

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 525038

(P2003 - 525038A)

(43)公表日 平成15年8月26日 (2003.8.26)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-コード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		C 0 7 K 14/82	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/82		16/32	4 B 0 6 3
16/32		19/00	4 H 0 4 5
19/00		C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 75数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 558738(P2001 - 558738)

(86) (22)出願日 平成13年2月8日 (2001.2.8)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月8日 (2002.8.8)

(86)国際出願番号 PCT/CA01/00133

(87)国際公開番号 W001/059459

(87)国際公開日 平成13年8月16日 (2001.8.16)

(31)優先権主張番号 60/181,091

(32)優先日 平成12年2月8日 (2000.2.8)

(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 ユニバーシティー オブ プリティッシュ
コロンビア

カナダ国 プリティッシュ コロンビア州
バンクーバー イースト モール 111 -
2386 インダストリー リエゾン オフィ
ス

(72)発明者 チェン ニック

カナダ国 プリティッシュ コロンビア州
コキトラム ユニット 66 パノラマ
ドライブ 2979

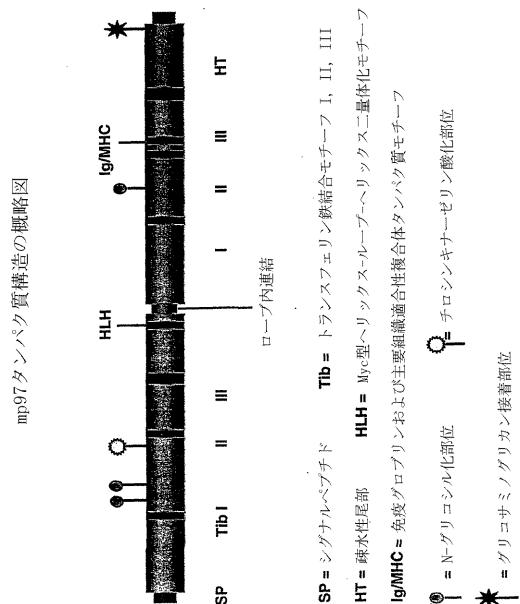
(74)代理人 弁理士 清水 初志 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 治療薬をスクリーニングするための組成物および方法

(57)【要約】

血液脳関門を越えて薬剤を輸送するための方法およびモデル、抗体およびアンチセンスオリゴヌクレオチドの調製、マウス p97 を研究するための実験系の調製、マウス p97 の発現および/または活性を調節する物質の単離、ならびに診断的および治療的な適用における、マウス p97 核酸配列およびそれらのタンパク質および修飾因子の使用を記載する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルツハイマー病（AD）を治療するための治療薬をスクリーニングするための方法であって、mp97のレベルが高いマウスに薬剤を投与する段階、およびmp97のレベルを測定する段階を含み、mp97のレベルの低下によって該薬剤がアルツハイマー病の治療に有用でありうることが示される方法。

【請求項2】 mp97のレベルをマウスの血清中で測定する、請求項1記載の方法。

【請求項3】 mp97のレベルを、放射免疫アッセイ法、競合アッセイ法または酵素結合免疫吸着アッセイ法を用いて測定する、請求項2記載の方法。

【請求項4】 薬剤が血液脳関門を通過する能力を評価するための方法であって、

(1) 有効量の

(a) マウスmp97と関連のある薬剤、または

(b) マウスmp97を結合する化合物と関連のある薬剤
を投与する段階、および

(2) 神経系における該薬剤のレベルを試験する段階
を含む方法。

【請求項5】 治療薬が神経症状を治療する能力を評価する方法であって、

(1) マウスに有効量の

(a) マウスmp97と関連のある薬剤、または

(b) マウスmp97を結合する化合物と関連のある薬剤
を投与する段階、および

(2) 投与の結果をモニターする段階
を含み、神経症状における改善によって薬剤が治療効果を有することが示される方法。

【請求項6】 神経症状が、癌、神経変性疾患、脱髄疾患、筋萎縮側索硬化症、細菌感染症およびウイルス感染症、欠乏性疾患、てんかん、精神病、疼痛ならびに神経障害からなる群より選択される、請求項5記載の方法。

【請求項7】 神経症状がアルツハイマー病である、請求項5記載の方法。

【請求項8】 以下の段階を含む、マウスp97タンパク質の活性または発現に影響を及ぼす化合物を同定するための方法：

- (a)被験化合物をマウスp97タンパク質またはマウスp97タンパク質をコードする核酸とともにインキュベートする段階、ならびに
- (b)マウスp97タンパク質の活性量または発現量を測定し、かつ対照と比較する段階であって、対照と比較したマウスp97タンパク質の活性または発現における変化によって、被験化合物がマウスp97タンパク質の活性または発現に影響を及ぼすことが示される段階。

【請求項9】 p97が細胞内で発現される、請求項8記載の方法。

【請求項10】 細胞がp97をレポーター遺伝子との融合タンパク質として発現する、請求項9記載の方法。

【請求項11】 以下の段階を含む、マウスp97と結合しうる物質を同定する方法：

- (a)マウスp97と被験物質との間に複合体を形成することができる条件下で、マウスp97および被験物質を反応させる段階、ならびに
- (b)マウスp97と被験物質との複合体、遊離物質または非複合型マウスp97に関してアッセイする段階であって、複合体の存在によって、被験物質がマウスp97を結合できることが示される段階。

【請求項12】 p97が配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する、請求項1から11のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】 p97の発現が増大している、トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項14】 p97の発現が減少している、トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項15】 動物がマウスである、請求項13または14記載のトランスジェニック動物。

【請求項16】 治療薬を試験するための、請求項13から15のいずれか一項記載のトランスジェニック動物の使用。

【請求項17】 神経症状を治療するための治療薬を試験するための、請求

項16記載の使用。

【請求項18】 アルツハイマー病を治療するための治療薬を試験するための、請求項17記載の使用。

【請求項19】 配列番号：2のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有する、実質的に単離されたmp97タンパク質。

【請求項20】 配列同一性が少なくとも90%である、請求項19記載の実質的に単離されたmp97タンパク質。

【請求項21】 配列同一性が100%である、請求項19記載の実質的に単離されたmp97タンパク質。

【請求項22】 配列番号：2のアミノ酸1位から718位と少なくとも80%の配列同一性を有する、実質的に単離されたmp97タンパク質。

【請求項23】 配列同一性が少なくとも90%である、請求項22記載の実質的に単離されたmp97タンパク質。

【請求項24】 配列同一性が100%である、請求項22記載の実質的に単離されたmp97タンパク質。

【請求項25】 配列番号：1と少なくとも80%の配列同一性を有するmp97タンパク質をコードする、実質的に単離された核酸配列。

【請求項26】 配列番号：1と少なくとも90%の配列同一性を有するmp97タンパク質をコードする、実質的に単離された核酸配列。

【請求項27】 配列番号：1と少なくとも80%の配列同一性を有するmp97タンパク質をコードする、実質的に単離された核酸配列。

【請求項28】 請求項19から24のいずれか一項記載のタンパク質に結合する抗体。

【請求項29】 請求項25から28のいずれか一項記載の核酸配列に対して相補的な、アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本発明は、治療薬を試験するための、およびマウスp97を調節する薬剤をスクリーニングするための方法および実験モデルに関する。

【0002】**発明の背景**

悪性腫瘍、アルツハイマー病、パーキンソン病、細菌感染およびウイルス感染、ならびに欠乏症（例えば、ウェルニッケ症および栄養性多発性神経障害）のような、脳の疾患の治療に対する主要な障害は、血液脳関門を越えて治療薬を送達するための、有効かつ非侵襲性の手段がないことである。血管から脳への薬物および溶質の輸送は、内皮の密着結合および内皮細胞における水性の孔の欠如によって、脳の毛細管内皮壁の透過性が限られていることにより制限されている（Pardridge, W.M.ら、J. Pharmacol. & Expt. Therapeut. 253: 884-891, 1990）。Jefferiesら（PCT国際公開公報第94/01463号）は、それに結合した治療薬を、血液脳関門、血液眼関門、および血液胎盤関門を越えて輸送する「シャトル（shuttle）」タンパク質である、p97の使用を開示する。

【0003】

ヒトp97（hp97、または、メラノトランスフェリンまたはヒト黒色腫瘍関連抗原として公知である）は、ヒト皮膚癌と関連する最初の細胞表面マーカーの一つである（Brownら、J. Immunol., 127: 539-546, 1981; Hellstromら、Int. J. Cancer 31: 553-555, 1983）。P97は、脊椎動物で見出された、密接に関連する鉄結合タンパク質の群に属する（Rose, T.M. ら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 83:1261, 1986）。このファミリーは、血清トランスフェリン、ラクトフェリン、および鳥類の卵白オボトランスフェリンを含む。p97は、シアロ糖タンパク質であり、ヒトにおける3番染色体にコードされている（Plowmanら、Nature 303: 70-72, 1983）。ヒトp97およびラクトフェリンは40%の配列相同性を共有している。しかしながら、p97は、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカーにより細胞膜に接続されることが示されている点において、トランスフェリン

ファミリーの中で固有であると考えられる (Alemanyら、J. Cell Sci. 104: 115 5-1162; Food ら、J. Biol. Chem. 269: 3034-3040, 1994)。

【0004】

肝臓細胞、腸の上皮細胞、胎児細胞、腸細胞、臍帯、胎盤および汗腺管を含む、培養された通常の細胞型でp97が発現する。さらに最近、p97は、ヒトの脳の正常な毛細管内皮細胞、およびアルツハイマー病患者の反応性ミクログリアで発現することが示された (PCT国際公開公報第94/01463号; Jefferiesら)。さらに、GPIアンカーを欠くp97の可溶型は、アルツハイマー病患者の血清および他の体液において、増加していることが見出されている (PCT国際公開公報第94/01463号; PCT出願第CA96/00587号; Kennardら、Nature Medicine 2: 1230-1235, 1996)。p97は、Tfおよびその受容体に左右されない、細胞の鉄の取り込みのための新しい経路を提供することもまた示されている (米国特許第5,981,194号およびKennard 1995)。本発明者らはまた、p97およびTRがヒト脳の毛細管系で同時に発現するのに対して、Tfが主にグリア細胞に局在することも示しており (米国特許第5,981,194号およびRothenberger 1996)、これは、MTfが脳内の鉄輸送において役割を果たしうることを示唆する。さらに、脳の内皮細胞で発現されるp97はPI-PLC消化に耐性であり、それはTRに結合したp97の可溶型であることを示唆する。さらに、アミロイド斑と特異的に結合する反応性ミクログリアは、アルツハイマー病の脳においてp97を発現し (米国特許第5,981,194号およびJefferies 1996)、かつp97の血清レベルならびにCSFのレベルは、アルツハイマー病患者において著しく上昇する (米国特許第5,981,194号およびKennard 1996、前記)。これらのデータは、反応性ミクログリアから生じるp97が、血液脳関門に存在する特異的な輸送系を横断することによって血清中に現れることを示唆し、さらに注入される場合には血流から血液脳関門への経細胞輸送 (transcytosis) の可能性も暗示する。多数の研究 (Jefferiesら、Trends in Cell Biology 6: 223-228, 1996に要約される) は、血液脳関門を超えるイオンの経細胞輸送において、積極的な役割を果たしうることを示唆する。

【0005】

ヒトp97はクローニングされ、発現されて (米国特許第5,262,177号、第5,141

,742号)、治療薬がそれに結合または連結される治療プロトコールでの使用に利用可能である。しかしながら、p97に関連する様々な治療薬の、前臨床スクリーニングおよびインビボの試験は、安価で便利な相同性試験系がないことにより妨げられている。例えば、マウスモデルにおいてヒトp97を用いる非相同試験系を使用できるが、ヒトにおいて血液脳関門を越えて治療物質を輸送するためにヒトp97が使用されると考えられる、相同な臨床状況を反映すると考えられる相同性試験系を有することは、有用と考えられる。特異的なp97-薬剤の組み合わせの有効性についてより正確な情報を提供し、かつ潜在的な治療のための迅速なスクリーニング系を提供するために、相同な動物モデルにおいてp97が連結した治療薬を試験する必要性がある。

【0006】

また、インビボのp97の生理学的な役割をさらに解明するために、マウス系においてp97の「ノックアウト」または過剰発現実験を行うために、相同なマウスp97を有することが望ましいと考えられる。

【0007】

発明の概要

一つの局面において、本発明は、配列番号：2のアミノ酸配列を持つ単離されたマウスp97（下記において「mp97」）ポリペプチド、ならびにそのアミノ酸配列の一部を含むポリペプチド、およびそれらの産生のための方法を提供する。好ましい態様は、膜貫通部分を欠き、配列番号：2のアミノ酸1位～718位を含む、切断されたmp97である。

【0008】

別の局面において、本発明は配列番号：1のヌクレオチド配列を持つmp97タンパク質をコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0009】

本発明の別の局面は、血液脳関門を通過して治療効果を発揮する能力に関して、治療組成物をスクリーニングするための方法を提供する。

【0010】

本発明は、p97の修飾因子(modulator)を同定し、かつそのインビボでの役割

を研究するための、細胞および動物を含む実験モデルも含む。

【0011】

発明の詳細な説明

本発明は、mp97ポリペプチド、それらをコードするポリヌクレオチド、ならびに治療薬を評価し、かつp97を調節する物質を同定するためのモデル系におけるそれらの使用法に向けられる。

【0012】

1. マウスp97ポリヌクレオチド

一局面において、本発明は配列番号：1に示される、p97タンパク質を含むmp97ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド配列を提供する。配列番号：1の解析は、図式的には図2に示される以下の特徴を明らかにした：

1. 1位～63位：5'非翻訳写領域（UTR）；
2. 64位～66位：翻訳開始コドンATG；
3. 64位～2277位：マウスp97mp97タンパク質のオープンリーディングフレーム（ORF）；
4. 1063位：731bpのRT-PCR産物における野生型である、EST2における単一のヌクレオチドC欠失；
5. 2278位～2280位：翻訳終止コドンTGA；
6. 2281位～4068位：3'UTR；
7. 3299位～3304位：推定の選択的（alternative）ポリアデニル化シグナルI、AATAAC；
8. 3544位：選択的ポリアデニル化部位I；
9. 3106位～3111位：推定のポリアデニル化シグナルII、AATGAA；
10. 3128位：選択的ポリアデニル化部位II；
11. 4028位～4033位：EST2転写物の推定の選択的ポリアデニル化シグナルAATAA A；
12. 4048位：EST2転写物のポリアデニル化部位；
13. 4049位～4068位：ポリアデニル化尾部（A=20）；および
14. 491位～1221位：野生型配列（1063位の単一のヌクレオチドC欠失のない、

マウス黒色腫細胞株JB/MS由来の731bpのRT-PCR産物との重複

【0013】

本発明者らは、下記の実施例1に詳細に記載する、mp97cDNAをコードするDNAを単離した。これはヒトp97cDNAの3'領域中の領域に79%のcDNA相同性を有する、565塩基対断片を同定するために、EST配列を含むデータベースの使用を伴った。

