Co., New York, NY）という事実に起因して、60アミノ酸以上のタンパク質を潜在的にコードするこれらのORFのみが夾呂される。HP I P 1をコードする核酸配列は、終止コドンを含む。HP I P 1（ヌクレオチド1から519、173アミノ酸）をコードするORFは、より長いタンパク質のカルボキシ末端を推定する。ヒトHN 1ホモログ（ヌクレオチド106から564、153アミノ酸リーディングフレーム、メチオニン開始コドンで始まり、そして終止コドンで終わる）をコードするORFは、153アミノ酸のタンパク質を予測する。これは、算出された分子量が15946.4である。

【0102】

当該分野において利用可能な任意の方法を利用して、HP I P 1およびヒトH

N1ホモログタンパク質をコードする全長(すなわち、全長コード配列を含む) cDNAクローンを入手し得る。特に、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を利用して、cDNAライブラリーからインシリコで配列増幅し得る。同定された配列の3'末端および5'末端の配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーを、プライマーとして使用して、核酸サンプル(cDNAまたはDNA)、好ましくはcDNAライブラリーから;適切な供給源(例えば、改変された酵母ツ-ハイブリッドアッセイ融合物の集団についてのもともとのcDNAライブラリーが由来するサンプル)からの目的の配列のPCRによる増幅を容易にし得る。例えば、PCRは、Perkin-Elmer Cetus Thermal CyclerおよびTaqポリメラーゼの使用によって実施され得る。増幅されるDNAは、任意の真核生物種から入手したゲノムDNAまたはcDNAを含み得る。PCR反応において使用するために、いくつかの異なる縮重プライマーを合成することを選択し得、そしてPCR反応をプライミングすることにおいて使用されるハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを変動して、核酸ホモログを増幅すること(例えば、ヒト以外の種からのHP1P1およびヒトHN1ホモログタンパク質配列、およびHP1P1およびヒトHN1タンパク質に対して相同性を有するヒト配列を入手すること、またはヒト配列を入手すること)もまた、公知のヌクレオチド配列と核酸ホモログとの間に、高い程度または低い程度のヌクレオチド配列相同性を単離することによって、可能である。交叉種ハイブリダイゼーションのために、低ストリンジェンシーが一般に好ましい。対照的に、同じ種のハイブリダイゼーションのために、中程度のストリンジェント条件が一般に好ましい。

【0103】

HP1P1およびヒトHN1ホモログタンパク質配列のすべてまたは一部を含む首尾良い増幅の後、それらの増幅された配列は、続いてクローニングおよび配列決定され得る。そして所望な場合、プローブとして利用して完全なcDNAまたはゲノムクローンを単離し得る。次いで、これは、機能的分析のために、その遺伝子の完全なヌクレオチド配列の決定、その発現の分析およびそのタンパク質産物の産生を可能にする。このようにして、HP1P1およびヒトHN1ホモロ

グタンパク質のヌクレオチド配列は、同定され得る。

【0104】

任意の真核生物細胞は、潜在的に、HP1P1およびヒトHN1ホモグタンパク質遺伝子のクローニングのための核酸供給源として働き得る。このDNAは、当該分野で公知の標準的な手順によって、クローニングされたDNA（例えば、DNA「ライブラリー」）から、化学合成により、cDNAクローニングにより、または所望の細胞から精製された、ゲノムDNAもしくはそのフラグメントのクローニングによって、入手され得る（例えば、以下を参照のこと：Sambrookら, 1989 Molecula) - Cloning, A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY); 1985. DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K., 第IおよびII巻)。ゲノムDNAに由来するクローンは、コードエクソン領域に加えて調節性またはイントロン性のDNA領域を含み得る。他方、cDNAに由来するクローンは、エクソン性配列のみを含む。

【0105】

目的の配列（例えば、遺伝子）をゲノムDNAからクローニングする際に、DNAフラグメントは、当該分野において周知の多数の方法によって精製され得る。これらの方法としては以下が挙げられるがそれらに限定されない：(i) DNAの1つ以上の制限エンドヌクレアーゼを用いた切断、(ii) マンガンの存在下でのDNアーゼの使用によるDNAの断片化、あるいは(iii) 例えば、超音波処理よりによるDNAの物理的剪断。次いで、直鎖状の二本鎖DNAフラグメントは、以下を含む標準的な技術によってサイズの関数として分離され得る：例えば、アガロースおよび/またはポリアクリルアミドゲル電気泳動、勾配超遠心分離、またはカラムクロマトグラフィー。

【0106】

一旦そのDNAフラグメントが精製されると、所望の遺伝子を含む特定のDNAのフラグメントの同定は、種々の方法で達成され得る。例えば、HP1P1お

よびヒトHN1ホモログタンパク質の一部（例えば以下により生成される：PCR増幅または公知のヌクレオチド配列の一部の配列を有するオリゴヌクレオチド）またはその特定のmRNAあるいはそれらのフラグメントもしくは誘導体が精製および標識され得る。次いで、精製されたDNAフラグメントは、その標識されたプローブ分子に対する核酸ハイブリダイゼーションによってスクリーニングされ得る（例えば以下を参照のこと：Benton R Davis, 1977. Science 196:180-182; Grunstein & Hogness, 1975. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3961-3964）。制限酵素消化および公知の制限地図（そのようなものが利用可能である場合）に従って予測されるものとのフラグメントサイズの比較によるかまたはDNA配列分析およびHP1P1およびヒトHN1ホモログタンパク質の公知のヌクレオチド配列との比較によって適切なフラグメントを同定することも可能である。さらなる選択は、目的の遺伝子またはあるいはその発現された遺伝子産物の特定の特性に基づいて、その産物の物理的、化学的または免疫学的な特性に基づいたアッセイによって行われ得る。例えば、cDNAクローンまたは適切なmRNAをハイブリッド選択するDNAクローンは、特定のタンパク質産生に基づいて選択され得る（すなわち、HP1P1およびヒトHN1ホモログタンパク質について実証されたように、類似または同一の電気泳動移動、等電点フォーカシングの挙動、タンパク質加水分解消化マップ、抗原性特性またはHP5タンパク質に結合する能力を産生するこれらのクローンの選択）。さらに、HP1P1タンパク質を推定的に産生するクローンは、ELISA（酵素結合免疫ソルベントアッセイ）型の手順において、推定されたクローンに対して、標識された（HP1P1およびヒトHN1ホモログタンパク質について特異的な）抗体の結合によって同定され得る。HP1P1およびヒトHN1ホモログタンパク質のcDNAの単離に対する代替方法としては以下が挙げられるがそれらに限定されない：公知の配列由来の遺伝子配列自体を化学的に合成すること。他の方法が可能であり、そして本発明の範囲内である。

【0107】

続いて、次いで、同定および単離された核酸を、適切なクローニングベクター

に連結し得る。大多数のベクター宿主系が当該分野において公知である。本発明において利用され得るベクターの例としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：バクテリオファージベクター（例えば、誘導体）または細菌プラスミドもしくは酵母プラスミド（例えば、pBR322）。目的のDNAフラグメントのクローニングベクターへの挿入は、以下を含む種々の方法の使用により達成され得る：(i) 相補的接着性末端の使用；(ii) 酵素（DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント）を使用して挿入物である末端「平滑末端」を作製すること；(iii) 挿入物DNAフラグメントに連結された「リンカー」ヌクレオチド配列の使用（例えば、特異的、化学合成されたオリゴヌクレオチド（RE配列を含む））、あるいは(iv) ベクターおよびDNA挿入物の両方の相補的、ホモポリマーテールの使用など。

【0108】

目的の遺伝子配列の多数のコピーの産生を容易にするために、次いで、組換え分子を、例えば、形質転換、トランスフェクション、感染、電気泳動などにより宿主細胞に導入する。代替方法において、所望の遺伝子は、「ショットガン」クローニングアプローチにおいて同定および単離され得る。このアプローチでは、目的の遺伝子は、例えば、適切なクローニングベクターへのその挿入の前にサイズ分画によって富化される。多量の目的の核酸は、以下を用いて宿主細胞の形質転換によって生成され得る：(i) HPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質ヲコードする配列（遺伝子）を有する組換えDNA分子；(ii) HPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質のcDNAまたは(iii) 化学的に合成されたDNA配列。

【0109】

本発明によって提供されるHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質配列は、以下をコードするヌクレオチド配列を含む：(i) ネイティブのHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質内に見出されるのと実質的に同じアミノ酸配列；(ii) 機能的に等価なアミノ酸置換物を有するアミノ酸配列、ならびに(iii) HPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質の他の誘導体、フラグメントまたはアナログ。

【0110】

((3) HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体ならびに HPI P1およびヒトHN1ホモログタンパク質のタンパク質に対して特異的な抗体)

本発明によって本明細書において開示されるように、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体またはそれらのフラグメント、誘導体、アナログもしくはホモログ、あるいは、HPI P1およびヒトHN1ホモログタンパク質、またはそれらのフラグメント、誘導体、アナログもしくはホモログを免疫原として利用して、上記の免疫原性分子に免疫特異的に結合する抗体を生成し得る。そのような抗体としては以下が挙げられるがそれらに限定されない：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、Fabフラグメント、およびFab発現ライブラリー。1つの実施形態において、ヒトHPSタンパク質およびヒトHPSタンパク質-IPの複合体に対して特異的な抗体が生成される。当該分野において公知の種々の方法は、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、またはその誘導体、ホモログもしくはアナログ、あるいはHPI P1およびヒトHN1ホモログタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、ホモログ、もしくはアナログに対するポリクローナル抗体の産生のために利用され得る。抗体の産生のために、種々の宿主細胞は、ネイティブHPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、HPI P1およびヒトHN1ホモログタンパク質、またはその合成バージョンもしくは誘導体(例えば、架橋HPSタンパク質/HPSタンパク質-IP)を用いた注射によって免疫され得る。

【0111】

本発明の実施形態において、抗原性ペプチドによって包含されるエピートは、HPSIPポリペプチドの領域であって、そのタンパク質の表面に位置するもの(例えば、親水性領域)である。抗体産生を標的化するための手段として、親水性および疎水性の領域を示す親水性疎水性プロットは、以下を含む当該分野において周知の任意の方法によって生成され得る：Kyte DoolittleまたはHopp Woodsの方法、これらは、フーリエ変換を伴うかまたは伴わない。例えば、以下を参照のこと：Hopp and Woods, 1981, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78:3824-3828;

Kyte and Doolittle 1982. J. Mol. Biol. 157: 105 - 142、これらは各々、本明細書においてその全体が参考として援用される。

【0112】

HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、HP/IP1およびヒトHN1ホモログタンパク質またはそれらの誘導体、フラグメント、ホモログもしくはアナログに対して指向されるモノクローナル抗体の調製のために、連続的なインビトロ細胞株による抗体分子の産生を提供する任意の方法が利用され得る。そのような方法としては以下が挙げられるがそれらに限定されない：(i)ハイブリドーマ技術（以下を参照のこと：Kohler & Milstein F 1975. Nature 256: 495 - 497）；(ii)トリオーマ技術（以下を参照のこと：Rosenら, 1977. Cell 11: 139 - 147）；(iii)ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（以下を参照のこと：Kozborら, 1983. Immunol, Today A: 7284）ならびに(iv)ヒトモノクローナル抗体を産生するために利用されるEBVハイブリドーマ技術（以下を参照のこと：Coleら, 1985.、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Alan R. Liss, Inc., 77 - 96頁)）。

【0113】

本発明の1つの実施形態において、ヒトハイブリドーマを用いる（例えば、以下を参照のこと：Coleら, 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026 - 2030）か、またはヒトB細胞のエプスタインバーウイルス（EBV）でのインビトロ形質転換によって（例えば、以下を参照のこと：Coleら, 1985. In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96)）得られたヒトモノクローナル抗体。別の実施形態において、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体またはHP/IP1およびヒトHN1ホモログタンパク質に対して特異的なマウス抗体からの遺伝子をスプライスすることによるキメラ抗体の産生のために開発された技術（例

例えば、以下を参照のこと：Morrissonら、1984 . Proc . Nat l . Acad . Sci . USA 81 : 6851 - 6855 ; Takedaら、1985 . Nature 314 : 452 - 454) は、適切な特異性および生物学的活性のヒト抗体分子をコードする遺伝子とともに、利用され得る。別の実施形態において、単鎖抗体の産生のための方法（例えば、以下を参照のこと：米国特許第4,946,778号）は、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体特異的、かつHP/IP1およびヒトHN1ホモログタンパク質特異的な、単鎖抗体を産生するために利用され得る。あるいは、Fab発現ライブラリーの構築のための方法（例えば、以下を参照のこと：Huseら1989 . Science 246 : 1275 - 1281）は、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体または個別のHP/IP1およびヒトHN1ホモログタンパク質、誘導体ホモログ、もしくはアナログに対して所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメント迅速かつ効率よい同定を可能にするように開示される。非ヒト抗体は、当該分野において公知のいくつかの方法によって「ヒト化」され得る（例えば、以下を参照のこと：米国特許第5,225,539号）。

【0114】

同様に、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体、またはHP/IP1およびヒトHN1ホモログタンパク質のイディオタイプを含む抗体フラグメントは、当該分野において公知の技術によって生成され得る。これには、例えば、以下が含まれ得る：(i) インタクト抗体分子のペプシン消化によるF (ab)₂フラグメントの産生；(ii) F (ab)₂フラグメントのジスルフィド架橋の産生によるF_{ab}フラグメントの産生；(iii) パパインおよび還元剤での抗体分子の処置によるF_{ab}フラグメント生成；ならびに(iv) F_vフラグメント。

【0115】

本発明は、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体のドメインに特異的な抗体を含む。同様に、HP/IP1およびヒトHN1ホモログタンパク質の特定のドメインに対して抗体も開示される。いくつかの実施形態において、その複合体に対して惹起される抗体は、このメンバーがその複合体に存在しない場合

、その複合体の1つ以上のメンバーに対するよりも高い親和性で結合する。抗体の産生において、所望の抗体特異性についてのスクリーニングは、当該分野において公知の任意の技術の使用によって達成され得る（例えば、酵素連結免疫ソルベントアッセイ、ELISA）。HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体またはHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質の特定のドメインについて特異的である抗体を選択するために、そのドメインを含む、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体のフラグメント、またはHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質に対して結合する抗体の産生についてハイブリドーマをスクリーニングし得る。上記の抗体は、本発明のHPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、またはヒトHN1ホモログタンパク質の局在化および/または定量のために利用され得る（例えば、適切な生理的サンプルにおけるレベルの測定、診断方法におけるなど）。本発明の別の実施形態において、抗HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体抗体、およびそのフラグメントもしくは誘導体、ならびにHPIP1タンパク質およびそれらのフラグメントもしくは誘導体であって結合ドメインを含むものに対して特異的な抗体が開示される。

【0116】

((4) HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体ならびにHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質のタンパク質と関連するタンパク質および核酸の診断および予後上の使用)

HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体は、通常の生理的プロセスの「マーカー」として使用され得、それゆえ診断上の有用性を有する。これらのプロセスとしては以下が挙げられるがそれらに限定されない：(i) ベシクル輸送、タンパク質トラフィッキング、色素調節、および血小板機能のような生理的プロセス、ならびに(ii) 眼・皮膚(oculocutaneous)機能不全、神経変成疾患および線維性肺血小板疾患のような病理プロセス。さらに、上昇レベルまたは欠失レベルのHPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体ならびにHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質を伴う特定の患者亜集団の特徴付けは、新たな疾患分類を生じ得る。これは、従ってさらに診断能力を付

与する。さらに、上記タンパク質のレベルの検出、その関連mRNAまたはそれらに指向される抗体はまた、アッセイ（例えば、免疫アッセイ）において利用されて、種々の状態、疾患および障害、ならびにそれらの処置を、検出、予後、診断またはモニターし得る。これらの状態などは、異常レベルのHPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体または異常レベルのHIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質によって特徴づけられる。

【0117】

1つの実施形態において、HPSタンパク質-HPSタンパク質-IP複合体またはHIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質に対して特異的な抗体を利用して、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体またはHIP1タンパク質の存在について、患者組織または血清のサンプルをアッセイし得る。ここで、異常レベルのそのタンパク質または複合体は、疾患状態の指標である。「異常レベル」とは、実際に存在するレベル、または身体の一部に由来するかもしくはその障害を有しない別の個体からのサンプルである、そのレベルを代表する標準的なレベルに対して、増加または減少したレベルと定義される。利用され得る免疫アッセイとしては以下が挙げられるがそれらに限定されない：以下のような方法を用いる競合的または非競合的なアッセイ系：ウェスタンブロット、放射免疫アッセイ；酵素連結免疫ソルベントアッセイ（ELISA）；「サンドイッチ」免疫アッセイ；免疫沈降アッセイ；沈降（precipitation）反応；ゲル拡散沈降反応；免疫拡散アッセイ；凝集アッセイ；補体固定アッセイ；免疫放射分析アッセイ；蛍光免疫アッセイ；プロテインA免疫アッセイなど。

【0118】

HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体の種々の成分をコードする核酸、HIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質ならびに関連するヌクレオチド配列をコードする核酸、それらのサブ配列および相補配列（少なくとも8ヌクレオチドの最低の長さを含む）はまた、プローブとしてハイブリダイゼーションアッセイにおいて利用され得る。上記のように、そのようなハイブリダイゼーションアッセイを使用して、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体またはHIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質の成分をコードするm

RNAの異常レベルに関連する種々の状態、障害、または疾患状態を、検出、予後、診断またはモニターし得る。1つの実施形態において、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体の両方のメンバーの発現を同時に測定するために、ハイブリダイゼーションアッセイを、HPSタンパク質に対し、およびHPSタンパク質の結合パートナーに対してハイブリダイズし得る核酸プローブを用いて実施する。同様に、別の実施形態において、HIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質をコードするmRNAの発現が測定される。

【0119】

従って、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体の異常レベルを関与するかまたはそれによって特徴づけられる疾患および障害が診断され得、その推定される存在は、スクリーニングされた手順によって確認され得、またはHPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、非複合体化されるHPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-IPの異常レベルを定量することによって、そのような障害の素因が検出され得る。さらに、機能的活性（例えば、HPSタンパク質-IPに結合すること、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-IP RNAにおける変異の検出；DNAまたはタンパク質（例えば、トランスロケーション、短縮、野生型HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-IPに対するヌクレオチドもしくはアミノ酸の配列における変化であって、HPSタンパク質-HPS・タンパク質-IP複合体、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-IPの発現もしくは活性における増加もしくは減少を引き起こすものを含む）もまた利用され得る。

【0120】

さらに、当該分野において公知の種々の免疫アッセイを利用して、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体の、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体の非複合体化された成分（すなわち、目的の複合体におけるHPSタンパク質および/または特異的なHPSタンパク質-IP）に対する比率が、特定の疾患もしくは障害に罹患するか、またはそのような疾患もしくは障害を発生する素因を有する患者からのサンプル内で、そのような疾患もしくは障害を有しない被検体からサンプル内での同一の比に比較して、増加または減少してい

るか否かを決定し得る。

【0121】

検出技術（特に、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体またはHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質に対する抗体を含む技術）の使用は、その複合体またはタンパク質を発現する特定の細胞を検出する方法を提供する。そのようなアッセイを用いて、特定の細胞型を決定し得る。ここでは、1つ以上の特定のHPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、またはHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質が発現され、そしてその複合体またはタンパク質の存在が、その細胞生存度と相関づけられる。

【0122】

本明細書において具現されるのはまた、採集のためのこれらの上記タンパク質を特徴付けまたは調製する目的のために、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、HPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質、あるいはその誘導体を発現する、細胞培養モデル内でのHPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、ならびにHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質の検出のために方法である。この実施形態は、以下を包含する方法を包含する：(i) 原核生物の細胞ソーティング（例えば、以下を参照のこと：Davey & Kell, 1996, *Microbiol. Rev.* 60:641-696）；(ii) 真核生物（例えば、以下を参照のこと：Steeleら, 1996, *Clin. Obstet.* 39:801-813）および連続細胞培養物（例えば、以下を参照のこと：Orfao & Ruiz-Arguelles, 1996, *Clin. Biochem.* 29:5-9）からの初代培養物および組織検体。

【0123】

診断目的のためのキットの使用は、本明細書において開示される。1つの実施形態において、このキットは、1つ以上の容器内に、抗HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体抗体またはHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質に対して特異的な抗体、ならびに必要に応じてその抗体に対して標識された結合パートナーを備える。この抗体は、以下を含む当該分野において公知の任

意の手段によって検出可能に標識され得る：例えば、化学発光、酵素、蛍光、呈色、または放射性の標識。1つ以上の容器において、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-IP mRNAに対してハイブリダイズし得る核酸プローブを含む、第二のキット実施形態。具体的には、そのキットは、1対のプライマー（各々は、そのサイズ範囲が約6から30ヌクレオチド）を備え得、これらは、PCR増幅（例えば、以下を参照のこと：Innisら、1990.PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CA）、離ガーゼ連鎖反応（以下を参照のこと：PCT公開EP 320,308）または当該分野において公知の他の方法（例えば、Qレプリカーゼ、環状プローブ反応など）をプライミングし得る。キットは、必要に応じてさらに、所定量の精製されたHPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、HPSタンパク質、またはHPSタンパク質-IPを、標準またはコントロールとして使用するために含み得る。

【0124】

((5) HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体ならびにHP1P1およびヒトタンパク質HN1ホモログの治療上の使用)

本発明は、治療化合物の投与（本明細書以降「治療剤（Therapeutics（大文字）」）による、種々の疾患および障害の処置または予防を提供する。そのような治療剤としては以下が挙げられるがそれらに限定されない：HPSタンパク質HPSタンパク質-IP複合体；HPSタンパク質および個々のHPSタンパク質-IPタンパク質、ならびにそれらの誘導體、フラグメントおよびアナログ；それらに対する抗体；HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-IPをコードする核酸；HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-IPのアンチセンス核酸およびHPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体ならびにHP1P1およびヒトHN1ホモログタンパク質モジュレーター（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）。

【0125】

上記第2節において概説したように、HPSタンパク質は、主に、ベシクル輸送、タンパク質トラフィッキング、色素沈着、生理的プロセス調節、および血小板

機能のようなものと相関づけられている。同様に、HPSタンパク質もまた、以下を含むがそれらに限定されない病理的状态からの保護と強力に相関づけられている：眼・皮膚白皮症、血小板機能不全、神経変成疾患および線維性肺疾患。

【0126】

特徴づけられたHPSタンパク質 - IP (特に、14-3-3 eta、Hrs、BMK1、CDK2およびNF90)の主要部は、本明細書において開示されているように、シグナル伝達および分泌プロセスに關与する。連鎖が、シグナル伝達障害と、細胞性アポトーシスとの間に示されており、これは、HPSタンパク質およびHPSタンパク質 - IPに關連し得る。本発明はまた、自己免疫疾患および炎症において役割を果たすHPSタンパク質 - IP (例えば、14-3-3 eta)を開示する。14-3-3ファミリーのタンパク質は、自己免疫疾患において重要であり、これは例えば、インスリンレセプター気質1との相互作用による。さらに、HPSタンパク質、および本明細書において同定されるような結合パートナー (例えば、14-3-3 eta、Hrs、アトロフィン-1、およびDGS-1)は、神経変成の障害と有意に相関づけられている。例えば、14-3-3 etaは、アルツハイマー病、神経原纖維錯綜およびクロイツフェルトヤコブ疾患に罹患する患者の脳脊髄液内に存在することが示された。ATPアーゼであるHrsは、カルシウム調節關連分泌に相関付けされた。アトロフィン-1は、齒状核赤核淡蒼球 (dentatorubral pallidoluysian) 萎縮症 (DRPLA; スミス病) に相関づけられた遺伝子のタンパク質産物であり、そして神経組織に普遍的に発現する。DGS-1は、発生欠損ディジョージ症候群と關連するタンパク質である。

【0127】

HPIP1およびヒトHn1ホモログタンパク質についての遺伝子によってコードされるHPSタンパク質 - IPもまた、上記のように、HPSタンパク質およびHPSタンパク質 - IPの相関づけられた機能に關連し得る。

【0128】

((a) HPSタンパク質およびHPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体の増加レベルを伴う疾患および障害の処置)

細胞内シグナル伝達、ベシクル輸送およびタンパク質トラフィッキングによって影響を受ける、広汎な細胞性疾患は、治療剤の投与によって処置または予防され得る。この治療剤は、H P S タンパク質・H P S タンパク質 - I P 複合体ならびに / または H P I P 1 およびヒト H N 1 ホモログタンパク質の生物学的因子を調節（すなわち、阻害、拮抗、増強または促進）する。同様に、異常な H P S タンパク質・H P S タンパク質 - I P 複合体のレベルまたは活性、あるいは H P I P 1 およびヒト H N 1 ホモログタンパク質の異常レベルに関連する疾患または障害はまた、調節治療剤の投与によって処置され得る。特定の実施形態において、H P S タンパク質の活性またはレベルは、H P S タンパク質 - I P の投与によって調節される。別の特定の実施形態において、H P S タンパク質 - I P の活性またはレベルは、H P S タンパク質の投与によって調節される。

【0129】

((b) H P S タンパク質・H P S タンパク質 - I P 複合体形成または活性の拮抗)

H P S タンパク質・H P S タンパク質 - I P レベルまたは活性の増加、あるいは H P I P 1 およびヒト H N 1 ホモログタンパク質のレベルまたは活性の増加によって特徴づけられる疾患および障害は、治療剤によって処置され得る。この治療剤は、これら上記のタンパク質またはタンパク質複合体のレベルまたは活性と拮抗（すなわち、減少または阻害）する。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：(i) H P S タンパク質または H P S タンパク質 - I P（またはそのアナログ、誘導體もしくはフラグメント）；(ii) 抗 H P S タンパク質・H P S タンパク質 - I P 複合体抗体；(iii) H P S タンパク質または H P S タンパク質 - I P をコードする核酸；(iv) H P S タンパク質および H P S タンパク質 - I P アンチセンス核酸、または H P I P 1 およびヒト H N 1 ホモログタンパク質アンチセンス核酸の同時投与；(v) H P S タンパク質および / または H P S タンパク質 -、あるいは H P I P 1 およびヒト H N 1 ホモログタンパク質核酸であって、H P S タンパク質または H P S タンパク質 - I P コード配列のコード配列内への異種（非 H P S 関連）挿入（これは、H P S タンパク質および / または H P S タンパク質 I P の内因性機能を、相

同組換によって「ノックアウト」するために使用される)に起因して機能不全であるもの(例えば、以下を参照のこと:Capecchi, 1989. Science 244:1988-1999)。

【0130】

本発明の特定の実施形態において、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-I P遺伝子の部分を含む核酸であって、これらの上記の配列が異なる遺伝子配列に隣接するものは、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-I Pのあんだ語にストとして利用されるか、またはHPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-I Pの相同組換によって不活化を促進するように利用される。例えば、Koller & Smithies, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstraら, 1989, Nature 342:435-438を参照のこと。さらに、第一のHPSタンパク質-I Pの変異体または誘導体であって、HPSタンパク質について、第二のHPSタンパク質-I Pよりも高い親和性を有するものは、HPSタンパク質結合について、第二のHPSタンパク質-I Pと競合するように投与され得、それにより、第二のHPSタンパク質-I Pを含むHPSタンパク質複合体のレベルを減少させる。他の治療剤であって、HPSタンパク質・HPSタンパク質-I P複合体またはHP I P 1およびヒトHN 1ホモログタンパク質の機能を阻害する治療剤は、公知のインビトロアッセイの使用により同定され得る。このアッセイは、例えば、HPSタンパク質・HPSタンパク質-I P結合を阻害するそれらの能力に基づく。

【0131】

さらなる特定の実施形態において、HPSタンパク質・HPSタンパク質-I P複合体系性または活性、あるいはHP I P 1およびヒトHN 1ホモログタンパク質の活性と競合する治療剤は、以下において治療的に(予防的を含む)投与される:(i) HPSタンパク質・HPSタンパク質-I P複合体、あるいはHP I P 1およびヒトHN 1ホモログタンパク質のレベルの増加を含む、疾患または障害、あるいは(ii)疾患または障害であって、インビトロまたはインビボでのアッセイがHPSタンパク質・HPSタンパク質-I P複合体、またはHP I P

1 およびヒトHN1ホモログタンパク質アンタゴニスト投与の有用性を示すもの。HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、またはHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質のレベルの増加は、当該分野において標準的な方法によって容易に検出され得、これらは以下を包含するがそれらに限定されない：HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、またはHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質を検出および/または可視化するための免疫アッセイ（例えば、ウェスタンブロット免疫沈降に続いて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など）、ならびに/あるいはHPSタンパク質およびHPSタンパク質-IP複合体、または個々のHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質のmRNAの同時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、ノーザンブロットアッセイ、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）。

【0132】

((c) HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体の発現の減少)
1つの実施形態において、reduction of HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体発現（すなわち、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体の発現および/またはその複合体の形成）の減少、あるいはHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質発現の減少は、これらのタンパク質部分をコードするmRNAを標的化することによって達成される。RNA治療剤は、現在、3つのクラスに分類される：アンチセンス種、リボザイムまたはRNAアプタマー。例えば、以下を参照のこと：Goodら、1997. Gene Therapn 4: 45 - 54。

【0133】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、最も広汎に利用されているほうほうであって、そして以下に説明される。リボザイム治療は、特定のRNAを切断、結合または他の方法で不活化して、特定のタンパク質の発現を減少もしくは除去する低分子RNAの投与、誘導された発現などを包含する。例えば、以下を参照のこと：Grassi & Marini, 1996. Arznals of Med. 28: 499 - 510; Gibbon 1996. Cancer and

Metastasis Rev. 15: 287 - 299。現在、「ヘアピン」および「ハンマーヘッド」RNAリボザイムの生成は、特定のmRNA（例えば、HPSタンパク質をコードするmRNA）を特異的に標的化するために必要である。RNAアプタマーは、タンパク質について特異的なRNA離岸度（例えば、TatおよびRev RNA）である（例えば、以下を参照のこと：Goodら, 1997. Gene Ther - apu4: 45 - 54）。これらは、その翻訳を特異的に阻害し得る。

