

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-533985

(P2004-533985A)

(43) 公表日 平成16年11月11日(2004.11.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/46	A 6 1 K 37/54	4 B 0 5 0
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 3/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-507996 (P2002-507996)	(71) 出願人	597013168
(86) (22) 出願日	平成13年6月25日 (2001. 6. 25)		ユニバーシティ カレッジ ロンドン
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月26日 (2002. 12. 26)		イギリス国, ロンドン, ガワー、ストリート (番地なし)
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/002803	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開番号	W02002/002756		弁理士 志賀 正武
(87) 国際公開日	平成14年1月10日 (2002. 1. 10)	(74) 代理人	100108578
(31) 優先権主張番号	0015986.3		弁理士 高橋 詔男
(32) 優先日	平成12年6月29日 (2000. 6. 29)	(74) 代理人	100089037
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 渡邊 隆
		(74) 代理人	100101465
			弁理士 青山 正和
		(74) 代理人	100094400
			弁理士 鈴木 三義

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アテローム性動脈硬化症の治療または診断のためのグリコシルホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼDタンパク質

(57) 【要約】

本発明は、アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態の予防および治療のための GPI - PLD 使用に関する。ある種の実施形態では、このプロセスは、例えば 1 型糖尿病などの GPI - PLD の生成不全、あるいはアポリポタンパク質 A 1 が欠乏している患者、あるいは GPI - PL または Apo - A 1 に対する自己抗体をもつ患者など、GPI - PLD の送達不全によって引き起こされていてもよい。他の実施形態では、アテローム硬化プロセスは、例えば、その活性に影響を与えるあるいは標的組織への送達に影響を与える GPI - PLD の遺伝的改変が存在し、それによってアテローム硬化プロセスがもたらされるというような、GPI - PLD 活性の喪失に起因していてもよい。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態の治療用の医薬品を調製するための、G P I - P L Dの使用。

【請求項 2】

アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態の治療用の医薬品を調製するための、G P I - P L Dをコードする核酸分子の使用。

【請求項 3】

アテローム性動脈硬化症がG P I - P L Dの生成不全、G P I - P L Dの送達不全によって、あるいはG P I - P L DまたはA p o - A 1に対する自己抗体の存在によって引き起こされる、請求項 1 または 2 に記載の使用。 10

【請求項 4】

アテローム性動脈硬化症が自己免疫状態の結果である、請求項 1 または 2 に記載の使用。

【請求項 5】

アテローム性動脈硬化症がG P I - P L D活性の喪失に起因する、請求項 1 または 2 に記載の使用。

【請求項 6】

アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態の治療用の医薬品の調製における、G P I - P L Dを発現および分泌する能力がある宿主細胞の使用。

【請求項 7】

前記状態が、1型糖尿病、A p o A 1欠乏を特徴とする状態、冠動脈疾患(C A D)などの心血管障害、全身性エリテマトーデス(S L E)、またはシェーグレン症候群である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の使用。 20

【請求項 8】

アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態の治療用のG P I - P L Dを含む組成物を含むキット。

【請求項 9】

アテローム性動脈硬化症の特徴があるか、あるいは発症する恐れのある患者を診断する方法であって、この患者から得たサンプル中のG P I - P L Dの量および/またはG P I - P L D活性を決定することを含む方法。 30

【請求項 10】

(a) G P I - P L Dに特異的な結合部位をもつ結合剤を固定化した固体支持体に、患者から得たサンプルを接触させる工程、(b) 結合剤に結合しているG P I - P L Dの量またはG P I - P L Dの活性を決定する工程を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

方法が、工程(b)で得られた値を、対照被験者から得られた測定値と相関させて、患者が前記状態を有している、あるいはそれを発症する危険があるか決定する工程(c)をさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

その状態が1型糖尿病、A p o A 1欠乏を特徴とする状態、冠動脈疾患(C A D)などの心血管障害、全身性エリテマトーデス(S L E)、またはシェーグレン症候群である、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の方法。 40

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、グリコシルホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼD(G P I - P L D)タンパク質の使用、詳細には、アテローム性動脈硬化症の進行によって特徴付けられる状態の治療または診断のためのG P I - P L Dの使用に関する。

【0002】**【従来技術】**

多数の細胞表面タンパク質が、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーとの共有結合によって細胞膜に付着していることが、研究により示されてきた。酵素 GPI-PLD は、グリコシルホスファチジルイノシトールがホスファチジン酸と結合しているホスホジエステル結合を切断し、それによって、固着したタンパク質を遊離させることが示されている。

【0003】

GPI-PLD タンパク質は、ウシおよびヒト血清中に豊富である。これは、膵臓のランゲルハンス細胞およびマスト細胞によって最初に合成され、循環に放出され、アポリポタンパク質 A1 (ApoA1) との複合体の形で標的組織に運ばれると考えられている (Hoenerら、1993年)。GPI-PLD 酵素は、グリコシルホスファチジルイノシトール (多数の細胞表面タンパク質が、これによって細胞膜に接着付着している) を加水分解する能力がある。GPI-PLD は、ジアシルグリセロールを産生するホスホリパーゼ C 活性と対照的に、ホスホジエステル結合を切断してホスファチジン酸を遊離する。

10

【0004】

さらに提案された GPI-PLD の機能は、成長因子またはホルモンがその受容体に結合するのに応答して、原形質膜内の「遊離の」 GPI を切断することによって、イノシトールホスホグリカンを生産することである (Rademacherら、1994年)。GPI-PLD のこの役割は、好塩基球中で実証されており、ここでは、これらの細胞の IgE 依存性活性化により、ヒスタミン、すなわち炎症反応のメディエータなどの物質を含めた細胞顆粒の内容物が放出される。ヒスタミンは、抗原の存在下で放出されるが、この放出は、IPG の添加によって模倣することができ、抗 GPI-PLD 抗体の添加によってブロックされる (Linら、1991年)。

20

【0005】

米国特許第 5,418,147 号 (Huangら) は、ウシの肝臓からの GPI-PLD の精製、およびウシの肝臓、ヒトの肝臓、およびそれに続くヒトの膵臓 cDNA ライブラリからの 3 種の GPI-PLD 酵素のクローニングを記載している。この特許は、ヒトおよびウシの肝臓からの GPI-PLD の全長 cDNA およびアミノ酸配列、ならびにこの酵素のヒトの膵臓型の部分 cDNA およびアミノ酸配列を報告している。その後、GPI-PLD の膵臓型の全長配列が、Tsangら (1992年) で報告されており、この酵素は、胸、目、脾臓、および扁桃腺からの cDNA ライブラリ中に発見されている。これらの 3 型の酵素は、高度に相同であり、ウシの肝臓 GPI-PLD の予想される成熟タンパク質の配列は、ヒトの肝臓の酵素との配列同一性が 82% であり、ヒトの膵臓の酵素と配列同一性が 81% である。GPI-PLD のヒトの肝臓および膵臓型のアミノ酸配列は、受託番号 L11701 および L11702 で GenBank に寄託されており、それぞれ 841 個および 840 個のアミノ酸からなる。GPI-PLD のヒトの肝臓型と膵臓型は、配列同一性が 94.6% である。さらに、GPI-PLD の構造は、Scallionら、1991年に考察されている。

30

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、GPI-PLD 酵素のクローニングおよびこの酵素の生化学的特性に関する研究にもかかわらず、*in vivo* での酵素の役割あるいは可能なあらゆる医療使用 (medical use) のうちの多くは、未知のままである。

40

【0007】

O'Brienら (1999年) は、マクロファージによる GPI-PLD の発現を述べ、GPI-PLD の発現の増加が、アテローム性動脈硬化症における炎症および病原を引き起こすことに関与することを示唆している。

【0008】

【課題を解決するための手段】

概して、本発明は、アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態の予防および治療のための GPI-PLD の使用に関する。ある種の実施形態では、このプロセスは、例えば 1 型糖

50

尿病など、G P I - P L Dの生成不全によって引き起こされていてもよく、アポリポタンパク質 A 1 が欠乏した患者、または G P I - P L D または A p o - A 1 に対する自己抗体をもつ患者など、G P I - P L Dの送達不全によって引き起こされていてもよい。他の実施形態では、アテローム硬化プロセスは、G P I - P L D活性の喪失、例えば、その活性または標的組織への送達に影響し、それによりアテローム硬化プロセスがもたらされる、G P I - P L Dの遺伝的改変が存在することに起因してもよい。したがって、O ' B r i e n ら (1 9 9 9 年) とは対照的に、本発明は、G P I - P L Dを投与することによって、アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態を治療することを提案する。

【 0 0 0 9 】

アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態の例には、1型糖尿病、A p o A 1の欠乏の特徴がある状態、冠状動脈疾患 (C A D) などの心血管障害、全身性エリテマトーデス (S L E) 、およびシェーグレン症候群がある。

10

【 0 0 1 0 】

したがって、第一の態様では、本発明は、アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態の治療用の医薬品の調製のための G P I - P L Dの使用を提供する。

【 0 0 1 1 】

他の態様では、本発明は、アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態の治療用の医薬品の調製のための G P I - P L Dをコードする核酸分子の使用を提供する。

【 0 0 1 2 】

他の態様では、本発明は、アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態の治療のための医薬品の調製における、G P I - P L Dを発現および分泌する能力がある宿主細胞の使用を提供する。

20

【 0 0 1 3 】

一実施形態では、宿主細胞は、宿主細胞によって生成された G P I - P L D が、患者の免疫系による拒絶が妨げられながら、患者に分泌されるように、例えば生体適合性ポリマー中に封入される。生体適合性ポリマーに細胞を封入するための方法は、W O 9 3 / 1 6 6 8 7 および W O 9 6 / 3 1 1 9 9 に記載されている。

【 0 0 1 4 】

さらに他の態様では、本発明は、アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態の治療のための G P I - P L Dを含む組成物を含むキットを提供する。G P I - P L Dを含む組成物は、単独で、あるいは同時投与あるいは逐次投与用の、アテローム性動脈硬化症の治療のための他の医薬品と組み合わせて投与してもよい。

30

【 0 0 1 5 】

他の態様では、本発明は、アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態である、あるいは発生の危険がある患者を診断する方法であって、この患者から得られたサンプル中の G P I - P L Dの量および/または G P I - P L D活性を決定することを含む方法を提供する。

【 0 0 1 6 】

一実施形態では、本発明は、アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態である、あるいは発症する危険性がある患者を診断する方法であって、(a) この患者から得られたサンプルを、G P I - P L Dに特異的な結合部位をもつ結合剤を固定した固形支持体と接触させる工程と、(b) この結合剤に結合している G P I - P L Dの量または G P I - P L Dの活性を決定する工程を含む方法を提供する。

40

【 0 0 1 7 】

この方法は、工程 (b) で得られた値を、対照被験者から得られた測定値と相関させて、患者が前記状態を有しているか、あるいはそれを発する危険性があるかを決定する追加の工程 (c) を含んでもよい。

【 0 0 1 8 】

本発明のこれらの態様、および他の態様を、以下により詳細に説明する。本発明の実施形態を、実施例を介して、添付の図面に関して説明する。

【 0 0 1 9 】

50

【発明の実施の形態】

G P I - P L Dタンパク質

用語「G P I - P L Dの生物活性」は、本明細書では、例えばG P Iに固着したタンパク質の遊離など、ホスホジエステル結合の切断によってグリコシルホスファチジルイノシトールからホスファチジン酸を遊離するG P I - P L D酵素活性と定義される。H e l l e rら(1994年)に記載されるように、この活性は、全長G P I - P L DのN末端39kD部分に局在している。

【0020】

本明細書で述べたG P I - P L Dの医療使用は、H u a n gらによって開示された、また、P C T / G B 9 9 / 0 4 3 9 9に開示されたG P I - P L D変異体(v a r i a n t)を使用することができる。当分野の技術者であれば、医薬品用に、こうしたタンパク質、またはそれらの断片、活性な部分、変異体、およびアレル(a l l e l e)を大量に生成するために、本明細書で述べた技術、および当技術分野でよく知られた他の技術を使用することができる。

10

【0021】

こうした従来技術の配列のアミノ酸配列変異体またはアレルであるG P I - P L Dタンパク質も、本発明において使用できる。変異体またはアレルであるポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸の付加、置換、欠失、および挿入のうちの一つまたは複数によって与えられるものとは異なるアミノ酸配列を有していてもよい。ある種の実施形態では、このポリペプチドは、上で定義した通りのG P I - P L D酵素機能をもつ。他の実施形態では、G P I - P L Dは酵素として不活性、例えばI P Gを遊離する活性をもたず、しかも、異常な、または調節障害のあるG P I - P L Dと競合することによって、アテローム性動脈硬化症をもたらす恐れのある異常なG P I - P L Dの活性を下方制御することができる。

20

【0022】

図1に示したアミノ酸配列のアミノ酸配列変異体またはアレルであるG P I - P L Dタンパク質は、図1に示されたアミノ酸配列との配列同一性が約70%超、約80%超、約90%超、約95%超、約97%超、約98%超、または約99%であるアミノ酸配列を含むことができる。配列比較および同一性の計算は、Clusterプログラム(Thompsonら、1994年)を用いて、次のパラメータ(Pairwise Alignment Parameters: Weight Matrix: pam series, Gap Open Penalty: 10.00, Gap Extension Penalty: 0.10)を使用することができる。あるいは、Genetics Computer Group, Oxford Molecular Group, Madison, Wisconsin, USA, Version 9.1から入手できるGCGプログラムを用いることができる。特定のアミノ酸配列変異体は、1アミノ酸、2、3、4個、5~10個、10~20個、20~30個、30~50個、50~100個、100~150個、あるいは150個以上のアミノ酸の挿入、付加、置換、または欠失により、図1に示されているものと異なってもよい。