(データベースの記録は565塩基対のESTによってコードされる、いかなるポリペプチドも開示せず、かつもしあるとしても、リーディングフレームと考えられるものを示さない。)不完全なcDNA部分を伸長するために、ポリdTおよび推定上のmp97cDNAから設計された内部のプライマーを用いて、マウス黒色腫細胞株JB/MS由来のポリA+RNAにRACE PCRを行った。または、ポリA+RNAを用いてラムダgt10のような適切な宿主で生成された、一つまたは複数のcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって、mp97cDNAを得ることができた。mp97を発現する細胞株または組織は、細胞質のRNA、好ましくはポリA+RNAをヒトp97cDNAにハイブリダイズする能力に関してスクリーニングすることによって、同定される。ヒトp97cDNAをコードする配列を含むクローンは、寄託番号CRL 8985 (PMTp97b) およびCRL 9304 (pSVp97a) の下、米国菌培養収集所 (American Type Culture Collection : ATCC) に寄託されている。mp97cDNAを含むクローンは、推定上のmp97cDNA断片、および/または完全長ヒトp97cDNAから生成された、標識された核酸プローブを用いたストリンジントな条件下でハイブリダイズする能力によって、同定される。

【0014】

本発明の好ましい態様は、mp97コード領域である、配列番号：1のヌクレオチド64位～2277位からなる群より選択されたヌクレオチド配列を含む、単離されたDNAを提供した。シャトルとして作用し、血液脳関門を越えて薬剤を輸送することができるmp97タンパク質の一部をコードする、配列番号：1のDNA断片もまた、本発明の範囲に含まれる。そのようなDNA断片は、血液脳関門を通過することができるか否かを判定するための、インビトロまたはインビボのモデルにおいて、適切な系でコードされたポリペプチドを発現し、標識し、かつ試験することによって同定される。これら全ての段階の方法を以下に示す。産生および使用の他

の好ましい態様および方法を、以下にさらに詳細に述べる。本発明のmp97ポリヌクレオチドまたは核酸は、cDNA、化学的に合成されたDNA、PCRにより単離されたDNA、ゲノムDNAおよびそれらの組み合わせを含む。ゲノムp97DNAは、標準的な技術を用いて本明細書に開示されたマウスp97cDNAへのハイブリダイゼーションによってゲノムDNAライブラリーから単離されてもよい。mp97DNAから転写されたRNAもまた、本発明に含まれる。

【0015】

従って、本発明はmp97タンパク質が配列番号：1と少なくとも80%の配列同一性を有する、mp97タンパク質をコードする実質的に単離された核酸配列を提供する。好ましくは核酸配列は以下を含む：

- (a) TがUでありうる、配列番号：1に示された核酸配列；
- (b) (a)の核酸配列に相補的である核酸配列；
- (c) (a)もしくは(b)の核酸配列と実質的な配列同一性を有する核酸配列；
- (d) (a)、(b)もしくは(c)の核酸配列の類似体である核酸配列；または
- (e) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、(a)、(b)、(c)または(d)の核酸配列にハイブリダイズする核酸配列。

【0016】

「実質的な配列同一性を有する配列」という用語は、(a)または(b)の配列に由来する、わずかなまたは取るに足らない配列変化を有する、核酸配列を意味し、すなわちこの配列は、実質的に同じ様式で機能する。この変化は局所変異または構造的変更に起因しうる。実質的な同一性を有する核酸配列は、配列番号：1に示される核酸配列と、少なくとも65%、より好ましくは少なくとも85%、かつ最も好ましくは90%～95%の同一性を有する核酸配列を含む。

【0017】

「ハイブリダイズする配列」という用語は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、(a)、(b)、(c)、または(d)の配列にハイブリダイズすることができる核酸配列を意味する。DNAハイブリダイゼーションを促進する適切な「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、当業者に公知であり、「分子生物学における最新プロトコール (Current Protocols in Molecular Bio

logy)」 John Wiley& Sons, N.Y. (1989)、6.3.1.~6.3.6.に見出されうる。例えば、以下を用いてよい：約45 で6.0×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (SSC)の後に、50 で2.0×SSC；50 ~65 で0.2×SSC；または44 ~50 で2.0×SSCの洗浄を行う。ストリンジェンシーは洗浄段階で用いられた条件に基づいて選択されてもよい。例えば、洗浄段階における塩濃度は、50 で約0.2×SSCの高ストリンジェンシーから選択されうる。さらに、洗浄段階における温度は、約65 で高ストリンジェンシー条件で有りうる。

【0018】

「類似体である核酸配列」という用語は、(a)、(b)、または(c)の配列と比較して変更されている塩基配列であって、ここで本明細書に記載するように、変更によって配列の有用性は変化しない塩基配列を意味する。変更された配列または類似体は、(a)、(b)または(c)において示された配列上の特性を改良しているかもしれない。類似体を調製するための変更の一例は、配列表：1に示された配列の天然に存在する塩基（すなわち、アデニン、グアニン、シトシン、またはチミン）のうちの一つを、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、6-メチル、2-プロピルおよび他のアルキルアデニン、5-ハロウラシル、5-ハロシトシン、6-アザウラシル、6-アザシトシンおよび6-アザチミン、シュドウラシル、4-チオウラシル、8-ハロアデニン、8-アミノアデニン、8-チオールアデニン、8-チオールアルキルアデニン、8-ヒドロキシルアデニンおよび他の8-置換アデニン、8-ハログアニン、8-アミノグアニン、8-チオグアニン、8-チオールアルキルグアニン、8-ヒドロキシルグアニン、および他の8-置換グアニン、他のアザおよびアザウラシル、チミジン、シトシン、アデニン、またはグアニン、5-トリフルオロメチルウラシルならびに5-トリフルオロシトシンなどの、変更された塩基で置換することである。

【0019】

変更の別の例は、リン酸バックボーン中の変更されたリンまたは酸素のヘテロ原子、配列番号：1に示された核酸分子における、短鎖のアルキルもしくはシクロアルキルの間糖 (intersugar) 連結、または短鎖のヘテロ原子もしくは複素環式の間糖連結を含む。例えば、核酸配列は、ホスホロチオエート、ホスホトリエ

ステル、メチルホスホネート、およびホスホロジチオエート含んでもよい。

【0020】

本発明の核酸分子の類似体のさらなる例は、ペプチド核酸（PNA）であって、ここでDNA（またはRNA）中のデオキシリボース（またはリボース）リン酸バックボーンは、ペプチドにおいて見出されるものと同様のポリアミドバックボーンで置換される（P.E. Nielsenら、Science 1991、254、1497）。PNA類似体は、酵素による分解に耐性があり、かつインビボおよびインビトロにおいて長期の寿命を有することが示されている。PNAはまた、PNA鎖とDNA鎖との間に電荷の反発がないため、相補的なDNA配列により強く結合する。他の核酸類似体は、ポリマーバックボーン、環式バックボーン、または非環式バックボーンを含んでいるヌクレオチドを含んでもよい。例えば、ヌクレオチドは、モルフォリノバックボーン構造（米国特許第5,034,506号）を有してもよい。類似体はまた、レポーター基、核酸配列の薬物動態学的または薬力学的な特性を改良するための基のような基を含んでもよい。

【0021】

II. マウスp97ポリペプチド

配列番号：1のcDNAによってコードされるmp97タンパク質のアミノ酸配列を、配列番号：2に示す。cDNA配列から予測されるマウスp97タンパク質は、分子量81,294Daでかつ理論上のpIが5.69であり、738アミノ酸からなる。N末の最初の19アミノ酸、MRLLSVTFWLLLLSLRTVVCは、ニールソン（Nielsen）H.ら、Protein Engineering、10、1~6 1997の方法により、予測されるシグナルペプチドである。最も可能性の高いこのシグナルペプチドの切断部は、19位と20位の間、VVC-VMにあり、分子量が79,061Daであり、かつpIが5.59である成熟タンパク質を産生する。アミノ酸配列の解析により、図3に図式的に示す、保存された配列および潜在的な機能的モチーフが明らかになった。

I. 一次構造の特徴：

1. 19アミノ酸シグナルペプチド：

MRLLSVTFWLLLLSLRTVVC (1-19)

2. N末端ローブ（20位～356位）；

3.9アミノ酸ローブ間ドメイン (357位~365位) ;

4.C末端ローブ (366位~738718位) ;

5.疎水性尾部

VPLLALLLLTLAAGLLPRVL (719-738)

および

6.N末端ローブとC末端ローブの間で保存された領域 : (23位~356位、366位~705位)

【0022】

II. 他の潜在的な機能的モチーフ

1.N-グリコシル化部位 : NVTI (118位~121位)

NRTV (135位~138位)

NASC (515位~518位)

2.トランスフェリンイオン結合モチーフ :

モチーフ I N-ローブ YYAVAVVRRN (107-116)

C-ローブ YFVVAVARRD (451-460)

モチーフ II N-ローブ YSGAFRCLAEGAGDVAF (210-226)

C-ローブ YSGAFRCLVEHAGDVAF (556-572)

モチーフ III N-ローブ DFQLLCDGSRADITEWRRCHLAKVPAHAVV

(252-282)

C-ローブ —————DYELLCPNGARAEVDQFQACN

LAQMPSHAVM (598-628)

3.チロシンキナーゼリン酸化部位 : KSPLERYY (201位~208位)

4.Myc型ヘリックス-ループ-ヘリックス二量体化モチーフ : STLELVPIA (328位~336位)

5.免疫グロブリンおよび主要組織適合性複合体タンパク質モチーフ : FRCLVEH (560位~566位)

6.グリコサミノグリカン付着部位 : SGAG (710位~713位)

7.疎水性尾部

VPLLALLLLTLAAGLLPRVL (719-738)

【0023】

ヒトおよびマウスにおけるp97タンパク質は高度に保存されている。それらは、アミノ酸配列において83%の同一性および89%の類似性を共有している。それらの全体構造は類似しており（図4に図式的に示される）、両方とも19アミノ酸のシグナルペプチドで始まり、短いローブ間ドメインによって分離された、2つの保存された半領域（half）の後には、C末端に20個～27個の疎水性アミノ酸が続いている。シグナルペプチドおよび疎水性尾部は、配列が類似している。より重要なことに、3つのトランスフェリン鉄結合モチーフおよびタンパク質内におけるそれらの位置が高度に保存されており、マウスおよびヒトにおいてp97タンパク質が鉄の結合および輸送において役割を担っていることを示唆している（図5参照）。

【0024】

本発明のmp97ポリペプチドは、実施例2における細菌または哺乳類細胞培養発現系において、ポリペプチドをコードするcDNAを含むベクターを発現させることによって得られた。本発明の範囲内の他のp97ポリペプチドを得るための方法を以下に提示する。

【0025】

従って、本発明は配列番号：2のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有する、実質的に単離されたmp97タンパク質を提供する。

【0026】

本発明の文脈内において、p97およびその誘導体は、血液脳関門を越えて薬剤を輸送する能力を維持する、様々な構造的な形状の初期（primary）タンパク質を含んでもよい。例えば、p97タンパク質は、酸性もしくは塩基性の塩の形状であっても、または中性の形状であってもよい。さらに、各アミノ酸残基は、酸化または還元によって変更されてもよい。さらに、様々な置換、欠失、または付加が、アミノ酸またはDNA核酸配列になされてもよく、その正味の効果は、mp97の生物学的活性または免疫原性を維持することである。コード縮重によれば、例え

ば、同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列において多数の変化がありうる。

【0027】

本発明の範囲内の他のmp97誘導体は、以下で議論するように、タンパク質またはポリペプチドのような他の分子と共に、mp97の結合体を含む。これは例えば、mp97の精製もしくは同定を容易にするための、N末端もしくはC末端融合タンパク質、または内的に標識されたタンパク質の合成により、達成されてもよい（米国特許第4,851,341号を参照、またHoppら、Bio/Technology 6:1204、1988も参照）。融合タンパク質は、前述したように本発明の組成物における使用のために調製されてもよい。融合タンパク質は、組換え技術によって、p97のN末端もしくはC末端またはその他の部分、および望ましい生物学的または治療的な機能を有する、選択されたタンパク質の配列を融合することによって、調製されてもよい。結果として生じる融合タンパク質は、選択されたタンパク質と融合された、mp97またはその一部を含む。融合タンパク質を調製するために選択されうるタンパク質の例には、 γ -インターフェロン、腫瘍壊死因子、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、GM-CSF、CSF-1およびG-CSFのようなリンフォカインが含まれる。特に好ましい分子には、神経成長因子および免疫グロブリン分子のFc部分が含まれる。

【0028】

上記の分子をコードする配列は、例えば、米国菌培養収集所（the American Type Culture Collection：ATCC、Rockville Maryland）、および英国バイオテクノロジー社（the British Biotechnology Limited：Cowley、Oxford England）を含む、配列をコードするプラスミドを収容する寄託機関を含む、様々な供給源から通常得ることができる。そのようなプラスミドの例は、BBG 12（127アミノ酸の成熟タンパク質をコードするGM-CSF遺伝子を含む）、BBG 6（ γ -インターフェロンをコードする配列を含む）、ATCC第39656号（TNFをコードする配列を含む）、ATCC第20663号（ γ -インターフェロンをコードする配列を含む）、ATCC第31902号および第39517号（ γ -インターフェロンをコードする配列を含む）、ATCC第67024号（インターロイキン-1bをコードする配列を含む）、ATCC第39405号、

第39452号、第39516号、第39626号、および第39673号（インターロイキン-2をコードする配列を含む）、ATCC第59399号、第59398号、および第67326号（インターロイキン-3をコードする配列を含む）、ATCC第57592号（インターロイキン-4をコードする配列を含む）、ATCC第59394号および第59395号（インターロイキン-5をコードする配列を含む）、およびATCC第67153号（インターロイキン-6をコードする配列を含む）を含む。

【0029】

mp97タンパク質の発現：_____

1. 完全長mp97タンパク質：

mp97タンパク質を産生するために、哺乳類の発現ベクターpNUTを用いた。完全長mp97のために、EST2 cDNAをpNUTにクローニングすることにより2つの構築物を作製した。簡単には、cDNAをXhoIで完全かつ部分的に消化し、付着性末端をクレンノー（Klenow）を用いて埋めた。部分的消化由来の全cDNAの4.0 kb XhoI断片（内部のXhoI部位を有する）、および約0.6 kb の3'UTRを欠失した3.4kb XhoI断片をゲル精製した。pNUTプラスミドをSmaIで消化した後、ウシ腸アルカリホスファターゼによって脱リン酸化した。線形化されたpNUTをゲル精製して、mp97XhoI断片と連結反応させた。非対称に位置する制限酵素部位を用いて、診断上の消化により正しい方向の陽性クローンを同定した。

【0030】

2. mp97の分泌型：

p97の天然の分泌型のC末端アミノ酸は、ヒトまたはマウスのいずれにおいてもまだ決定されていない。C末端の20アミノ酸の疎水性尾部は、GPI連結の付加に必要とされるシグナルであると考えられる。疎水性尾部からNローブと保存された領域までは13アミノ酸であり、それらがGPI付着部位である可能性は変化した。これらの13アミノ酸は、C末端を切断して分泌型を作るための、部位特異的（site-directed）突然変異誘発のための候補部位である。ニワトリにおけるp97の推定の分泌型およびGPI連結型のC末端の比較により、疎水性尾部の前の最後のアミノ酸であるArg（CGAによってコードされる）を選択して、転写終止（TGA）に変換した。mp97pNUTプラスミドをU.S.E.突然変異誘発のために用いて（前を参照）

、3'UTR内に位置する内部のXhoI部位を固有の選択部位として用いて、SmaI部位に変換することができる。使用する突然変異誘発プライマーおよび選択プライマーは、それぞれ