【0134】

本発明の別の実施形態において、HPSタンパク質の活性またはレベルは、HPSタンパク質 - IP、HPSタンパク質 - IPをコードする核酸、またはHPSタンパク質 - IPに免疫特異的に結合する抗体もしくはその結合ドメインを含む抗体のフラグメントもしくは誘導体の投与によって減少する。本発明のなお別の局面において、HPSタンパク質または特定のHPSタンパク質 - IP（例えば、HPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質）の増加レベルに関連する疾患もしくは障害は、その複合体形成がHPSタンパク質もしくはその特定のHPSタンパク質 - IPを、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体形成を通じて減少もしくは不活化するように作用する場合、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体形成を増加する治療剤の投与によって処置もしくは予防され得る。

【0135】

((d) HPSタンパク質およびHPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体のレベルの減少を伴う疾患および障害の処置)

HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体、HPSタンパク質または特定のHPSタンパク質 - IPの過少発現に関連する疾患および障害は、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体または機能を促進（すなわち、増加または供給）する治療剤の投与によって処置または予防される。そのような治療剤の例としては、以下があげられるがそれらに限定されない：HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体、ならびにその誘導体、アナログおよびフラグメントであって、機能的に活性であるもの（例えば、HPSタンパク質・HPS

タンパク質 - I P 複合体を形成するに活性であるもの)、複合体化されていない H P S タンパク質および H P S タンパク質 - I P タンパク質、ならびにその誘導体、アナログ、およびフラグメント、ならびに H P S タンパク質・タンパク質 - I P 複合体、あるいはその機能的活性誘導体もしくはフラグメントのメンバーをコードする核酸(例えば、遺伝子治療における使用のため)。

【0136】

((e) 治療剤の生理学的効果の決定)

好ましくは、適切なインビトロまたはインビボアッセイを利用して、特定の治療剤の効果を決定し、そしてその投与が離間した組織の処置のために適応されるか否かを決定する。種々の特定の実施形態において、インビトロアッセイは、患者の障害に関与する代表的細胞または細胞型を用いて実施して、治療剤がそのような細胞型に対する所望の効果を有するか否かを決定し得る。

【0137】

治療剤としての使用のための化合物は、ヒトでの試験の前に適切な動物モデル系において試験し得る。この系は例えば、以下を包含し得る: ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなど。インビボ試験について、ヒトに対する投与の前に、当該分野において公知の任意の動物モデル系が使用され得る。

【0138】

((6) H P S タンパク質または H P S タンパク質複合体に関連する疾患および障害)

((a) 色素沈着 (pigmentation) 障害)

H P S タンパク質は、目皮白皮症および色素低下症のような色素沈着障害に対して強力に相関付けられている。本発明の治療剤、特に、H P S タンパク質・H P S タンパク質 - I P 複合体活性を調節(または供給)するものは、色素沈着疾患または障害を処置または予防するにおいて有効であり得る。H P S タンパク質・H P S タンパク質 - I P 複合体のレベルまたは活性を調節する治療剤は、以下を含む当該分野において公知の任意の方法によってアッセイされ得る: 例えば、細胞培養モデルを用いたインビトロアッセイおよび色素沈着疾患もしくは障害の動物も出るを用いたインビボアッセイ。例えば、以下を参照のこと: M c G e o

ch.ら、1986、Gen.Virol.67:813-825。

【0139】

従って、一旦色素沈着疾患または障害がHPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体活性の調節による処置を受け入れ得ることが示されると、色素沈着疾患または障害は、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体形成を調節する（HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体を供給することを包含する）治療剤の投与によって処置または予防され得る。

【0140】

((b) 血小板機能不全)

HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体活性の調節によって処置され得る血小板機能不全は、以下の2つの一般的クラスへと分類される：(i) 血小板貯蔵プール欠損（例えば、ヘルマンスキー - パドラック症候群、チェディアック東症候群、グレー血小板症候群）と関連する疾患もしくは血小板減少；ならびに(ii) 血小板減少または増加した血栓傾向（例えば、心筋梗塞、深静脈血栓症、心臓血管事故、一過性虚血性衝撃）。

【0141】

本発明の治療剤、特にHPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体活性を調節（または供給）するものは、血小板機能不全疾患または障害を処置または予防するにおいて有効であり得る。治療剤は、コントロールに比較して動物モデルにおいて例えば、血小板機能不全疾患または障害を減少し得る。従って、一旦血小板機能不全疾患または障害がHPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体活性の調節による処置を受け入れ得ることが示されると、その血小板機能不全疾患または障害は、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体形成を調節する（HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体を供給することを包含する）治療剤の投与によって処置または予防され得る。

【0142】

((c) 神経変性障害)

HPSタンパク質は、神経変性疾患において役割を果たすことと相関付けられている。従って、本発明の治療剤（例えば、HPSタンパク質および/またはタ

ンパク質複合体を調節（または供給）するもの）は、神経変性疾患を処置または予防するにおいて有効であり得る。神経変性障害に關与するHPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体を調節する本発明の治療剤は、当該分野において公知の任意の方法によって、そのような神経変性疾患および障害を処置または予防するにおける効力について、アッセイし得る。そのようなアッセイとしては以下が挙げられるがそれらに限定されない：制御された細胞分泌、タンパク質トラフィッキング、および/またはフォールディング、またはアポトーシスの阻害、あるいは、神経変性疾患もしくは障害の動物モデルを用いたインビボアッセイインビトロアッセイなど。治療剤としては、例えば、限定ではなく、制御された細胞成熟を促進し得、そして培養物中の細胞アポトーシスを予防し得るか、またはコントロールに比較して、動物モデルにおいて、神経変性を減少させ得る。

【0143】

((d) 線維性肺疾患)

HPSタンパク質はまた、重篤な線維性肺疾患の病因と強力に相關付けられている。本発明の治療剤、特にHPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体のレベルまたは活性を調節するものは、線維性肺疾患の処置または予防するにおいて有用であり得る。治療剤は、以下を含む線維性肺疾患を処置または予防するにおける効力について、当該分野において公知の任意の方法によってアッセイされ得る：例えば、細胞培養モデルを用いるインビトロアッセイ、および線維性肺疾患の動物モデルを用いたインビボアッセイ。

【0144】

一旦線維性肺疾患がHPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体の調節による処置を受け入れ得ることが示されると、その線維性肺疾患は、HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体形成を調節（HPSタンパク質・HPSタンパク質 - IP複合体を供給することを包含する）治療剤の投与によって処置または予防され得る。

【0145】

((7) HPS関連疾患の処置の方法)

((a) 遺伝子治療)

遺伝子治療とは、被検体への公知の特定の配列の核酸分子の投与により実施される治療をいう。当該分野において現在公知の任意の方法が、本発明の実施における遺伝子治療のために使用され得る。遺伝子治療の一般的概説については、例えば、以下を参照のこと：Goldspielら、1993. *Clinical Wu & Wu*, 1991. *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev, 1993. *Ann. Rev. Pharmacy* 12: 488-505; *Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596; Mulligan. 1993. *Science* 260: 926-932; Morgan & Anderson., *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217. 1993。

【0146】

本発明の1つの実施形態において、HPSタンパク質、HPSタンパク質-IPまたはそれらの機能的誘導体をコードする配列を含む核酸は、遺伝子治療により、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体を調節するため、またはHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質機能を調節するために投与される。他の実施形態において、HPSタンパク質およびHPSタンパク質-IP、その機能的誘導体またはキメラタンパク質の両方をコードする核酸（単数または複数）は、遺伝子治療の使用により投与される。次いで、これらの実施形態において、その核酸分子は、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体を調節すること、またはHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質機能を調節することによって治療的效果を媒介するタンパク質をコードするそのタンパク質を生成する。特に、この上記の核酸は、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-IPコード配列に作動可能に連結されたプロモーターを有し、そのプロモーターは、誘導性または構造的であり、そして必要に応じて、組織特異的である。別の特定の実施形態において、核HPSタンパク質および/もしくはHPSタンパク質-IPコード配列またはHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質、ならびに任意の他の所望の配列が、ゲノム中の所望の部位で相同組換えを促進する領域に隣接する核酸分子が使用され、従って、HPSタンパク質およびHPSタンパク質-IPの核酸の染色体内発現を提供する。例えば、以下を参

照のこと：Koller & Smithies, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935; Zijksstraら、1989. *Nature* 342:435-438。さらに別の実施形態において、遺伝子治療の目的で導入されるべき核酸は、コード領域に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含み、その結果、その核酸の発現は、転写の適切なインデューサーの存在または非存在を制御することによって制御可能である。

【0147】

その核酸の患者への送達は、直接（その患者がその核酸を有するベクターに直接暴露される場合）、または間接（細胞がまずその核酸でインビトロ形質転換され、次いでその患者に移植される場合）のいずれかであり得るこれらの2つのアプローチは、それぞれ、インビボおよびエキソビボの遺伝子治療として知られる。特定の実施形態において、その核酸は、それがコードされた産物を産生するように発現する場合インビボで直接投与される。これは、以下を含む当該分野において公知の多数の方法のいずれかによって達成され得る：例えば、(i) 適切な核酸発現ベクターの一部としてそれを構築し、そしてそれを投与しその結果それが細胞内にあるようになることによる；(ii) 欠失または減弱されたレトロウイルスまたは他のウイルスベクターを用いた感染（例えば、米国特許代4,980,286号を参照のこと）；(iii) 裸のDNAの直接注射によるか、または微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃、Biolistic、DuPont）の使用；(iv) 脂質または細胞表面レセプターあるいはトランスフェクト剤を用いたコーティング；(v) リポソーム、微粒子または微小カプセルにおけるカプセル化によるか、あるいは、核へ侵入することが知られるペプチドに連結させてそれを投与すること；(vi) それをリガンドと連結させて投与して、レセプター媒介されたエンドサイトーシスに供すること（例えば、以下を参照のこと：Wu & Wu, 1987. *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432）、これは、そのレセプターを発現する細胞型を標的化するために使用され得る；など。別の実施形態において、核酸リガンド複合体が形成され、ここで、そのリガンドは、融合原性ウイルスペプチドを含み、このペプチドは、

エンドソームを破壊し、その核酸のリソソーム破壊を妨害する。さらに別の実施形態において、その核酸は、特定のレセプターを標的化することによる細胞特異的な摂取および発現のためのインビボ標的化され得る（例えば、以下を参照のこと：米国特許第5,844,107号）。あるいは、その核酸は、細胞内に導入され得および相同組換によって発現のための宿主細胞DNA内に組み込まれ得る。たとえば、以下を参照のこと：Koller & Smithies, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstraら, 1989. Nature 342:435-438。

【0148】

特定の実施形態において、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-IPコード核酸配列を含むウイルスベクターが利用される。例えば、ウイルスゲノムのパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組み込みのために必要ではないレトロウイルス配列を欠失するように改変されたレトロウイルスベクターが使用され得る。例えば、以下を参照のこと：Millerら, 1993. Meth. Enzymol. 217:581-599。遺伝子治療において使用されるべき、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-IP（好ましくは、HPSタンパク質およびHPSタンパク質-IPの両方）をコードする核酸は、そのベクターにクローニングされ、これは、患者へのその遺伝子の送達を容易にする。例えば、以下を参照のこと：Clowesら, 1994. J. Clin. Invest. 93, 644-651; Kiemら: 1994. Blood 83:1467-1473。

【0149】

本発明の別の実施形態において、アデノウイルスは、遺伝子治療におけるウイルスベクターとして利用し得、そして遺伝子の呼吸器上皮への送達のために特に魅力的な「ビヒクル」である。アデノウイルスは、天然に、呼吸器上皮に感染し、そこで、そのウイルスは、緩和な疾患を引き起こすが、アデノウイルスベースの送達系のための他の標的としては以下が挙げられるがそれらに限定されない：肝臓、中枢神経系、上皮細胞および筋肉。アデノウイルスは、非分割性細胞に感染し得るさらなる利点を有する。例えば、以下を参照のことKozarsky

& Wilson, 1993. *Curr. Opin. Gen. Develop.* 3: 499-503。アデノ随伴ウイルス(AAV)もまた、遺伝子治療における使用について提唱されている。例えば、以下を参照のこと: Walshら、1993. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204: 289-300。

【0150】

本発明の実施における遺伝子治療に対する別のアプローチは、インビトロ細胞培養物中の遺伝子を細胞へ移入することを包含する。通常、移入の方法は以下を包含する: 選択マーカーをその細胞へ移入して、移入される遺伝子を取り込みそしてそれを発現するそれらの細胞の単離を容易にすること。この実施形態において、その核酸は、以下を包含する当該分野において公知の任意の方法によって得られた組換え細胞のインビトロ投与の前に細胞へ導入される: 例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション、微小注入、その核酸配列を含むウイルスもしくはバクテリオファージベクターへの感染、細胞融合、染色体媒介遺伝子移入、微小細胞媒介遺伝子移入、スフェロプラスト融合、など。例えば、以下を参照のこと: Loeffler & Behr, 1993. *Meth. Cohen, et al., 1993. Meth. Enzymol.* 217: 599-618; 217: 618-644: *cline, 1985. Pharmacol. Ther.* 29: 69-22。この移入技術は、その核酸を安定に細胞へと移入し、その結果、その核酸がその細胞によって発現され得、そしてその細胞の子孫によって遺伝可能でありかつ発現可能であるように、ならびにレシピエント細胞のその必要な発生および生理学的機能が破壊されないことを確実にすることを提供するように選択されるべきである。得られた、選択された、組換え細胞は、当該分野において公知の種々の方法によって患者に送達され得る。1つの実施形態において、上皮細胞は、皮下注射されるか、または患者上の皮膚移植片として塗布される。組換え血球(例えば、造血幹細胞または子孫細胞)は、好ましくは、静脈内に投与される。利用される細胞の総濃度および送達経路は、所望の効果、患者の状態などに依存し、そしてそれら個々の当業者によって確認され得る。

【0151】

核酸が遺伝子治療の目的で導入され得る細胞は、任意の所望の利用可能な細胞型を包含し、そして以下が挙げられるがそれらに限定されない：上皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞、Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球；ならびに種々の造血幹細胞またはその子孫細胞（以下から得られる：骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝臓など）好ましくは、遺伝子治療に用いられる細胞は、その患者に対して自己性である。

【0152】

組換え細胞が遺伝子治療に使用される本発明の1つの実施形態において、HPSタンパク質をコードする核酸分子および/またはHPSタンパク質-IPをコードする核酸分子（好ましくは、HPSタンパク質およびHPSタンパク質-IPの両方をコードする核酸分子）は、その細胞へと導入され、その結果、遺伝子（単数または複数）は、その細胞またはその子孫によって発現可能であり、そして次いでその組換え細胞は治療効果のためにインビボ投与される。1つの実施形態において、幹細胞またはその子孫細胞（例えば、造血幹細胞（HSCを含む）、上皮組織の幹細胞（例えば、皮膚および腸の内張り、胚性心臓筋肉細胞、肝臓幹細胞（例えば、以下を参照のこと：PCT 特許公開WO 94/08598）、ならびに神経幹細胞（例えば、以下を参照のこと：Stemple & Anderson, 1992, Cell 71:973-985）が利用され得る。上皮幹細胞（ESC）またはケラチノサイトは、組織（例えば、皮膚および腸の内張り）から公知の手順によって得られ得（例えば、以下を参照のこと：Reinwald, 1980, Metts, Cell Bio. 21:229-247）、そして組織培養物において増殖し得る（例えば、以下を参照のこと：Pittelkow & Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771）。ESCはドナーから提供される場合、対移植片宿主反応の抑制のための方法（例えば、中程度の免疫抑制を促進するための照射、薬物または抗体投与）もまた利用され得る。