30

【0023】

一実施形態では、本発明の変異体G P I - P L Dポリペプチドは、その成熟配列の689~692番目のアミノ酸のリン酸化部位、すなわちアミノ酸モチーフR R F S内で、ヒトG P I - P L Dと比較して、アミノ酸配列が異なる。用語「変異体G P I - P L Dポリペプチド」は、とりわけ、1つまたは複数のアミノ酸の欠失、置換および/または挿入によってこの領域内で改変されたポリペプチドを含むものとする。こうした配列の相違は、例えば、このポリペプチドをコードする核酸の操作によって、あるいはこのポリペプチド自体が変化することによって、あるいは変異体タンパク質の新規合成によって、親G P I - P L Dポリペプチド、すなわち野生型のG P I - P L Dポリペプチドあるいは1つまたは複数の他の改変を含むG P I - P L Dポリペプチドの、G P I - P L Dアミノ酸配列が変わる結果であり得る。好ましい実施形態では、G P I - P L Dは、例えば、機能的N末端

40

50

ドメインを含むことによって、少なくとも部分的に、その生物活性の1つを保持する。

【0024】

欠失は、この領域内の1、2、3個のアミノ酸、あるいは4個すべてのアミノ酸の欠失の形をとり得る。ある種の実施形態では、欠失は、GPI-PLD分子のより大きな部分を包含する、より大きな欠失の一部であってもよい。好ましい実施形態では、変異体GPI-PLDポリペプチドは、689~692(両端を含む)残基を含む欠失によって、ヒト野生型GPI-PLDのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列をもつ。

【0025】

挿入は、RRFSモチーフ内のアミノ酸の間に、それを中断するように挿入された、1、2、3、4、または5個、あるいはそれ以上の追加のアミノ酸の形をとり得る。

10

【0026】

置換は、野生型ヒトGPI-PLDの689~692アミノ酸に相当する領域内の1、2、3個のアミノ酸、または4個すべてのアミノ酸の置換の形をとり得る。この領域内の置換は、GPI-PLDポリペプチドの他の部分を含む、より広範囲な一連の置換の一部であってもよい。特に、実際に使用される可能性のあるGPI-PLDの突然変異形は、野生型の配列とは異なる。これらの突然変異体のいくつかは、下に述べる実験で使用する。

【0027】

こうした配列の相違は、例えば、このポリペプチドをコードする核酸の操作によって、あるいはこのポリペプチド自体が変化することによって、あるいは変異体タンパク質の新規合成によって、親GPI-PLDポリペプチド、すなわち野生型のGPI-PLDポリペプチドあるいは1つまたは複数の他の改変を含むGPI-PLDポリペプチドの、GPI-PLDアミノ酸配列が変わる結果であり得る。好ましい実施形態では、GPI-PLDは、例えば、機能的N末端ドメインの存在によって、少なくとも部分的に、その生物活性の1つを保持する。

20

【0028】

本発明で使用するためのGPI-PLD変異体は、ホスホジエステル結合の切断によって、グリコシルホスファチジルイノシトールからホスファチジン酸を遊離する、GPI-PLD酵素活性を保持することが好ましい。

【0029】

他の実施形態では、GPI-PLDは、正常でないまたは異常調節されたGPI-PLDの異常活性がこの状態の原因因子であるようなアテローム性動脈硬化症を治療するために使用され得る、酵素として非活性な変異体であってもよい。この場合、この酵素として非活性な変異体は、例えばそのApo-A1担体からの正常でないまたは異常調節されたGPI-PLDと競合するあるいは置き換わり、それによってGPI-PLD活性を下方制御する効果をもつ。こうした拮抗的なアンタゴニストの設計および合成は、本出願で提供するGPI-PLDについての情報を用いて容易に実施できる。

30

【0030】

本発明はまた、アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態の予防または治療用の医薬品の調製のためのGPI-PLDタンパク質の活性な部分およびフラグメントの使用も含む。

【0031】

GPI-PLDタンパク質の「活性な部分」は、前記の全長GPI-PLDタンパク質より短い、少なくともその基本的酵素活性、例えば、上で言及した、酵素のN末端39kD部分に位置することが知られている酵素活性を保持しているポリペプチドである。例えば、GPI-PLDタンパク質の一部は、他のタンパク質と相互作用することによって、封鎖剤(sequester)または拮抗的なアンタゴニストとして働く。通常、活性な部分は、例えば、図1に示される配列からの1つまたは複数のモチーフから選択されるアミノ酸など、少なくとも約300個のGPI-PLDのアミノ酸、より好ましくは少なくとも500個のGPI-PLDのアミノ酸、よりいっそう好ましくは少なくとも700個のGPI-PLDのアミノ酸を含む。

40

【0032】

50

GPI-PLDタンパク質の「フラグメント」は、少なくとも約5～7個の連続するアミノ酸、しばしば少なくとも約7～9個の連続するアミノ酸、通常少なくとも約9～13個の連続するアミノ酸、より好ましくは少なくとも約20～30個以上の連続するアミノ酸、より好ましくは40個より多いアミノ酸、より好ましくは100個より多いアミノ酸のアミノ酸残基のひと続きを意味する。

【0033】

本発明によるアテローム硬化状態の予防または治療用の医薬品の調製において使用するためのポリペプチドは、例えば、それをコードする核酸（以下を参照のこと）からの発現によって生成された後に、（例えば、抗体を用いて）単離および/または精製してもよい。本発明によるポリペプチドは、化学合成によって、完全にまたは部分的に作成することもできる。

10

【0034】

GPI-PLDポリペプチドは、例えばエフェクター分子、標識、薬物、毒素および/または担体、あるいは輸送分子などの結合相手と連結することもできる。本発明のペプチドを、ペプチジルおよび非ペプチジル結合相手のどちらとも結合させるための技術は、当技術分野でよく知られている。一実施形態では、（例えば、「Penetratin」という名前で販売されている）担体分子は、アンテナペディア（Antennapedia）のホメオドメインから得られた16aaペプチド配列であり、これは、末端Cys残基を介してペプチドと結合することができる。「Penetratin」分子およびその性質は、WO91/18981に記載されている。

20

【0035】

GPI-PLD核酸

「GPI-PLD核酸」には、GPI-PLD活性をもつポリペプチドをコードするヌクレオチド配列をもつ核酸分子が含まれる。ヒトおよびウシのGPI-PLD酵素の適当な全長配列は、例えば、Huangらによって、Tsangら（1992）によって、また、PCT/GB99/04399中で提供されている。これらの形のGPI-PLDは、ヒト第6染色体に位置しており、95.95および99.71位置で、D6S1660～D6S1558の4センチモルガン領域（NCBI GeneMap'98）に含まれる。この遺伝子は、6p22.3に相当する細胞発生（cytogenic）領域に始まり、6p21.3に伸長する。この領域はまた、IDD1およびHLA遺伝子座（HLA遺伝子は、隣接するD6S1558～D6S1616間に位置しているが）も含んでいる。マウスGPI-PLD遺伝子もまた、ヒトでは第6染色体上にみられるfim1位置の近くの第13染色体に位置している。

30

【0036】

GPI-PLDコード配列は、上で述べた、発表された配列の1つ、または相補的な核酸配列であってもよく、あるいは、こうした配列の1つの突然変異体、変異体、誘導体、またはアレルであってもよい。この配列は、示された配列のうちの1つまたは複数のヌクレオチドの、付加、挿入、欠失、および置換のうちの1つまたは複数である変化によって示されたものと異なってもよい。ヌクレオチド配列に対する変化は、タンパク質レベルでのアミノ酸変化、すなわち遺伝コードによって決定されるものではない変化をもたらしてもよい。

40

【0037】

コードされたポリペプチドは、発表されたGPI-PLDアミノ酸配列の1つと、1つまたは複数のアミノ酸だけ異なるアミノ酸配列を含んでいてもよい。本発明では、さらに、知られているGPI-PLDアミノ酸配列突然変異体、変異体、またはアレルであるポリペプチドをコードする核酸の使用を想定している。こうしたポリペプチドは、以下に明らかにしている。こうしたポリペプチドをコードする核酸は、上に述べた通りのGPI-PLDタンパク質に対する発表されたコード配列と、約70%超の同一性、約80%超の同一性、約90%超の同一性、約95%超の同一性、約98%超の同一性、あるいは約99%超の同一性を示してもよい。

50

【0038】

本発明はまた、好ましくは少なくとも長さ12、15、30、45、60、120、または240ヌクレオチドのフラグメントである、GPI-PLD核酸配列のフラグメントの使用も含む。

【0039】

一般に、本発明による使用のための核酸は、単離および/または精製された形の、あるいは、例えば、発現のためのおそらく1つまたは複数の制御配列以外は、ヒトゲノム中のその遺伝子に隣接する核酸がないか、または実質上ないものなど、天然では結合している物質がないか、または実質上ない単離物として提供される。核酸は、完全にまたは部分的に合成でもよく、ゲノムDNA、cDNA、またはRNAを含んでもよい。本発明による核酸がRNAを含む場合、示された配列に対する言及は、Tの代わりにUを含むRNA等価物に対する言及と解釈されるべきである。

10

【0040】

GPI-PLD遺伝子および/またはその調節エレメントのすべてまたは一部をコードする核酸配列は、本明細書に含まれる情報および参考文献、ならびに当技術分野で知られた技術を用いて、当分野の技術者によって容易に調製することができる。例えば、Sambrookら、1989年、およびAusubelら、1992年を参照のこと。これらの技術には、(i)例えばゲノム源(genomic source)などからこうした核酸のサンプルを増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の使用、(ii)化学合成、あるいは(iii)E.coli中での増幅が含まれる。改変されたGPI-PLDタンパク質の発現を提供するために、例えば部位特異的変異変異(site directed mutagenesis)を用いて、あるいはこの核酸を発現するために使用した宿主細胞中のコドン選択(codon preference)を考慮して、GPI-PLD配列に対する改変を行うことができる。

20

【0041】

GPI-PLD核酸配列の発現を得ることを目的として、その発現を制御するために、GPI-PLD核酸に作動可能に連結した制御配列を有するベクター中に、その核酸配列を組み込むことができる。発現システムの使用により、技術的工夫が進歩してきた。ベクターは、例えばプロモーターやエンハンサーなどの、挿入された核酸の発現させるための他の配列、GPI-PLDタンパク質が融合体として生成されるような核酸配列、および/または宿主細胞中で生成されたポリペプチドが、この細胞から分泌されるような、分泌シグナルをコードする核酸を含んでもよい。その後、ベクターを、このベクターが機能的であるような宿主細胞中で形質転換させし、宿主細胞をGPI-PLDタンパク質が生成されるように培養し、宿主細胞または周囲の培地からGPI-PLDタンパク質を回収することによって、GPI-PLDタンパク質を得ることができる。当技術分野のこの目的のためには、E.coli株、酵母、COSまたはCHO細胞などの真核細胞を含めて、原核細胞および真核細胞が使用できる。宿主細胞を選択することにより、これらの細胞中に発現するGPI-PLDタンパク質の性質を制御する、例えば、宿主細胞中でポリペプチドが蓄積する場所を制御する、あるいはその糖鎖形成およびリン酸化などの性質に影響を与えることができる。

30

40

【0042】

核酸の増幅のためのPCR技術は、米国特許第4,683,195号に記載されている。一般に、こうした技術では、フォワード(forward)およびリバース(reverse)オリゴヌクレオチドプライマーを、増幅のための標的であるポリヌクレオチド配列と同一であるまたは類似であるように設計するために、標的配列の両端の配列情報が分かっている必要がある。PCRは、鋳型核酸の変性(二重鎖の場合)、標的へのプライマーのアニールング、および重合の工程を含む。増幅反応においてプローブとして、または鋳型として使用される核酸は、ゲノムDNA、cDNA、またはRNAであり得る。PCRを使用して、ゲノムDNAからの特異的配列、mRNAから転写された特異的RNA配列およびcDNA、バクテリオファージ、またはプラスミド配列を増幅することができる。

50

発表された GPI-PLD タンパク質核酸配列により、当分野の技術者であれば、容易に PCR プライマーを設計できるであろう。PCR 技術の一般使用のための参考文献には、Mullisら、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263, 1987、Ehrlich (編)、PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989、Ehrlichら、Science, 252: 1643-1650, 1991、「PCR protocols; A Guide to Methods and Applications」、Eds. Innisら、Academic Press, New York, 1990がある。

【0043】

本発明による使用のための核酸は、図に示した核酸配列の1種または複数のフラグメント、特に、コドン使用または統計分析に基づいたとき比較的珍しい配列のフラグメントとハイブリダイズするように設計された1種または複数のオリゴヌクレオチドプローブあるいはプライマーを用いて得ることができる。上の図に示した核酸配列のフラグメントとハイブリダイズするように設計されたプライマーは、標的核酸をクローニングするクローニングベクター中の配列にハイブリダイズするように設計された1種または複数のオリゴヌクレオチドと組み合わせて使用してもよく、ライブラリ中のcDNAが、オリゴヌクレオチドリンカーに結合し、図に示したGPI-PLD核酸配列とハイブリダイズするプライマーおよびオリゴヌクレオチドリンカーにハイブリダイズするプライマーを用いて、PCRが実施される、いわゆる「RACE」(cDNA末端の急速増幅)において使用してもよい。

10

20

【0044】

こうしたプローブは、試験対象となる個体から得られたサンプルからの標的配列とハイブリダイズするので、こうしたオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマー、ならびに全長配列(および突然変異体、アレル、変異体、および誘導体)もまた、核酸を含む試験サンプルを、GPI-PLDタンパク質のアレル、突然変異体、および変異体の存在についてスクリーニングするのに有用である。ハイブリダイゼーションの条件を制御して、非特異的な結合を最小限にすることができるが、好ましくはストリンジェントないし中度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が好ましい。当分野の技術者であれば、こうしたプローブを容易に設計し、これを標識し、Sambrookら(1989年)およびAusubelら(1992年)などのテキストを参考として、ハイブリダイゼーション反応のための適当な条件を工夫することができるであろう。

30

【0045】

「ストリンジェントな条件」の例は、次のようなものである:(1)洗浄には低イオン強度、高温を使用する、例えば0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを50 で使用する、(2)ハイブリダイゼーション中、ホルムアミドなどの変性剤、例えば42 で、0.1%BSA+50%(v/v)ホルムアミド/0.1%Ficoll/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)を、750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムとともに使用する、あるいは(3)50%ホルムアミド、5xSSC(0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH 6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5xデンハート溶液、超音波処理したサケ精子DNA(50mg/ml)、0.1%SDS、および10%デキストラン硫酸を、42 で使用し、0.2xSSC、55 の50%ホルムアミド中の洗浄液を42 で使用し、続いて、55 の、EDTAを含有する0.1xSSCからなる高度にストリンジェントな洗浄液を使用する。これらのハイブリダイゼーション条件は、GPI-PLD核酸配列とハイブリダイズする核酸配列を定める状況で使用してもよい。