GGG GCC GCG GTC GAG TGA GTC CCC
CTG G and CAT TTT GCC ATT GTT CTC CCG GGA ACC AGA AAA
AGT TTT C

である。

【0031】

上記のU.S.E.突然変異誘発は、疎水性尾部のすぐ前に未成熟な終止コドンを導入して、mp97の分泌型を作ることができる。他のC末端欠失型を同様に実施する。PCRを基にした方法を用いて、制限消化と併用してN末端欠失を実施する。

【0032】

3. mp97融合タンパク質：

発現したタンパク質の単離および精製を助けるために、完全長p97または切断型を、一つまたは複数の以下のタグと融合する：His6タグ、flagタグ、またはmycタグ。哺乳類系または細菌系のいずれかにおいて融合タンパク質を発現する。例えば、mp97分泌型のC末端にHis6タグを付着させる。簡単には、mp97のEST2を含むpNUTプラスミドをSacIIで線形化して、ウシ腸アルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化する。His6タグに関して相補的なオリゴを、次のようにSacIIアダプターとともに合成する：

5'-G GTCGAG CGA CAT
CAT CAT CAT CAT CAT TGA GC-3', 5'-TCA ATG ATG ATG ATG
ATG ATG TCG CTC GAC CGC-3'

合成オリゴを、T4キナーゼによりリン酸化し、変性し、アニールし、そして調製したmp97構築物と連結反応させる。次に、Hisタグを付けたmp97タンパク質の発現のため、哺乳類細胞株にこの構築物をトランスフェクトする。抗His6抗体を用いてこの融合タンパク質を同定して、ニッケルカラムを用いて親和性精製した。

【0033】

p97誘導体の発現のために構築された核酸配列における変異は、コード配列の

リーディングフレーム相を保存しなければならない。さらに、この変異は好ましくは、ハイブリダイズして受容体mRNAの翻訳に不利に影響を及ぼすと考えられる、ループまたはヘアピンのような第2のmRNA構造を産生しうる、相補的領域を作らないことである。

【0034】

変異は、天然の配列断片に連結反応できる制限酵素部位に隣接する、変異配列を含むオリゴヌクレオチドを合成することにより、特定の位置に導入され、連結反応後に結果として生じる再構築された配列は、所望のアミノ酸挿入、置換、または欠失を有する誘導体をコードする。

【0035】

または、上記したオリゴヌクレオチド指示性 (directed) 部位特異的突然変異誘発の手順を用いて、必要とされる置換、欠失、または挿入に従って改変したコドンを含む、改変された遺伝子を提供することができる。p97の欠失または切断誘導体は、所望の欠失に隣接する便利な制限エンドヌクレアーゼ部位を利用することによっても作製されうる。制限処理に続いて、突出部を埋め合わせ、そのDNAを再度連結することができる。前述した改変組を作る例示的な方法は、サムブルック (Sambrook) ら (「分子クローニング実験マニュアル (Molecular cloning A Laboratory Manual)」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年) によって開示される。

【0036】

上記のように、本発明は、適切な転写または翻訳の調節要素と実施可能に連結したmp97またはその誘導体をコードする、合成またはcDNA由来のどちらかのDNA断片を含む組換え発現ベクターを提供する。適切な調節要素は、細菌、菌類、ウイルス、哺乳類、または昆虫の遺伝子を含む、様々な供給源に由来しうる。適切な調節要素の選択は、選択された宿主細胞に依存し、かつ当業者によって用意に達成されうる。調節要素の例は以下を含む：転写プロモーターおよびエンハンサーまたはRNAポリメラーゼ結合配列、翻訳開始シグナルを含むリボソーム結合配列。さらに、選択する宿主細胞および用いるベクターに依存して、複製開始点、さらなるDNA制限酵素部位、エンハンサー、転写誘導性を与える配列、および選

択マーカーのような他の遺伝要素が発現ベクターに組み込まれうる。

【0037】

mp97をコードするDNA配列は、細菌、哺乳類、酵母もしくは他の菌類、ウイルス、植物、または昆虫の細胞を含む、広く多様な原核生物および真核生物の宿主細胞によって、発現されうる。そのような細胞を形質転換またはトランスフェクトして外来DNAを発現するための方法は、当技術分野において公知である（例えば、その全体が参照として本明細書に組み入れられる、Itakuraら、米国特許第4,704,362号；Hinnenら、PNAS USA 75:1929-1933、1978；Murrayら、米国特許第4,801,542号；Upshallら、米国特許第4,935,349号；Hagenら、米国特許第4,784,950号；Axelら、米国特許第4,399,216号；Goeddelら、米国特許第4,766,075号；およびSambrookら、「分子クローニング実験マニュアル」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年を参照）

【0038】

本発明を実施するために適切な細菌宿主細胞は、大腸菌（*E. coli*）、枯草菌（*B. subtilis*）、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）およびシュードモナス（*Pseudomonas*）属、ストレプトミセス（*Streptomyces*）属、およびブドウ球菌（*Staphylococcus*）属内の様々な種、ならびに当業者に公知の多くの他の細菌種を含む。細菌宿主細胞の代表例は、DH5a（Stratagene、La Jolla、California）、JM109 ATCC第53323号、HB101 ATCC第33694号、およびMN294を含む。

【0039】

細菌発現ベクターは、好ましくは、宿主細胞において機能するプロモーター、一つまたは複数の選択可能な表現型マーカー、および細菌の複製開始点を含む。代表的なプロモーターは、b-ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）およびラクトースプロモーター系（Changら、Nature 275:615、1978）、trpプロモーター（NicholsおよびYanofsky、Meth in Enzymology 101:155、1983）およびtacプロモーター（Russellら、Gene 20: 231、1982）を含む。代表的な選択マーカーは、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子のような様々な抗生物質耐性マーカーを含む。宿主細胞を形質転換するのに適切な多数のプラスミドが、当技術分野において公知であり、例えばpBR322（Bolivarら、Gene 2:9S、1977）、pUCプラスミドp

UC18、pUC19、pUC118、pUC119 (Messing、Meth in Enzymology、101:20-77、1983、ならびにVieiraおよびMessing、Gene 19:259-268、1982)、およびpNH8A、pNH16a、pNH18a、およびBluescript M13(Stratagene、La Jolla、Calif.)を含む。

【0040】

本発明を実施するのに適切な酵母および菌類宿主細胞は、特に出芽酵母 (Saccharomyces Cerevisiae)、ピキア (Pichia) およびクルイベロミセス (Kluyveromyces)、およびアスペルギルス (Aspergillus) 属の様々な種を含む。酵母および菌類のための適切な発現ベクターは、特に、酵母のためのYCp50 (ATCC第37419号)、およびamdSクローニングベクターpV3 (Turnbull、Bio/Technology 7:169、1989)。酵母の形質転換のためのプロトコールも当業者に公知である。例えば、形質転換は、DNAを用いた酵母のスフェロプラストの調製 (Hinnenら、PNAS USA 75:1929、1978) により、またはLiClのようなアルカリ塩での処理 (Itohら、J. Bacteriology 153:163、1983) のいずれかにより、容易に達成されうる。菌類の形質転換も、Cullenら (Bio/Technology 5:369、1987) により記載されたように、ポリエチレングリコールを用いて実施されうる。

【0041】

本発明を実施するのに適切な哺乳類細胞には、特に以下が含まれる: COS (例えば、ATCC CRL第1650号または第1651号)、BHK (例えば、ATCC CRL第6281号)、CHO (例えば、ATCC CCL第61号)、HeLa (例えば、ATCC CCL第2号)、293 (例えば、ATCC第1573号) およびNS-1細胞。哺乳類細胞において発現を導くための適切な発現ベクターは、通常プロモーター、ならびに他の転写および翻訳の制御配列を含む。共通のプロモーターは、SV40、MMTV、メタロチオネイン-1、アデノウイルスE1a、CMV、近接した初期の免疫グロブリン重鎖プロモーターおよびエンハンサー、ならびにRSV-LTRを含む。哺乳類細胞のトランスフェクションのためのプロトコールは当業者に公知である。代表的な方法は、リン酸カルシウムが仲介するエレクトロポレーション、レトロウイルス、および原形質体の融合が仲介するトランスフェクション (Sambrookら、上記を参照) を含む。

【0042】

本明細書に提供される開示を考慮すると、適切な型の発現ベクターを植物、トリー、および昆虫の細胞への導入するための、プロモーター、ターミネーター、および方法も容易に達成されうる。例えば、ある態様ではmp97またはその誘導体が植物細胞から発現されうる（アグロバクテリウムリゾゲネス（*Agrobacterium rhizogenes*）ベクターを概説する、Sinkarら、*J. Biosci (Bangalore)* 11:47-58, 1987を参照；特にpAS2022、pAS2023、およびpAS2034を含む、植物細胞のための発現ベクターの使用を記載する、Zambryskiら、「遺伝子工学、原理および方法（*Genetic Engineering, Principles and Methods*）」、HollaenderおよびSetlow（編）、Vol. VI、pp. 253-278、Plenum Press、New York、1984も参照）。

【0043】

本発明の特に好ましい態様では、mp97をバキュロウイルスから発現させる、（以下の実施例2を参照）（LuckowおよびSummers、*Bio/Technology* 6:47、1988；Atkinsonら、*Petic. Sci* 28:215-224、1990も参照）。宿主昆虫細胞からのmp97のGPI切断型の発現により、AcMNPVのようなバキュロウイルスの使用が特に好まれる。

【0044】

組換えmp97を発現するため、mp97は、上述した宿主/ベクター系を培養することにより調製されうる。組換えにより産生されたmp97は、下記でさらに詳しく記載するようにさらに精製されうる。

【0045】

別の実施例において、mp97はmp97を発現する細胞から単離されうる。本発明者らは、ヒトmp97のようにmp97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）アンカーによって細胞表面に固定される場合に、リン脂質アンカーを切断する酵素とともに細胞表面でmp97を発現する細胞をインキュベートする段階を含む、mp97切断型を調製するための方法を開発した。様々な酵素が、GPI結合に対する特異性を示し、したがって本発明の文脈内においてGPIアンカーを切断するために利用されうる。代表例は、細菌のホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ C（PI-PLC）（Ikezawaら、*Methods Enzymol.* 71:731-741、1981；Taguchiら、*Arch. Biochem. Biophys.* 186:196-201、1978；Low、*Methods Enzymol.*

71:741-746、1981を参照)、真核生物のGPI-PLC (Fergusonら、J. Biol. Chem. 260:4963-68、1985; Bulowら、FEBS Lett. 187:105-110、1985を参照)、および真核生物のホスホリパーゼ D (GPI-PLD2または「PLD」) (Malikら、Biochem. J. 240:519-527、1986を参照) (一般的には、FergusonおよびWilliams、「グリコシルホスファチジルイノシトール構造によるタンパク質の細胞表面固定化 (Cell-Surface Anchoring of Proteins via Glycosyl-Phosphatidylinositol Structure)」、Ann. Rev. Biochem. 57:285-320、1988を参照)を含む。

【0046】

特に好ましいGPI酵素は、細菌の供給源 (Low、「ホスホリパーゼの精製および定量化 (Phospholipase Purification and Quantification)」「実用的方法シリーズ: 累積方法索引 (The Practical Approach Series: Cumulative Methods Index)」、RichwoodおよびHames、編、IRC出版、Oxford、N.Y.、N.Y.、1991; Kuperaら、Eur. J. Biochem. 185:151-155、1989; Volwerkら、J. Cell Biochem. 39:315-325、1989を参照)由来、または組換え体の供給源 (Kokeら、「タンパク質の発現および精製 (Protein Expression and Purification)」2:51-58、1991; および Hennerら、Nuc. Acids Res. 16:10383、1986)いずれかから得られるホスホリパーゼC (PI-PLC)である。

【0047】

mp97は、それを発現することが見出された様々な細胞、ならびにmp97を発現するベクターが感染またはトランスフェクトされている様々な細胞の表面から、切断されうる。望ましい場合は、切断された(可溶化された)mp97は、親和性クロマトグラフィーを含む、下記でもさらに詳細に記載される技術を利用して精製されうる。

【0048】

mp97の可溶型は、細胞増殖の対数期を通じて可溶性mp97を含む細胞を培養し、かつ上清を回収することにより調製されうる。好ましくは、上清は細胞がコンフルエンス (confluency) に達する前に回収される。可溶性mp97は、次に単離された可溶性mp97をもたらすために下記のように精製されうる。可溶性mp97を精製するための方法は、可溶性mp97の親水性に基づいて選択されうる。例えば、可溶

性mp97はトリトン X-114の相分離によって容易に得られうる。

【0049】

別の実施例において、mp97はGPIアンカーで固定された(GPI-anchored)mp97を発現するように遺伝的に操作されて培地で生育された、CHO細胞から単離されうる。GPIアンカーで固定されたタンパク質は、GPIアンカーを切断できる酵素とともに簡単にインキュベーションをすることによって回収される。そのような酵素は、当技術分野において公知であり(Ferguson, M.J., Ann. Rev. Biochem. 57:285-320, 1988)、代表例を上述した。好ましくはPI-PLCまたはGPI-PLCを本発明の方法において用いる。切断された可溶性タンパク質は培地から回収され、細胞はさらなるタンパク質の発現のために増殖培地に戻されうる。増殖および回収のサイクルは十分な量のタンパク質を得るまで繰り返されうる。

【0050】

好ましい態様において、CHO細胞は、カルチスフィア-GH(Cultispher-GH)多孔性マイクロキャリアのような、多孔性マイクロキャリア、サイトデックス-1(Cytodex-1)のような固形マイクロキャリア、または球状体上での攪拌培養で、生育されうる。

【0051】

マウスp97の精製

mp97およびその誘導体ならびに可溶性mp97は、実施例2および本明細書における他の場所において提供される開示を考慮すると、容易に精製されうる。一般的には、mp97は上記のように、可溶化されたmp97を含む上清、または培養された宿主/ベクター系のいずれかから精製されうる。様々な精製段階は、単独でまたは併用して用いられ、mp97を精製するために利用されうる。例えば、上記のように、mp97を可溶化することにより、または宿主/ベクター培地より得られる上清は、市販されているタンパク質濃縮フィルター、例えばアミコン(Amicon)もしくはミリポアペリコン(Millipore Pellicon)の限外濾過装置を用いることにより、またはタンパク質を塩析後に透析することによって、容易に濃縮しうる。濃縮に加えて、適切な支持体に結合させた抗mp97抗体のような親和性精製基質に、上清(または濃縮物)を接触させてもよい。または、例えばペンダントのジエチルア

ミノエチル (DEAE) 基を有する基質または基体である、陰イオン交換樹脂が用いられ得る。代表的な基質は、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、または他のタンパク質の精製において共通に用いられる種類を含む。同様に、スルホプロピル基またはカルボキシメチル基のような、様々な不溶性基質を利用する陽イオン交換体が用いられうる。

【0052】

最後に、疎水性RP-HPLC培地、例えば、ペンダントのメチル基または他の脂肪族基を有するシリカゲルを用いる、一つまたは複数の逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) 段階が、さらにグルカゴン受容体組成物を精製するために用いられうる。