【0153】

造血幹細胞（HSC）について、HSCのインビトロでの単離、増殖および維

持を提供する任意に技術が本発明のこの実施形態において使用され得る。これが達成され得る技術としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：(i) 将来の宿主またはドナーから単離された骨髄細胞のHSCの単離および樹立、あるいは(ii)同種異系または異種性であり得る、すでに樹立されたHSC長期培養物の使用。非自律HSCは、好ましくは、将来の宿主患者の移植免疫反応を抑制する方法とともに用いられる。本発明の1つの特定の実施形態において、ヒト骨髄細胞は、針吸引によって後腸骨稜から得られ得（例えば、以下の文献を参照のこと：Kodora, 1984. J. Clin. Invest. 73: 1377-1384）そして、討議分野において公知の任意の技術によって、高度に富化または実質的に純粋な形態にされ得る。骨髄細胞の長期培養は、例えば、以下のものを使用することによって樹立および維持し得る：Dexter細胞培養技術（以下を参照のこと：Dexterら, 1977. J. Cell Physiol 91. - 335）またはWitlock-Witte培養技術（以下を参照のこと：Witlock & Witte, 1982. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3608-3612）。

((b) アンチセンスオリゴヌクレオチド)

本発明の実施形態において、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体形成および機能は、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-IPのアンチセンス核酸の使用によって阻害され得、そして好ましくは、HPSタンパク質およびHPSタンパク質-IPの両方を包含する。さらに、本発明は、(少なくとも6ヌクレオチド長の)核酸の治療的または予防的な使用を開示する。この核酸は、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-IPあるいはその部分をコードするゲノム配列(遺伝子)またはcDNAである。そのようなアンチセンス核酸は、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体形成を阻害する治療剤としての有用性を有し、そして治療的または予防的な様式において利用され得る。

【0154】

本発明の別の特定の実施形態は、原核生物細胞または真核生物細胞内でのHPSタンパク質およびHPSタンパク質-IP核酸配列の発現の阻害のための方法

を開示する。この方法は、その細胞に、治療的有効量のHPSタンパク質およびHPSタンパク質 - IPのアンチセンス核酸またはその誘導体を提供する工程を包含する。

【0155】

本発明のアンチセンス核酸は、オリゴヌクレオチドであり得、これは、細胞に直接投与され得るか、または外因性の導入された配列の転写によってインビボで産生され得る。さらに、このアンチセンス核酸は、HPSまたはHPSタンパク質 - IPのmRNAのコード（すなわち、エキソン）領域および/または非コード（すなわちイントロン）領域のいずれかに相補的であり得る。HPSタンパク質およびHPSタンパク質 - IPのアンチセンス核酸は、少なくとも、6ヌクレオチド長であり、そして好ましくは6 ~ 200ヌクレオチド長の範囲のオリゴヌクレオチドである。特定の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチドであり、少なくとも15ヌクレオチドであり、少なくとも100ヌクレオチドであり；または少なくとも200ヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNAまたはRNAであり得（またはそのキメラ混合物、誘導体もしくは改変体）、一本鎖または二本鎖のいずれかであり得、そして塩基、糖またはリン酸の骨格部分で改変され得る。

【0156】

さらに、本発明のアンチセンスヌクレオチドは、他の関連する官能基（例えば、ペプチド、オリゴヌクレオチドの細胞膜を横切る輸送を容易にするペプチド部分、ハイブリダイゼーションが惹起する架橋剤、ハイブリダイゼーションが惹起する開裂剤など）を有し得る。例えば、以下を参照のこと：L e t s i n g e r ら、1989 . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 86 : 6553 - 6556 ; P C T P u b l i c a t i o n N o . W O 88 / 09810 . 。特定の実施形態において、HPSタンパク質およびHPSタンパク質 - IPアンチセンスオリゴヌクレオチドは、触媒性RNAまたはリボザイムを含む。例えば、以下を参照のこと：S a r v e r ら、1990 . S c i e n c e 247 : 1222 - 1225。

【0157】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、当該分野において公知の標準的な方法によって合成され得る。そのような方法には以下が含まれる：(i) 自動ホスホロチオエート媒介性オリゴヌクレオチド合成（例えば、以下を参照のこと：Steinら、1988.Nuc.Acids Res.16:3209）または(ii) メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、制御された孔ガラスポリマー支持体の使用によって調製され得る（例えば以下を参照のこと、Sarinら、1988.Proc.Natl., Acad.Sci.U.S.A.85:7448-7451）。

【0158】

代替の実施形態において、HPSタンパク質およびHPSタンパク質-IPアンチセンス核酸は、外因性配列の転写によって細胞内で産生される。例えば、（細胞によりエキソサイトーシスされるときに）インビボに転写されるベクターが生成され得る。これは従って、アンチセンス核酸（RNA）種を生成する。上記のベクターは、それが所望のアンチセンスRNAを生成するように転写され得る限り、エピソーム性のままであり得るか、または染色体内に組み込まれ得る。本発明の実施において利用されるベクターは、細菌、ウイルス、酵母または当該分野における他の供給源に由来し得る。これは、哺乳動物細胞における複製および発現のために利用される。HPSタンパク質およびHPSタンパク質-IPのアンチセンスRNAをコードする配列の発現は、哺乳動物（好ましくは、ヒト）細胞において機能する当該分野において公知の任意のプロモーターによって容易にされ得る。そのようなプロモーターは、誘導性または構成性であり得、そして以下が挙げられるがそれらに限定されない：(i) SV40初期プロモーター領域；(ii) ラウス肉腫ウイルス（RSV）の3'末端長末端反復プロモーター；(iii) ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーターおよび(iv) メタロチオネイン遺伝子の調節配列。

【0159】

HPSタンパク質およびHPSタンパク質-IPのアンチセンス核酸は、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体を発現（または好ましくは過剰発現）する細胞型の障害を処置または予防するに置いて予防的または治療的に利用

され得る。H P S タンパク質およびH P S タンパク質 - I P のRNAを発現または過剰発現する細胞型は、以下を含むがそれらに限定されない当該分野において公知の種々に方法によって同定され得る：H P S タンパク質特異的な核酸およびH P タンパク質 - I P 特異的な核酸を用いたハイブリダイゼーション（例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、ドットプロットハイブリダイゼーション、インサイチュハイブリダイゼーション）あるいは特定の細胞型からのRNAがインビトロでH P S タンパク質およびH P S タンパク質 - I P へと、インビトロで翻訳される能力を免疫組織化学によって観察することによるもの。例えば、患者kらの初代組織を、例えば、免疫細胞化学またはインサイチュハイブリダイゼーションによる実際の処置の前に、H P S タンパク質および/またはH P S タンパク質 - I P 発現について、アッセイされ得る。

【0160】

薬学的に受容可能なキャリア内に含まれる有効量のH P S タンパク質およびH P S タンパク質 - I P アンチセンス核酸を含む、本発明の薬学的組成物は、H P S タンパク質・H P S タンパク質 - I P 複合体のRNAまたはタンパク質を発現または過剰発現する型の疾患または障害を有する患者へと投与され得る。特定の障害または状態の処置において有効であるH P S タンパク質および/またはH P S タンパク質 - I P のアンチセンス核酸の量は、その障害または状態の性質に依存し、そして標準的な臨床技術によって決定され得る。可能な場合、インビトロでそのアンチセンスの細胞傷害性を判定することが所望され、次いで、ヒトにおける試験および使用の前に有用な動物モデルにおいて判定されることが所望される。特定の実施形態において、H P S タンパク質およびH P S タンパク質 - I P アンチセンス核酸を含む薬学的組成物は、リポソーム、微粒子、または微小カプセルを介して投与され得る。例えば、以下を参照のこと：Leonettiら、1990 . Proc . Natl . Acad . Sci . U . S . A . 87 : 2448 - 2451。

【0161】

(8 . H P S タンパク質およびH P S タンパク質・H P S タンパク質 I P 複合体アッセイ)

HP Sタンパク質・HP Sタンパク質 - IP、HP IP 1およびヒトHN 1ホモログタンパク質、あるいはその誘導体、フラグメントおよびアナログの機能的活性は、当該分野において公知の種々の方法によってアッセイされ得る。HP Sタンパク質・HP Sタンパク質 - IP複合体、またはHP IP 1およびヒトHN 1ホモログタンパク質の活性の潜在的な機能的調節因子（例えば、インヒビター、アゴニストおよびアンタゴニスト）（例えば、HP Sタンパク質、HP Sタンパク質 - IPまたはHP Sタンパク質 - IP複合体について特異的な抗体またはアンチセンス核酸）は、それがHP Sタンパク質・HP Sタンパク質 - IP複合体形成および/または活性を調節する能力について、ならびにHP IP 1およびヒトHN 1ホモログタンパク質活性についてアッセイされ得る。

【0162】

((a) イムノアッセイ)

野生型HP Sタンパク質またはHP Sタンパク質 - IPタンパク質と、結合、あるいは上記のタンパク質またはタンパク質複合体について特異的な抗体への結合について競合する能力についてアッセイする、本発明の1つの実施形態において、当該分野において公知の種々の免疫アッセイ方法が使用され得る。これには、例えば、以下が挙げられる：例えば、以下を使用する競合性アッセイシステムおよび非競合性アッセイシステム：放射性免疫アッセイ、酵素連結免疫ソルベントアッセイ（ELISA）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫放射測定アッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、インサイチュ免疫アッセイ、ウェスタブロット、沈降反応、凝集アッセイ、競合固定アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイ、免疫電気泳動アッセイなど。

【0163】

((b) 遺伝子発現アッセイ)

HP Sタンパク質またはHP Sタンパク質 - IPの遺伝子の発現（内因性遺伝子または組換えDNAから発現されるもの）は、以下を含む当該分野において公知の技術を用いて検出され得る：種々の細胞型において、HP Sタンパク質およびHP Sタンパク質 - IPの遺伝子について特異的なプローブを用いた、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、制限エンドヌクレ

アーゼマッピング、DNA配列分析、およびポリメラーゼ連鎖反応増幅(PCR)、続いてサザンハイブリダイゼーションもしくはRNアーゼ保護(例えば、以下を参照のこと: Current Protocols in Molecular Biology 1997. (John Wiley and Sons New York, NY))。

【0164】

本発明の1つの特定の実施形態において、サザンハイブリダイゼーションは、HPSタンパク質および/またはHPSタンパク質-IPの遺伝子の変異の、生理学的状態または病理状態への、遺伝子連鎖を検出するように使用され得る。種々の発生段階における多数の細胞型は、そのHPSタンパク質およびHPSタンパク質-IPのそれらの発現(特に、同じ細胞内でのHPSタンパク質およびHPSタンパク質-IPの同時発現)について特徴付けられ得る。ノーザンブロットまたはサザンブロット分析についてのハイブリダイゼーション状態のストリンジェンシーを操作して、使用される特定のプローブへの関連性の所望の程度を有する核酸の検出を確実にし得る。これらの上記の方法の改変および当該分野において周知の他の方法が本発明の実施において利用され得る。

【0165】

((c) 結合アッセイ)

HPSタンパク質-IPの誘導体(例えば、フラグメント)、アナログおよびホモログは、当該分野において公知の任意の方法によってそれらのHPSタンパク質に結合する能力についてアッセイされ得る。これには、例えば以下が挙げられる: 改変された酵母ツーハイブリッドアッセイシステム、複合体におけるHPSタンパク質に結合する抗体を用いた免疫沈降に続いてその免疫沈降したタンパク質を、変性または非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるサイズ分画分析、ウェスタン分析、非変性ゲル電気泳動および類似の方法。

【0166】

((d) 生物学的活性アッセイ)

本発明の1つの実施形態は、HPSタンパク質の誘導体、アナログまたはホモログの、生物学的活性についてのスクリーニングのための方法を提供する。この

方法は、そのH P Sタンパク質の誘導体、アナログ、またはホモログを、以下からなる群より選択されるタンパク質に接触させる工程：H P I P 1およびヒトH N 1ホモログタンパク質、ならびにそのH P Sタンパク質の誘導体、アナログまたはホモログとその他との間の複合体の引き続いての形成を検出する工程であって、その複合体の形成を検出することは、そのH P Sタンパク質の誘導体、アナログ、またはホモログが、生物学的（例えば、結合）活性を有することを示す、工程、を包含する。

【0167】

さらなる実施形態は、以下からなる群より選択されるタンパク質の誘導体、アナログ、またはホモログの、生物学的活性についてのスクリーニングのための方法を開示する：14-3-3タンパク質、Hrs、BMK1、CDK2、NF90、アトロフィン-1、DGS-I、またはH P I P 1およびヒトH N 1ホモログタンパク質。ここでこの方法は、そのタンパク質の誘導体、アナログまたはホモログをそのH P Sタンパク質に接触させる工程、およびそのタンパク質の誘導体、アナログまたはホモログと、そのH P Sタンパク質との間の複合体の引き続いての形成を検出する工程であって、その複合体の形成を検出することは、そのタンパク質の誘導体、アナログ、またはホモログが生物学的（例えば、結合）活性を有することを示す、工程を包含する。

【0168】

((e) タンパク質の生物学的活性の調節)

本発明はまた、H P Sタンパク質・H P Sタンパク質-I Pに關与し得る目的のタンパク質の生物学的活性の調節のための方法を開示する。これは、その目的のタンパク質の結合パートナーまたはその誘導体もしくはアナログを投与することによる。例えば、H P Sタンパク質（および誘導体もしくはそのアナログ）がH P Sタンパク質-I Pの活性またはレベルを調節する能力は、細胞を接触させること、動物に投与すること、H P Sタンパク質またはH P Sタンパク質をコードする核酸を用いてH P Sタンパク質-I P遺伝子を発現すること、またはH P Sタンパク質を免疫特異的に結合する工程、およびH P Sタンパク質-I Pレベルまたは活性における変化を測定することような方法によって確認され得る。H

HP Sタンパク質 - IPレベルまたは活性における変化は、HP Sタンパク質 - IPレベルまたは活性を調節する能力を有するHP Sタンパク質の指標である。

【0169】

本発明の代替の実施形態において、HP Sタンパク質 - IPは、HP Sタンパク質の活性またはレベルを、以下により調節する能力についてアッセイされ得る：細胞に以下を接触させること、以下を動物に投与すること、以下を有するHP Sタンパク質遺伝子を発現すること：(i) HP Sタンパク質 - IP；(ii) HP Sタンパク質 - IPをコードする核酸または(iii) HP Sタンパク質 - IPに免疫特異的に結合する抗体、またはその結合ドメインを含む、抗体のフラグメントもしくは誘導体、ここで、HP Sタンパク質レベルまたは活性における変化は、HP Sタンパク質 - IPがHP Sタンパク質レベルまたは活性を調節し得ることを示す。