40

【0046】

GPI-PLD核酸の使用

GPI-PLD核酸配列は、GPI-PLDを発現する能力をもつ細胞系の調製において使用することができ、かつ、発現ベクター中に含めるかそうでなければ、例えば、遺伝子

50

治療技術における使用するために処方することができる。

【0047】

したがって、本発明は、GPI-PLDをコードする核酸を用いて形質転換され、GPI-PLDを発現および分泌する能力がある、患者に移植するための細胞株を提供する。一実施形態では、細胞株によって生成されたGPI-PLDが、宿主の免疫系による拒絶が妨げられながら患者に分泌されるように、これらの細胞株を例えば生体適合性ポリマー中に封入することができる。細胞を生体適合性ポリマー中に封入するための方法は、WO93/16687およびWO96/31199に記載されている。

【0048】

他の代替法として、GPI-PLDタンパク質をコードする核酸を、遺伝子療法において使用するこ 10
によって、野生型GPI-PLDタンパク質によってもたらされる作用を提供し、また標的細胞における糖尿病の発生を抑制して、活性なポリペプチドを合成することができない、あるいは活性なポリペプチドを正常レベルで合成することができない患者を治療することができる。

【0049】

ウイルスベクターなどのベクターは、遺伝子を様々な異なる標的細胞に導入するために、従来 20
の技術で使用されてきた。通常、これらのベクターは、所望のポリペプチド発現からの有用な治療または予防効果を提供するために、十分な割合の細胞に形質移入が起こるように、標的細胞に曝される。形質移入された核酸は、標的となる腫瘍細胞のそれぞれのゲノムに永続的に組み込むことができ、長期持続的効果を提供する、あるいは、この治療を周期的に繰り返してもよい。

【0050】

様々なベクター、ウイルスベクターとプラスミドベクターの両方が、当技術分野で知られており、米国特許第5,252,479号およびWO93/07282を参照されたい。具体的には、遺伝子導入ベクターとして、SV40などのパポバウイルス、ワクシニアウイルス、HSVおよびEBVを含めたヘルペスウイルス、ならびにレトロウイルスを含めて、多くのウイルスが使用されている。従来 30
の技術の多くの遺伝子治療プロトコルは、無力化したマウスレトロウイルスを使用している。

【0051】

ウイルスベクターの使用に代わるものとして、核酸を細胞に導入する、知られている他の方法には、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈法、マイクロインジェクションなどの機械技術、リポソームによって仲介される導入、およびDNAの直接取り込み、および受容体が仲介するDNA導入がある。 30

【0052】

上で言及した通り、GPI-PLDタンパク質をコードする核酸、またはその活性な部分を用いた遺伝子治療の目的は、野生型GPI-PLDタンパク質のレベルが0であるまたは少ないレベルでのみ存在する細胞において、この核酸の発現産物の量を増加させることである。遺伝子治療のための標的細胞には、インシュリンを分泌する細胞や、ニューロンから誘導されたあらゆる細胞がある。細胞工学を使用して、その後ヒトに移植することができる形質移入された細胞株中のGPI-PLDタンパク質の過剰発現または抑制をもたらすことができる。組織特異的な方式でGPI-PLDタンパク質を発現させるプロモーターを用いて、遺伝子治療を使用することができる(すなわちGPI-PLD cDNAに連結しているインシュリン・プロモーターは、b細胞中、および一時的に脳内で、GPI-PLDタンパク質を過剰発現することとなる)。GPI-PLDタンパク質の欠陥機能が、神経疾患に関与する場合、GPI-PLDタンパク質は、移植用の形質転換された細胞株中で過剰発現させることができる。 40

【0053】

GPI-PLD核酸を選択的に標的組織に向ける遺伝子導入技術が好ましい。この例には、この核酸が、標的細胞の表面上に存在する受容体に特異的であるタンパク質リガンドに、ポリリジンを通じて連結するものである、受容体が仲介する遺伝子導入が含まれる。 50

【 0 0 5 4 】

薬剤組成物

上で言及した通り、G P I - P L Dタンパク質および核酸は、当技術分野でよく知られた技術を用いて、薬剤組成物として配合することができる。

【 0 0 5 5 】

経口投与用の薬剤組成物は、錠剤、カプセル剤、散剤、または液体の形状中に入ってもよい。錠剤は、ゼラチンなどの固形状担体、または補助薬または不活性な希釈剤を含んでもよい。液体の薬剤組成物は、一般に、水、石油、動物油または植物油、鉱油、あるいは合成油などの液状担体を含む。生理的食塩水、あるいはエチレングリコール、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコールなどのグリコールが含まれてもよい。こうした組成物および調製物は、一般に、少なくとも0.1重量%の化合物を含有する。

10

【 0 0 5 6 】

非経口投与には、次の経路による投与が含まれる。すなわち、静脈内、皮膚または皮下、経鼻、筋肉内、眼内、経上皮、腹腔内、ならびに（経皮、眼、直腸内、経鼻、吸入、およびエアロゾルを含めて）局所、ならびに直腸全身的経路である。静脈内、皮膚、または皮下注射、あるいは苦痛部位での注射については、有効成分は、発熱性物質なしの、pH、等張性、および安定性が適切である、非経口的に許容される水溶液の形状の中に入ることとなる。当分野の技術者であれば、例えば化合物またはその誘導体の、例えば生理的食塩水、グリセロールを用いて調製した分散液、液状ポリエチレングリコール、またはオイルの溶液を用いて、適当な溶液を適切に調製することができるであろう。

20

【 0 0 5 7 】

他の有効成分と任意選択で組み合わせた化合物の1種または複数の他に、組成物は、当分野の技術者によく知られている薬剤として許容される賦形剤、担体、緩衝液、安定剤、等張化剤、保存剤または酸化防止剤、あるいは他の材料の1種または複数を含むことができる。こうした材料は、非毒性であるべきであり、有効成分の効力を妨げるものであってはならない。担体または他の材料のストリンジェントな性質は、例えば経口的にまたは非経口的になど、投与経路に応じて変わってもよい。

【 0 0 5 8 】

液状の薬剤組成物は、通常、pHが約3.0と9.0の間、より好ましくは約4.5と8.5の間、よりいっそう好ましくは約5.0と8.0の間であるように配合される。組成物のpHは、通常、約1mM~50mMの範囲で使用される酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、コハク酸塩、T r i s、またはヒスチジンなどの緩衝液を使用することによって保つことができる。組成物のpHは、生理的に許容される酸または塩基を用いて別の方法で調整することもできる。

30

【 0 0 5 9 】

一般に、薬剤組成物中には、微生物の成長を遅らせる、組成物の貯蔵寿命を延長させる、また、複数回使用の包装を可能にするために保存剤が含まれる。保存剤の例には、フェノール、メタクレゾール、ベンジルアルコール、パラヒドロキシ安息香酸およびそのエステル、メチルパラベン、プロピルパラベン、塩化ベンザルコニウム、ならびに塩化ベンゼトニウムがある。保存剤は通常、約0.1~1.0(%) (w/v)の範囲で使用される。

40

【 0 0 6 0 】

薬剤組成物は、個体に対する利益を示すのに十分である「予防有効量」または「治療有効量」（場合により、予防を治療とみなすが）で、個体に投与されることが好ましい。通常、これは、個体に対する利益をもたらす、治療的に有用な活性をもたらすこととなる。投与される化合物の実際の量、ならびに投与の速度および時間経過は、治療される状態の種類および重さに依存することとなる。治療の処方箋、例えば用量の決定などは、一般開業医および他の医師に責任があり、通常、治療される障害、それぞれの患者の状態、送達部位、投与方法、および開業医に分かる他の要因を考慮する。上で言及した技術およびプロトコルの例は、R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e

50

s、16th edition、Osol、A.(編)、1980に出ている。例として、組成物は、患者に、体重1kgあたり活性な化合物0.01mgと100mgの間の用量で投与されることが好ましく、体重1kgあたり0.5mgと10mgの間であることがより好ましい。

【0061】

組成物は、さらに1種または複数の他の薬剤として活性な薬剤、本発明のさらなる化合物、イノシトールホスホグリカン、インシュリンなどの成長因子、NGFまたは下に列挙する他の成長因子、あるいは下に述べる状態の治療のために使用する薬物など、他の薬物を含んでもよい。

【0062】

医療使用

本発明のGPI-PLDポリペプチドおよび核酸は、アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態、あるいは自己免疫状態、特に、GPI-PLDまたはApoA1/GPI-PLD複合体に対する自己抗体が存在する特徴がある状態を(予防的または治療的に)治療するための医薬品の調製において使用することができる。こうした状態の例には、冠状動脈疾患(CAD)などの心血管障害およびその合併症、全身性エリテマトーデス(SLE)の治療、特にアテローム硬化病変、シェーグレン症候群、および1型または2型糖尿病に関連する脂質異常がある。

【0063】

異常脂肪血症は、冠状動脈疾患の古典的(classic)危険因子であると認識されている。早発性のアテローム性動脈硬化症は、全身性エリテマトーデス(SLE)、すなわち広範囲の全身性病態がみられる原因が知られていない自己免疫疾患を患う患者における、重要な罹患の原因である。SLEを患う患者は、アポリタンパク質A1に対する自己抗体をもつことが報告されている(Merrillら、Arthritis and Rheum., 38: 1655-1659, 1995)。

【0064】

特定の理論に拘泥するものではないが、本発明は、アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態の患者が、ApoA1によるGPI-PLD送達における欠陥をもつと仮定する。このことは、ApoA1の先天的な欠損があり、糖尿病合併症の徴候を示す患者について整合性がある。

【0065】

ある種の態様では、GPI-PLDを、それがヒトの血清および血液中で結合するアポリタンパク質A1と組み合わせて投与してもよい。

【0066】

さらなる態様では、本発明は、アテローム性動脈硬化症の特徴がある状態の診断および/または治療において有用な材料を含む製造品を提供する。この製造品は、容器およびラベルを含む。適当な容器には、例えばガラスまたはプラスチックなどの材料から形成されるビン、バイアル、注射器、および試験管がある。容器は、アテローム性動脈硬化症を診断するか、または治療に有効な組成物を入れ、例えば、組成物に接触するために針によって穴を開けることができる栓などの滅菌した接触口を備えていてもよい。この商品をアテローム性動脈硬化症の予防または治療のために使用する場合、組成物はGPI-PLDまたは変異体、活性な部分またはその断片を含んでいてもよい。この商品は、任意選択で、GPI-PLDとの混合物で、あるいは1つまたは複数のさらなる容器に入ったキットの一部として、アテローム性動脈硬化症の治療のための、あるいはGPI-PLDの薬理学的特性を向上するための、1種または複数のさらなる有効成分を含んでいてもよい。この商品をアテローム性動脈硬化症の診断のために使用する場合、容器を、本明細書で述べるアッセイを行うのに有用な1種または複数の試薬を入れるために使用してもよい。容器面の、あるいは添付したラベルに、アテローム性動脈硬化症の診断または治療のためのこの組成物の使用を記載し、使用者に指示するための詳細な指示書を提供してもよい。製造用商品は、薬剤として許容される緩衝液、リンガー溶液および/またはブドウ糖溶液を入れた

10

20

30

40

50

第2の容器をさらに含んでもよい。

【0067】

診断アッセイ

個体からの生体サンプル中のGPI-PLD活性、あるいはこの酵素の量または濃度を決定するための方法は、当技術分野でよく知られており、個体がアテローム性動脈硬化症または本明細書で述べる他の状態のうちの1つを患っている、あるいはアテローム性動脈硬化症の危険があるかどうか決定するために、本発明のコンテキストで使用することができる。こうした分析の目的を、医師がアテローム性動脈硬化症の重さまたは経過見込みを決定するのを補助するために、かつ/またはその治療を最も効果的にするために、診断または予後のために使用してもよい。

10

【0068】

胎盤中に存在する正常でないまたは異常調節されたGPI-PLD活性が、アテローム性動脈硬化症の原因の1つであると考えられているので、好ましい診断方法は、GPI-PLD活性の決定に頼るものである。一実施形態では、この方法は、例えば標識した基質に対するGPI-PLDの作用を測定することによって、患者から得られた生体サンプル中のGPI-PLD活性を決定することを含む。あるいは、または追加的に、サンプル中のGPI-PLDの濃度または量を決定してもよい。通常、この方法は、血液、血清、組織サンプル、または尿などの生体サンプルを使用する。サンプルに応じて、例えばサンプルから細胞屑または望ましくない混在物を除去するなど、前処理工程を行うことが好都合である可能性がある。

20

【0069】

ある種の実施形態では、GPI-PLD活性を決定するためのアッセイ方法は、個体において、GPI-PLDに特異的に結合する能力がある結合部位をもつ結合剤を使用し、また、当技術分野でよく知られており、個体がアテローム性動脈硬化症または本明細書で述べる他の状態の1つを患う、あるいは発生の危険があるかどうか決定するために、本発明において使用することができる。こうした分析の目的を、医師がアテローム性動脈硬化症の重さまたは経過見込みを決定するのを補助するために、かつ/またはその治療を最も効果的にするために、診断または予後のために使用してもよい。

【0070】

胎盤中に存在する異常なまたは調節障害のあるGPI-PLD活性が、アテローム性動脈硬化症の原因の1つであると考えられているので、好ましい診断方法は、GPI-PLD活性の決定に頼るものである。一実施形態では、この方法は、例えば標識した基質に対するGPI-PLDの作用を測定することによって、患者から得られた生体サンプル中のGPI-PLD活性を決定することを含む。あるいは、または追加的に、サンプル中のGPI-PLDの濃度または量を決定してもよい。通常、この方法は、血液、血清、組織サンプル、または尿などの生体サンプルを使用する。サンプルに応じて、例えばサンプルから細胞残渣または望ましくない混在物を除去するなど、前処理工程を行うことが好都合である可能性がある。