【0053】

本発明の文脈内において、「単離された」または「精製された」は、mp97の純度を規定するために用いられ、タンパク質が天然起源または内因性起源の他のタンパク質を実質的に含まず、さらに産生過程の残渣によるタンパク質夾雑物を質量で約1%未満しか含まないことを意味する。mp97は、SRS-PAGE上でクーマシーブルーによる染色が行われて、単一のタンパク質バンドとして検出可能な場合は、「単離された」と考えられうる。

【0054】

III. 使用法

本発明は、血液脳関門を越えて薬剤を輸送する方法およびモデル、抗体およびアンチセンスオリゴヌクレオチドの調製、マウスp97を研究するための実験系の調製、マウスp97の発現および/または活性を調節する物質の単離、ならびに診断上および治療的な適用におけるマウスp97核酸配列ならびにタンパク質およびその修飾因子の使用法を含むが、それらに限定されない、本発明のマウスp97核酸分子およびマウスp97タンパク質のすべての使用法を含む。使用法のいくつかは以下にさらに記載する。

【0055】

(a) 血液脳関門を越えて治療薬を輸送するための組成物、方法、およびモデル

本発明は、血液脳関門を越えて薬剤を輸送するための組成物であって、(a)mp9

7または(b)薬剤に関連したmp97を結合できる物質を含む、組成物を提供する。特に、本組成物は、薬剤に結合されたmp97；薬剤に融合されたmp97もしくはその一部を含むmp97融合タンパク質；mp97に結合できる物質、例えば鉄または薬剤に結合された、mp97に結合できる物質、例えば抗mp97抗体を含みうる。そのような組成物は、本明細書において「mp97-薬剤複合体」、または「mp97-治療薬複合体」とよぶ。

【0056】

従って、本発明は薬剤が血液脳関門を通過する能力を評価するための方法であって、(1)有効量の(a)マウスp97と関連のある薬剤、または(b)マウスp97に結合する化合物と関連のある薬剤を投与する段階、および(2)神経系における該薬剤のレベルを試験する段階を含む方法を提供する。

【0057】

また本発明は、治療薬が神経疾患を治療する能力を評価する方法であって、(1)マウスに有効量の(a)マウスp97と関連のある薬剤、または(b)マウスp97に結合する化合物と関連のある薬剤を投与する段階、および(2)投与の結果をモニターする段階を含み、神経症状の改善によって薬剤が治療効果を有することが示される方法を提供する。保因を受け入れるが複合体は受け入れない対照マウスが、モニタリングに含まれうる。ある態様において、薬剤を標識することで(例えば¹²⁵Iで)、モニタリングに投与後のマウスにおける薬剤の局在化を含むことができる。標識のための方法を以下に記載する。他の態様において、モニタリングは望ましい薬理的な効果、または望ましい行動上の効果のためのアッセイ法を行うことを伴う。例えば、悪性の脳転移を有するマウスにmp97細胞毒性化学療法薬を投与した後、モニターする段階は、複合体を受け入れなかった対照動物と比較して、転移の大きさおよび/または数を定量する段階を必要とすると考えられる。別の態様において、複合体はmp97および酵素を含んだ場合、モニターする段階は脳組織において酵素のアッセイを行う段階を伴うと考えられる。そのような酵素アッセイ法は当技術分野において公知である。

【0058】

好ましい態様において、複合体が投与されたマウスはリソソーム酵素欠乏をも

たらず遺伝的欠損を有する。欠乏した酵素は、静脈内に供給されても血液関門を越えず、したがって治療的效果がないことは当技術分野において公知である。mp97酵素複合体がマウスに注入され、マウスは脳細胞における通常細胞代謝の回復に関してモニターされる。大きな小胞がリソソーム酵素を欠乏している動物の脳細胞に現れるため、回復は脳組織の顕微鏡解析によって評価されうる。大きな小胞の消失は通常の表現型の回復を示す。

【0059】

本発明の方法の別の好ましい態様において、mp97薬剤複合体が「アルツハイマー病(AD)易発性マウス」に投与され、シャオ(Hsiao)ら(Science 274: 99-102, 1996)がADのトランスジェニックマウスを開発したそのマウスは、老人斑、散発性斑、およびことによると神経原繊維変化を発生する動物である点において、ヒトADの病理に類似性を示し、利用可能である。最も重要なことには、これらの動物は明白な記憶欠損を発症する。ADのための潜在的な治療であるmp97治療薬複合体は、AD易発性マウスに投与することにより試験されうる。AD易発性マウスの血清または他の体液におけるmp97のレベルは、治療の前後にモニターされうる。mp97に関するアッセイ法は、本明細書に記載されるように抗体がmp97に対するものである点を除いて、その全体が本明細書に組み入れられる、PCT出願第CA96/00587号およびケナード(Kennard)ら、Nature Medicine 2:1230-1235, 1996において、ヒトp97に関して記載されるのと本質的に同様である。マウス血清におけるmp97レベルの低下は、治療薬の成功のしるしの一つと考えられる。

【0060】

本発明の方法は、任意の特定の治療薬または任意の特定のクラスの治療薬の送達にとって、最適のp97ポリペプチドを精製するためにも使用されうる。例えば、治療薬は、本明細書において記載されるように、全長の分泌p97タンパク質、ならびにp97の様々な断片または誘導体に結合されうる。モニターする段階は、その治療薬またはそのクラスの薬剤の送達のために、最も適切なp97ポリペプチドを明らかにすると考えられる。

【0061】

本発明の様々なmp97薬剤複合体は、血液脳関門を越える能力に関して試験され

、血液脳関門のインビトロのモデルを用いて望ましい薬理学的効果を提供しうる。インビトロのモデルの実施例は、培地において薬剤および溶質輸送に高耐性である内皮単層を形成する、毛細管内皮細胞株を含む (Pardridge, W.M.ら、J. Pharmacol. & Expt. Therapeut. 253:884-891, 1990)。

【0062】

組成物を血流へ希釈する、無処置のマウス(または他の動物)へのmp97薬剤複合体の任意の投与経路が用いられうる。好ましくは、組成物は末梢において投与され、最も好ましくは静脈内に、または心臓カテーテルによって投与される。投与される用量は、個人の必要、望ましい効果、および選択される投与の経路に依存すると考えられる。

【0063】

本発明の組成物はまた、カプセルに入れられ、またはウイルス外被もしくは小胞に付着され、または細胞に組み入れられて投与されうる。小胞は通常は球状で、しばしば脂質である、ミセル粒子である。リポソームは、二重層の膜から形成された小胞である。適切な小胞は、米国特許第4,394,448号に記載されているような公知の技術を用いて、ホスファチジルコリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン、糖脂質、ガングリオシド等のような、広範囲の脂質またはリン脂質化合物から作製されうる、単層の小胞および、多重膜の脂質小胞またはリポソームを含む。そのような小胞またはリポソームは、静脈に化合物を投与するため、および血液脳関門を越えて化合物を供給するために用いられうる。治療薬の制御された放出は、カプセル化を用いることによっても達成されうる(米国特許第5,186,941号)。

【0064】

本発明は、本発明の組成物が血液眼関門および血液胎盤関門を越えて送達されることも意図する。血液胎盤関門を越えての送達は、胎児へ組換えDNA分子を提供するための遺伝子治療において、有用な実用性を有することが予想される。遺伝子治療において、機能的な遺伝子は、遺伝子欠損を正す必要性がある胎児へ導入されうる。組換えDNA分子の哺乳類胎児への移入は、例えば、インビボで欠失したまたは欠損した遺伝子産物の合成による、先天的または後天的な障害を正す

ための遺伝子治療において、用いられうる。組換えDNA分子は、上記の小胞、リポソームまたはウイルス外被に組み込まれうる。p97および本発明の送達組成物は、治療薬および製薬（例えば、抗生物質）を、肝臓を含む他の器官へ送達すると同様に、血液胎盤関門を越えて送達するために有用でありうることも意図されている。本組成物は、p97を発現する黒色腫の治療のような、癌治療を試験するためにも用いられうる。

【0065】

本発明の組成物において用いられうるmp97は、可溶性mp97、切断されたp97、ならびにその誘導体および一部を含む。血液脳関門を越えて輸送されうるために十分なmp97の部分を含む、mp97の一部またはペプチドが用いられうる。mp97またはその一部の調製方法は、本明細書において詳細に記載される。組成物において使用されうるmp97に対する抗体も、以下に詳しく説明される。

【0066】

本発明の方法および組成物において用いられうる薬剤は、神経症状の治療に関して公知であるか、または神経症状に対する活性を有すると推測されうる。本明細書において用いられる「神経症状」という用語は、癌、神経変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病）、脱髄疾患（例えば、多発性硬化症）、筋萎縮性側索硬化症、細菌感染症およびウイルス感染症、欠乏性疾患（例えば、ウェルニッケ病および栄養性多発性神経障害）、てんかん、精神病、疼痛ならびに神経障害を含むが、これらに限定されない、神経系に影響を及ぼす任意の症状を意味する。

【0067】

従って、本発明の組成物において使用されうる薬剤は、化学療法薬、抗生物質、コリン作動薬、抗コリンエステラーゼ剤、アドレナリン作用性受容体拮抗薬、中枢神経系および末梢神経系に作用する薬物、神経伝達物質、ならびに神経ペプチドホルモン、鎮静剤、抗精神病化合物、および神経系に作用する任意の他の薬物を含む。

【0068】

一つの態様において、組成物はアルツハイマー病の治療において脳に薬剤を送

達するために用いられる。アルツハイマー病の治療のための組成物で用いられうる可能性のある治療薬は、鉄キレート剤のような鉄を封鎖する化合物、および抗炎症薬を含むが、これらに限定されない。神経成長因子、脳由来神経栄養因子を含む成長因子、ならびに γ -インターフェロン、腫瘍壊死因子、インターロイキン、GM-CSF、CSF-1、およびG-CSFを含むリンフォカインのようなタンパク質は、本発明の送達組成物での使用のための治療薬としても意図される。アルツハイマー病において変性する基底前脳のコリン作用性神経は、生存に関して神経成長因子に依存することが公知である。神経成長因子は、前脳において変性しつつあるコリン作用性ニューロンを救助することも示されている (Hefti, F.J. Neurosci 6:2155, 1986)。

【0069】

結合体

mp97またはmp97を結合する物質と、薬剤との接合体は、当技術分野において公知の技術を用いて調製されうる。タンパク質の結合または化学的架橋に関して多数の方法があり、当業者はどの方法が結合させる治療薬に適切であるか判定することができる。用いられる方法は、mp97がその受容体に結合する能力を妨害することなく、かつ治療薬の活性を著しく変えることなく、mp97またはmp97を結合する物質と薬剤を接合することができなければならない。もし治療薬がタンパク質またはペプチドであるならば、mp97またはmp97を結合する物質と薬剤を結合するため、数百の架橋剤を利用できる。(例えば、「タンパク質の結合および架橋の化学 (Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking)」1991年、Shans Wong、CRC Press、Ann Arborを参照)。架橋剤は一般的に、利用可能な反応性の官能基に基づいて選択されるか、または治療薬に挿入される。さらに、反応基がない場合は、光活性化 (photoactivatable) 架橋剤が用いられうる。ある例においては、mp97またはmp97を結合する物質と、治療薬との間にスペーサーを含むことが望ましいかもしれない。一つの例においては、mp97またはそれに対する抗体およびタンパク質治療薬は、mp97または抗体にスルフヒドリル基を導入することにより、かつタンパク質薬剤にカルボキシル基を通じて反応性チオール基を含む架橋剤を導入することにより、結合されうる (Wawizynczak, E.J.およびThorp

e, P.E. 「免疫結合体：癌の放射イメージングおよび治療における抗体結合体 (Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer)」、C.W. Vogel (編)、Oxford University Press、1987年、pp.28-55；ならびにBlair、A.H.およびT.I. Ghose、J. Immunol. Methods 59:129、1983)。

【0070】

mp97は、いずれもピアス (Pierce) から入手可能である、SATA、およびヘテロ二官能性の架橋剤であるSulfo-SMCCを用いて、ペプチドまたはポリペプチドに架橋されうる。sulfo-SMCCのNHS半領域 (一級アミンと反応する) でのmp97の活性化、およびSATAのNHS半領域 (一級アミン上に保護されたスルフヒドリル基を導入する) での他のタンパク質の活性化。-SH基の脱保護の後、mp97由来のSulfo-SMCCのマレイミド半領域は、架橋される他のポリペプチドの遊離-SH基と反応できる。または、ポリペプチドまたはmp97は過ヨウ素酸塩により活性化されて、次に他の化合物と反応できる。別の選択肢は、ストレプトアビジン-ビオチン法である。

【0071】

融合タンパク質

mp97またはmp97を結合する物質と、タンパク質またはペプチド治療薬との融合タンパク質は、当技術分野において公知の技術を用いて調製されうる。そのような場合において、mp97をコードするDNA分子またはその一部分は、治療薬をコードするDNA分子に連結される。キメラDNA構築物は、適切な調節要素とともに発現ベクターにクローニングされ、適切な宿主において発現されうる。融合タンパク質を調製するための方法は、さらに詳細に上述されている。

【0072】

mp97に対する抗体の調製

mp97ポリペプチドに対する抗体は、実施例3において記載するように生成した。一般的に、mp97またはその誘導體、可溶性mp97、またはそれらの表面にmp97を含む細胞 (mp97DNAでトランスフェクトした細胞を含む) が、抗体を調製するために利用されうる。本発明の文脈内において、抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体断片 (例えば、Fab、およびF(ab')₂)、ならびに組換

えにより作製された結合相手を含むと理解される。抗体は、 10^{-7} Mより大きいかまたは等しいKaで結合する場合、mp97に対して反応性があると理解される。当業者によって認識されると考えられるように、mp97のようなリガンドに結合するだけでなく、該リガンドの生物学的活性も妨げる（例えば、鉄またはトランスフェリン受容体のmp97への結合を妨げることにより）抗体を開発しうる。

【0073】

ポリクローナル抗体は、ウマ、ウシ、様々な鳥類、ウサギ、またはラットのような、様々な温血動物から当業者により容易に作製されうる。簡単には、腹腔内注入、筋肉内注入、眼内注入、または皮下注入、フロイントの完全もしくは不完全アジュバンドのようなアジュバンドを通じて動物を免疫するために、mp97が利用される。数回の追加免疫の後、血清試料を回収してmp97への反応性を試験する。特に好ましいポリクローナル抗血清は、これらのアッセイ法の一つにおいて、少なくともバックグラウンドの三倍を超えるシグナルを示すと考えられる。一度、動物の力価がmp97に対する反応性に関して安定水準に達したら、毎週の採血により、または動物の全採血により、より大量の抗血清を容易に得ることができる。

【0074】

モノクローナル抗体も、従来の技術を用いて容易に生成されうる（本明細書に参照として組み入れられる、米国再発行特許第32,011号、米国特許第4,902,614号、第4,543,439号、および4,411,993号を参照；また、本明細書に参照として組み入れられる「モノクローナル抗体、ハイブリドーマ：生物学的解析における新局面（Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses）」、Plenum Press、Kennett、McKearn、およびBechtol（編）、1980年、および「抗体：実験マニュアル（Antibodies: A Laboratory Manual）」、HarlowおよびLane（編）、Cold Spring Harbor Laboratory Pressも参照）。

【0075】

簡単には、一態様においてウサギのような対象動物にmp97を注入する。mp97は、結果として生じる免疫反応を増大するために、フロイントの完全または不完全アジュバンドのようなアジュバンドが混合されうる。最初の免疫の後、1週目と3