【0170】

HP Sタンパク質・HP Sタンパク質 - IP複合体、またはHP IP1およびヒトHN1ホモログタンパク質、またはその誘導体、アナログもしくはフラグメントはまた、HP Sタンパク質の活性およびタンパク質結合パートナー（すなわち、HP Sタンパク質 - IP）（特にHP IP1およびヒトHN1ホモログタンパク質）の活性を調節するにおける活性についてスクリーニングされ得る。本発明のタンパク質およびタンパク質複合体は、下記の如くHP Sタンパク質・HP Sタンパク質 - IP複合体を調節する（すなわち、増加または減少させる）能力についてスクリーニングされ得る。

【0171】

((f) 色素沈着障害の処置についてのアッセイ)

HP Sタンパク質は、色素沈着障害の病因と相関付けられている。この障害には、眼・皮膚白皮症および過小色素沈着が挙げられる。従って、HP Sタンパク質・HP Sタンパク質 - IP複合体ならびにその誘導体、アナログおよびフラグメント、HP Sタンパク質遺伝子をコードする核酸、抗HP Sタンパク質・HP Sタンパク質 - IP複合体、ならびに他の調節因子は、インビトロおよびインビボのアッセイの両方において色素沈着障害の処置または予防における活性につい

て試験され得る。

【0172】

1つの実施形態において、治療剤は、以下によって、色素沈着障害を処置または予防するにおける活性についてアッセイされ得る：インビトロで色素沈着反応の指標を示す培養された細胞を、その治療剤に接触させること、およびその治療剤に接触している細胞における指標のレベルを、そのように接触していない細胞におけるその指標のレベルとを比較すること、ここで、その接触している細胞におけるより低いレベルは、その治療剤が色素沈着障害の処置または予防において活性を有することの指標である。そのようなアッセイのために使用され得る細胞モデルとしては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：培養された白斑メタのサイトおよびケラチノサイトを用いるインビトロ研究（例えば、以下を参照のこと：Bessouら1997、Br. J. Dermatol. 137：890-897）；ヌル遺伝子型 $p(c p) / p(25H)$ のマウスからの不死性重篤過小色素沈着メラノサイトおよびメラニン芽細胞の株（例えば、以下を参照のこと：Sviderskayaら1997、J. Invest. Dermatol. 108：30-34）およびメラノサイト移動を研究するためのヒト皮膚の有機型培養物（例えば、以下を参照のこと：Le Poolleら、Pigment. Cell Res. 7：33-43、1994）。

【0173】

((g) 血小板機能不全の処置についてのアッセイ)

HPSタンパク質は、血小板機能不全に相関付けられている。従って、HPS関連タンパク質およびタンパク質複合体は、インビトロおよびインビボのアッセイにおけるそのような血小板機能不全の処置または予防における活性について試験され得る。

【0174】

1つの実施形態において、本発明の治療剤は、以下により、血小板機能不全の処置または予防における活性についてアッセイされ得る：インビトロで色素沈着反応の指標を示す培養された細胞を、その治療剤に接触させること、およびその治療剤に接触している細胞における指標のレベルを、そのように接触していない

細胞におけるその指標のレベルとを比較すること。別の実施形態において、本発明の治療剤は、以下により血小板機能不全の処置または予防における活性においてアッセイされ得る：血小板反応を示す試験動物または血小板反応を示さないが後に血小板反応を惹起する薬剤によるチャレンジを受ける試験動物にその治療剤を投与すること；およびその治療剤の投与後にその血小板反応における変化を測定すること。

【0175】

正確に天然のヒト血小板機能不全を模倣する血小板機能不全の多数の動物モデルが当該分野において知られている。特定のモデルの例としては以下が挙げられるがそれらに限定されない：ラットモデルにおける皮膚出血時間試験（以下を参照のこと：MacDonaldら, 1994. *Tizromb Res.* 76: 535 - 540）；ラット実験モデルにおける血小板抑制薬剤の出血時間と抗血栓効果との間の相関（以下を参照のこと：Suehiroら, 1994. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 83: 157 - 163）ならびに他の類似のアッセイ。

【0176】

（（h）神経変性疾患の処置についてのアッセイ）

HPSは、種々の神経変性疾患に関連する。本発明の1つの実施形態において、本発明の治療剤は、以下により神経変性疾患の処置または予防においてその活性についてアッセイされ得る：神経変性疾患の指標（例えば、 α -A4ペプチドのインビトロ過剰発現）を示す培養細胞にその治療剤を接触すること、およびその治療剤と接触している細胞におけるその指標レベルを、そのようには接触していない細胞におけるその指標のレベルを比較すること。ここで、その接触している細胞におけるより低いレベルは、その治療剤が神経変性疾患の処置または予防において活性を有することの指標である。神経変性疾患についての細胞培養モデルの特定の例としては以下が挙げられるがそれらに限定されない：罹患した個体および罹患していない個体からの培養ラット内皮細胞（例えば以下を参照のこと：Maneiroら, 1997. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 19: 5 - 12）；P19マウス胚癌腫細胞（例えば以下を参

照のこと：Hungら1992．*Plvc．Natl Acad．Sci．USA* 89：9439-9443)およびマイネルトの基底核からのコリン作用性ニューロンの剥離した細胞培養物(例えば以下を参照のこと：Nakajimら，1985．*Proc．Natl．Acad．Sci．USA*，82：6325-6329)。

【0177】

別の実施形態において、本発明の治療剤は、以下によって神経変性疾患の処置または予防における活性についてアッセイされ得る： α -APPを発現するトランスジェニック動物における認知欠損の未熟発達のような神経変性疾患の症状を示すか、または神経変性疾患の症状を発症する素因を有する試験動物にその治療剤を投与すること；およびその治療剤の投与後にその神経変性疾患の症状における変化を測定すること。特定の神経変性疾患動物モデルの例としては以下が挙げられるがそれらに限定されない：部分的トリソミー16マウス(以下を参照のこと：HHolzmanら、1996．*Proc．Natl．Acad．Sci．USA* 93：13333-13338)；双極性：両側基底核損傷ラット(以下を参照のこと：Popovicら、1996．*Glut．J．Neurosci* 86：281-299)；加齢ラット(Muir、1997．*Pharmacol．Biochem．Behav* 56：687-696)、アルツハイマー疾患のPDAPPトランスジェニックマウスモデル(Johnson-Woodら、1997．*Proc．Natl．Acad．Sci．USA* 94：1550-1555)、および実験自己免疫痴呆(Oronら、1997．*J．Neural Transm．補遺* 49：77-84)。

【0178】

((i) HPSタンパク質およびタンパク質複合体のアンタゴニストおよびアゴニストのスクリーニング)

本発明は、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体、HPSタンパク質、またはHPSタンパク質-IP核酸、タンパク質または誘導体に特異的に結合する分子の検出についてのアッセイを提供する。例えば、HPSタンパク質および/もしくはHPSタンパク質-IP複合体核酸の両方またはHPIP1お

よびヒトHN1ホモログタンパク質核酸を発現するを発現する組換え細胞を使用して、これらのアッセイにおいて使用されるその複合体またはそのタンパク質を組換え産生して、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体に結合または阻害する分子、あるいはHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質の機能を阻害する分子についてスクリーニングし得る。

【0179】

あるいは、調節因子は、ネイティブHPSタンパク質のプロモーターでもネイティブHPSタンパク質-IPプロモーターでもないプロモーターから、HPSタンパク質およびHPSタンパク質-IPの両方を発現するトランスジェニック非ヒト動物に対して、候補分子を投与することによって同定される。ここで、好ましくは、その候補分子はまた、トランスジェニック非ヒト動物において発現される。あるいは、そのような調節因子を同定するための方法は、インビトロで実施され得、好ましくはHPSタンパク質精製したHPSタンパク質-IPおよび精製した候補分子を用いて行われ得る。スクリーニングされる薬剤はまた、すべての形態の抗血清、アンチセンス核酸アドを含み得、これらは、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体活性を調節し得るか、またはHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質活性を調節し得る。

【0180】

例示ではあるが限定ではなく、多様なライブラリー（例えば、ランダムペプチドまたはコンビナトリアルペプチド、または非ペプチドのライブラリー）が、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体またはHPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質に特異的に結合する分子についてスクリーニングされ得る。多くのライブラリーは、当該分野において知られる（例えば、化学合成ライブラリー、組換えライブラリー（例えば、ファージディスプレイライブラリー）およびインビトロ翻訳ベースのライブラリー）。そのライブラリーをスクリーニングすることは、任意の種々の一般に使用される公知の方法によって達成され得る。例えば以下を参照のこと：Bockら，1992．Nature 355：56：364-566；Tuerkら，1992．Proc．Nat1．Acad．Sci．U．S．A 89：6988-6992；米国特許第5，096

、815号；米国特許第5,223,498号；米国特許5,198,346号；PCT公開No.番号WO94/18318。

【0181】

1つの実施形態において、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体活性を調節（すなわち、アンタゴナイズまたはアゴナイズ）する薬剤は、結合阻害アッセイを用いてスクリーニングされ得る。ここで、薬剤は、それがHPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体の形成を、水性生理的結合条件下で阻害する能力についてスクリーニングされる。ここで、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体形成は、試験されるべき薬剤の非存在下で生じる。HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体の形成を阻害する薬剤は、複合体形成のアンタゴニストと識別される。HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体の形成を除去する薬剤は、複合体形成のインヒビターと識別される。HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体の形成を増強する薬剤は、複合体形成のアゴニストと識別される。

【0182】

スクリーニングについて本発明の実施において利用される方法は、以下を包含し得る：以下を用いてその複合体タンパク質を標識すること：(i) radio ligands（例えば、 ^{125}I または ^3H ）；(ii) 磁性リガンド（例えば、フォトビオチン（photobiotin）アセテートに共有結合した常磁性ビーズ）；(iii) 蛍光性リガンド（例えば、フルオレセインまたはローダミン）、あるいは (iv) 酵素リガンド（例えば、ルシフェラーゼ、またはガラクトシダーゼ）。次いで溶液中で結合する反応剤は、当該分野において公知の多くの技術のうちの1つによって単離され得る。それには以下が挙げられるがそれらに限定されない：標識されていない結合パートナー（またはその標識部分において使用されるものとは識別可能な標識で標識された結合パートナー）にたいする抗血清を用いた標識された部分の免疫共沈；免疫親和性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、および密度勾配遠心分離。結合の際に、標識された種は、そのフィルターを通過させないようにし、複合体血清の単純なアッセイを提供する。

【0183】

代表的な結合アッセイは、例えば、限定ではなく、以下において実施され得る：10 - 250 mM NaCl、5 - 50 mM Tris-HCl、pH 5 - 8、および0.5% Triton X 100 または他の界面活性剤であって相互作用の特異性を改善するものの水性塩溶液。金属キレート剤および/または二価のカチオンを添加して結合を改善し得および/または加水分解を減少させ得る。反応温度としては以下が挙げられる：4、10、15、22、25、35 または42、そしてインキュベーション時間は、代表的には、スクリーニング15秒間であるが、より長い時間が、結合平衡を生じさせるために好ましい。特定のHPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体は、慣用タンパク質結合アッセイを用いてアッセイされた、再現性のよい結合についての指摘結合条件を決定し得る。次いで、複合体形成の物理的パラメータは、利用される特定の標識について特異的なアッセイ方法（すなわち、放射能検出のための液体シンチレーション分光学）を用いて複合体形成の定量によって分析され得る。次いで、この反応結果は、Scatchard分析、Hill分析および他の一般的に当該分野において公知の方法を用いて定量的に分析される。例えば、以下を参照のこと：Proteins, Structures, and Molecular Principles. 第2版(1993) Creighton編 (W.H. Freeman and Company, New York, NY)。

【0184】

結合アッセイに対する第二の共通のアプローチにおいて、結合種の1つは、固体状態のプラットフォーム（例えば、フィルター、マイクロタイタープレートウェル、試験管、クロマトグラフィーマトリクスなど）に共有結合または非共有結合的な手段のいずれかで固定される。1つの実施形態において、固定されたHPSタンパク質を利用して、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP複合体形成を調節するその能力について試験される化合物の存在または非存在下で標識されるHPSタンパク質-IPとの結合についてアッセイし得る。その結合パートナーは、水性の生理的条件下で（すなわち、もとの相互作用が検出された条件下

)で、結合させられる。逆に、さらに別の実施形態において、H P Sタンパク質 - I Pが固定され、そして標識されたH P Sタンパク質、またはその誘導体と、結合条件下で接触される。

【0185】

((j) タンパク質同士の相互作用についてのアッセイ)

本発明は、H P Sタンパク質 - I Pの誘導体、フラグメント、アナログおよびホモログを、H P Sタンパク質との結合についてアッセイおよびスクリーニングするための方法を開示する。H P Sタンパク質と相互作用する、H P Sタンパク質 - I Pの誘導体、フラグメント、アナログおよびホモログは、酵母ツーハイブリッドアッセイ系 (例えば以下を参照のこと : F i e l d s & S o n g , 1 9 8 9 . N a t u r e 3 4 0 : 2 4 5 - 2 4 6) ; または好ましくは、その改変および改良の手段 (以下に記載される : 米国特許出願第 0 8 / 6 6 3 , 8 2 4 (1 9 9 6 年 6 月 1 1 日出願) および同 0 8 / 8 7 4 , 8 2 5 (1 9 9 7 年 6 月 1 3 日出願) (これらはともに発明の名称「 I d e n t i f i c a t i o n a n d C o m p a r i s o n o f P r o t e i n - P r o t e i n I n t e r a c t i o n s t h a t O c c u r i n P o p u l a t i o n s a n d I d e n t i f i c a t i o n o f I n h i b i t o r s o f T h e s e I n t e r a c t i o n s 」 (N a n d a b a l a n ら) であり、その全体が本明細書において参考として援用される) によって同定され得る。

【0186】

改善された酵母ツーハイブリッド系による相互作用タンパク質の同定は、レポーター遺伝子 (本明細書以後「レポーター遺伝子 (R e p o r t e r G e n e) 」と称する) の発現の検出に基づく。レポーター遺伝子の転写は、転写調節因子の半分に各々が融合した、2つのタンパク質の相互作用による転写調節因子の再構成に依存する。ベイトH P Sタンパク質 (または誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログ) 、およびプレイタンパク質 (そのベイトタンパク質と相互作用する能力について試験されるべきタンパク質) は、それぞれDNA結合タンパク質および転写調節ドメインへの融合タンパク質として発現されるかまた

はその逆である。本発明の特定の実施形態において、プレイ集団は、H P Sタンパク質 - I Pの変異体をコードする1つ以上の核酸であり得る（例えば、部位特異的変異誘発またはヌクレオチド配列における変異を生成する別の方法による）。好ましくは、そのプレイ集団は、DNA（例えば、cDNAゲノムDNAまたは合成生成されたDNA）によりコードされるタンパク質である。例えば、その集団は、哺乳動物RNAからのcDNAの集団の特徴づけされていないサンプルに由来するcDNA配列を含むキメラ遺伝子から発現され得る。別の特定の実施形態において、ランダムなペプチドを発現する生物学的ライブラリーを、プレイ核酸の供給源として使用し得る。