30

【0071】

ある種の実施形態では、GPI-PLD活性を決定するためのアッセイ方法は、他の分子、特にサンプル中に存在する可能性がある他の分子よりも優れて、GPI-PLDに特異的に結合する能力がある結合部位をもつ結合剤を使用する。結合剤の例には、GPI-PLDに特異的に結合する能力がある抗体、受容体、および他の分子がある。好都合には、結合剤は、アッセイ中の扱いを容易にするために、例えば定められた位置で、固体支持体に固定させる。これは、結合剤を固体支持体に化学的に結合させるために、例えばビオチン/アビジンまたはビオチン/ストレプトアビジンを使用するなど、物理吸着や化学吸着などの当技術分野でよく知られた技術を用いて実現できる。

40

【0072】

サンプルは、一般に、サンプル中に存在するGPI-PLDが、結合剤と結合できるように適切な条件下で結合剤と接触させる。GPI-PLD活性は、GPI-PLDによって

50

切断するホスホジエステル結合をもち、ホスファチジン酸とGPIアンカーを遊離するグリコシルホスファチジルイノシトールなどの適当な基質を使用し、例えば、アッセイ系において、基質あるいは(1種または複数の)反応生成物の量を追跡することによってこの酵素反応をモニターすることによって決定できる。このプロセスは、基質を標識し、基質の標識の減少、または反応生成物中の標識の増加を検出することによって容易になる。

【0073】

サンプル中のGPI-PLDの(活性ではなく)量の決定の場合、顕色剤の1種または複数を用いて、結合剤の結合部位の占有率を決定することができる。結合剤の占有結合部位に対して、顕色剤が分析物と競合する(例えば、この分析物の標識類似体を使用する)拮抗的な方法、あるいは、標識された顕色剤が、結合剤と結合しているか、または占有結合部位に結合している分析物と結合する(例えば適切な結合特異性をもつ抗体を使用する)非拮抗的な方法で、顕色剤を使用することができる。どちらの方法も、分析物によって占有された結合部位の数を示し、またそれにより、例えば濃度が知られている分析物を含有するサンプルを用いて得られた基準値と比較することによって、サンプル中の分析物の濃度を提供する。

10

【0074】

通常、基質または顕色剤は、検出可能で、好ましくは測定可能なシグナルを直接的または間接的に発生する標識分子またはレポーター分子で標識される。レポーター分子の結合は、直接的または間接的に、例えばペプチド結合を介して共有結合的でもよいし、非共有結合的でもよい。ペプチド結合を介する結合は、抗体およびレポーター分子をコードする遺伝子融合体の組み換え体発現の結果であるものであってもよい。抗体を検出可能部分に別々に結合させるためには、Hunterら、Nature 144: 945、1962、Davidら、Biochemistry 13: 1014、1974、Painら、J. Immunol. Meth. 40: 219、1981、およびNygren、J. Histochem. and Cytochem. 30: 407、1982によって記載されている方法を含めて、当技術分野で知られたどんな方法を使用してもよい。

20

【0075】

1つの好ましい方式は、スペクトルとして分離された吸収または発光特性を有する個々の蛍光色素、リン光体、あるいはレーザー色素と、基質または顕色剤の各の種を共有結合することである。適当な蛍光色素には、フルオレセイン、ローダミン、ルシフェリン、フィコエリトリン、およびTexas Redがある。適当な発色性色素には、ジアミノベンジンがある。他の検出可能な標識には、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、または $^{99\text{m}}\text{Tc}$ などの放射性同位体標識、ならびに、検出可能な反応生成物が触媒反応をもたらす、シグナルを増幅させることが可能である、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、またはホースラディッシュペルオキシダーゼなどの酵素標識がある。

30

【0076】

他のレポーターには、着色した、磁性の、または常磁性のラテックスビーズ、ならびに検出可能なシグナルを直接的または間接的に、視覚的に観察されるまたは電氣的に検出されるまたは他の方法で記録できるようにする、生物学的または化学的に活性な薬剤などの、高分子のコロイド粒子または微粒子状の材料がある。これらの分子は、呈色または変色する、あるいは、例えば、電氣的性質を変化させる反応を触媒する酵素であってもよい。これらは、エネルギー状態の間の電子遷移が、特有のスペクトル吸収または発光をもたらすように、分子励起できるものであってもよい。これらには、バイオセンサーと組み合わせ使用される化学物質も含まれる。

40

【0077】

上で言及した通り、基質または顕色剤は、当技術分野でよく知られた技術を用いて検出できるように、(例えば、放射能、蛍光、または酵素標識で)標識される。したがって、放射能標識は、シンチレーションカウンタまたは他の放射線計数装置を用いて、蛍光標識は、レーザーおよび共焦点顕微鏡を用いて、酵素標識は、通常色の変化を示す、基質上の酵素標識の作用によって検出できる。

50

【0078】

【実施例】

SLE患者において、Apo-A1に対して自己抗体が存在することが確立されており、SLEは、早発性の冠動脈心疾患についての最良のモデルとみなされている。冠動脈心疾患への連関は、従来技術では確立されていないが、ApoA1複合体に対する抗体は、GPI-PLDの組織への送達を妨げ、Apo-A1欠乏患者と同様の臨床効果をもつ。これらの連関は、GPI-PLDの欠乏が、インシュリン抵抗性を仲介する他に、その活性が低下すると冠動脈心疾患が引き起こされる、IPGが仲介する成長因子の欠乏も仲介することを示唆する。したがって、糖尿病合併症、SLE、およびApo-A1の先天性異常はすべて、標的組織におけるGPI-PLDの減少を伴うので、これらの間には連関が存在する。

10

【0079】

この仮説を試験するために、多くの自己免疫異常におけるGPI-PLD血漿濃度の比較を行った。SLEおよびシェーグレン症候群を患う患者のGPI-PLDレベルを測定し、コントロール群、すなわち正常な患者および慢性関節リウマチを患う患者と比較した。図2に示すように、SLEとシェーグレン症候群の両方を患う患者のGPI-PLDレベルは、統計的に上昇し、これらの条件では、自己抗体はGPI-PLDの組織への送達を抑制または予防し、血流中にGPI-PLDを蓄積させるという本明細書で開示したとと整合性があった。したがって、こうした患者は、GPI-PLDの血漿濃度が高く、組織中では対応する欠乏を示すために、逆説的な欠乏を生じる。

20

【0080】

ここに挙げた参考文献は、その全部が参照としてここに取りこまれるものとする。

【0081】

【参考文献】

Huang et al, US Patent No: 5,418,147.

Tsang et al, FASEB J. (supp), 6:A1922, 1992.

Scallan et al, Science, 252:446-448, 1991.

Hoener et al, Eur. J. Biochem., 206:747-757, 1992. 10

Heller et al, Eur. J. Biochem., 224:823-833, 1994.

Rademacher et al, Brazilian J. Med. Biol. Res., 27:327-341, 1994.

Lin et al, J. Cell Biol., 115:220a, 1991. 20

Thompson et al, Nucleic Acid Research, 22:4673-4680, 1994, with algorithm from Higgins et al, CABIOS, 8(2):189-191, 1992.

Caro et al, Biochem. Molec. Med., 61:214-228, 1997.

O'Brien et al, Circulation, 99: 2876-2882, 1999. 30

Merrill et al, Arthritis & Rheumatism, 38:1655-1659, 1995.

Borba et al, Arthritis & Rheumatism, 43: 1033-1040, 2000.

【図面の簡単な説明】 40

【図1A】PCT/GB99/04399に開示されたヒトの肝臓のGPI-PLDの、推定されたアミノ酸配列、ならびに米国特許第5,418,147号(Huangら)に開示されたウシの肝臓およびヒトの肝臓のGPI-PLD配列を並べたものを示す。

【図1B】図1Aの続きである。

【図2】自己免疫異常を患う患者からのサンプル中にみられるGPI-PLDの血漿濃度を、コントロール群(正常な患者および関節リウマチを患う患者)と比較して示す。

【 図 1 A 】

上段: eDNAクローンA1ヒト肝臓配列PCT/G899/04399から生成したタンパク質
中段: Roche特許ウシ肝臓配列から生成したタンパク質
下段: Roche特許ヒト肝臓配列から生成したタンパク質

MSAFRLWPGLLMLG-SLCHRGSPCGLS...
NSAFRFWSGLLMLG-FLCFRSPCGIS...
NSAFRLWPGLLMTVMSLCHRGSGGLS...
YQAGIVFPDPCYFSLCKGGKFDVSE...
YQAGVFPDPCYFSLCKGGKFDVSE...
YQAGVFPDPCYFSLCKGGKFDVSE...
FGITSHMAADVSWHSLGLEQGLR...
FGITSHMAADVSWHSLGLEQGLR...
FGITSHMAADVSWHSLGLEQGLR...
RRWYVFPKDLLGIYEKLYGRVITEN...
RRWYVFPKDLLGIYEKLYGRVITEN...
RRWYVFPKDLLGIYEKLYGRVITEN...
VEQFQRYFLGGLDMAFWSTNIYHL...
VEQFQRYFLGGLDMAFWSTNIYHL...
VEQFQRYFLGGLDMAFWSTNIYHL...
SMMQKDFRNLTTSLTESVDNIN...
SMMQKDFRNLTTSLTESVDNIN...
SMMQKDFRNLTTSLTESVDNIN...
GSQLSQKRVSSPLASFLSFPYARL...
GSQLSQKRVSSPLASFLSFPYARL...
GSQLSQKRVSSPLASFLSFPYARL...
YLIYGNLGLFPVDLDELKBAHRIL...
YLIYGNLGLFPVDLDELKBAHRIL...
YLIYGNLGLFPVDLDELKBAHRIL...
EQLTYKGAIVYVYFGSKQGMSSP...
EQLTYKGAIVYVYFGSKQGMSSP...
EQLTYKGAIVYVYFGSKQGMSSP...
FAPGGKQKGI VAAAFYSGPSLS...
FAPGGKQKGI VAAAFYSGPSLS...
FAPGGKQKGI VAAAFYSGPSLS...
LVGSPTWKNSRLGRLHLHIDEKKS...
LVGSPTWKNSRLGRLHLHIDEKKS...
LVGSPTWKNSRLGRLHLHIDEKKS...

【 図 1 B 】

VLMNGTLKQVLLVGAFTYDVS...
VLMNGTLKQVLLVGAFTYDVS...
VLMNGTLKQVLLVGAFTYDVS...
SRFGVVLHLSDLDDGGLDEI...
SRFGVVLHLSDLDDGGLDEI...
SRFGVVLHLSDLDDGGLDEI...
KSWITPCPEEKAQYVLISPEAS...
KSWITPCPEEKAQYVLISPEAS...
KSWITPCPEEKAQYVLISPEAS...
SLGSD
RLGSD
SLGSD

Fig. 1 Part 2 of 2)

Fig. 1 (part 1 of 2)

【 図 2 】

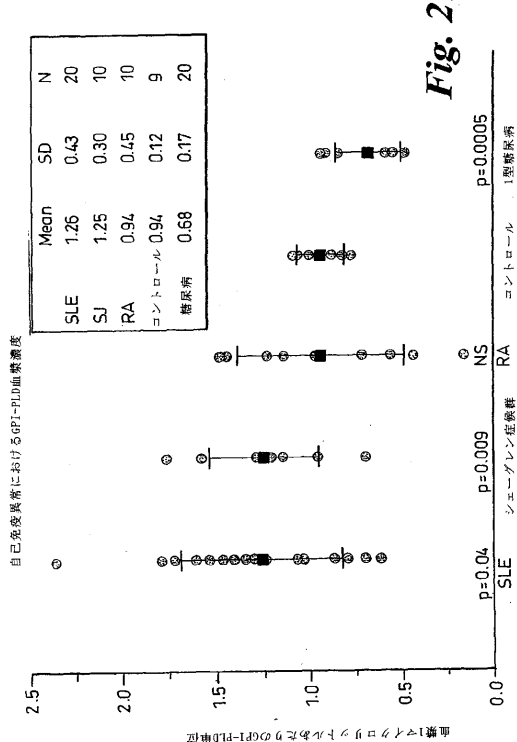


Fig. 2

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/02756 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 9/00
- (21) International Application Number: PCT/GB01/02803
- (22) International Filing Date: 25 June 2001 (25.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0015986.3 29 June 2000 (29.06.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY COLLEGE LONDON [GB/GB]; Gower Street, London, Greater London WC1E 6BT (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NI, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SCHOFIELD, Julian [GB/GB]; 39 Moorgreen House, Wynyard Street, London, Greater London EC1V 7JA (GB); RADEMACHER, Thomas, William [US/GB]; Foxcombe, The Ridgeway, Boars Hill, Oxford, Oxfordshire OX1 5EY (GB).

(74) Agents: KIDDLE, Simon, J, et al.; Mewburn Ellis, York House, 23 Kingsway, London, Greater London WC2B 6HP (GB).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/02756 A2

(54) Title: GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL SPECIFIC PHOSPHOLIPASE D PROTEINS FOR THE TREATMENT OR DIAGNOSIS OF ATHEROSCLEROSIS

(57) Abstract: The present invention relates to the use of GPI-PLD for the prevention and treatment of conditions characterised by atherosclerosis. In some embodiments, this process may be caused by a failure to produce GPI-PLD, for example type 1 diabetes, or deliver GPI-PLD, such as patients deficient in apolipoprotein-A1, or those patients with autoantibodies to either GPI-PLD or Apo-A1. In other embodiments, the atherosclerotic process may result from a loss in GPI-PLD activity, e.g. where there is a genetic modification of GPI-PLD either affecting its activity or delivery to a target tissue, thereby leading to the atherosclerotic process.

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

Glycosylphosphatidylinositol Specific Phospholipase D
Proteins for the Treatment or Diagnosis of
Atherosclerosis

5 Field of the Invention

The present invention relates to the use of glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D (GPI-PLD) proteins, and in particular the use of GPI-PLD for the treatment or diagnosis of conditions characterised by an atherosclerotic process.