週目の間に、その動物は別の追加免疫で再免疫され、かつ上記のアッセイ法を用いてmp97に対する反応性に関して試験されうる。一度、その動物がmp97に対する反応性に関して安定水準に達すると、それを屠殺し、脾臓およびリンパ節のような多くのB細胞を含む器官を回収する。

【0076】

免疫された動物から得られる細胞は、エプスタインバーウイルス (EBV) のようなウイルスをトランスフェクトすることにより不死化されうる (Glaskyおよび Reading、Hybridoma 8(4):377-389、1989参照)。または、好ましい態様において、回収された脾臓および/またはリンパ節細胞懸濁液は、モノクローナル抗体を分泌する「ハイブリドーマ」を作製するために適切な骨髓腫細胞と融合される。適切な骨髓腫系は、例えば、NS-1 (ATCC 第TIB18号)、およびP3X63-Ag8.653 (ATCC 第CRL1580号) を含む。

【0077】

融合の次に、RPMI 1640、またはDMEM (ダルベッコ改変イーグル培地) (JRH Biosciences、Lenexa、Kansas) のような適切な培地、ならびに、ウシ胎児血清 (FBS、すなわち、Hyclone、Logan、Utah、またはJRH Biosciences由来) のような、付加的な成分を含む培養プレート中に、細胞をおいてもよい。さらに、培地は HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン) (Sigma Chemical Co.、St. Louis、Missouri) のような、融合された脾臓細胞および骨髓腫細胞の成長を選択的に可能にする試薬を含むべきである。約7日後、結果として生じる融合細胞またはハイブリドーマは、mp97に対して反応性の抗体の存在を判定するためにスクリーニングされうる。例えば、対向流免疫電気泳動法、放射免疫アッセイ法、放射免疫沈降、酵素結合免疫吸着アッセイ法 (ELISA)、ドットプロットアッセイ法、阻害または競合アッセイ法、およびサンドイッチアッセイ法を含む、多様なアッセイ法を、mp97に対して反応性の抗体の存在を判定するために利用しうる (米国特許第4,376,110号および第4,186,530号を参照; 「抗体: 実験マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual)」、HarlowおよびLane (編)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988) も参照)。数回のクローンの希釈および再アッセイに続いて、mp97に対して反応性の抗体を産生するハイブリドーマ

が単離されうる。

【0078】

モノクローナル抗体を作製するために、他の技術も利用しうる (William D. Huseら、「ファージにおける免疫グロブリンレパートリーの、大規模な組合わせライブラリーの生成 (Generation of a Large Combinational Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda)」、*Science* 246:1275-1281, 1989年12月; L. Sastryら、「モノクローナル触媒抗体の産生のための大腸菌 (*Escherichia coli*) における免疫レパートリーのクローニング: 重鎖可変領域特異的cDNAライブラリーの構築 (Cloning of the Immunological Repertoire in *Escherichia coli* for Generation of Monoclonal Catalytic Antibodies: Construction of a Heavy chain Variable Region-Specific cDNA Library)」*Proc Natl. Acad. Sci USA.* 86:5728-5732、1989年8月も参照; Michelle Alting-Meesら、「モノクローナル抗体発現ライブラリー: ハイブリドーマに対する急速な代替物 (Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas)」、*Strategies in Molecular Biology* 3:1-9、1990年1月も参照; これらの参照は、組換え技術により抗体作製を可能にする、Stratocyte、La Jolla、Californiaから入手できる、市販の系を記載する)。簡単には、mRNAはB細胞群から単離され、ImmunoZap (H) およびImmunoZap (L) ベクターにおいて、重鎖および軽鎖免疫グロブリンcDNA発現ライブラリーを作製するために利用される。これらのベクターは、個別にスクリーニングされるか、またはFab断片もしくは抗体を形成するため共発現されうる (Huseら、上記を参照; Sastryら、上記も参照)。次に陽性斑は、大腸菌 (*E. coli*) 由来のモノクローナル抗体断片の高レベル発現を可能にする、非溶解性プラスミドに変換されうる。

【0079】

同様に、結合相手もまた、特異的に結合する抗体をコードする遺伝子の可変領域を組み入れるために組換えDNA技術を利用することによって構築されうる。一つの態様において、関心対象のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ由来の可変領域をコードする遺伝子は、可変領域に関するヌクレオチドプライマーを使用することによって増幅される。これらのプライマーは、当業者によって合

成されるか、または市販の供給源から購入されうる。ストラタサイト社 (Stratacyte) (La Jolla, Calif) は、特にVHa、VHb、VHc、VHd、CH1、VL、およびCL領域に関するプライマーを含む、マウスおよびヒトの可変領域に関する細胞プライマーを販売している。これらのプライマーは、それぞれImmunoZap (商標) HまたはImmunoZap (商標) L (Stratacyte) のようなベクターに挿入されうる、重鎖または軽鎖の可変領域を増幅するために利用されうる。これらのベクターは次に、発現のために大腸菌 (E. coli) に導入されうる。これらの技術を利用することにより、VHドメインおよびVLドメインの融合体を含む、大量の一本鎖タンパク質を産生しうる (Birdら、Science 242:423-426、1988を参照)。さらに、そのような技術は、抗体の結合特異性を変えことなく、「マウス」抗体を「ヒト」抗体に変換するために利用されうる。

【0080】

一度適切な抗体または結合相手を得たら、それらは当業者に公知の多数の技術によって、単離または精製されうる (「抗体：実験マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual)」、HarlowおよびLane (編)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988を参照)。適切な技術は、ペプチドもしくはタンパク質親和性カラム、HPLCもしくはRP-HPLC、プロテインAもしくはプロテインGカラムによる精製、またはこれらの技術の任意の組合わせを含む。

【0081】

mp97の標識

mp97、可溶性mp97、切断されたmp97、GPIアンカーで固定されたmp97、およびそれらの誘導体、ならびに上記の抗体は、例えば、蛍光分子、毒素、治療活性を有する物質、すなわち治療薬、発光性分子、酵素、および放射性核種を含む、様々な分子で標識されうる。蛍光分子の代表例は、フルオレセイン、フィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、およびルシフェラーゼを含む。毒素の代表例は、リシン、アプリンジフテリア毒素、コレラ毒素、ゲロニン、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、トリチン、赤痢菌毒素、およびシュードモナス外毒素Aを含む。放射性核種の代表例は、Cu-64、Ga-67、Ga-68、Zr-89、Ru-97、Tc-99m、Rh-105、Pd-109、In-111、I-123、I-125、I-131、Re-186、Re-188、Au-19

8、Au-199、Pb-203、At-211、Pb-212およびBi-212を含む。適切な酵素の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ビオチン、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含む；ならびに発光材料の例はルミノールを含む。さらに、mp97または上記の抗体もまた、標識されるか、またはリガンド結合対の一つの結合相手に結合しうる。代表例には、アビジン-ビオチンおよびリボフラビン-リボフラビン結合タンパク質が含まれる。

【0082】

上記の代表的な標識によって、mp97または上記の抗体を結合または標識するための方法は、当業者によって容易に達成されうる（「トリコテセン抗体結合（Trichothece Antibody Conjugate）」、米国特許第4,744,981号；「抗体結合（Antibody Conjugate）」、米国特許第5,106,951号；「蛍光発生的な材料および標識技術（Fluorogenic Materials and Labelling Techniques）」、米国特許第4,018,884号；「診断および治療のための、金属放射性核種標識されたタンパク質（Metal Radionuclide Labelled Proteins for Diagnosis and Therapy）」、米国特許第4,897,255号；および「改良されたキレート化動態のための金属放射性核種キレート化合物（Metal Radionuclide Chelating Compounds for Improved Chelation Kinetics）」、米国特許第4,988,496号を参照；Inman、Methods In Enzymology、第34巻、「親和性技術、酵素精製：B部（Affinity Techniques、Enzyme Purification：Part B）」、JakobyおよびWicheck（編）、Academic Press、New York、p.30、1974も参照；WilchekおよびBayer、「生物分析応用におけるアビジン-ビオチン複合体（The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications）」、AnaL Bichem. 171:1-32、1988も参照）。

【0083】

本発明のいくつかの態様において、当技術分野において一般的に公知であり、簡単に上述した技術を用いて、トランスフェリン、トランスフェリン受容体、またはトランスフェリン受容体に対する抗体を標識した。

【0084】

(b) 実験系

真核生物の発現系は、薬物の有効性を試験するため、通常完全なタンパク質

、そのタンパク質の特異的な部分、または天然に生じる変異タンパク質および人工的に産生される変異タンパク質の機能を研究するためを含む、p97遺伝子およびタンパク質の多数の研究のために用いられうる。

【0085】

当技術分野において公知の技術を用いて、マウスp97cDNA配列またはその一部を含む発現ベクターを、マウス細胞および他種由来の哺乳類細胞ならびに非哺乳類細胞を含む、様々な細胞に導入できる。細胞系におけるマウスp97遺伝子の発現を用いて、構造-機能関係を説明し、ならびに薬物スクリーニングのために細胞株を提供しうる。

【0086】

本発明はまた、発明の核酸分子によりコードされるマウスp97タンパク質の機能を調べるための方法も提供する。例えば、mp97はマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、およびブタのような非ヒトトランスジェニック動物において発現されうる (Hammerら (Nature 315:680-683、1985)、Palmiterら (Science 222:809-814、1983)、Brinsterら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:4438-4442、1985)、PalmiterおよびBrinster (Cell 41:343-345、1985) および米国特許第4,736,866号参照)。好ましくは、動物はマウスである。トランスジェニックマウスを調製するために用いられるマウスは、野生型マウス、または公知の表現型もしくは遺伝子型の異常を有するマウスでありうる。簡単には、適切に配置された発現制御配列と共に発現されるDNA配列を含む発現単位が、受精卵の前核に導入される。DNAの導入は、一般に微量注入法によってなされる。注入されたDNAの組込みは、組織試料、一般的には尾の組織試料由来のDNAのプロット解析によって、検出される。導入されたDNAは動物の生殖系列に組み込まれて、その動物の子孫に伝えられることが好ましい。組織特異的発現は、組織特異的プロモーターの使用を通じて、または導入遺伝子の発現を調節できる、メタロチオネイン遺伝子プロモーター (Palmiterら、1983、同章) のような、誘導性プロモーターの使用を通じて、成し遂げられうる。mp97の組織特異的発現 (例えば、脳における) を生じる動物は、アルツハイマー病のための疾患モデルとして利用されうる。または、酵母人工染色体 (YAC) を、YACを有する酵母スフェロプラストと融合することにより

、胚由来の幹細胞にDNAを導入するために利用しうる (Capecchi、Nature 362:255-258、1993; Jakobovitsら、Nature 362:255-258、1993)。そのような方法を利用することにより、組織(例えば、脳)または発生サイクルにおける異なる段階において、mp97を発現する動物が発生しうる。

【0087】

従って、本発明は、生殖細胞および体細胞が動物またはその動物の先祖に導入されたp97遺伝子を含む、トランスジェニック非ヒト動物を提供する。

【0088】

本出願人は以前に、高レベルのp97はアルツハイマー病(AD)の症状であることを示している。結果として、p97のレベルが増大したマウスは、ADを研究するため、およびADのために可能な治療法を試験するための、有用なモデルである。

【0089】

従って、本発明はアルツハイマー病(AD)を治療するための治療薬をスクリーニングするための方法であって、mp97のレベルが高いマウスに薬剤を投与する段階、およびmp97のレベルを測定する段階を含み、mp97レベルの低下によって該薬剤がアルツハイマー病の治療に有用でありうることが示される方法を提供する。p97のレベルが増大したマウスは、本明細書において記載されるようにトランスジェニックマウスでありうるか、またはシャオ(Hsiao)ら(1996)によって記載されるようにAD易発性のマウスでありうる。トランスジェニックマウスに加えて、スクリーニングアッセイ法はまた、p97を発現する形質転換された細胞株についても行われうる。

【0090】

p97を発現する動物に加えて、p97を生産しない動物が、p97の機能を研究するために発生させられうる。タンパク質の発現を欠くまたは発現を部分的に欠く細胞、組織、および非ヒト動物は、本発明の核酸分子において特異的な欠失または挿入変異を有する本発明の組換え分子を用いて、発生させられうる。組換え分子は、相同組換えによって内因性の遺伝子を不活性化しまたは改変するために用いられ、それによって欠損細胞、組織または動物を作り出す。そのような変異細胞、組織または動物は、本発明の核酸分子によりコードされるタンパク質に通常依

存する、特異的な細胞集団、発生パターンおよびインビボの過程を規定するために用いられうる。

【0091】

p97の役割を確認するために、p97ノックアウトマウスを調製できる。実施例により、標的した組換え方策は内因性p97遺伝子を不活性化するために用いられうる。すべてのリーディングフレームに終止コドンを導入し、かつタンパク質の生物学的活性を廃する遺伝子が、タンパク質のゲノムコピーに挿入されうる。変異を受けた断片が胚幹細胞に導入され、かつコロニーが相同組換えに関して陽性（ネオマイシン）/陰性（ガンシクロビル、チミジンキナーゼ）の耐性遺伝子で選択されうる。生殖系列への伝達を確立するため、一つの対立遺伝子上の破壊された遺伝子を運ぶ2つのクローンが、C57/B16マウスの未分化胚芽細胞に注入され、B6/SJL乳母に移入されうる。キメラをC7B1/6マウスに交配させ、子孫を解析して、変異に関してホモ接合の動物（p97^{-/-}）を検出できる。

【0092】

従って、本発明は、マウスp97の発現が減少した非ヒト動物を提供する。本発明はまた、p97を研究するために、そのようなトランスジェニックノックアウト動物の使用も含む。

【0093】

トランスジェニックp97マウスは、様々な目的にも用いられうる。例えば、p97ノックアウトマウスは、発生および生物の成体の機能化における、p97の本質的な生理的役割を同定するのに役立つと考えられる。一度これらの機能を確認すると、p97トランスジェニックマウスを、p97またはp97関連経路を通じて作用しうる、潜在的な治療薬のスクリーニングに用いることができる。例えば潜在的な治療薬を対照マウスおよびトランスジェニックp97マウスにおいて試験し、異なる反応が得られるかどうか判定することができ、したがって治療薬の活性におけるp97またはp97経路を含意する。p97ノックアウトマウスおよびp97ノックインマウスの両方とも、これらの評価において有用である。特に好ましいのは、アルツハイマー病の表現型の治療において、有用な潜在的な治療薬が、p97トランスジェニック変異体において任意の方法で増強されるか、または減少されるかどうかを

明らかにすると考えられる、p97トランスジェニックアルツハイマー病モデルの使用である。これは次に新規の改善された治療薬をもたらさう。

【0094】

p97トランスジェニックマウスの代わりの使用法は、本明細書において(a)項にで開示したように、p97タンパク質に結合する潜在的治療薬および診断薬の試験に関する。p97-アドリアマイシンまたはp97-タキソール結合体のような組成物は、宿主マウスが内因性p97を産生しないかどうか(p97ノックアウト)、またはp97過剰発現を有するかどうか(p97ノックイン)に依存して、異なる効果を有する。これに関して、マウスp97-接合体は、ヒトp97-接合体と比べて、トランスジェニックp97マウスにおける試験に使用するのが好ましい場合がある。