【0187】

本発明は、H P Sタンパク質 - I Pのインヒビターについてのスクリーニングのための方法を開示する。手短には、タンパク質同士の相互作用アッセイを、1つ以上の候補分子の存在下で、そのアッセイが行われることを除き本明細書上記に記載したとおりに実施し得る。その1つ以上の候補分子が非存在のときに、存在したものに比較した、レポーター遺伝子活性において生じる増加または減少は、その候補分子が、相互作用対合に対する効果を発揮することを示す。1つの実施形態において、そのタンパク質相互作用の阻害は、例えば、酵母細胞が生存するのに必要であり、そこで、減弱化していないタンパク質相互作用が、URA3遺伝子の活性化を生じ、これは、化学物質5 - フルオロオロチン酸を含む培地中での酵母の死をもたらす。例えば、以下を参照のこと：Rothstein, 1983. Meth. Enzymol. 101: 167 - 180。

【0188】

一般に、ベイトおよびプレイの集団を含むタンパク質は、融合（キメラ）タンパク質として提供され、好ましくはこれは、各々のタンパク質を予め選択した配列に連続して含むキメラコード配列の組換え発現による。一方の集団について、予め選択した配列ハイブリダイゼーション、そのドメインがプロモーター内のDNA配列を特異的に認識する限り、任意のDNA結合ドメインであり得るDNA結合ドメインである（例えば、転写アクチベーターまたはインヒビター）。他方の集団について、予め選択された配列は、それぞれ、転写アクチベーターまたは

インヒビターのアクチベーターまたはインヒビターのドメインである。調節ドメイン単独（タンパク質配列に対する融合物としてではない）およびDNA結合ドメイン単独（タンパク質配列に対する融合物としてではない）は好ましくは、検出可能には相互作用せず、その結果、アッセイにおける擬陽性が回避される。そのアッセイ系は、転写アクチベーター（またはインヒビター）のDNA結合ドメインについての結合部位を含むプロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子をさらに包含する。従って、本発明の実施において、プレイ融合タンパク質へのHPSタンパク質融合タンパク質の結合は、転写アクチベーター（またはインヒビター）の再構成をもたらし、これは、同時に、レポーター遺伝子の発現を活性化（または阻害）する。

【0189】

特定の実施形態において、本発明は、以下の工程を包含する、1つ以上のタンパク質同士の相互作用を検出するための方法を開示する：(i) 第一の接合型でありHPSタンパク質配列およびDNA結合ドメインを含む第一の融合タンパク質を有する酵母細胞の第一の集団中にHPS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）を組換え発現する工程であって、ここで、その酵母細胞の第一の集団は、そのDNA結合ドメインによって認識される1つ以上のDNA結合部位によって「駆動される」プロモーターに作動可能に連結される第一のヌクレオチド配列を含み、その結果、その第一のタンパク質の第二の融合タンパク質（転写活性化ドメインを含む）への相互作用が、第一のヌクレオチド配列の転写物の増加を生じる、工程；(ii) その第二の融合タンパク質の非存在下で第一のヌクレオチド配列の転写の増加が生じる第一の集団において、それら酵母細胞の除去するためにネガティブ選択を行う工程；(iii) 第一の接合型とは異なる第二の接合型の酵母細胞の第二の集団において、複数の第二の融合タンパク質を組換え発現させる工程であって、その第二の融合タンパク質は、HPSタンパク質-IPの誘導体、フラグメント、アナログまたはホモログの配列および転写アクチベーターの活性化ドメインを含み、ここで、その活性化ドメインは、各々第二の融合タンパク質において同じである、工程；(iv) 酵母細胞のその第一の集団を、酵母細胞の第二集団と接合して、二倍体の酵母

細胞の第三の集団を形成する工程であって、二倍体酵母細胞の第三の集団は、DNA結合ドメインによって認識されるDNA結合部位によって「駆動」されるプロモーターに作動可能に連結される第二のヌクレオチド配列を含み、その結果、第一の融合タンパク質と、第二の融合タンパク質との相互作用は、その第二のヌクレオチド配列の転写の増加を生じ、そこで、その第一のヌクレオチド配列およびその第二のヌクレオチド配列は、同じであり得るかまたは異なり得る、工程、ならびに(v)その第一のおよび/またはその第二のヌクレオチド配列の転写の増加を検出する工程であって、それによって、第一の融合タンパク質と第二の融合タンパク質との間の相互作用を検出する、工程。

【0190】

1つの実施形態において、ベイト(HPSTタンパク質配列)およびプレイ(キメラ遺伝子のライブラリー)は、その2つの酵母株を、およそ6~8週間にわたり固体培地上で接合することによって合わされる。あるいは、その接合は、液体培地において行われる。その得られる二倍体は、キメラ遺伝子の両方の型を含む(すなわち、DNA結合ドメイン融合物および活性化ドメイン融合物)。相互作用性タンパク質が得られると、その相互作用性タンパク質の対をコードするDNA配列が、DNA結合ドメインハイブリッドまたは活性化ドメインハイブリッドが別個の反応において増幅されるほうほうによって単離される。好ましくは、その増幅は、そのDNA結合ドメインハイブリッドまたは活性化ドメインハイブリッドのいずれかについて特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの対を用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR;例えば、以下を参照のこと:Innisら、1990、PCR Protocols(Academic Press Inc.、San Diego、CA)によって実施される。PCR増幅反応はまた、相互作用するタンパク質対を発現するプールされた細胞において、好ましくは、相互作用物のプールされたアレイの上において実施され得る。当該分野において公知の他の増幅方法はまた、使用され、それらにはいかが挙げられる:例えば、リガーゼ連鎖反応;Qレプリカーゼなど。例えば、以下を参照のこと:Krickaら、1995.、Molecular Probing Blotting, and Sequencing(Academic Press New

York, NY)。

【0191】

本発明のさらなる実施形態において、DNA結合ドメインハイブリッドおよび活性化ドメインハイブリッド蛋白質をコードするプラスミドもまた、当該分野において周知の方法のいずれかにより単離およびクローニングされ得る。例えば、限定ではないが、シャトル(E. coliに対する酵母)ベクターを使用してその融合タンパク質を発現する場合、その遺伝子は、続いて、その酵母DNAでE. coliを形質転換することおよびその細菌からそのプラスミドを回収することによって回収され得る。例えば、以下を参照のこと：Hoffmanら, 1987. Gene 57:267-272。

【0192】

((9) 治療剤の薬学的組成物および投与)

本発明は、本発明の治療剤の薬学的有香料の被験体への投与による処置または予防の方法を開示する。1つの実施形態において、その治療剤は、実質的に精製され、そしてその被験体は、哺乳動物であり、そして最も好ましくはヒトである。

【0193】

その治療剤が核酸を含む場合に使用され得る処方物および投与方法は上記される。種々の送達系が公知であり、そしてこれを使用して本発明の治療剤を投与し得る。これには、以下が挙げられる：例えば、(i) リポソーム、微小粒子、微小カプセルにおけるカプセル化；(ii) その治療剤を発現し得る組換え細胞；(iii) レセプター媒介性エンドサイトーシス(例えば、以下を参照のこと：Wu & Wu, 1987. J. Biol. Chem. 262:4429-4432)；(iv) 治療剤核酸を、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての構築など。

【0194】

投与方法としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻内、硬膜外、および経口経路。本発明の治療剤は、任意の簡便な経路によって投与され得(例えば、注入またはポラス注射、上皮

または粘膜皮膚（例えば、経口粘膜、直腸粘膜および腸粘膜など）内膜を介した吸収、そして他の生物学的に活性な薬剤とともに投与され得る。投与は、全身性または局所性であり得る。さらに、その治療剤を中枢神経系に、任意の適切な経路（脳室内およびクモ膜下腔または硬膜下腔内を含む）によって投与することが遊離であり得る。脳室内の注射は、リザーバに接続された脳室内のカテーテルによって容易にされ得る（例えば、Ommayaリザーバ）。肺投与もまた、吸入器または噴霧器（ネブライザ）の使用およびエアゾール化剤の処方によって使用され得る。また、その治療剤を、処置の必要な領域に局所的に投与することが所望され得る。これは、例えば、限定ではないが、手術の間の局所注入、局所塗布、注射、カテーテルによる、坐剤による、または移植体によるものにより達成され得る。特定の実施形態において、投与は、悪性腫瘍または新生物もしくは前新生物組織の部位（または以前の部位）に直接注射することであり得る。。

【0195】

本発明の別の実施形態において、その治療剤は、ベシクル、特にリポソーム中で到達され得る。例えば、以下を参照のこと：Langer, 1990. Science 249:1527-1533。さらに別の実施形態において、その治療剤は、徐放系中で送達され得る。これは例えば以下が挙げられる：送達ポンプ（例えば以下を参照のこと：Saudekら, 1989. New Engl. J. Med. 321:574）および半透膜性ポリマー材料（例えば、以下を参照のこと：Howardら, 1989. J. Neurosurg. 71:105）。さらに、徐放系は、治療標的（例えば、脳）の付近に配置され得る。従って、全身性投与の一部のみを必要とする。例えば、以下を参照のこと：Goodson, In: Medical Applications of Controlled Release 1984. (CRC Press, Boca Raton, FL)。

【0196】

その治療剤がタンパク質をコードする核酸である本発明の特定の実施形態において、その治療剤核酸は、適切な核酸発現ベクターの一部としてそれを構築することおよびそれを投与して細胞内にさせること（例えば、レトロウイルスベクタ

一、直接注射、微小粒子ボンバードメントの使用、脂質または細胞表面レセプターでのコーティング、またはトランスフェクト剤による)、またはそれを核へ侵入することが公知のホメオボックス様ペプチドに連結させて投与することによって、そのコードされるタンパク質の発現を促進するようにインビボ投与され得る(例えば、以下を参照のこと: J o l i o t r a、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868)など。あるいは、核酸治療剤は細胞内に導入され得、そして相同組換えにより、発現のための宿主細胞DNA内に取り込まれる。

【0197】

本発明はまた、薬学的組成物を提供する。そのような組成物は、治療有効量の治療剤および薬学的に受容可能なキャリアを含む。本明細書において利用される場合、「薬学的に受容可能な」とは、連邦政府または州政府の規制当局によって承認されること、または動物またはより特定するとヒトでの使用について、米国薬局方もしくは他の承認された薬局方に掲載されることを意味する。用語「キャリア」とは、希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルであって、治療剤とともに投与されるものであり、そして水および油のような滅菌液体を含むがそれに限定されない。

【0198】

特定の障害または状態の処置において有効な本発明の治療剤の量は、その障害または状態の性質に依存し、そして当業者によって標準的な臨床技術により判定され得る。さらに、インビトロアッセイが必要に応じてしよす荒れて、最適投薬量範囲の同定を補助する。処方物において使用される正確な用量はまた、投与の経路および疾患または障害の全体の重篤さに依存する。そして、担当医の判断および各患者の環境に従って決定されるべきである。しかし、本発明の治療剤の静脈投与のための適切な投薬量範囲は、一般に、約20~500マイクログラム(μg)の活性化化合物(体重1kgあたり)である。鼻内投与のための適切な投薬量範囲は、およそ0.01pg/kg体重~1mg/kg体重である。有効量は、インビトロまたは動物モデル試験系に由来する用量応答曲線から推定され得る。坐剤は、一般に、0.5重量%~10重量%の範囲内で活性成分を含む、経口

処方物は、好ましくは10%~95%の活性成分を含む。

【0199】

本発明はまた、薬学的パックまたはキットを提供し、これらには、1つ以上の薬学的組成物の成分および本発明の治療剤が充填された1つ以上の容器を備える。必要に応じて、そのような容器には、医薬または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府当局により規定された形式の通知書が伴い得る。この通知書は、ヒト投与のための製造、使用または販売の当局による承認を反映する。

【0200】

本発明は、さらに、以下の実施例に記載される。この実施例は、添付の特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定しない。

【0201】

(実施例1：HPSタンパク質 - IP複合体の同定)

改変され改良された酵母ツーハイブリッド系を利用して、HPSポリペプチド相互作用物と相互作用するポリペプチドを同定した。2つのハイブリッドタンパク質をコードする発現ベクターを構築した。「フォワード (forward)」スクリーニングのために、HPSタンパク質の一部に融合された一方のハイブリッドは、酵母転写アクチベーターGal4のDNA結合ドメインからなる。他方のハイブリッドは、哺乳動物 cDNAライブラリーによってコードされる「プレイ」部分配列に対して融合されたGal4アクチベータードメインからなる。「リバーズ (reverse)」スクリーニングのために、HPSタンパク質の部分を、Gal4アクチベータードメインに融合し、そして哺乳動物 cDNAライブラリーのそのプレイタンパク質配列を、DNA結合ドメインに融合したが、そのアッセイをそうでなければ同一に行った。

【0202】

次いで、上記のベクターの各々を、当該分野において公知の方法を用いて酵母の補完接合型 (aおよび)へ挿入した。例えば、以下を参照のこと：Chien,ら、1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578-9581。接合は、同じ酵母細胞内の両方の発現を容易にするために実施し、これは、相互作用を生じさせる。ベイトドメインとプレイドメインとの間

の相互作用は、Gal 4 についてのシス結合エレメントを含むレポーター遺伝子の転写活性をもたらした。指標タンパク質 ガラクトシダーゼならびにウラシルおよびヒスチジン栄養性のための代謝マーカーをコードするレポーター遺伝子を、特定の様式で、接合において使用された酵母株の一方または他方において含ませた。この様式で、酵母を、首尾よい接合、両方の融合構築物の発現およびHPSタンパク質またはHPSタンパク質 - IPの発現について選択した。相互作用するタンパク質を含んだ酵母クローンを選択肢、そしてマイクロタイタープレートの個々のウェル中で培養した。次いで、HPSタンパク質 - IP配列を含むプラスミドを単離および特徴付けした。

【0203】

プレイcDNAを、 1×10^7 の独立単離体のヒト胎児脳cDNAライブラリーから取得した(カタログ番号HL4029AH; Clontech, Palo Alto, CA)。このライブラリーを、Xho-dT₁₅プライム刺激した胎児脳mRNA(5匹の雄性/雌性 19~22週胎児由来)から合成した。次いで、これらは、以下のいずれかに直接的にクローニングした:pAD-GAL4(酵母Gal4活性化ドメインクローニングベクターであって、ロイシン生合成を欠損する酵母において選択するためのLEU遺伝子を含むもの)、またはpBD-GAL4(酵母Gal4 DNA結合ドメインクローニングベクターであって、トリプトファン生合成を欠損する酵母において選択するためのTRP1遺伝子を含むもの)。

【0204】

フォワードスクリーニングを、一回利用して、プレイcDNA産物の、ベイトタンパク質のアレイに対する相互作用を試験した。このうち1つは、ヌクレオチド210-1292(以下ベイトフラグメント210-1292と称する)のHPSタンパク質ヌクレオチド配列によってコードされていた(GenBank登録番号u65676)。次いで、ベイトフラグメント210-1292を、全長HPSタンパク質cDNAから、標準的な技術によるPCR増幅によって増幅した。この増幅されたフラグメントを、pGBT9BSのBamHIおよびEcoRI制限部位に連結した(例えば、以下を参照のこと:Yangら、1995、