Background of the Invention

Studies have shown that a number of cell surface proteins are attached to the cell membrane by covalent linkage to a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. It has been shown that the enzyme GPI-PLD cleaves the phosphodiester bond linking glycosylphosphatidylinositol to phosphatidic acid, thereby releasing anchored proteins.

20 GPI-PLD proteins are abundant in bovine and human serum. It is thought that they are primarily synthesised by the Langerhans cells of the pancreas and mast cells and released into the circulation and transported to target tissue in a complex with apolipoprotein-A1 (ApoA1)
25 (Hoener et al 1993). The GPI-PLD enzyme is capable of hydrolysing glycosylphosphatidylinositol, by which a number of cell surface proteins are attached to cell membranes. GPI-PLD cleaves a phosphodiester bond, to liberate phosphatidic acid, in contrast to phospholipase
30 C activity, which generates diacyl glycerol.

A further proposed function of GPI-PLD is to produce inositolphosphoglycans by cleavage of "free" GPIs in the plasma membrane in response to a growth factor or hormone

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

binding to its receptor (Rademacher et al, 1994). This
role for GPI-PLD has been demonstrated in basophils where
IgE-dependent activation of these cells results in
release of their granule contents, which include
5 substances such as histamine, a mediator of the
inflammatory response. In the presence of antigen,
histamine is released; this release can be mimicked by
addition of IPGs and is blocked by addition of anti-GPI-
PLD antibodies (Lin et al, 1991).

10 US Patent No: 5,418,147 (Huang et al) describes the
purification of GPI-PLD from bovine liver, and the
subsequent cloning of three GPI-PLD enzymes from bovine
liver, human liver and human pancreas cDNA libraries.
15 This patent reports the full length cDNA and amino acid
sequences of the GPI-PLDs from human and bovine liver,
and the partial cDNA and amino acid sequences of the
human pancreatic form of the enzyme. Subsequently, the
full length sequence of the pancreatic form of GPI-PLD
20 was reported in Tsang et al (1992), and this enzyme has
been found in cDNA libraries from breast, eye, spleen and
tonsil. The three forms of the enzymes are highly
homologous with the predicted mature protein sequences of
bovine liver GPI-PLD sharing 82% sequence identity with
25 the human liver enzyme and 81% sequence identity with the
human pancreatic enzyme. The amino acid sequences of
human liver and pancreatic forms of GPI-PLD were
deposited at GenBank under accession numbers L11701 and
L11702 and consist of 841 and 840 amino acids
30 respectively. The human liver and pancreatic forms of
GPI-PLD share 94.6% sequence identity. The structure of
GPI-PLDs is further discussed in Scallon et al, 1991.

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

However, despite the cloning of GPI-PLD enzymes and investigation as to their biochemical properties, many of the roles of the enzyme *in vivo* or any possible medical use remain unknown.

5

O'Brien et al (1999) relates to the expression of GPI-PLD by macrophages and suggests that increased expression of GPI-PLD participates in causing inflammation and pathogenesis in atherosclerosis.

10

Summary of the Invention

Broadly, the present invention relates to the use of GPI-PLD for the prevention and treatment of conditions characterised by atherosclerosis. In some embodiments, this process may be caused by a failure to produce GPI-PLD, for example type 1 diabetes, or deliver GPI-PLD, such as patients deficient in apolipoprotein-A1, or those patients with autoantibodies to either GPI-PLD or Apo-A1. In other embodiments, the atherosclerotic process may result from a loss in GPI-PLD activity, e.g. where there is a genetic modification of GPI-PLD either affecting its activity or delivery to a target tissue, thereby leading to the atherosclerotic process. Thus, in contrast to O'Brien et al (1999), the present invention proposes treating conditions characterised by atherosclerosis by administering GPI-PLD.

25

Examples of conditions characterised by atherosclerosis include type 1 diabetes, conditions characterised by ApoA1 deficiency, cardiovascular disorders such as coronary artery disease (CAD), systemic lupus erythematosus (SLE) and Sjogren's syndrome.

30

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

Accordingly, in a first aspect the present invention provides the use of GPI-PLD for the preparation of a medicament for the treatment of conditions characterised by atherosclerosis.

5

In a further aspect, the present invention provides the use of a nucleic acid molecule encoding GPI-PLD for the preparation of a medicament for the treatment of conditions characterised by atherosclerosis.

10

In a further aspect, the present invention provides the use of a host cell capable of expressing and secreting GPI-PLD in the preparation of a medicament for the treatment of conditions characterised by atherosclerosis.

15

In one embodiment, the host cell is encapsulated, e.g. in a biocompatible polymer, so that the GPI-PLD produced by the host cell can be secreted into the patient, while preventing rejection of the host cell by the immune system of the patient. Methods for encapsulating cells in biocompatible polymers are described in WO93/16687 and WO96/31199.

In a yet further aspect, the present invention provides a kit comprising a composition including GPI-PLD for the treatment of conditions characterised by atherosclerosis. The composition comprising GPI-PLD may be administered alone, or in conjunction with other medicaments for the treatment of atherosclerosis, for either simultaneous or sequential administration.

In a further aspect, the present invention provides a method of diagnosing a patient who has or at risk of

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

developing a condition characterised by atherosclerosis, the method comprising determining the amount of GPI-PLD and/or GPI-PLD activity in a sample obtained from the patient.

5

In one embodiment, the present invention provides a method of diagnosing a patient who has or at risk of developing a condition characterised by atherosclerosis, the method comprising the steps of:

10 (a) contacting a sample obtained from the patient with a solid support having immobilised thereon a binding agent having binding sites specific for GPI-PLD;

(b) determining the amount of GPI-PLD or the activity of GPI-PLD which binds to the binding agent.

15

The method may involve the additional step of:

(c) correlating the value obtained in step (b) with measurements obtained from control subjects to determine whether the patient has or is at risk of developing the condition.

20

These and other aspects of the present invention are described in more detail below. By way of example, embodiments of the present invention will be described with reference to the accompanying figures.

25

Brief Description of the Figures

Figure 1 shows an alignment of the deduced amino acid sequences of human liver GPI-PLD disclosed in

30 PCT/GB99/04399 the bovine and human liver GPI-PLD sequences disclosed in US Patent No: 5,418,147 (Huang et al).

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

Figure 2 shows GPI-PLD plasma levels observed in samples from patients with autoimmune disorders, as compared to control groups (normal patients and patients with rheumatoid arthritis).

5

Detailed Description

GPI-PLD Proteins

The term "GPI-PLD biological activity" is herein defined as the enzymatic activity of GPI-PLD in liberating phosphatidic acid from a glycosylphosphatidylinositol by cleavage of a phosphodiester bond, e.g. releasing a GPI-anchored protein. As noted in Heller et al (1994), this activity has been localised to the N-terminal 39 kD portion of full length GPI-PLD.

15

The medical uses of GPI-PLD described herein can employ the GPI-PLD variants disclosed by Huang et al, and in PCT/GB99/04399. The skilled person can use the techniques described herein and others well known in the art to produce large amounts of these proteins, or fragments, active portions, variants and alleles thereof, for use as pharmaceuticals.

GPI-PLD proteins which are amino acid sequence variants or alleles of these prior art sequences can also be used in the present invention. A polypeptide which is a variant or allele may have an amino acid sequence which differs from that given by one or more of addition, substitution, deletion and insertion of one or more amino acids. In some embodiments, the polypeptides have GPI-PLD enzymatic function as defined above. In other embodiments, the GPI-PLDs are enzymatically inactive, e.g. not having the activity of releasing IPGs, and can

25

30

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

compete with the abnormal or dysregulated GPI-PLD to down regulate the abnormal GPI-PLD activity potentially leading to atherosclerosis.

- 5 A GPI-PLD protein which is an amino acid sequence variant or allele of an amino acid sequence shown in Figure 1 may comprise an amino acid sequence which shares greater than about 70%, greater than about 80%, greater than about 90%, greater than about 95%, greater than about 97%,
10 greater than about 98% or greater than about 99% sequence identity with an amino acid sequence shown in Figure 1. Sequence comparison and identity calculations may be carried out using the Cluster program (Thompson et al, 1994), using the following parameters (Pairwise Alignment
15 Parameters: Weight Matrix: pam series; Gap Open Penalty: 10.00; Gap Extension Penalty: 0.10). Alternatively, the GCG program could be used which is available from Genetics Computer Group, Oxford Molecular Group, Madison, Wisconsin, USA, Version 9.1. Particular amino acid
20 sequence variants may differ from those shown in Figure 1 by insertion, addition, substitution or deletion of 1 amino acid, 2, 3, 4, 5-10, 10-20, 20-30, 30-50, 50-100, 100-150, or more than 150 amino acids.
- 25 In one embodiment, the variant GPI-PLD polypeptides of the present invention differ in amino acid sequence as compared to human GPI-PLD at the phosphorylation site from amino acids 689 to 692 of the mature sequence, i.e. within the amino acid motif RRFS. The term "variant GPI-
30 PLD polypeptide" is intended, inter alia, to include polypeptides which are modified within this region by deletion, substitution and/or insertion of one or more amino acids. These sequence differences may be the

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

result of varying the GPI-PLD amino acid sequence of a parent GPI-PLD polypeptide, either a wild type GPI-PLD polypeptide or a GPI-PLD polypeptide comprising one or more other modifications, e.g. by manipulation of the nucleic acid encoding the polypeptide, by altering the polypeptide itself or by the *de novo* synthesis of the variant protein. In preferred embodiments, the GPI-PLD retains, at least in part, one of its biological activities, e.g. by including a functional N-terminal domain.

A deletion may take the form of the deletion of one, two, three or all four amino acids within this region. In some embodiments, the deletion may be part of a larger deletion encompassing a greater part of the GPI-PLD molecule. In a preferred embodiment, the variant GPI-PLD polypeptides have an amino acid sequence which differs from the amino acid sequence of human wild type GPI-PLD by the deletion comprising residues 689 to 692 inclusive.

An insertion may take the form of 1, 2, 3, 4 or 5 or more additional amino acids inserted between amino acids within the RRFS motif to disrupt it.

A substitution may take the form of the substitution of one, two, three or all of the four amino acids within the region corresponding to amino acids 689 to 692 of wild type human GPI-PLD. The substitutions within this region may be part of a more extensive series of substitutions encompassing other parts of the GPI-PLD polypeptide. In particular, mutant forms of GPI-PLD which may have practical use differ from the wild type sequence. Some of these mutants are used in the experiments described

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

below.

These sequence differences may be the result of varying the GPI-PLD amino acid sequence of a parent GPI-PLD polypeptide, either a wild type GPI-PLD polypeptide or a
5 GPI-PLD polypeptide comprising one or more other modifications, e.g. by manipulation of the nucleic acid encoding the polypeptide, by altering the polypeptide itself or by the *de novo* synthesis of the variant
10 protein. In preferred embodiments, the GPI-PLD retains, at least in part, one of its biological activities, e.g. by the presence of a functional N-terminal domain.

It is preferred that GPI-PLD variants for use in the
15 present invention retain the enzymatic activity of GPI-PLD in liberating phosphatidic acid from a glycosylphosphatidylinositol by cleavage of a phosphodiester bond.

20 In other embodiments, the GPI-PLD may be a non-enzymatically active variant that may be used to treat atherosclerosis where the over activity of abnormal or dysregulated GPI-PLD is a causative factor of this condition. In this case, the non-enzymatically active
25 variants can compete with or displace the abnormal or dysregulated GPI-PLD, e.g. from its Apo-A1 carrier, thereby having the effect of down regulating the GPI-PLD activity. The design and synthesis of such competitive antagonists can be readily carried out using the
30 information about the GPI-PLD provided in this application.

The present invention also includes the use of active

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

portions and fragments of the GPI-PLD proteins for the preparation of a medicament for the prevention or treatment of conditions characterised by atherosclerosis.

- 5 An "active portion" of GPI-PLD protein is a polypeptide which is less than said full length GPI-PLD protein, but which retains at least its essential enzymatic activity, e.g. the enzyme activity mentioned above known to be located in the N-terminal 39kD portion of the enzyme.
- 10 For instance, portions of GPI-PLD protein can act as sequestrators or competitive antagonists by interacting with other proteins. Typically, active portions comprise at least about 300 amino acids of GPI-PLD, more preferably at least 500 amino acids, and still more
- 15 preferably at least 700 amino acids, with, for example, the amino acids being selected from one or more motifs from a sequence shown in Figure 1.

- A "fragment" of the GPI-PLD protein means a stretch of
- 20 amino acid residues of at least about 5 to 7 contiguous amino acids, often at least about 7 to 9 contiguous amino acids, typically at least about 9 to 13 contiguous amino acids, more preferably at least about 20 to 30 or more contiguous amino acids, more preferably greater than 40
- 25 amino acids, more preferably greater than 100 amino acids.

- A polypeptide for use in the preparation of a medicament for the prevention or treatment of atherosclerotic
- 30 conditions according to the present invention may be isolated and/or purified (e.g. using an antibody) for instance after production by expression from encoding nucleic acid (for which see below). Polypeptides

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

according to the present invention may also be generated wholly or partly by chemical synthesis.

The GPI-PLD polypeptides can also be linked to a coupling partner, e.g. an effector molecule, a label, a drug, a toxin and/or a carrier or transport molecule. Techniques for coupling the peptides of the invention to both peptidyl and non-peptidyl coupling partners are well known in the art. In one embodiment, the carrier molecule is a 16 aa peptide sequence derived from the homeodomain of *Antennapedia* (e.g. as sold under the name "Penetratin"), which can be coupled to a peptide via a terminal Cys residue. The "Penetratin" molecule and its properties are described in WO91/18981.

15

GPI-PLD Nucleic Acid

"GPI-PLD nucleic acid" includes a nucleic acid molecule which has a nucleotide sequence encoding a polypeptide with GPI-PLD activity. Suitable full-length sequences of human and bovine GPI-PLD enzymes have been provided, for example, by Huang et al, Tsang et al (1992) and in PCT/GB99/04399. These forms of GPI-PLD have been mapped to human chromosome 6 and are contained in the 4 centimorgan region of D6S1660-D6S1558 at positions 95.95 and 99.71 (NCBI GeneMap'98). The gene starts in the cytogenic region corresponding to 6p22.3 and extends into 6p21.3. This region also contains the IDDM1 and HLA loci (although the HLA genes map to the adjacent D6S1558-D6S1616 interval). The mouse GPI-PLD gene has also been mapped to chromosome 13, near the *fim 1* locus, which is found in humans on chromosome 6.