【0095】

(c) アンチセンスオリゴヌクレオチド

マウスp97をコードする核酸分子の単離により、p97の発現および/または活性を調節できるアンチセンスオリゴヌクレオチドの産生が可能になる。

【0096】

従って、本発明はp97をコードする核酸配列に相補的な、アンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。

【0097】

本明細書で用いられる「アンチセンスオリゴヌクレオチド」という用語は、その標的に相補的なヌクレオチド配列を意味する。

【0098】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、天然に生じる塩基、糖および間糖(バックボーン)連結からなる、ヌクレオチドのオリゴマーもしくはポリマーまたはヌクレオシドモノマーを意味する。この用語はまた、同様に機能する天然に生じないモノマーまたはその一部を含む、修飾されたまたは置換されたオリゴマーも含む。そのような修飾または置換されたオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ存在下での増強された細胞の取り込み、または増大した安定性のような特性のため、天然に生じる形状よりも好ましい場合がある。この用語は、2つまたはそれ以上の化学的に別個の領域を含む、キメラオリゴヌクレオチドも含む。例えば、キ

メラオリゴヌクレオチドが、有益な特性（例えば、増大したヌクレアーゼ耐性、増大した細胞への取り込み）を与える、少なくとも一つの修飾されたヌクレオチド領域を含むか、または発明の2つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドが接合されて、キメラオリゴヌクレオチドを形成しうる。

【0099】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、リボ核酸またはデオキシリボ核酸であり、アデニン、グアニン、シトシン、チミジンおよびウラシルを含む、天然に生じる塩基を含みうる。オリゴヌクレオチドは、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、6-メチル、2-プロピル、および他のアルキルアデニン、5-ハロウラシル、5-ハロシトシン、6-アザウラシル、6-アザシトシンおよび6-アザチミン、シュードウラシル、4-チオウラシル、8-ハロアデニン、8-アミノアデニン、8-チオールアデニン、8-チオールアルキルアデニン、8-ヒドロキシルアデニン、および他の8-置換アデニン、8-ハログアニン、8-アミノグアニン、8-チオールグアニン、8-チオールアルキルグアニン、8-ヒドロキシルグアニンおよび他の8-置換グアニン、他のアザおよびデアザウラシル、チミジン、シトシン、アデニン、またはグアニン、5-トリフルオロメチルウラシル、ならびに5-トリフルオロシトシンのような、修飾された塩基も含みうる。

【0100】

本発明の他のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、変更されたリン、リン酸バックボーンにおける酸素ヘテロ原子、短鎖のアルキルもしくはシクロアルキル間糖連結、または短鎖のヘテロ原子もしくは複素環式間糖連結を含みうる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、およびホスホロジチオエートを含みうる。発明の一態様においては、4個から6個の3'末端塩基の間にホスホロチオエート結合の連結がある。もう一つの態様においては、ホスホチオエート結合がすべてのヌクレオチドを連結する。

【0101】

本発明の他のアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、治療試薬または実験試薬としてより適すると考えられる、ヌクレオチド類似体も含みうる。オリゴヌク

レオチド類似体の例は、DNA（またはRNA）におけるデオキシリボース（またはリボース）リン酸バックボーンがペプチドにおいて見出されるものに類似しているポリアミドバックボーンで置換されているペプチド核酸（PNA）である（P.E. Nielsenら、Science 1991、254、1497）。PNA類似体は酵素による分解に耐性があり、インビボおよびインビトロの寿命が長いことが示されている。PNAはまた、PNA鎖とDNA鎖の間に電荷の反発がないため、相補DNAにより強く結合する。他のオリゴヌクレオチドは、ポリマーバックボーン、環式バックボーン、または非環式バックボーンを含むヌクレオチドを含みうる。例えば、ヌクレオチドは、モルフォリノバックボーン構造を有しうる（米国特許第5,034,506号）。オリゴヌクレオチドはまた、オリゴヌクレオチドの薬物動態学的特性を改善するための群、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの薬力学的特性を改善するための群のような、レポーター群も含みうる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、糖模倣物（mimetics）も有しうる。

【0102】

アンチセンス核酸分子は、当技術分野で公知の手順を用いて、化学合成および酵素連結反応を用いて構築されうる。本発明のアンチセンス核酸分子またはそれらの断片は、天然に生じる核酸、または分子の生物学的安定性を増大するか、もしくはmRNAもしくは天然の遺伝子と共に形成された二重鎖の物理的安定性を増大するように設計された、様々に修飾された核酸（例えば、ホスホチオエート誘導体およびアクリジン置換されたヌクレオチド）を用いて、化学的に合成されうる。アンチセンス配列が高効率調節領域の制御下で産生される、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化されたウイルスの形態で細胞に導入された発現ベクターを用いて、アンチセンス配列を生物学的に産生することができ、その調節領域の活性は、ベクターが導入される細胞型によって決定されうる。

【0103】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ベクター（レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびDNAウイルスベクター）を含む当技術分野における技術、または微量注入法のような物理的な技術を用いて、組織もしくは細胞に導入されうる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、インビボに直接投与され、また

はインビボに投与されるインビトロの細胞にトランスフェクトするために用いられる。ある態様においては、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、リポソーム製剤でマクロファージおよび/または内皮細胞に供給される。

【0104】

(d) マウスp97修飾因子

上記の抗体およびアンチセンスオリゴヌクレオチドに加えて、p97の発現または活性を調節する他の物質も同定される。従って、本発明は、マウスp97の発現または活性を調節する物質を開発または同定するためのマウスp97をコードする核酸およびp97タンパク質の使用法を含む。

【0105】

(i) マウスp97に結合する物質

マウスp97の活性に影響を及ぼす物質は、マウスp97に結合する能力に基づいて同定される。

【0106】

本発明のマウスp97と結合できる物質は、マウスp97に潜在的に結合する物質とマウスp97を反応させることにより、および複合体、遊離物質、もしくは非複合型マウスp97、またはマウスp97の活性化をアッセイすることによって同定される。特に、酵母ツーハイブリッドアッセイ系は、マウスp97と相互作用するタンパク質を同定するために用いられる (Fields, S. および Song, O., 1989, Nature, 340:245-247)。同様に、用いられる分析系には、ELISAも含まれる。

【0107】

従って、本発明は、マウスp97と結合できる物質を同定する方法であって、以下の段階を含む方法を提供する：

- (a) マウスp97および被験物質間での複合体の形成を可能にする条件下で、マウスp97と被験物質を反応させる段階；ならびに
- (b) マウスp97および被験物質の複合体、遊離物質、または非複合型マウスp97に関してアッセイする段階であって、複合体の存在によって、被験物質がマウスp97と結合できることが示される段階。

【0108】

アッセイ法において用いられるマウスp97タンパク質は、配列番号:2に示されたアミノ酸配列を有するか、または本明細書において記載されたようなその断片、類似体、誘導体、相同体または模倣物でありうる。

【0109】

物質およびマウスp97複合体の形成を可能にする条件は、物質およびタンパク質の性質および量などの因子を考慮して選択されうる。

【0110】

物質-タンパク質複合体、遊離物質または非複合型タンパク質は、例えば、塩析、クロマトグラフィー、電気泳動、ゲル濾過、分画、吸着、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、凝集、またはそれらの組み合わせなどの従来の単離技術によって単離されうる。成分のアッセイ法を容易にするため、マウスp97もしくは物質に対する抗体、または標識されたマウスp97、または標識された物質が利用されうる。抗体、タンパク質、または物質は、上記のような検出可能な物質で標識されうる。

【0111】

本発明の方法において用いられるマウスp97または物質は、不溶化されてもよい。例えば、マウスp97または物質は、適切な担体に結合されてもよい。適切な担体の例は、アガロース、セルロース、デキストラン、セファデックス、セファロース、カルボキシメチルセルロースポリスチレン、濾紙、イオン交換樹脂、プラスチックフィルム、プラスチックチューブ、ガラスビーズ、ポリアミンメチルビニルエーテルマレイン酸コポリマー、アミノ酸コポリマー、エチレンマレイン酸コポリマー、ナイロン、絹などである。担体は、例えば、チューブ、試験プレート、ビーズ、ディスク、球体などの形であってよい。

【0112】

不溶性のタンパク質または物質は、例えばプロモシアン(cyanogen bromide)カップリングなど、公知の化学的または物理的方法を用いて、適切な不溶性担体を材料と反応させることによって調製されうる。

【0113】

p97タンパク質または物質は、本明細書に記載された方法を用いて、細胞表面

上にも発現されうる。

【0114】

本発明はまた、マウスp97の活性の拮抗薬または作動薬をアッセイすることを意図する。

【0115】

本発明の方法を用いてアッセイされうる作動薬および拮抗薬は、作動薬結合部位、競合拮抗薬結合部位、非競合拮抗薬結合部位またはアロステリック部位を含む、タンパク質上または物質上の一つまたは複数の結合部位に作用しうることが理解されると考えられる。

【0116】

本発明はまた、マウスp97の作動薬の効力を阻害する拮抗薬のスクリーニングも可能にする。したがって本発明は、マウスp97の同じ結合部位に関して競合する物質をアッセイするためにも用いられうる。

【0117】

(ii)ペプチド模倣物

本発明はまた、本発明のマウスp97のペプチド模倣物も含む。例えば、マウスp97の結合ドメイン由来のペプチドは、野生型の結合ドメインを模倣するような様式で、直接的または間接的に関連分子と相互作用すると考えられる。そのようなペプチドは、競合阻害剤、増進剤、ペプチド模倣物などを含みうる。これらのペプチド、および実質的に相同的、相補的、またはさもなくば機能的もしくは構造的に、これらのペプチドに等価な分子のすべてが、本発明の目的のために用いられうる。

【0118】

「ペプチド模倣物」は、分子間の相互作用においてペプチドの代用物としてはたらく構造である（概説として、Morganら（1989）、Ann. Reports Med. Chem. 24:243-252を参照）。ペプチド模倣物は、アミノ酸および/またはペプチド結合を含みうるもしくは含まない合成構造を含むが、ペプチドの構造的および機能的特徴、または本発明の増進剤もしくは阻害剤を保持する。ペプチド模倣物はまた、ペプトイド、オリゴペプトイド（Simonら（1972）Proc. Natl. Acad. Sci. US

A. 89:9367) ; および、本発明のペプチドに対応するすべての可能なアミノ酸配列を表す設計された長さのペプチドを含む、ペプチドライブラリーも含む。

【0119】

ペプチド模倣物は、D-アミノ酸によるL-アミノ酸の体系的な置換、異なった電気的特性を有する基を持つ側鎖との置換、およびアミド結合置換を有するペプチド結合の体系的な置換により得られた情報に基づいて設計されうる。候補ペプチド模倣物の活性のための立体構造の必要性を判定するために、局所的な立体構造上の制約もまた導入することができる。模倣物は、逆向ターン立体構造を安定化させるまたは促進するため、および分子の安定化を補助するための、等配電子のアミド結合またはD-アミノ酸を含みうる。環状アミノ酸類似体は、アミノ酸残基を特定の立体配位状態に制約するために用いられうる。模倣物は、阻害剤ペプチドの二次構造の模倣物も含むことができる。これらの構造は、アミノ酸残基の3次元配向を、タンパク質の公知の二次構造中で模擬(model)しうる。またN置換型アミノ酸のオリゴマーであるペプトイドを用いてもよく、新規分子の化学的に多様なライブラリー作製のためのモチーフとして用いることができる。

【0120】

本発明のペプチドは、薬物開発のためのリード化合物を同定するためにも使用されうる。本明細書において記載されたペプチドの構造を、NMRおよびX線結晶学のような多くの方法により、容易に決定できる。配列上は類似しているが、標的分子内で顕在化される生物学的活性上は異なるペプチドの構造比較は、標的の構造と活性の関係についての情報を提供できる。構造と活性の関係の試験から得られた情報は、変更されたペプチド、または標的分子と関係すると予想される性質に関して試験されうるその他の小分子もしくはリード化合物を設計するために用いられうる。リード化合物の活性は、本明細書において記載されたものと同様のアッセイ法を用いて評価されうる。

【0121】

構造と活性の関係についての情報は、共結晶化研究からも得られうる。これらの研究において、望ましい活性をもつペプチドは標的分子と結合して結晶化され、複合体のX線構造が決定される。構造は次に天然状態の標的分子の構造と比較

され、そのような比較からの情報は、入手したい化合物を設計するために用いられうる。

【0122】

(e) 薬物のスクリーニング方法

一態様によると、本発明は、マウスp97タンパク質の活性を増大または減少させる能力に関して候補化合物をスクリーニングする方法を可能にする。そのような化合物は、例えばアルツハイマー病の治療において治療的有効性を有しうる。この方法は、p97活性をアッセイし、候補化合物または被験化合物の存在下または非存在下における活性をアッセイし、かつ化合物がp97活性を増大または減少させるかどうかを判定するためのアッセイ系の提供を含む。

【0123】

従って、本発明は、以下の段階を含む、マウスp97タンパク質の活性または発現に影響する化合物を同定するための方法を提供する：

- (a)被験化合物をマウスp97タンパク質またはマウスp97タンパク質をコードする核酸とともにインキュベートする段階；ならびに
- (b)マウスp97タンパク質の活性量または発現量を決定し、かつ対照（すなわち被験化合物の非存在下）と比較する段階であって、対照と比較したマウスp97タンパク質の活性または発現の変化によって、被験化合物がマウスp97タンパク質の活性または発現に影響を及ぼすことが示される段階。

【0124】

さらなる態様によると、本発明は、p97タンパク質の発現を増加または減少させるための能力に関して候補化合物をスクリーニングする方法を可能にする。この方法は、細胞がレポーター遺伝子のコード領域に機能的に結合されたp97遺伝子またはその一部を含む、細胞を候補化合物とともに置く段階、およびレポーター遺伝子の発現における変化を検出する段階を含む。

【0125】

一つの態様において、本発明は、p97の発現に及ぼす影響を試験するために、p97遺伝子およびしたがってp97タンパク質産物を発現する細胞株が候補化合物とインキュベートされる培養系を可能にする。そのような培養系を、他のタンパク

質との相互作用を通じて、マウスp97の発現またはその機能を上方制御または下方制御する化合物を同定するために用ることができる。

【0126】

そのような化合物は、タンパク質化合物、化学物質、および培養培地に加えらる様々な薬物から選択されうる。選択された被験物質（又は複数）の存在下でのインキュベーション期間の後、標準的なノーザンブロッティング手順を用いてp97mRNAレベルを定量することによってp97の発現を試験でき、被験化学物質の結果としての発現における任意の変化を判定できる。p97を発現する構築物でトランスフェクトされた細胞株はまた、タンパク質発現を変更するために開発された化合物の機能を試験するためにも用いられうる。さらに、通常のp97タンパク質を発現する形質転換細胞株はまた、突然変異誘発剤の使用によって突然変異誘発されうり、改変表現型を産生しうる。ここで、タンパク質産物の構造/機能の関係およびその生理学的影響を研究するために、変異p97の役割を研究できる。

【0127】

動物モデルもまた、新規薬物を試験するために重要であり、したがってp97の発現および活性、ならびにしたがって生理学的機能に影響を及ぼす任意の潜在的に有用な化合物を同定するためにも用いられうる。増大されまたは減少されたp97発現を含む動物モデルは、本明細書において既に記載されている。

【0128】

本発明のこれらのおよびその他の局面は、発明の範囲を説明することが意図されるがこれを限定するものではない、以下の詳細な実施例の参照において明白になると考えられる。さらに、本明細書においてその全体が参照として組み入れられる様々な特許および出版物への参照が本明細書において作られる。