Nucl. Acids. Res. 23:1152-1156)。この配列を、核酸配列決定によって、確認して、そのPCR増幅がその配列の正確なコピーを再生したことを確認した。この試験は、予想されるように、配列がヒトHPSタンパク質と同一の相互作用ドメインをコードしたことを決定した。

【0205】

3つのリバーススクリーニングを利用して、プレイcDNA産物のベイトタンパク質のアレイに対する相互作用を試験した。フラグメント210-1292、1272-2306、および1272-2357はそれぞれ、標準的な技術によるPCR増幅によって全長HPSタンパク質cDNAから増幅した。次いで、この増幅したフラグメントを、ベクターpGAD-GH(Clontech)にクローニングした。この配列を、核酸配列決定によって確認して、そのPCR増幅が配列の正確なコピーを再生したことを確認した。この試験は、予想されるように、その配列がヒトHPSタンパク質に同一な相互作用ドメインをコードしたことを決定した。

【0206】

フォワードスクリーニングにおいて、導入されたベイトをコードする核酸での、酵母株YULH（接合型 a.ura3, his3, lys2, Ade2, trp1, pieu2, gal4, gal80, GALRA3GALL-lacZ）（フォワードスクリーニング）の酢酸リチウム/ポリエチレングリコール形質転換（例えば、以下を参照のこと：Itora, 1983. J. Bacteriol. 153:163-168）により発現した。他方、プレイ配列を、酵母株N106r（接合型 a, ura3, his3, ade2 ; trp1, leu2, gal4, gal80, cvh^r, Lys2::GALL_{UAS}-IS3_{TATA}-HIS3, ura3::GALL_{UAS}-GALL_{TATA}-lacZ）中への形質転換により導入した。リバーススクリーニングについて、ベイトを、N106r中に、そしてプレイをYULH中に形質転換した。

【0207】

次いで、2つの形質転換された集団を、当該分野において公知の標準的な方法を用いて接合させた例えば以下を参照のこと：Shermanら, 1991. G

etting Started with Yeast, 第194版 (Academic Press, New York, NY)。手短には、細胞を、適切なプラスミドの存在について選択する培地内で中期から後期の対数増殖器まで増殖させた。次いで、この2つの接合株(およびa)を、ニトロセルロース膜上で濾過したYAPD培地(上記を参照)に希釈し、そして30 で6~8時間インキュベートした。次いで、この細胞を、所望の二倍体(すなわち、 ガラクトシダーゼ、ウラシル自己栄養性およびヒスチジン自己栄養性についてレポーター遺伝子を有し、そしてそのベイトおよびプレイをコードするベクターを発現する酵母) についての選択培地へと移した。接合産物を、アデニンおよびリジン(首尾よい接合について選択するため)、ロイシンおよびトリプトファン(ベイトおよびプレイの両方のプラスミドによってコードされる遺伝子の発現について選択するため)、およびヒスチジン(タンパク質相互作用を選択するため) を欠如する合成完全(SC)培地にプレートした(以下を参照のこと: Kaiser, Michaelis & Mitchell. 編, 1994. Methods in Yeast Genetics, 1994 Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY)。この培地を、本明細書以下、SC選択(Selective)培地という意味のSCS培地と称する。

【0208】

選択されたクローンを、続いて、 ガラクトシダーゼの発現について試験して、HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP相互作用の形成を確認した。次いで、 ガラクトシダーゼのフィルターリフトアッセイをBreedemおよびNasmythのプロトコルの改変に従って行った(1985, Cold Spring Harbor Quant. Biol. 50:643-650)。コロニーを、SCSプレート上にパッチプレートし、一晚増殖させ、そしてWhatman No. 1フィルター上にレプリカプレートした。次いで、そのフィルターを ガラクトシダーゼ活性について試験した(すなわち、「陽性」であったコロニーは、可視性の青色を呈した)。

【0209】

タンパク質相互作用について「陽性」であったコロニー内に含まれる細胞は、DNA結合プラスミドおよび活性化ドメインプラスミドの混合物を含んでいた。これらの細胞を、96ウェルのマイクロタイタープレートの個々のウェル中で単一の単離体として再増殖させた。およそ10 μ lの各々の選択された単離体を溶解し、活性化ドメインプラスミドについてpAD-GAL4 またはpGAD-GH内およびpBD-GAL4またはpGBT9BSプラスミドの挿入物を、各々のベクターの隣接配列について特異的なプライマーを用いてPCR増幅し、そしておよそ300ヌクレオチド（これは、翻訳後タンパク質のアミノ末端となる）を、ABI377配列決定機を用いて決定した。公知の配列との比較を、National Center for Biotechnology Informationを通じて公に利用可能な「BLAST」プログラムを用いて行った。HPSタンパク質およびHPSタンパク質-IP相互作用ドメインのまとめおよび同定された単離体を以下の表Iに示す。

【0210】

フォワードのスクリーニングアッセイにおいて、2つの独特の単離体を、新規配列として同定した。決定された核酸配列ならびに同一のEST、ca49368.b1；cg49367.h11；cg49424.c10（本明細書以後HPIP1とする）およびcg Hs2950_0（HN1ホモログとする）の対応する推定アミノ酸配列をそれぞれ図1および2に示す。

【0211】

3つのリバーススクリーニングアッセイにおいて、7つの単離体が、公開されたタンパク質と同一であったことが見出された：

1.ヌクレオチド1272-2306によってコードされるHPSタンパク質ドメインと相互作用する同定された配列ハイブリダイゼーション、以下と同一の物を含む：

(i)14-3-3タンパク質(eta)配列(GenBank登録番号X80536)(764ヌクレオチドに始まる)(これは、ヌクレオチド192-932から翻訳されるc末端領域に対応する)；ならびに

(ii)核因子NF90(GenBank登録番号U10324)(ヌクレ

オチド1930に始まる)(ヌクレオチド265-2280から翻訳されるタンパク質のC末端領域に対応する)。

【0212】

2. HPSタンパク質ドメイン1272-2357と相互作用する2つの同定された配列は、以下と同一であったことが実証された:

(i) 14-3-3タンパク質(eta)配列(GenBank登録番号X80536)(ヌクレオチド764に始まる)(これは、ヌクレオチド192932から翻訳されたタンパク質のC末端領域に対応する);および

(ii) CDK2配列(GenBank登録番号X61622)(ヌクレオチド4で始まる)(そのタンパク質は、ヌクレオチド1-897から翻訳される)

3. さらに、HPSタンパク質ドメイン210-1292と相互作用する4つの同定された配列が、以下と同一であることが実証された:

(i) ヒトHrs(GenBank登録番号D84064)(ヌクレオチド98および100に始まる)(ヌクレオチド62-2394から翻訳されたそのタンパク質)。

【0213】

(ii) BMK1配列(GenBank登録番号U29725)(ヌクレオチド431に始まる)(ヌクレオチド222-2672から翻訳されるタンパク質のC末端領域に対応する);

(iii) アトロフィン-1配列(GenBank登録番号U23851)(ヌクレオチド649に始まる)(ヌクレオチド74-3628から翻訳されるタンパク質のカル簿記死末端領域に対応する);ならびに

(iv) DGS-1配列(GenBank登録番号L77566)(ヌクレオチド16および27に始まる)(タンパク質は、ヌクレオチド1-1698から翻訳される)。

表I: 酵母ツーハイブリッドスクリーンにより同定されたHPSタンパク質とのタンパク質相互作用

【0214】

【表1】

活性化タンパク質登録番号	活性化領域 b.p.	結合タンパク質登録番号	HPSCPのORF	結合領域 b.p.	単離体	スクリーン	所見(例えばHPSIPの相克機能)
HPS U65676	1272-2306 1272-2357	14-3-3 ^{elz} NS0536	192-932	761 [*] 764 [*] (c-末端)	1 1	リバーズ リバーズ	小胞輸送およびシグナル伝達
HPS U65676	210-1292	Hrs DB4064	61-2394	98 [*] 100 [*]	1 1	リバーズ	小胞輸送およびシグナル伝達
HPS U65676	210-1292	BMK1 alpha U29725	222- 2280	2431 [*] (c-末端)	2	リバーズ	シグナル伝達
HPS U65676	1272-2357	CDK2 X61622	1-897	4 [*]	1	リバーズ	細胞周期調節
HPS U65676	1272-2306	NF90 U10324	265- 2280	1930 [*] (c-末端)	1	リバーズ	活性化T細胞の核因子の大きいサブユニットのDNA依存タンパク質キナーゼの基質
HPS U65676	210-1292	Atrophin 1 U23851	74-3628	2649 [*] (c-末端)	1	リバーズ	歯状核赤核浸着球形ルイ体蓄積症(DRPLA、スミス病)、小胞輸送?
HPS U65676	210-1292	DGS-1 L77566	1-1698	16 [*] 27 [*]	2 1	リバーズ	致死欠陥のデリン症候群(DGS) 致死領域由来の新規の遺伝子
HPIP1 (cg49367.c1, cg49367.b1, cg49424.e9)	1 [*]	HPS U65676	1-519	210- 1292	3	フォワード	?
HNI (cgHs2950_0)	22 [*]	HPS U65676	106-564	210- 1292	1	フォワード	造血系細胞および免疫系細胞において発現する

1998年4月3日に提出された米国特許出願番号または1999年3月に提出されたPCT特許出願を参照のこと。

【0215】

(実施例2 HPSタンパク質・HPSタンパク質-IP相互作用の特異性の検証)

ベイト：プレイ相互作用の特異性の全体的な程度を確認するために、2つの一般的なアッセイを、最初に行った。第1の例において、上記の遺伝子の結合ドメ

イン融合物をコードする個々のプラスミドを発現する酵母細胞を、作製した(表Iを参照のこと)。これらの酵母細胞を、一晚増殖させ、そして増殖について試験した。試験された全てのタンパク質について増殖は見出されなかった。これにより、それらが、「自己活性化」タンパク質ではないこと、すなわち、これらのタンパク質は、機能的活性化複合体に対して第2のタンパク質ドメインとの相互作用を必要とすることが確認された。

【0216】

フォワードスクリーニングにおいて検出された相互作用をまとめ、そしてそれらの特異性をさらに実証するために、HPSについて単離されたベイトプラスミドを使用して、酵母株YULH(接合型a)を形質転換した。HPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質由来の相互作用ドメインを株N106r(接合型)中に形質転換した。形質転換体を再増幅し、そして接合を行って、同定されたHPS・HPSIP相互作用をまとめた。HPSは、HPIP1およびヒトHN1ホモログタンパク質との特異性に複合体化した。これは、ベクターと非特異的に反応しなかった。

【0217】

第2の例において、HPIP1およびHN1ホモログタンパク質インサートを含むプラスミドを、株YULH(接合型a)に形質転換し、そしてHPSタンパク質以外のタンパク質を発現する酵母株N106r(接合型)と接合させた。無差別の結合体、すなわち、非特異的様式で多数の他のタンパク質と結合し得るインサートは、非HPSタンパク質ドメインと非特異的に相互作用し、そして非特異的相互作用体として廃棄される。相互作用体のいずれもが、HPSタンパク質以外のタンパク質への結合を示さなかった。

【0218】

リバース(reverse)スクリーニングにおいて検出された相互作用をまとめ、そしてそれらの特異性をさらに実証するために、HPSについて単離されたベイトプラスミドを使用して、酵母株N106r(接合型)を形質転換した。HPSは、14-3-3 eta、Hrs、BMK1、CDK2、NF90、アトロフィン-1、DGS-I由来の相互作用ドメインを、株YULH(接合

型 a) に形質転換した。この形質転換体を再増幅し、そして接合を行って、同定された相互作用体をまとめた。H P S は、14 - 3 - 3 eta、Hrs、BMK1、CDK2、NF90、アトロフィン - 1、DGS - I と特異的に複合体化した。これは、ベクターと非特異的に反応しなかった。

【0219】

第2の例において、14 - 3 - 3 eta、Hrs、BMK1、CDK2、NF90、アトロフィン - 1、DGS - I インサートを含むプラスミドを、株 YULH (接合型 a) に形質転換し、そして H P S 以外のタンパク質を発現する酵母株 N106r (接合型) と接合させた。無差別な結合剤、すなわち、非特異的な様式で多数の他のタンパク質と結合し得るインサートは、非 H P S タンパク質ドメインと非特異的に相互作用し、そして非特異的相互作用体として廃棄される。相互作用体のいずれもが、H P S タンパク質以外のタンパク質への結合を示さなかった。

【0220】

((c) 新規配列の分析)

ヒト EST をコードする配列の同一性検索についての一般的な手順を、公的に利用可能な EST データベース (例えば、National Center for Biotechnology Information (N . C . B . I .) BlastN2.0 プログラム) を使用して行った。Altschul ら、1990 . J . Mol . Biol . 215 : 403 ~ 410 を参照のこと。BlastN2.0 プログラムは、DNA 配列を6つのリーディングフレーム全てで翻訳し、そしてこの翻訳されたタンパク質配列とタンパク質データベース中のタンパク質配列とを比較する。統計学的な有意性を、問い合わせ配列における1つのリーディングフレーム全体の等価物がタンパク質をコードするという仮定、および有意な整列がコードリーディングフラグメントのみに関するという仮定の下で評価する。BlastN2.0 プログラムの結果において高いスコアリングセグメントの対を生じる配列のみを示す。

【0221】

さらに、配列を、標準的な遺伝コードを使用する、(構築された) DNA 配列

の6個のリーディングフレーム全体でDNA配列を翻訳する特許 (p r o p r i e t a r y) ソフトウェアを使用して、オープンリーディングフレーム (O R F) について分析した。相互作用性 E S T を、指向的にクローニングされたライブラリーから入手し、これによって構築された E S T の翻訳の方向は、5' ~ 3' の方向であることがわかる。入手した翻訳中に、フレーム 1 ~ 3 において見出された全ての O R F を分析した。以下を含む O R F ((i) 開始コドンに続く 50 個よりも多いアミノ酸のアミノ酸配列、または (i i) 5' 末端に開始メチオニンを含まない O R F) について、潜在的なタンパク質産物であることを決定し、そして B l a s t P プログラムを使用してタンパク質データベース中の配列に比較した。

【0222】

((i) H P I P 1)

3つの同一のクローン (c g 4 9 3 6 8 . b 1、c g 4 9 3 6 8 . h 1 1、および c g 4 9 4 2 4 . c 1 0) を、本発明における H P S 相互作用体として同定した。619個のヌクレオチドの同定されたプレイ配列 (本明細書中で H P I P 1 と い わ れ る) は、s o a r e s 黒色腫 E S T A A 4 2 5 6 4 (ヌクレオチド 287 で開始する) に 98% 同一であり、そして E S T 3 8 4 1 1 4 (ヌクレオチド 149 で開始する) に 97% 同一であった。しかし、これらの E S T のいずれかの 5' 伸長は、推定 H P I P 1 タンパク質の O R F を変化させないことから、H P I P 1 は、いずれかの方向に伸長されなかった。H P S タンパク質との H P I P 1 の相互作用は、ヌクレオチド 1 で開始する。