20

25

30

The GPI-PLD coding sequence may be one of the published

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

sequences referred to above, or a complementary nucleic acid sequence, or it may be a mutant, variant, derivative or allele of one of these sequences. The sequence may differ from that shown by a change which is one or more
5 of addition, insertion, deletion and substitution of one or more nucleotides of the sequence shown. Changes to a nucleotide sequence may result in an amino acid change at the protein level, or not, as determined by the genetic code.

10 The encoded polypeptide may comprise an amino acid sequence which differs by one or more amino acid residues from one of the published GPI-PLD amino acid sequences. Use of nucleic acid encoding a polypeptide which is an
15 amino acid sequence mutant, variant or allele of a known GPI-PLD is further envisaged by the present invention. Such polypeptides are discussed below. Nucleic acid encoding such a polypeptide may show greater than about
20 70% identity, greater than about 80% identity, greater than about 90% identity, greater than about 95% identity, greater than about 98% identity, or greater than about 99% identity with a published coding sequence for a GPI-PLD protein as described above.

25 The present invention also embraces use of fragments of GPI-PLD nucleic acid sequences, the fragments preferably being at least 12, 15, 30, 45, 60, 120 or 240 nucleotides in length.

30 Generally, nucleic acid for use according to the present invention is provided as an isolate, in isolated and/or purified form, or free or substantially free of material with which it is naturally associated, such as free or

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

substantially free of nucleic acid flanking the gene in the human genome, except possibly one or more regulatory sequence(s) for expression. Nucleic acid may be wholly or partially synthetic and may include genomic DNA, cDNA
5 or RNA. Where nucleic acid according to the invention includes RNA, reference to the sequence shown should be construed as reference to the RNA equivalent, with U substituted for T.

10 Nucleic acid sequences encoding all or part of the GPI-PLD gene and/or its regulatory elements can be readily prepared by the skilled person using the information and references contained herein and techniques known in the art. For example, see Sambrook et al, 1989, and Ausubel
15 et al, 1992. These techniques include (i) the use of the polymerase chain reaction (PCR) to amplify samples of such nucleic acid, e.g. from genomic sources, (ii) chemical synthesis, or (iii) amplification in *E. coli*. Modifications to the GPI-PLD sequences can be made, e.g.
20 using site directed mutagenesis, to provide expression of modified GPI-PLD protein or to take account of codon preference in the host cells used to express the nucleic acid.

25 In order to obtain expression of the GPI-PLD nucleic acid sequences, the sequences can be incorporated in a vector having control sequences operably linked to the GPI-PLD nucleic acid to control its expression. The use of expression systems has reached an advanced degree of
30 sophistication. The vectors may include other sequences such as promoters or enhancers to drive the expression of the inserted nucleic acid, nucleic acid sequences so that the GPI-PLD protein is produced as a fusion and/or

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

nucleic acid encoding secretion signals so that the polypeptide produced in the host cell is secreted from the cell. GPI-PLD protein can then be obtained by transforming the vectors into host cells in which the vector is functional, culturing the host cells so that
5 the GPI-PLD protein is produced and recovering the GPI-PLD protein from the host cells or the surrounding medium. Prokaryotic and eukaryotic cells are used for this purpose in the art, including strains of *E. coli*,
10 yeast, and eukaryotic cells such as COS or CHO cells. The choice of host cell can be used to control the properties of the GPI-PLD protein expressed in those cells, e.g. controlling where the polypeptide is deposited in the host cells or affecting properties such
15 as its glycosylation and phosphorylation.

PCR techniques for the amplification of nucleic acid are described in US Patent No:4,683,195. In general, such techniques require that sequence information from the
20 ends of the target sequence is known to allow suitable forward and reverse oligonucleotide primers to be designed to be identical or similar to the polynucleotide sequence that is the target for the amplification. PCR comprises steps of denaturation of template nucleic acid
25 (if double-stranded), annealing of primer to target, and polymerisation. The nucleic acid probed or used as template in the amplification reaction may be genomic DNA, cDNA or RNA. PCR can be used to amplify specific sequences from genomic DNA, specific RNA sequences and
30 cDNA transcribed from mRNA, bacteriophage or plasmid sequences. The published GPI-PLD protein nucleic acid sequences readily allow the skilled person to design PCR primers. References for the general use of PCR

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

techniques include Mullis et al, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263, 1987; Ehrlich (ed), PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989; Ehrlich et al, Science, 252:1643-1650, 1991; "PCR protocols; A Guide to Methods and Applications", Eds. Innis et al, Academic Press, New York, 1990.

Nucleic acid for use according to the present invention is obtainable using one or more oligonucleotide probes or primers designed to hybridize with one or more fragments of the nucleic acid sequence shown in the figures, particularly fragments of relatively rare sequence, based on codon usage or statistical analysis. A primer designed to hybridize with a fragment of the nucleic acid sequence shown in the above figures may be used in conjunction with one or more oligonucleotides designed to hybridize to a sequence in a cloning vector within which target nucleic acid has been cloned, or in so-called "RACE" (rapid amplification of cDNA ends) in which cDNA's in a library are ligated to an oligonucleotide linker and PCR is performed using a primer which hybridizes with a GPI-PLD nucleic acid sequence shown in figures and a primer which hybridizes to the oligonucleotide linker.

Such oligonucleotide probes or primers, as well as the full-length sequence (and mutants, alleles, variants and derivatives) are also useful in screening a test sample containing nucleic acid for the presence of alleles, mutants and variants of GPI-PLD protein, the probes hybridizing with a target sequence from a sample obtained from the individual being tested. The conditions of the hybridization can be controlled to minimise non-specific binding, and preferably stringent to moderately stringent

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

hybridization conditions are preferred. The skilled person is readily able to design such probes, label them and devise suitable conditions for the hybridization reactions, assisted by textbooks such as Sambrook et al (1989) and Ausubel et al (1992).

Examples of "stringent conditions" are those which: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulphate at 50°C; (2) employ during hybridisation a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% BSA/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750mM sodium chloride, 75mM sodium citrate at 42°C; or (3) employ 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50mg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulphate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC and 50% formamide at 55°C, followed by high stringency wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55°C. These hybridisation conditions may be used in the context of defining nucleic acid sequences which hybridize with GPI-PLD nucleic acid sequences.

Uses of GPI-PLD Nucleic Acid

The GPI-PLD nucleic acid sequences can be used in the preparation of cell lines capable of expressing GPI-PLD and included in expression vectors or otherwise formulated, e.g. for use in gene therapy techniques.

Thus, the present invention provides a cell line for

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

transplantation into a patient, the cell line being transformed with nucleic acid encoding GPI-PLD, and being capable of expressing and secreting GPI-PLD. In one embodiment, the cell lines are encapsulated, e.g. in a biocompatible polymer, so that the GPI-PLD produced by the cell line can be secreted into the patient, while preventing rejection by the immune system of the host. Methods for encapsulating cells in biocompatible polymers are described in WO93/16687 and WO96/31199.

10

As a further alternative, the nucleic acid encoded the GPI-PLD protein could be used in a method of gene therapy, to treat a patient who is unable to synthesize the active polypeptide or unable to synthesize it at the normal level, thereby providing the effect provided by wild-type GPI-PLD protein and suppressing the occurrence of diabetes in the target cells.

Vectors such as viral vectors have been used in the prior art to introduce genes into a wide variety of different target cells. Typically, the vectors are exposed to the target cells so that transfection can take place in a sufficient proportion of the cells to provide a useful therapeutic or prophylactic effect from the expression of the desired polypeptide. The transfected nucleic acid may be permanently incorporated into the genome of each of the targeted tumour cells, providing long lasting effect, or alternatively the treatment may have to be repeated periodically.

30

A variety of vectors, both viral vectors and plasmid vectors, are known in the art, see US Patent No: 5,252,479 and WO93/07282. In particular, a number of

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

viruses have been used as gene transfer vectors, including papovaviruses, such as SV40, vaccinia virus, herpesviruses, including HSV and EBV, and retroviruses. Many gene therapy protocols in the prior art have used
5 disabled murine retroviruses.

As an alternative to the use of viral vectors other known methods of introducing nucleic acid into cells includes electroporation, calcium phosphate co-precipitation,
10 mechanical techniques such as microinjection, transfer mediated by liposomes and direct DNA uptake and receptor-mediated DNA transfer.

As mentioned above, the aim of gene therapy using nucleic acid encoding the GPI-PLD protein, or an active portion thereof, is to increase the amount of the expression product of the nucleic acid in cells in which the level of the wild-type GPI-PLD protein is absent or present only at reduced levels. Target cells for gene therapy
20 include insulin secreting β -cells or any neuron derived cells. Cell engineering can be used to provide the overexpression or repression of GPI-PLD protein in transfected cell lines which can then be subsequently transplanted to humans. Gene therapy can be employed
25 using a promoter to drive GPI-PLD protein expression in a tissue specific manner (i.e. an insulin promoter linked to GPI-PLD cDNA will overexpress GPI-PLD protein in β -cells and transiently in the brain). If defective function of GPI-PLD protein is involved in neurological
30 disease, GPI-PLD protein can be overexpressed in transformed cell lines for transplantation.

Gene transfer techniques which selectively target the

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

GPI-PLD nucleic acid to target tissues are preferred. Examples of this included receptor-mediated gene transfer, in which the nucleic acid is linked to a protein ligand via polylysine, with the ligand being
5 specific for a receptor present on the surface of the target cells.

Pharmaceutical Compositions

As mentioned above, GPI-PLD proteins and nucleic acid can
10 be formulated as pharmaceutical compositions using techniques well known in the art.

Pharmaceutical compositions for oral administration may be in tablet, capsule, powder or liquid form. A tablet
15 may include a solid carrier such as gelatin or an adjuvant or an inert diluent. Liquid pharmaceutical compositions generally include a liquid carrier such as water, petroleum, animal or vegetable oils, mineral oil or synthetic oil. Physiological saline solution, or
20 glycols such as ethylene glycol, propylene glycol or polyethylene glycol may be included. Such compositions and preparations generally contain at least 0.1 wt% of the compound.

25 Parenteral administration includes administration by the following routes: intravenous, cutaneous or subcutaneous, nasal, intramuscular, intraocular, transepithelial, intraperitoneal and topical (including dermal, ocular, rectal, nasal, inhalation and aerosol), and rectal
30 systemic routes. For intravenous, cutaneous or subcutaneous injection, or injection at the site of affliction, the active ingredient will be in the form of a parenterally acceptable aqueous solution which is

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

pyrogen-free and has suitable pH, isotonicity and stability. Those of relevant skill in the art are well able to prepare suitable solutions using, for example, solutions of the compounds or a derivative thereof, e.g. 5 in physiological saline, a dispersion prepared with glycerol, liquid polyethylene glycol or oils.

In addition to one or more of the compounds, optionally in-combination with other active ingredient, the 10 compositions can comprise one or more of a pharmaceutically acceptable excipient, carrier, buffer, stabiliser, isotonicizing agent, preservative or anti-oxidant or other materials well known to those skilled in the art. Such materials should be non-toxic and should 15 not interfere with the efficacy of the active ingredient. The precise nature of the carrier or other material may depend on the route of administration, e.g. orally or parenterally.

20 Liquid pharmaceutical compositions are typically formulated to have a pH between about 3.0 and 9.0, more preferably between about 4.5 and 8.5 and still more preferably between about 5.0 and 8.0. The pH of a composition can be maintained by the use of a buffer such 25 as acetate, citrate, phosphate, succinate, Tris or histidine, typically employed in the range from about 1 mM to 50 mM. The pH of compositions can otherwise be adjusted by using physiologically acceptable acids or bases.

30 Preservatives are generally included in pharmaceutical compositions to retard microbial growth, extending the shelf life of the compositions and allowing multiple use

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

packaging. Examples of preservatives include phenol, meta-cresol, benzyl alcohol, para-hydroxybenzoic acid and its esters, methyl paraben, propyl paraben, benzalconium chloride and benzethonium chloride. Preservatives are typically employed in the range of about 0.1 to 1.0 % (w/v).

Preferably, the pharmaceutically compositions are given to an individual in a "prophylactically effective amount" or a "therapeutically effective amount" (as the case may be, although prophylaxis may be considered therapy), this being sufficient to show benefit to the individual. Typically, this will be to cause a therapeutically useful activity providing benefit to the individual. The actual amount of the compounds administered, and rate and time-course of administration, will depend on the nature and severity of the condition being treated. Prescription of treatment, e.g. decisions on dosage etc, is within the responsibility of general practitioners and other medical doctors, and typically takes account of the disorder to be treated, the condition of the individual patient, the site of delivery, the method of administration and other factors known to practitioners. Examples of the techniques and protocols mentioned above can be found in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980. By way of example, and the compositions are preferably administered to patients in dosages of between about 0.01 and 100mg of active compound per kg of body weight, and more preferably between about 0.5 and 10mg/kg of body weight.

The composition may further comprise one or more other pharmaceutically active agents, either further compounds

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

of the invention, inositol phosphoglycans, growth factors such as insulin, NGF or other growth factors listed below, or other drugs, e.g. those in use for the treatment of the conditions set out below.

5

Medical Uses

- The GPI-PLD polypeptides and nucleic acid of the invention can be used in the preparation of medicaments to treat (either prophylactically or therapeutically) conditions characterised by atherosclerosis, or autoimmune conditions, especially those characterised by the presence of autoantibodies to GPI-PLD or the ApoA1/GPI-PLD complex. Examples of conditions include cardiovascular disorders and their complications such as coronary artery disease (CAD), the treatment of systemic lupus erythematosus (SLE), especially atherosclerotic lesions, Sjogren's syndrome and lipidic disorders associated with Type 1 or Type 2 diabetes.
- 20 Dyslipidemia is recognised as a classic risk factor in coronary artery disease. Premature atherosclerosis is an important cause of morbidity in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), an autoimmune disease of unknown cause with a wide spectrum of systemic pathology.
- 25 It has been reported that patients with SLE contain autoantibodies directed against apolipoprotein A1 (Merrill et al, Arthritis and Rheum., 38:1655-1659, 1995).