【0129】

以下の限定的でない実施例は、本発明の例示である。

【0130】

実施例

実施例1

mp97のクローニング

マウスのESTデータベースにおけるポリヌクレオチド断片の同定

ヒトp97配列が、ヒトp97と有意な相同性を有する任意の現存のクローンに関するマウスESTデータベースSの検索に用いられた。相同性検索が最初に行われた時点で、利用可能な最長のmp97ESTはIMAGEクローンmf07c08.r1であった。クローンをATCC (American Type Cell Culture) から注文し、その全配列を決定した。cDNAは約2.4kbの大きさであり、コード領域および5'非転写リーダー配列の約半分が欠落した、mp97のC末端側の半分に対応する。プライマーを作製するために、公知のp97配列を用いて、以下に記載したRT-PCR法によりcDNAの不足している5'部分をクローニングした。用いたプライマーを表1に示す。

【 0 1 3 1 】

【表1】 Mp97のクローニングにおいて用いられるオリゴヌクレオチド

mMTf+1 GAC TCA AGC TTG CCA GCT GCG TGC CTG TC
 mMTf+2 GTG GTG GCT GTG GCT AGA A
 mMTf+3 TTC CCA ACA TCA CCA ACG C
 mMTf+4 CTG GAC AAG GCC CAG GAC CTG
 mMTf+5 TGA GGG AGA GGC AAG GTG
 mMTf+6 GCC AGA GCT GTA CTG TGG
 mMTf+7 CTT ATC CGT GTG AAC ATA TCT G
 mMTf+8 TGG AGA CGT TGC CAC CTG
 mMTf+9 TCT GTC GCC TCT GCC GTG
 mMTf-1 GTC AAG GAT CCG AAG GCC ACA GCC ATA TCT C
 mMTf-2 GCG TTG GTG ATG TTG GGA A
 mMTf-3 TTC TAG CCA CAG CCA CCA C
 mMTf-4 GCT CCT ACT TCT TCA GAC AAG CAG
 mMTf-5 TGC ATG CTC CAC AAG GCA CCT GAA GG
 mMTf-6 CAG GTC CTG GGC CTT GTC CAG
 mMTf-7 CCA CAG TAC AGC TCT GGC
 mMTf-8 CAC CTT GCC TCT CCC TCA
 mMTf-9 AGG CAC AGG TTC GCT GCT G
 mMTf-10 AGC AGC GGT CTT CAG AGA
 mMTf-11 GCT GGA AGT CCT CTG ACA
 mMTf-12 GTG CTA GCT AGC GCT CTG CGT CTG AGA TGG
 pME18S 5' CTT CTG CTC TAA AAG CTG CG
 pME18S 3' CGA CCT GCA GCT CGA GCA CA

【0132】

循環式 (circular) RT-PCRによるmf07c08.r1 ESTクローンの伸長 (図1)

1. JB/MSマウス黒色種細胞株

mp97タンパク質を発現することが公知であるので、マウス黒色腫細胞株JB/MSをRNA単離のために選択した。標準的な細胞培養手順に従って、98mm組織培養ペトリ皿内で細胞を培養した。用いた培地は、L-グルタミン、Hepesおよび非必須アミノ酸を添加したDMEMであった。

【0133】

2. 全RNAの単離

0.25%のトリプシンで処理し、かつ顕微鏡下で細胞分離をモニターすることによって組織培養皿からJB/MS細胞を収集した。5分間1,100 rpmで遠心分離することにより細胞をペレット状にし、6mlのGITC溶解緩衝液を加えて混合することによって細胞を溶解した。4mlのCsClを12mlの超遠心管に加えることによってCsClクッションを調製した。CsClクッション上に細胞溶解液を重層した。室温で16時間32,000rpmでチューブを遠心分離し、上清を取り除き、チューブ中でペレットを空気乾燥させた。200 μ lの蒸留水でRNAを含むペレットを溶解させ、エタノール沈殿した。最終RNAペレットを、蒸留され脱イオンされた200 μ lの水に溶解させた。

【0134】

3. ポリA+ mRNA単離

製造者の説明書に従ってプロメガPolyATtract mRNA単離システムIIIを用いてポリA+ mRNAを単離した。

【0135】

4. mp97特異的逆転写

逆転写のためのプライマーは、

mMTf-5: TGCATGCTCCACAAGGCACCTGAAGG

であった。微量遠心管中に最終容量12 μ lで、200ngのmMTf-5を、80ngのJB/MSポリA+ mRNA、およびdH₂Oと混合させた。混合物を10分間70 °Cで加熱してRNAを変性させ、氷上で素早く冷却した。4 μ lの5×第一鎖緩衝液 (First Strand Buffer) を、2 μ lの0.1M DTTおよび1 μ lの10mM dNTP混合液に加えた。チューブの内容物を2分間42 °Cで予熱し、200ユニットのSuperScript II (GIBCO BRL) を加えた。チューブを1時間42 °Cでインキュベートし、15分間75 °Cで加熱することによって反応を停止した。20分間37 °Cで2ユニットのRNaseHと共にインキュベートすることによってRNAを除いた。

【0136】

5. 一本鎖cDNA連結

50 μ l連結反応を次のように設定した：50mMのHepes pH7.4、10mMのMgCl₂、5mM

のDTT、5 μ lの第一鎖cDNA、2mMのATP、26ユニットのT4 RNAリガーゼ。連結反応物を一晩17 でインキュベートした。

【0137】

6. 循環式PCR

用いた戦略を図1に模式的に示す。用いたプライマー対は以下のようであった

:

mMTf+1 GACTCAAGCTTGCCAGCTGCGTGCCTGTC

HindIIIアダプターを有するmp97コード鎖に対応する、 $T_m=64$; および

mMTf-1 GTCAAGGATCCGAAGGCCACAGCCATATCTC

BamHIアダプターを有する非コード鎖に対応する、 $T_m=62$ 。

【0138】

PCR反応:

滅菌蒸留水、1 \times Pfu緩衝液、0.2mMのdNTP、1 μ lの連結された一本鎖cDNA、0.26 pmolの両プライマー、および5ユニットのクローニングされたPfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) を含む100 μ l容量で反応を行った。94 30秒間、57 30秒間、および72 4分間を30サイクル行うことにより増幅させた。

【0139】

7. PCR産物のクローニング

PCR産物のゲル生成:

PCR反応物の一部を0.7%アガロースゲル上にロードした。有意な非特異的産物を全く含まない0.8kb断片を増幅した。業者の説明書に従ってQIAEX IIゲル抽出キット (QIAGEN) を用いて断片を精製した。

【0140】

制限酵素消化:

23ngの精製されたPCR産物および1 μ gのpBluescript (KS+) ファージミドDNAを、37 で1時間BamHIおよびHindIIIの両制限酵素を用いて消化した。

【0141】

DNA精製:

消化されたPCR産物をクロロホルムで2回抽出し、エタノール沈殿した。QIAEX IIゲル抽出キットを用いて、上記のように、切断したファージミドDNAをゲル精製した。

【0142】

連結反応は、滅菌蒸留水、精製された0.8kb断片およびpBluescript II、10×連結反応緩衝液および1.5ユニットのT4DNAリガーゼをともに混合することによって、12μlの最終容量で設定された。反応を16℃で一晩行った。

【0143】

形質転換：

エレクトロポレーションのために1μlの連結混合物を用いて、宿主細菌DH10Bを形質転換した。形質転換された細菌を、37℃で1時間LB培地中で増殖させ、その後LB + アンピシリン + IPTG + X-Galプレート上に広げ、37℃で一晩インキュベートした。2個の白色コロニーをプラスミドDNA調製のために選択した。

【0144】

プラスミドDNA単離は、製造者の説明書に従ってウィザード (Wizard) DNA単離キット (Promega) を用いて行われた。両クローンは、BamHIおよびHindIIIで消化された場合に予想される大きさが0.8kbである挿入物を有した。

【0145】

マウスp97Mp97 cDNA配列の決定

すべてのDNA配列決定は、ブリティッシュコロンビア (British Columbia) 大学のバイオテクノロジー研究室の核酸/タンパク質サービス (the Nucleic Acid/Protein Service: NAPS) ユニットで行われた。用いたDNA鋳型は、0.8kbの循環式RT-PCR産物またはクローニングされたプラスミド、および2つのESTクローンであった。サイクル配列決定反応を、以下のようなパーキンエルマーサーマルサイクラー (Perkin-Elmer thermal cycler) を用いて、PEアプライドバイオシステム BigDyeターミネータープレミックス (PE Applied Biosystems BigDye terminator premix) により行った：20μl容量中、4μlのプレミックス、500ngのプラスミドDNAまたは90ngのPCR産物、3.2pmolのプライマー。温度サイクルは以下から構成されていた：

ラピッドサーマルランプ (Rapid thermal ramp) 96 まで ;

96 で30秒間 ;

ラピッドサーマルランプ50 まで ;

50 で15秒間 ;

ラピッドサーマルランプ60 まで ;

60 で4分間 ;

全25サイクル ;

ラピッドサーマルランプ4 (浸漬ファイル (soak file)) および保持。

【0146】

エタノール沈殿により反応物を精製し、パーキンエルマーモデル 480 (Perkin-Elmer Model 480) 機械で配列決定した。DNASIS配列解析ソフトウェア (Hitachi Software) および/または他のオンラインDNA配列解析プログラムを用いて、生の配列データを編集してコンパイルした。今日までに、3個のmp97cDNAクローンを用いて3,937bpのmp97 cDNA混合物の配列を決定した。cDNA配列を配列番号: 1に示し、予想されるタンパク質配列を配列番号: 2に示す。

【0147】

実施例2

切断されたmp97タンパク質の発現

細菌発現系pGEXおよびmp97タンパク質発現構築物の作製

pGEX系が、誘導可能な高レベル発現、および発現産物の親和性精製の容易さにより選択された。クローニングされたcDNAは、N末端においてグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) で融合タンパク質を産生する。GSTは、融合タンパク質の親和性精製のために用いられるトリペプチドグルタチオン (-Glu-Cys-Gly) と高い親和性を有する。GSTから関心対象のタンパク質を切除するために用いられる融合接合部 (junction) には、トロンピン切断部位が設計されている。

【0148】

その時点で最長のmp97 ESTであるmf07c08.r1を、pGEX系における発現のために用いた (Pharmacia)。EcoRIおよびNotI部位でベクター-pT7T3D (Pharmacia) 中にDNAをクローニングした。ESTの5'EcoRI部位は、EcoRI部位で融合された場合に

pGEX-4T-1のGSTコード領域とインフレーム (in frame) になる。従って、pGEX-4T-1を発現のために選択した。EcoRIおよびNotIの二重消化：それぞれ約4 μ gのmf07c08.r1およびpGEX-4T-1のDNAを、37 $^{\circ}$ Cで1.5時間、EcoRIおよびNotI酵素の両方を用いて消化した。消化されたDNAを一度フェノール/クロロホルムで抽出し、かつ一度クロロホルムのみで抽出し、その後エタノール沈殿した。抽出されたDNAを0.7%アガロースゲル上にロードし、2.4 kbのESTおよび線状化pGEXを精製のために切除する。業者の説明書に従ってQIAEX IIゲル抽出キット (QIAGEN) を用いてDNAのゲル精製を行った。最終容量25 μ lでDNAを溶出させた。

【0149】

連結反応を以下のように構成した：6 μ lのEST + 6 μ lのpGEX + 1.5 μ lの10 \times 緩衝液 + 1.5 μ lのT4DNAリガーゼ。反応物を一晩16 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。1 μ lの連結反応物を用いて、エレクトロコンピテント細菌DH10Bを形質転換した。製造者の説明書に従って、E-Cアパラス社 (E-C Apparatus Corporation) のEC100エレクトロポレーターを用いてエレクトロポレーションを行った。形質転換された細胞をLB + アンピシリンプレートに蒔いた。プラスミドDNA調製のために10個の別々のコロニーを選択し、陽性クローンをスクリーニングした。EcoRIおよびNotIの両方で消化されたとき、10個すべてのプラスミドDNAが約2.4kbの同一の挿入物断片を放出した。

【0150】

GST-p97mp97融合タンパク質の発現および精製

細菌培養：

100mlのLB + アンピシリンに、別々のpGEX-mp97コロニーを接種し、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。次の日に、1リットルのLB + アンピシリンに50mlの一晩培養液 (1:20希釈) を接種し、100分間37 $^{\circ}$ Cで増殖させ続けた。発現を誘導するために、0.5M IPTGを加えて最終濃度0.15mMとし、培養物を更に3時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。

【0151】

親和性精製：

細菌を5,000gで10分間ペレット状にして、上清を取り除き、かつペレットを一

晩 -80 で凍結した。ペレットを、全体で20mlの氷冷PBS中で再懸濁し、設定3で3×15秒間、Branson Sonifier 450および5mmプローブを用いて、細菌を超音波処理して溶解させた。トリトンX-100を溶解液に加えて、最終濃度1%となるように細胞を溶解させた。溶解液を含むチューブを、細胞片を取り除くために5分間10,000gで遠心分離し、かつ上清を清潔な50mlチューブに移した。1mlのグルタチオンを架橋 (cross linked) ビーズ状 (beaded) アガロース (Sigma、業者の説明書に従って再水和させて洗浄した) を加えた。チューブを、内容物を混合するために室温で穏やかに振盪した。アガロースビーズを30秒間1,000gで遠沈させ、再懸濁および1,000gで遠心分離することにより50mlの氷冷PBSで3回洗浄した。GST-mp97融合タンパク質を、1mlの50mM Tris-HCl (pH8.0) + 5mMの還元型グルタチオンを混合し、5分間室温で振盪し、および30秒間1,000gで遠心分離することによって溶出した。溶出段階をさらに4回繰り返した。溶出された融合タンパク質はSDS-PAGEにより特徴づけられ、見かけ上約63kDa (約27kDaのGSTを含む) の分子量を有していた。

【0152】

GSTからのmp97タンパク質の切断および精製：

融合タンパク質を、2時間30 でインキュベートすることによって、0.5ユニット/10 μ lのトロンピンで切断した。切断されたGSTは、上記の手順に従ってグルタチオン結合アガロースビーズにより混合物から取り除かれた。

【0153】

実施例3

mp97タンパク質に対するポリクローナル抗体の産生

2匹のニュージーランドホワイトウサギ (New Zealand White rabbits) を100 μ gの精製mp97タンパク質で免疫化し、その後さらに3ヶ月間毎月追加免疫化した。免疫化は、以下のような複数の場所への注射により行われた：初回免疫化、リンパ節注射および静脈注射；第二の免疫化、肩甲下 (sub-scap) 注射および筋肉内注射；第三の免疫化、リンパ節注射および静脈注射；最終採血。各注入から10日後、30ml ~ 35mlの血液を取得して抗体の力価を検査した。最初に血液を、チューブから分離させるためにときどき攪拌しながら37 で1時間加熱して、一晩4

で放置し、血清を回収した。その後0.2uM滅菌濾過ディスクで血清を濾過し、-80で保存した。上記のGST融合から切り離されたmp97断片の発現に対する抗体力価に関して血清を試験した。

【0154】

現在好ましい実施例であると考えられるものを参照として本発明を記載してきたが、本発明は、開示された実施例に限定されないことが理解されるべきである。反対に、本発明は、添付の特許請求の範囲の趣旨および目的に含まれる様々な変更および同等物に及ぶことが意図されている。