【0223】

173個のアミノ酸 (ヌクレオチド 1 ~ 519) のオープンリーディングフレーム (O R F) を、翻訳させ得、そして得られたタンパク質を、H P I P 1 と命名した。H P I P 1 アミノ酸配列との B l a s t P 検索は、D r o s o p h i l a m e l a n o g a s t e r の 1007個のアミノ酸の E G 0 0 0 3 . 5 タンパク質の c 末端 (T R E M B L N E W - A C C E 1 3 3 1 6 5 3) と 62% の類似性を示した。O R F は、メチオニン開始コドンを有さないことから、これは、より長い新規タンパク質の c a H P S o x y 末端部分を示すようである。H P

IP1のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、図1(それぞれ、配列番号1および配列番号2)に示す。

【0224】

((ii)HN1ホモログタンパク質)

729個のヌクレオチドの同定されたプレイ配列(cgHs29500;本明細書中HN1ホモログタンパク質といわれる)は、マウスHN1(Hn1)mRNAに82%同一であった。Tangら、1997、Mammalian Genome 8:695~696を参照のこと。HPSタンパク質とのHN1ホモログタンパク質の相互作用は、ヌクレオチド22で開始する。

【0225】

153個のアミノ酸(ヌクレオチド106~564)のオープンリーディングフレーム(ORF)を翻訳させ得、そして得られたタンパク質を、HN1ホモログと命名した。アミノ酸配列を用いるBlastP検索は、マウスの血液学的および神経学的に発現される配列1(mouse hematological and neurological expressed sequence 1)(HN1、154アミノ酸;SPTREMBL-ACC:P97825;Tangら、1997、Mammalian Genome 8:695~696を参照のこと)に83%の類似性および79%の同一性を示した。従って、このHPSタンパク質相互作用体は、マウスHN1タンパク質のヒトホモログを示す。126位のアミノ酸は、Met(ATG)、Leu(TTG)、Val(GTG)、またはLeu(CTG)であり得る。

【0226】

マウスHn1は、多くの胎児組織および成体組織で発現される。最高レベルの発現は、10日齢の卵黄嚢血液島由来循環赤血球芽細胞(erythroblast)、13日齢の胎児肝臓、成体の骨髄および脾臓を含む造血細胞中に見出される。この発現はまた、17日齢の胎児脳で非常に高く、一方成体の脳における発現は、かなり低い(Tangら、1997、Mammalian Genome 8:695~696を参照のこと)。HN1ホモログタンパク質のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、図2(それぞれ、配列番号3および配列番号4)

に例示される。

【0227】

本発明は、本明細書中に開示される特定の実施形態によって範囲を制限されるべきではない。実際、本明細書中に記載される改変に加えて、本発明の種々の改変は、前述の記載および添付の図面から、関連する分野の当業者に容易に明らかとなる。このような改変は、添付の特許請求の範囲内にあることが意図される。さらに、種々の刊行物が、本明細書中に引用され、そしてそれらの開示は、それらの全体において本明細書によって参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、HP1P1の核酸配列（配列番号1）、およびコードされるアミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図2】

図2は、ヒトHN1ホモログの核酸配列（配列番号3）、およびコードされるアミノ酸配列（配列番号4）を示す。126位を占めるアミノ酸残基は、Met（ATG）、Leu（TTG）、VAL（GTG）、またはLeu（CTG）であり得る。

【図3】

図3は、HPSタンパク質相互作用を実証する酵母ツーハイブリッド系アッセイから得られた結果を示す。ベイト（bait）タンパク質としてHPSタンパク質を利用するアッセイの結果は、上記の列に示される。HPSタンパク質を、フォワード（HPSタンパク質）スクリーニングに使用した。プレイ（prey）タンパク質14-3-3 eta、Hrs、BMK1 キナーゼ、CDK2、核因子NF90、アトロフィン-1、DGS-1、HP1P1、ヒトHN1ホモログ、網膜芽細胞腫、p27（Kip1）、RGL-2およびベクターコントロールは、列の左に示される。示されたベイトタンパクとプレイタンパク質との間の陽性の相互作用は、特定のベイトタンパク質とプレイタンパク質との間の区画を形成する囲いにおける「+」の符号として示され、特定のベイトタンパク質とプレイタンパク質との間の相互作用の欠落は、「-」の符号と命名される。

【図1】

FIGURE 1

1 GGCACGAGACTCAGTATAAATCCAATAACCATTCTTGGTTAATT
 G T R L S I N P N N H S W L I
 46 ATCCAGGCAGATATTTACTTTGCAACGAATCAGTATTCAGCAGCT
 I Q A D I Y F A T N Q Y S A A
 91 CTTCACTATTACCTCCAGGCAGGAGCTGTGTGTTCTGACTTCTTT
 L H Y Y L Q A G A V C S D F F
 136 AACCAAGGCTGTGCCCCCTGATGTTTATACAGACCAGGTAATAAAA
 N K A V P P D V Y T D Q V I K
 181 CGAATGATAAAATGTTGTTCTTTGCTGAATGCCACACACAGGTG
 R M I K C C S L L N C H T Q V
 226 GCTATTTTATGTCAGTTCCTCAGAGAAATGACTACAAAACAGCG
 A I L C Q F L R E I D Y K T A
 271 FTTAAATCTCTGCAAGAACAAAACAGTCATGATGCTATGGACTCC
 F K S L Q E Q N S H D A M D S
 316 TACTACGACTACATATGGGATGTTACCATTTGGGAATACTTGACT
 Y Y D Y I W D V T I L E Y L T
 361 TATCTTCATCATAAAAAGAGGAGAAACAGATAAAAGACAAATGCA
 Y L H H K R G E T D K R Q I A
 406 ATCAAAGCCATCGGCCAGACAGAGTTGAATGCAAGCAATCCAGAA
 I K A I G Q T E L N A S N P E
 451 GAAGTGTACAGCTGGCAGCGCAGAGAAGGAAAAAAAGTTTCTC
 E V L Q L A A Q R R K K K F L
 496 CAAGCAATGGCAAAACTTTACTTTTAAAGCAGTTAAATTTTTTTAA
 Q A M A K L Y F
 541 CTTTTATTTTTTAAACAATGGGCTAAAAATAACAGTATTTAAAG
 586 GGTAAGTTTATATAATACAAAAAATAAAAAA

【図 2】

FIGURE 2

```

1 CTCTGCAGCGGTGGTCGGCTGTTGGGTGTGGAGTTCCAGCGC
46 CCCTCGGGTCCGAC CCTTTGAGCGTCTGCTCCGGCGCCACTACC

91 TCGCTCCTCGGGCC CATGACCACAACCACCACCTTCAAGGGAGTC
MetThrThrThrThrThr PheLysGlyVal

136 GACCCAACAGCAGGAATAGCTCCCGAGTTTGGCGCCTCCAGGT
AspProAsnSerArgAsnSerSerArgValLeuArgProProGly

181 GGTGGATCCAATTTTTCATTAGGTTTGTGATGAACCAACAGAACAA
GlyGlySerAsnPheSerLeuGlyPheAspGluProThrGluGln

226 CCTGTGAGGAAGAA CAAAATGGCCTCTAATATCTTTGGGACACCT
ProValArgLysAsnLysMetAlaSerAsnIlePheGlyThrPro

271 GAAGAAAATCAAGCTTCTTGGGCCAAGTCAGCAGGTGCCAAGTCT
GluGluAsnGlnAlaSerTrpAlaLysSerAlaGlyAlaLysSer

316 AGTGGTGGCAGGGAAGACTTGGAGTCATCTGGACTGCAGAGAAGG
SerGlyGlyArgGluAspLeuGluSerSerGlyLeuGlnArgArg

361 AACTCCTCTGAAGCAAGCTCCGGAGACTTCTTAGATCTGAAGGGA
AsnSerSerGluAlaSerSerGlyAspPheLeuAspLeuLysGly

406 GAAGGTGATATTCATGAAAATGTGGACACAGACTTGCCAGGCAGC
GluGlyAspIleHisGluAsnValAspThrAspLeuProGlySer

451 CTGGGGCAGAGTGAAGAGAAGCCCGTGCCTNTGCCCTGTGCCCA
LeuGlyGlnSerGluGluLysProValProXaaArgLeuCysPro

496 GCCCCGTGCCCGGCCAGTGCCATCCAGAAGAAAATCCCCTGGC
AlaArgCysProGlyProSerAlaIleGlnLysLysSerProGly

541 GGC AAGTCCAGCCTCGTCTTGGGTTAGCTCTGACTGTCTCTGAACG
GlyLysSerSerLeuValLeuGly

586 CTGTCGTTCTGTCTGTTTCTCCATGCTTGTGAACTGCACAACCTT
631 GAGCCTGACTGTACATCTCTTGGATTTGTTTCATTAAGAAAGAGC
676 ACTTTANGTAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
721 AAAAAACAA

```

【図3】

	HPS フォワード	HPS リバース
14-3-3 eta	-	+
Hrs	-	+
BMK1 α	-	+
CDK2	-	+
核因子 NF90	-	+
アトロフィン-I	-	+
DGS-I	-	+
HPIP-1 (cg49368.b1, cg49367.h11, cg49424.c10)	+	-
HN1 ホモログ (cgHs2950_0)	+	-
網膜芽細胞腫	-	-
p27(Kip1)	-	-
RGL-2	-	-
ベクターコントロール	-	-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/06518

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	OH J. ET AL.: "The Hermansky-Pudlak syndrome (HPS) protein is part of a high molecular weight complex involved in biogenesis of early melanosomes" HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 9, no. 3, 12 February 2000 (2000-02-12), pages 375-385, XP000929687	16,17,31
P,A	figure 1	1-15,18, 28-30,32
A	SWANK R.T. ET AL.: "Mouse Models of Hermansky Pudlak Syndrome: A Review" PIGMENT CELL RESEARCH, vol. 11, no. 2, April 1998 (1998-04), pages 60-80, XP000925811 the whole document	1-18, 28-32
A	NCI-CGAP: "National Cancer Institute, Cancer Genome Anatomy Project (CGAP), Tumor Gene Index http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap/ qc80d09.xl Soares_placenta_8to9weeks_2NbHP8to9W Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1715921 3', mRNA sequence" EMBL DATABASE ENTRY AI151537; ACCESSION NO. AI151537, 1 October 1998 (1998-10-01), XP002146019	19-27
P,A	SUGANO S. ET AL.: "Homo sapiens cDNA FLJ20530 fis, clone KAT10776" EMBL DATABASE ENTRY AK000537; ACCESSION NO. AK000537, 22 February 2000 (2000-02-22), XP002146020	19-27
P,A	DE 198 18 619 A (METAGEN GES. FÜR GENOMFORSCHUNG) 28 October 1999 (1999-10-28) SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:63	19-27
A	WO 98 46757 A (GENETICS INST) 22 October 1998 (1998-10-22) SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:12	19-27

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 32 (incomplete)

Present claim 32 relates to a method of treating or preventing a disease or disorder involving an extremely large number of possible molecules that modulate the function of a defined HSP containing complex. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of said molecules. In the present case, the claim so lacks support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claim which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to said molecules as defined on page 3, lines 19 to 25; page 5, line 13 to page 6, line 10; page 16, line 19 to page 17, line 3; page 36, lines 17 to 23; page 27, lines 25 to 27; page 38, lines 2 to 21; page 39, line 10 to page 40, line 2 and page 39, lines 8 to 14.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/06518

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19818619 A	28-10-1999	WO 9954447 A	28-10-1999
WO 9846757 A	22-10-1998	AU 7142498 A	11-11-1998
		EP 0977851 A	09-02-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 P	7/00	A 6 1 P	7/04	4 B 0 6 5
	7/02		9/04	4 C 0 8 4
	7/04		9/10	4 C 0 8 5
	9/04		11/00	4 H 0 4 5
	9/10		17/00	
	11/00		25/00	
	17/00	C 0 7 K	14/47	
	25/00		16/18	
C 0 7 K	14/47		19/00	
	16/18	C 1 2 N	1/15	
	19/00		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19		9/12	
	1/21	C 1 2 P	21/02	C
	5/10	C 1 2 Q	1/02	
	9/12	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 P	21/02		33/50	Z
C 1 2 Q	1/02		33/53	D
G 0 1 N	33/15			M
	33/50		33/566	
	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
			5/00	A
	33/566	A 6 1 K	37/02	
(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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, 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, 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 AA25 AA40 CB01 DA12 DA13
DA14 DA36 DA77 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA10 BA63 CA04
DA12 EA04 GA11 HA01 HA17
4B050 CC03 DD11 LL01
4B063 QA01 QQ03 QQ43 QR32 QR48
QR55 QS02 QS34
4B064 AG01 CA06 CC24 DA01 DA13
4B065 AA72X AA93Y AB01 AC14
BA02 CA24 CA29 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01
BA02 BA22 BA23 CA17 CA53
CA56 DB01 NA14 ZA01 ZA38
ZA40 ZA51 ZA53 ZA54 ZA59
ZA89 ZC54
4C085 AA13 AA14 BB11 DD01 DD62
DD63 EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
BA41 CA40 CA45 DA01 FA74

专利名称(译)	Hermansky-Padlak综合征蛋白质相互作用蛋白质及其使用方法		
公开(公告)号	JP2003523723A	公开(公告)日	2003-08-12
申请号	JP2000603356	申请日	2000-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	CURAGEN CORP		
申请(专利权)人(译)	Kyurajen公司		
[标]发明人	ナンダバランキリシュナン ヤンメイジャ		
发明人	ナンダバラン, キリシュナン ヤン, メイジャ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P9/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P17/00 A61P25/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/12 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P11/00 A61P17/00 A61P25/00 C07K14/47 C07K23/19/00 C12N9/1205 G01N33/6893 G01N2800/207 G01N2800/52		
FI分类号	A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P9/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P17/00 A61P25/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/12 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA17 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B063/QA01 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS02 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/CA06 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA72X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA29 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA17 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/DB01 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA38 4C084/ZA40 4C084/ZA51 4C084/ZA53 4C084/ZA54 4C084/ZA59 4C084/ZA89 4C084/ZC54 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD01 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/CA45 4H045/DA01 4H045/FA74		
优先权	09/266225 1999-03-10 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了包含HPS多肽和HPS相互作用多肽 (HPSIP) 的多肽复合物。HPSIP多肽包括14-3-3蛋白, Hrs, atrophin-1, DGS-1, 核因子NF90, HPIP1和人HN1同源蛋白。还公开了编码HPIP1和人HN1同源蛋白的核酸, 及其衍生物, 片段和类似物。用于治疗和/或预防某些疾病和病症, 尤其是特异性疾病, 自身免疫性疾病, 神经退行性疾病, 癌症, 色素沉着障碍, 血小板功能障碍和病毒性疾病的复合物或蛋白质。还公开了筛选方法。

	HPS フォワード	HPS リバース
14-3-3 eta	.	+
Hrs	.	+
BMK1 α	.	+
CDK2	.	+
核因子 NF90	.	+
アトロフィン-1	.	+
DGS-I	.	+
HPIP-1 (cg49368.b1, cg49367.h11, cg49424.c10)	+	.
HN1 ホモログ (cgHs2950_0)	+	.
網膜芽細胞腫	.	.
p27(Kip1)	.	.
RGL-2	.	.
ベクターコントロール	.	.