- Without wishing to be bound by any particular theory, the present invention postulates that in patients having conditions characterised by atherosclerosis have a defect in the GPI-PLD delivery by ApoA1. This is consistent with patients who have a congenital absence of Apo A1 and

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

exhibit diabetic complications.

In some aspects, the GPI-PLD may be administered in combination with apolipoprotein A1 to which it is bound
5 in human serum and blood.

In a further aspect, the present invention provides an article of manufacture containing materials useful in the diagnosis and/or treatment of conditions characterised by
10 atherosclerosis. The article of manufacture comprises a container and a label. Suitable containers include bottles, vials, syringes and test tubes, for example formed from materials such as glass or plastic. The container holds a composition which is effective for
15 diagnosing or treating atherosclerosis and may have a sterile access port, e.g. a stopper which can be pierced by a needle to allow access to the composition. Where the article is used for the prevention or treatment of atherosclerosis, the composition may comprises GPI-PLD,
20 or a variant, active portion or fragment thereof. The article may optionally comprise one or more further active ingredients, in admixture with the GPI-PLD or as part of a kit in one or more further containers, for the treatment of atherosclerosis or to improve the
25 pharmacological properties of the GPI-PLD. Where the article is used for the diagnosis of atherosclerosis, the container may be used to hold one or more reagents useful in carrying out the assays described herein. The label on or associated with the container indicates the use of
30 the composition for the diagnosis or treatment of atherosclerosis and may provide detailed instructions to direct the user. The article for manufacture may further comprise a second container comprising a pharmaceutically

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

acceptable buffer, Ringer's solution and/or dextrose solution.

Diagnostic Assays

- 5 Methods for determining GPI-PLD activity or the amount or concentration of this enzyme in biological samples from individuals are well known in the art and can be employed in the context of the present invention to determine whether an individual has or is at risk of developing
- 10 atherosclerosis or one of the other conditions discussed herein. The purpose of such analysis may be used for diagnosis or prognosis to assist a physician in determining the severity or likely course of the atherosclerosis and/or to optimise treatment of it.
- 15 Preferred diagnostic methods rely on the determination of GPI-PLD activity as abnormal or dysregulated GPI-PLD activity present in the placenta is believed to be one of the causes of atherosclerosis. In one embodiment, this
- 20 method comprises determining GPI-PLD activity in a biological sample obtained from the patient, e.g. by measuring the action of GPI-PLD on a labelled substrate. Alternatively or additionally, the concentration or amount of GPI-PLD in a sample may be determined.
- 25 Typically, the methods employ biological samples such as blood, serum, tissue samples or urine. Depending on the sample, it may be advantageous to carry out a pretreatment step, e.g. to remove cellular debris or unwanted contaminants from the sample.
- 30 In some embodiments, the assay methods for determining GPI-PLD activity employ a binding agent having binding sites capable of specifically binding to GPI-PLD in

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

individuals are well known in the art and can be employed in the context of the present invention to determine whether an individual has or is at risk of developing atherosclerosis or one of the other conditions discussed
5 herein. The purpose of such analysis may be used for diagnosis or prognosis to assist a physician in determining the severity or likely course of the atherosclerosis and/or to optimise treatment of it.

10 Preferred diagnostic methods rely on the determination of GPI-PLD activity as abnormal or dysregulated GPI-PLD activity present in the placenta is believed to be one of the causes of atherosclerosis. In one embodiment, this method comprises determining GPI-PLD activity in a
15 biological sample obtained from the patient, e.g. by measuring the action of GPI-PLD on a labelled substrate. Alternatively or additionally, the concentration or amount of GPI-PLD in a sample may be determined. Typically, the methods employ biological samples such as
20 blood, serum, tissue samples or urine. Depending on the sample, it may be advantageous to carry out a pretreatment step, e.g. to remove cellular debris or unwanted contaminants from the sample.

25 In some embodiments, the assay methods for determining GPI-PLD activity employ a binding agent having binding sites capable of specifically binding to GPI-PLD in preference to other molecules, and especially other molecules likely to be present in the sample. Examples
30 of binding agents include antibodies, receptors and other molecules capable of specifically binding GPI-PLD. Conveniently, the binding agent is immobilised on solid support, e.g. at a defined location, to make it easy to

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

manipulate during the assay. This can be achieved using techniques well known in the art such as physisorption or chemisorption, e.g. employing biotin/avidin or biotin/streptavidin to chemically link the binding agent
5 to the solid support.

The sample is generally contacted with a binding agent under appropriate conditions so that GPI-PLD present in the sample can bind to the binding agent. GPI-PLD
10 activity can be determined by employing a suitable substrate, such as glycosylphosphatidylinositol which has a phosphodiester bond cleaved by GPI-PLD to release phosphatidic acid and a GPI-anchor, and monitoring the enzymatic reaction, e.g. by following the amount of
15 substrate or reaction product(s), in the assay system. This process can be facilitated by labelling the substrate, and detecting the reduction in the label on the substrate or the increase of the label in a reaction product.

20 In the case of determinations of the amount of GPI-PLD in the sample (rather than its activity), the fractional occupancy of the binding sites of the binding agent can then be determined using a developing agent or agents.
25 The developing agent can be used in a competitive method in which the developing agent competes with the analyte for occupied binding sites of the binding agent (e.g. using a labelled analogue of the analyte), or non-competitive method, in which the labelled developing
30 agent binds analyte bound by the binding agent or to occupied binding sites (e.g. using an antibody with appropriate binding specificity). Both methods provide an indication of the number of the binding sites occupied

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

by the analyte, and hence the concentration of the analyte in the sample, e.g. by comparison with standards obtained using samples containing known concentrations of the analyte.

5

Typically, the substrates or developing agents are tagged with a label or reporter molecule which are directly or indirectly generate detectable, and preferably measurable, signals. The linkage of reporter molecules

10 may be directly or indirectly, covalently, e.g. via a peptide bond or non-covalently. Linkage via a peptide bond may be as a result of recombinant expression of a gene fusion encoding antibody and reporter molecule. Any method known in the art for separately conjugating the
15 antibody to the detectable moiety may be employed, including those methods described by Hunter et al, Nature 144:945, 1962; David et al, Biochemistry 13:1014, 1974; Pain et al, J. Immunol. Meth. 40:219, 1981; and Nygren, J Histochem. and Cytochem. 30:407, 1982.

20

One favoured mode is to covalently link of each species of substrate or developing agent with an individual fluorochrome, phosphor or laser dye with spectrally isolated absorption or emission characteristics.

25 Suitable fluorochromes include fluorescein, rhodamine, luciferin, phycoerythrin and Texas Red. Suitable chromogenic dyes include diaminobenzidine. Other detectable labels include radioactive isotopic labels, such as ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{126}I , or $^{99\text{m}}\text{Tc}$, and enzyme labels
30 such as alkaline phosphatase, β -galactosidase or horseradish peroxidase, which catalyze reactions leading to detectable reaction products and can provide amplification of signal.

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

Other reporters include macromolecular colloidal particles or particulate material such as latex beads that are coloured, magnetic or paramagnetic, and
5 biologically or chemically active agents that can directly or indirectly cause detectable signals to be visually observed, electronically detected or otherwise recorded. These molecules may be enzymes which catalyze reactions that develop or change colours or cause changes
10 in electrical properties, for example. They may be molecularly excitable, such that electronic transitions between energy states result in characteristic spectral absorptions or emissions. They may include chemical entities used in conjunction with biosensors.

15 As mentioned above, the substrates or developing agents are labelled (e.g. with radioactive, fluorescent or enzyme labels) so that they can be detected using techniques well known in the art. Thus, radioactive
20 labels can be detected using a scintillation counter or other radiation counting device, fluorescent labels using a laser and confocal microscope, and enzyme labels by the action of an enzyme label on a substrate, typically to produce a colour change.

25 **Examples**

It has been established in SLE patients that autoantibodies are present against Apo-A1 and SLE is considered to be a prime model for premature coronary
30 heart disease. The linkage to coronary heart disease has not been established in the prior art, but antibodies against the ApoA1-complex could interfere with the delivery of GPI-PLD to the tissues, having a similar

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

clinical effect to the Apo-A1 deficient patients. These linkages suggest that deficiencies of GPI-PLD, in addition to mediating insulin resistance, also mediate deficiencies of the IPG mediated growth factors whose diminished activity gives rise to coronary heart disease. There is therefore a linkage between diabetic complications, SLE and congenital disorders of Apo-A1 as all involve a reduction in GPI-PLD levels in target tissues.

10

In order to test this hypothesis, a comparison was made of GPI-PLD plasma levels in a number of autoimmune disorders. The GPI-PLD levels in patients with SLE and Sjogren's syndrome was measured and compared to control groups, namely normal patients and patients with rheumatoid arthritis. As shown in Figure 2, the GPI-PLD levels in patients with both SLE and Sjogren's syndrome were statistically elevated, consistent with the disclosure herein that, in these conditions, autoantibodies inhibit or prevent delivery of GPI-PLD to the tissues and lead to a build-up of GPI-PLD in the blood stream. Thus, this creates a paradoxical deficiency in that such patients have high plasma levels of GPI-PLD and corresponding deficiency in tissue.

25

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

References:

The references mentioned herein are all incorporated by reference in their entirety.

- 5 Huang et al, US Patent No: 5,418,147.
- Tsang et al, FASEB J. (supp), 6:A1922, 1992.
- Scallon et al, Science, 252:446-448, 1991.
- 10 Hoener et al, Eur. J. Biochem., 206:747-757, 1992.
- Heller et al, Eur. J. Biochem., 224:823-833, 1994.
- 15 Rademacher et al, Brazilian J. Med. Biol. Res., 27:327-341, 1994.
- Lin et al, J. Cell Biol., 115:220a, 1991.
- 20 Thompson et al, Nucleic Acid Research, 22:4673-4680, 1994, with algorithm from Higgins et al, CABIOS, 8(2):189-191, 1992.
- Caro et al, Biochem. Molec. Med., 61:214-228, 1997.
- 25 O'Brien et al, Circulation, 99: 2876-2882, 1999.
- Merrill et al, Arthritis & Rheumatism, 38:1655-1659, 1995.
- 30 Borba et al, Arthritis & Rheumatism, 43: 1033-1040, 2000.

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

Claims:

1. Use of GPI-PLD for the preparation of a medicament for the treatment of conditions characterised by atherosclerosis.
- 5
2. Use of a nucleic acid molecule encoding GPI-PLD for the preparation of a medicament for the treatment of conditions characterised by atherosclerosis.
- 10
3. The use of claim 1 or claim 2, wherein the atherosclerosis is caused by a failure to produce GPI-PLD, a failure to deliver GPI-PLD, or by the presence of autoantibodies to either GPI-PLD or Apo-A1.
- 15
4. The use of claim 1 or claim 2, wherein the atherosclerosis is the result of an autoimmune condition.
5. The use of claim 1 or claim 2, wherein the atherosclerosis results from a loss in GPI-PLD activity.
- 20
6. Use of a host cell capable of expressing and secreting GPI-PLD in the preparation of a medicament for the treatment of conditions characterised by atherosclerosis.
- 25
7. The use of any one of the preceding claims, wherein the condition is type 1 diabetes, a condition characterised by ApoA1 deficiency, a cardiovascular disorders such as coronary artery disease (CAD), systemic lupus erythematosus (SLE) or Sjogren's syndrome.
- 30
8. A kit comprising a composition including GPI-PLD for the treatment of conditions characterised by

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

atherosclerosis.

9. A method of diagnosing a patient who has or at risk
of developing a condition characterised by
5 atherosclerosis, the method comprising determining the
amount of GPI-PLD and/or GPI-PLD activity in a sample
obtained from the patient.

10. The method of claim 9, wherein the method comprises
10 the steps of:

(a) contacting a sample obtained from the patient
with a solid support having immobilised thereon a binding
agent having binding sites specific for GPI-PLD;

(b) determining the amount of GPI-PLD or the
15 activity of GPI-PLD which binds to the binding agent.

11. The method of claim 10, wherein the method further
comprises the step of:

(c) correlating the value obtained in step (b) with
20 measurements obtained from control subjects to determine
whether the patient has or is at risk of developing the
condition.

12. The method of any one of claims 9 to 11, wherein the
25 condition is type 1 diabetes, a condition characterised
by ApoA1 deficiency, a cardiovascular disorders such as
coronary artery disease (CAD), systemic lupus
erythematosus (SLE) or Sjogren's syndrome.

30

WO 02/02756

PCT/GB01/02803

1/3

Top: protein produced from cDNA clone A1 human liver sequence PCT/GB99/04399.
Mid: protein produced from Roche patent bovine liver sequence
Bot: protein produced from Roche patent human liver sequence

```

MSAFRLWPGLLIMLG-SLCHRGSPCGLSTHIEIGHRALEFLQLHNGRVNVRELLLEHQDA
MSAFFWSSGLLIMLG-FLCPRSSPCGISTHIEIGHRALEFLHLQDSSINVKELLRHHQDA
MSAFRLWPGLLIMIVMASLCHRGSSCGLSTHIEIGHRALEFLHLHNGHVNKELLLEHQDA
      ↑
YQAGIVFPDCFYPSICKGGKFDHVSSESTHWTPFLNASVHYIARENYPWFWEKDEKLVAFV
YQAGSVFPDSFYPSICERQGFHDVSESTHWTPFLNASVHYIRKNYPLWDEDETEKLVAFV
YQAGTVFPDCFYPSLCKGGKFDHVSSESTHWTPFLNASVHYIARENYPWFWEKDEKLVAFV

FGITSHMAADVSWHSLGLEQGFRLTMGAIDFHGYSSEASAGDFGSDVLSQFEPFNFLYA
FGITSHRVADVNWHSGLIENGFLRTMAAIDFHNSTPEAHFAGDFGSDVLSQFEPFNFLYS
FGITSHMVADVSWHSLGLEQGFRLTMGAIDFHGYSSEASAGDFGSDVLSQFEPFNFLYA

RNVVVPKDLLGIYEKLYGRKIVITENVVDCSHIQFLEMVYEMLAIVSKLYPTYSYTKSPFL
RHWYVFAEDLLGIYRELYGRVITKKAIVDCSYLQFLEMVYEMLAIVSKLYPTYSYTKSPFL
RHWYVFPKDLLGIYEKLYGREVITENVVDCSHIQFLEMVYEMLAIVSKLYPTYSYTKSPFL

VEQFQEYFLGGLEDMAFWSTNIYHLTSFMLENGTSDCNLFPENPENLFIACGGQQRHTQG
VEQFQEYFLGGLEDMAFWSTNIYHLTSFMLENGTSDCNLFPENPENLFIACGGQQRHTQG
VEQFQEYFLGGLEDMAFWSTNIYHLTSFMLENGTSDCNLFPENPENLFIACGGQQRHTQG

SKMQKDFHRNLTSLTESVDRNINITYTERGVVFSVNSWTFDSMSFIYKALERNIRTMFIG
SKVQKNGFHNVTAAALTRNIGKHINITYKRGVFFSVDSWTFDFLFSFMYKLSERSIREMFIG
SKMQKDFHRNLTSLTENIDRNINITYTERGVVFSVNSWTFDSMSFIYKALERNIRTMFIG

GSQLSQKRVSSFLASYFLSPPYARLWANTSADLNQDGHDLVVGAPGYSRPGR.IHIGRV
SSQP-LTHVSSPAASYLSPFYTRLGWANTSADLNQDGYDLVVGAPGYSHPR.IHIGRV
GSQLSQKHISPLASYFLSPPYARLWANTSADLNQDGYDLVVGAPGYSRPGR.IHIGRV

YLIYGNLGLFPVDLDDKEAHRILEGFQPSGRFGSALAVLDFNVDGVPDLAVGAPSVGS
YLIYGNLGL-PRIDLDDKEAHRILEGFQPSGRFGSALAVLDFNVDGVPDLAVGAPSVGS
YLIYGNLGLFPVDLDDKEAHRILEGFQPSGRFGSALAVLDFNVDGVPDLAVGAPSVGS

EQLTYKAVVYVFGSKQGMSSPNITISQDICYNLGWTLLAADVNGDSEPD-LVIGSP
EKLTYKAVVYVFGSKQGMSSPNITISQDICYNLGWTLLAADVNGDSEPD-LVIGSP
EQLTYKAVVYVFGSKQGMSSPNITISQDICYNLGWTLLAADVNGDSEPD-LVIGSP

PAPGGGKQKGIIVAAFYSGPSLSDKEKLNVEAANWTVRGEEDFSWFGYSLHGVTVDNRTL
PAPGGGKQKGIIVAAFYSGSSYSREKLNVEAANWTVRGEEDFAWFGYSLHGVTVNNRTL
PAPGGGKQKGIIVAAFYSGPSLNKELNVEAANWTVRGEEDFAWFGYSLHGVTVDNRTL

LVGSPWKNASRLGHLHHRDEKSLGRVYGYFFPNQSWFTISGDKAMGKLGTSLSGGH
LAGSPWTKDTSSQGHLEFRTRDEKQSPGRVYGYFFPICQSWFTISGDKAMGKLGTSLSGGH
LVGSPWKNASRLGHLHHRDEKSLGRVYGYFFPNQSWFTIVGDKAMGKLGTSLSGGH

```

Fig. 1 (part 1 of 2)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

2/3

VLMNGTLKQVLLVGAPTYDDVSKVAFLIVTLHQGGATRMALISDAQPLLLSTFSGDRRF
VIVNGTRTQVLLVGAPTQDVVSKS - FLTMTLHQGGSTRMYELTPDSQPSLLSTFSGNRRF
VLMNGTLTQVLLVGAPTRDDVSKMAFLTMTLHQGGATRMALTSDLQPPLLSTFSGDRRF

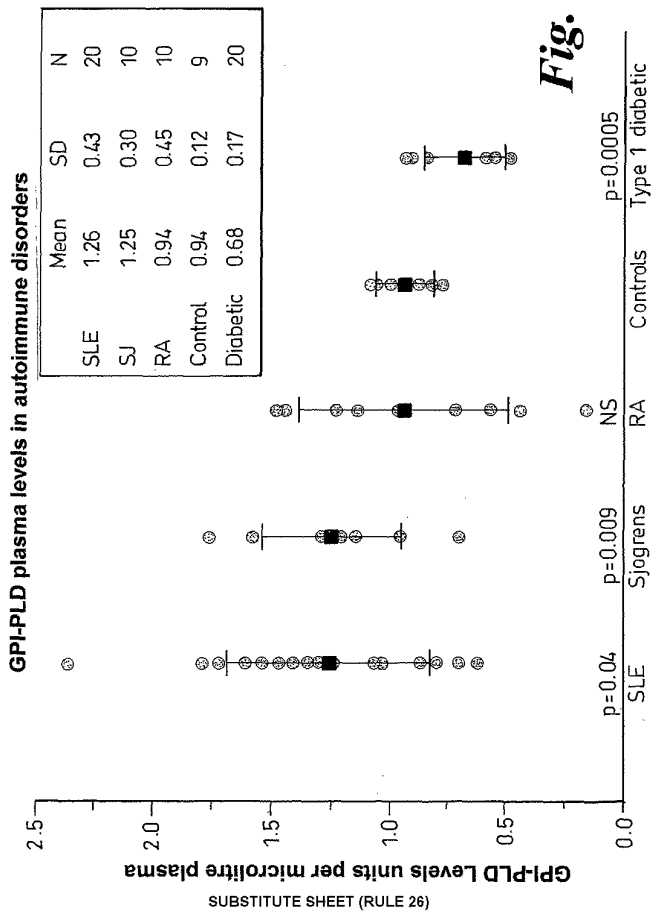
SRFGVHLHLSDLDDGLDEIIMAAPLRIADVTSGLIGGEDGRVYVYNGKETTLDGMTGKC
SRFGVHLHLSDLDDGLDEIIVAAPLRITDATAGLMGEEDGRVYVYNGKQITVGDVTGKC
SRFGVHLHLSDLDDGVDEIIVAAPLRIADVTSGLIGGEDGRVYVYNGKETTLDGMTGKC

KSWITPCPEEKAQYVLLISPEASSRFGSSLITVRSKAKNQVIAAGRSSLGARLSGALHVV
KSWVTPCPEEKAQYVLLISPEASSRFGSSVITVRSKEKNQVIAAGRSSLGARLSGVLHIY
KSWMTPCPEEKAQYVLLISPEASSRFGSSLITVRSKAKNQVIAAGRSSLGARLSGALHVV

SLGSD
RLGQD
SLGSD

Fig. 1 Part 2 of 2)

3/3



【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

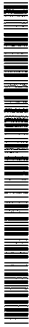
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/02756 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 38/46
48/00, G01N 33/50, A61P 9/10
- (21) International Application Number: PCT/GB01/02803
- (22) International Filing Date: 25 June 2001 (25.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0015986.3 29 June 2000 (29.06.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY COLLEGE LONDON [GB/GB]: Gower Street, London, Greater London WC1E 6BT (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report

- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): SCHOFIELD, Julian [GB/GB]; 59 Moorgreen House, Wynyatt Street, London, Greater London EC1V 7JA (GB). RADEMACHER, Thomas, William [US/GB]; Foxcombe, The Ridgeway, Boars Hill, Oxford, Oxfordshire OX1 5EY (GB).
- (88) Date of publication of the international search report:
30 May 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

- (74) Agents: KIDDLE, Simon, J. et al.; Mewburn Ellis, York House, 23 Kingsway, London, Greater London WC2B 6HP (GB).



WO 02/02756 A3

(54) Title: GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL SPECIFIC PHOSPHOLIPASE D PROTEINS FOR THE TREATMENT OR DIAGNOSIS OF ATHEROSCLEROSIS

(57) Abstract: The present invention relates to the use of GPI-PLD for the prevention and treatment of conditions characterised by atherosclerosis. In some embodiments, this process may be caused by a failure to produce GPI-PLD, for example type 1 diabetes, or deliver GPI-PLD, such as patients deficient in apolipoprotein-A1, or those patients with antibodies to either GPI-PLD or Apo-A1. In other embodiments, the atherosclerotic process may result from a loss in GPI-PLD activity, e.g. where there is a genetic modification of GPI-PLD either affecting its activity or delivery to a target tissue, thereby leading to the atherosclerotic process.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PC1/GB 01/02803
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K38/46 A61K48/00 G01N33/50 A61P9/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	O'BRIEN KEVIN D ET AL: "Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D is expressed by macrophages in human atherosclerosis and colocalizes with oxidation epitopes." CIRCULATION, vol. 99, no. 22, 8 June 1999 (1999-06-08), pages 2876-2882, XP002185518 ISSN: 0009-7322 cited in the application the whole document ---	1-12
A	US 5 418 147 A (SCALLON BERNARD J ET AL) 23 May 1995 (1995-05-23) cited in the application the whole document ---	1,2,6
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 December 2001		Date of making of the international search report 28/12/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stein, A

From PCT/ISA(2)10 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PC1/GB 01/02803
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAGUIRE ET AL: "Glycosyl phosphatidyl inositol phospholipase D activity in human serum" ANNALS OF CLINICAL BIOCHEMISTRY, BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, LONDON, GB, vol. 32, no. 1, January 1995 (1995-01), pages 74-78, XP000864653 ISSN: 0004-5632 the whole document	9-12
P, X	WO 00 39285 A (RADEMACHER THOMAS WILLIAM; UNIV LONDON (GB); SCHOFIELD JULIAN (GB)) 6 July 2000 (2000-07-06) cited in the application the whole document	1-12

1

Form PCT/ISA210 (continuation of previous sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No
PCT/GB 01/02803

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5418147	A	23-05-1995	EP 0477739 A2 JP 5076357 A	01-04-1992 30-03-1993
WO 0039285	A	06-07-2000	AU 1988300 A EP 1141334 A2 WO 0039285 A2	31-07-2000 10-10-2001 06-07-2000

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 Q 1/44	C 1 2 Q 1/44	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// C 1 2 N 9/16	C 1 2 N 9/16	D

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

(74) 代理人 100107836

弁理士 西 和哉

(74) 代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74) 代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72) 発明者 ジュリアン・ショフィールド

イギリス・グレーター・ロンドン・EC 1 V・7 J A・ロンドン・ウィニアット・ストリート・ム
ーアグリーン・ハウス・5 9

(72) 発明者 トーマス・ウィリアム・レイドメイチャー

イギリス・オックスフォードシャー・OX 1・5 E Y・オックスフォード・ボアーズ・ヒル・ザ・
リッジウェイ・フォックスコウム・(番地なし)

F ターム(参考) 4B050 CC03 DD11 LL01 LL03 LL05

4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ33 QR45 QR57 QS36

4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 CA33 DC02 NA14

ZA361 ZA451 ZB071 ZC191 ZC331 ZC351 ZC412

专利名称(译)	糖基磷脂酰肌醇特异性磷脂酶D蛋白用于治疗或诊断动脉粥样硬化		
公开(公告)号	JP2004533985A	公开(公告)日	2004-11-11
申请号	JP2002507996	申请日	2001-06-25
[标]申请(专利权)人(译)	伦敦大学学院		
申请(专利权)人(译)	伦敦大学学院		
[标]发明人	ジュリアンショフィールド トーマスウィリアムレイドメイチャー		
发明人	ジュリアン・ショフィールド トーマス・ウィリアム・レイドメイチャー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/46 A61K48/00 A61P3/06 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P37/00 A61P43/00 C12N9/16 C12Q1/44 G01N33/564 G01N33/566 G01N33/573		
CPC分类号	C12Q1/44 A61K38/00 C12N9/16 C12Y301/0405 G01N33/564 G01N33/573 G01N2333/916		
FI分类号	A61K37/54 A61K48/00 A61P3/06 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P37/00 A61P43/00.111 C12Q1 /44 G01N33/53.D G01N33/566 C12N9/16.D		
F-TERM分类号	4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B050/LL05 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063 /QQ02 4B063/QQ33 4B063/QR45 4B063/QR57 4B063/QS36 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/CA33 4C084/DC02 4C084/NA14 4C084 /ZA361 4C084/ZA451 4C084/ZB071 4C084/ZC191 4C084/ZC331 4C084/ZC351 4C084/ZC412		
代理人(译)	渡边 隆 正和青山 村山彦		
优先权	2000015986 2000-06-29 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及GPI-PLD用于预防和治疗以动脉粥样硬化为特征的病症的用途。在一些实施方案中，该过程可能是由于未能产生GPI-PLD，例如1型糖尿病，或递送GPI-PLD，例如缺乏载脂蛋白-A1的患者，或具有GPI-PLD自身抗体的患者或载脂蛋白A1。在其他实施方案中，动脉粥样硬化过程可能由GPI-PLD活性的丧失引起，例如，其中存在GPI-PLD的遗传修饰，其影响其活性或递送至靶组织，从而导致动脉粥样硬化过程。

		(P2004-5339 (43) 公表日 平成16年11月11日(2004.11
(61) Int. Cl. 7	FI	テーマコード(参考)
A61K 38/46	A61K 37/54	4B050
A61K 48/00	A61K 48/00	4B063
A61P 3/06	A61P 3/06	4C084
A61P 3/10	A61P 3/10	
A61P 9/00	A61P 9/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 58 頁) 最終頁に		
(21) 出願番号	特願2002-507996(P2002-507996)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成13年6月25日(2001.6.25)	ユニバーシティ カレッジ ロンドン
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月26日(2002.12.26)	イギリス国, ロンドン, ガワー、スト!
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/002803	ト(番地なし)
(87) 国際公開番号	W02002/002756	(74) 代理人
(87) 国際公開日	平成14年1月10日(2002.1.10)	弁理士 志賀 正武
(31) 優先権主張番号	0015986.3	(74) 代理人
(32) 優先日	平成12年6月29日(2000.6.29)	弁理士 高橋 昭男
(33) 優先権主張国	英国(GB)	(74) 代理人
		100089037
		弁理士 渡邊 隆
		(74) 代理人
		100101465
		弁理士 青山 正和
		(74) 代理人
		100084400
		弁理士 鈴木 三義