【0155】

それぞれの出版物、特許または特許出願が、特異的かつ個別にその全体が参照として組み入れられることが示されるのと同程度に、すべての出版物、特許、および特許出願は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

配列番号：1

TGGCCTACTG GGAAGAGGAA GCCAGGACAG ACCCGCCAGC ACCCCAGCCA ACCCAACGTT
 GCCATGAGGC TCCTGAGCGT GACTTTTTGG CTA CTCTCTGT CCCTGCGCAC TGTGCTGTGT
 GTGATGGAGG TGCAGTGGTG TACCATCTCA GACGCAGAGC AGCAGAAGTG CAAAGACATG
 AGCGAGGCCT TCCAGGGAGC TGGCATTCGT CCTTCCCTTC TCTGCGTCCA GGGCAACTCC
 GCTGACCACT GTGTCCAGCT CATCAAGGAA CAAAAAGCAG ATGCCATCAC CCTGGATGGA
 GGGGCCATCT ATGAGGCAGG GAAGGAGCAC GGCCTGAAGC CAGTGGTGGG GGAAGTCTAT
 GACCAAGACA TTGGGACTTC CTATTATGCC GTGGCTGTGG TCAGGAGGAA TTCCAATGTT
 ACCATCAACA CCTGAAGGG CGTCAAGTCC TGCCACACAG GCATTAACCG GACTGTGGGC
 TGGAACGTGC CTGTGGTTA CCTCGTAGAG AGCGGCCATC TGTCAGTGAT GGGCTGTGAT
 GTGCTCAAAG CCGTGGTGA TTATTTTGA GGCAGCTGTG TCCCTGGAAC AGGAGAAACC
 AGCCATTCAG AGTCCCTCTG TCGCTCTGC CGTGGCGACT CTTCTGGCA CAATGTGTGT
 GACAAGAGTC CCTAGAGAG ATACTACGAC TACAGTGGAG CCTTCCGGTG CCTGGCGGAA
 GGAGCCGGTG ACGTGGCCTT CGTGAAGCAC AGCACAGTGC TGGAAAATAC TGATGGAAC
 ACCCTGCCTT CCTGGGGCAA GTCCCTGATG TCAGAGGACT TCCAGCTACT ATGCAGGGAT
 GGCAGCCGAG CCGACATCAC TGAGTGGAGA CGTTGCCACC TGGCCAAGGT GCCTGCTCAT
 GCTGTGGTGG TCAGGGTGA CATGGATGGC GGTCTCATAT TCCAAGTGT CAACGAAGGC
 CAGCTTCTGT TCAGCCAYGA AGACAGCAGC TTCCAGATGT TCAGCTCAA AGCTACAGC
 CAGAAGAACT TGCTGTTCAA AGACTCCACC TTGGAGCTTG TGCCCATTCG CACACAGAAC
 TATGAGGCCT GGCTGGGCCA GGAATACCTG CAGGCCATGA AGGGGCTCCT CTGTGATCCC
 AACCGCTGC CCCACTACCT GCGCTGGTGT GTGCTGTCAG CGCCCGAGAT CCAGAAGTGT
 GGAGATATGG CTGTGGCCTT CAGCCGCCAG AATCTCAAGC CGGAAATTC A GTGTGTGTG
 GCCGAGTCCC CTGAGCACTG CATGGAGCAG ATCCAGGCTG GGCACACTGA CGCTGTGACT
 CTGAGGGGCG AGGACATTTA CAGGCAGGA AAGGTGTACG GCCTGGTTCC GGCGGCCGGG
 GAGCTGTATG CTGAGGAGGA CAGGAGCAAT TCCTACTTTG TGGTGGCTGT GGCAAGAAGG
 GACAGCTCCT ACTCCTTCAC CCTGGACGAG CTTTCGGGCA AGCGTTCCTG CCACCCCTAC
 TTGGGCAGCC CAGCGGGCTG GGAGGTGCC ATCGGCTCCC TCATCCAGCG GGGCTTCATC
 CGGCCAAGG ACTGTGATGT CCTCACAGCG GTGAGCCAGT TCTTCAATGC CAGCTGCGTG
 CCTGTCAACA ACCCTAAGAA CTACCCTTCC GCACTATGTG CGCTCTGCGT GGGAGACGAG
 AAGGGCCGCA ACAAATGTGT GGGGAGCAGC CAGGAGAGAT ACTACGGCTA CAGCGGGGCC
 TTCAGGTGCC TTGTGGAGCA TGCAGGGGAC GTGGCTTTG TCAAGCACAC GACTGTCTTT
 GAGAACACAA ATGGTCACAA TCCTGAGCCT TGGGCTTCTC ACCTCAGGTG GCAAGACTAT
 GAACTACTGT GCCCAATGG GGCACGGGCT GAGGTAGACC AGTTCCAAGC TTGCAACCTG
 GCACAAAATGC CATCCCACGC TGTGATGGTC CGTCCAGACA CCAACATCTT CACTGTGTAT
 GGACTTCTGG ACAAGGCCA GGACCTGTTT GGAGACGACC ATAACAAGAA CGGTTTCCAA
 ATGTTTGACT CCTCCAAATA TCACAGCCAA GACCTGCTTT TCAAAGATGC TACAGTCCGA
 GCGGTGCCAG TCCGGGAGAA AACCACATAC CTGGACTGGC TGGGTCTGA CTATGTGGTT

GCGCTGGAGG GGATGTTGTC TCAGCAGTGC TCCGGTGCAG GGGCCGCGGT CGAGCGAGTC
 CCCCTGCTGG CCCTGCTCCT GCTGACCCTG GCTGCAGGCC TCCTTCCTCG CGTTCTCTGA
 AGACCGCTGC TTCAGGCCAC GCCCAGAGCA GGGAAAGCTA CAGAGCTCAA CCGGAAGAAA
 CCAGGACATC AGCTAACCCCT GCAGGAGAGC GCGGGGCGGG ATGAGGAGAG GCAAGGTGAG
 AACTCACACA CACACACAAG CCTCCGAGGT GCGATTCTAA CCCAAAGAGA AATTTCTAGA
 ATCAGGATGA TTGTTAAGGC CAAGTCTTCC CACTTGCTGG AGCCCTCAAT ACCTGAGGCG
 ACTGGCGAGT ACGCCAGTCA CTCCTCCCAC ACCGGTGGCG CCAGCAGCGA ACCTGTGCCT
 CCCACCTGGA GCCTCCTGGC TGGCTGGGGT GGTAAAGGGG GGGGGGGGA GAGTGAAGAT
 GCTGGTTGCC ATGGCAACCG TGGAGCAGCT TCCAGCCTCT GTACCGGCCA CCTGGTGAGA
 TGCCAAGGAA GGAGCACACC ACCAACCTAG GGAACCTGTG CGACACACTA CCACCCAGCA
 GCCCTGCTT TCGCTGCCCC ACCGCTCTTT CCTATGGGCA CTTGTCCACC AAGGCCACAC
 CGTCGGAGGG GCAAGGCTGC TGAGCACATC AGCCTTCTGA TGTGACACCA ACCAAGGAGC
 CCAGCCCTCT GGACAGCAAG TTTTGCTAGA CTGGGATGGG AGGAAGGCCA GAGCTGTACT
 GTGGGGATGA AGTCCTCCAA AACCTCAGAG GAAGGAAGTG CCCCACCTT CCCATTAAGA
 ATGTTAGTGT GTGAGAACT TGATGCAGGG TGGAAACTAT CCTGTTTAAAC GGCTCCCGTG
 GCAAGCAGGA CTTGCGCTGT CTGCGCTGCC TGGACCTCAC TGCACAATGA AACTGTTGCC
 GAGATCTAT TGTFTGCTCT CCTGGTCTCA GTCTCAACAT TAGTTTTCTC CCTGCCTTCA
 TATACCCCTT CCCACATCAC CACGCAAGCA CGCACGCGCA CACGCACACG CACACACCTT
 ATCCGTGTGA ACATATCTGA ACATATCTGC TTGTCTGAAG AAGTAGGAGC TAACCCAAAA
 TAACITTCCTG TCATGAGCTG GGCCTTGGGA TATACCACGA GCCAGGGGAT TGGGGAGAGC
 CCTGTCTTCC CTTACCCCTG CACCTGTTGG GCAGTTGCAT CTTTCGAGAG GATCCCTGGT
 TCTCTCGAAC TGTGAGAGCC AAGGCCTAGG CTGCCATTTT GCCATTGTTT TCTCGAGAAC
 CAGAAAAAGT TTTCCAAAGC TACCAGCTCT TACCCAGAT CTTGTTCCCT TAAAAAAAAG
 TAATAAATAA AAAGGAGAAG AAACAGGAGC AAACAGCCAT CGTCAGCACA CTGGAAGCAG
 CGTGGGCCCG GAGCTATTTG TGTCTTGGTC TGTGTGGGGG GCCTCAGATC CCAATGACAG
 GCCAGGTTCC CAGTGGCTCG CCCCACCTG TGGGCGACGA CGGGACAGAT CCTTTCCATG
 GCTCACCAGT AGAGAAGGTC CTGGCAGTGT CCCAGCCAGA GTCACACAAT CCTGAGGAAA
 ATCGGTCACC ATGGTGCTTG GGAGAGCAAG CCCCTCCTCC TCCCAGTACA CAGCCATCCA
 TTCTTCTCTG AGCTGGGGAC TTCACAGTGA GAAGTGTA CTGTGTGGGC GACTGTGCTG
 CCCAAAGTGT GATGTCCTGT CCGTGTGCC TTCAGGTGTG ACTTTGAAGA GCGTTGTGTA
 AATGACGTCT GATTGCCATG GGCCACTGCT GTGTTTGTGC TAAAGAAAGA CATTGGTTTC
 TTTTAAAAAT AAAGCCATAT ATCCCTGCAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

配列番号：2

MRLLSVTFWL LLSLRTVVCV MEVQWCTISD AEQQKCKDMS EAFQGAGIRP SLLCVQGNNA
 DHCVQLIKEQ KADAITLDGG AIYEAGKEHG LKPVVGEVYD QDIGTSYYAV AVVRRNSNVT
 INTLKGVKSC HTGINRTVGW NVPVGYLVES GHLSVMGCDV LKAVGDYFVG SCVPGTGETS
 HSESLCRLCR GDSSGHNVCV KSPLERYDYD SGAFRCLEAG AGDVAFVKHS TVLENTDGNT
 LPSWGKSLMS EDFQLLCDRG SRADITEWRR CHLAKVPAHA VVVRGDMGG LIFQLLNEGQ
 LLFSHEDSSF QMFSSKAYSQ KNLLFKDSTL ELVPIATQNY EAWLGQEYLQ AMKGLLCDPN
 RLPHYLRCV LSAPETQKCG DMAVAFSRQN LKPEIQCVSA ESPEHCMEQI QAGHTDAVTL
 RGEDYRAGK VYGLVPAAGE LYAEEDRSNS YFVVAVARRD SSSYF'TLDEL RGKRSCHPYL
 GSPAGWEVPI GSLIQRGFIR PKDCDVLTAV SQFFNASCVP VNNPKNYPSA LCALCVGDEK
 GRNKC VGSSQ ERYYGYS GAF RCLVEHAGDV AFVKHTTVFE NTNGHNPEPW ASHLRWQDYE
 LLCPNGARAE VDQFQACNLA QMPSHAVMVR PDTNIFTVYG LLDKAQDLFG DDHNKNGFQM
 FDSSKYHSQD LLFKDATVRA VPVREKTTYL DWLGPDYVVA LEGMLSQQCS GAGAAVERVP
 LLLALLLTLA AGLLPRVL

【図面の簡単な説明】

本発明は、以下の図面に関して記載される：

【図1】 mp97cDNAの5'末端を増幅するための循環式RT-PCRの使用法を示す概略図である。

【図2】 mp97cDNAの概略図である。

【図3】 mp97タンパク質構造の概略図である。

【図4】 mp97およびhp97タンパク質構造を比較する概略図である。

【図5】 マウスとヒトのp97タンパク質間で保存された、構造的特徴を例示する概略図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> University of British Columbia
 Cheng, Nick
 Gagnier, Liane
 Jefferies, Wilfred A.

<120> Compositions and Methods for Screening Therapeutic Agents

<130> 7685-42

<160> 2

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
 <211> 4068
 <212> DNA
 <213> murine

<400> 1
 tggcctactg ggaagaggaa gccaggacag acccgccagc accccagcca acccaacggt 60
 gccatgaggc tcctgagcgt gacttttttg ctactcctgt ccctgcgcac tgtcgtctgt 120
 gtgatggagg tgcagtggtg taccatctca gacgcagagc agcagaagtg caaagacatg 180
 agcagggcct tccagggagc tggcattcgt ccttcccttc tctgcgtcca gggcaactcc 240
 gctgaccact gtgtccagct catcaaggaa caaaaagcag atgccatcac cctggatgga 300
 ggggccatct atgaggcagg gaaggagcac ggccctgaagc cagtgggtgg ggaagtctat 360
 gaccaagaca ttgggacttc ctattatgcc gtggctgtgg tcaggaggaa ttccaatggt 420
 accatcaaca ccctgaaggg cgtcaagtcc tgccacacag gcattaaccg gactgtgggc 480
 tggaaacgtgc ctgtcgggta cctcgtagag agcggccatc tgtcagtgat gggctgtgat 540
 gtgctcaaag ccgttgggta ttattttga ggcagctgtg tccttggaa aggagaaacc 600
 agccattccg agtccctctg tcgcctctgc cgtggcgact cttctgggca caatgtgtgt 660
 gacaagagtc ccctagagag atactacgac tacagtggag ccttccggtg cctggcggaa 720
 ggagccgggt acgtggcctt cgtgaagcac agcacagtgc tggaaaatac tgatggaaac 780
 accctgcctt cctggggcaa gtccctgatg tcagaggact tccagctact atgcagggat 840
 ggcagccgag ccgacatcac tgagtggaga cgttgccacc tggccaaggt gcctgctcat 900
 gctgtggtgg tcaggggtga catggatggc ggtctcatat tccaactgct caacgaaggc 960
 cagcttctgt tcagccayga agacagcagc ttccagatgt tcagctccaa agcctacagc 1020

cagaagaact	tgctgttcaa	agactccacc	ttggagcttg	tgcccattgc	cacacagaac	1080
tatgaggcct	ggctgggcca	ggaatacctg	caggccatga	aggggctcct	ctgtgatccc	1140
aaccggctgc	cccactacct	cgctgtgtgt	gtgctgtcag	cgcccagat	ccagaagtgt	1200
ggagatatgg	ctgtggcctt	cagccgccag	aatctcaagc	cggaattca	gtgtgtgtcg	1260
gccgagtccc	ctgagcactg	catggagcag	atccaggctg	ggcacactga	cgctgtgact	1320
ctgagggggc	aggacattta	cagggcagga	aagggtgtacg	gcctgggttc	ggcggccggg	1380
gagctgtatg	ctgaggagga	caggagcaat	tcctactttg	tgggtggctgt	ggcaagaagg	1440
gacagctcct	actccttcac	cctggacgag	cttcgcgcca	agcgttcctg	ccaccctac	1500
ttgggcagcc	cagcgggctg	ggaggtgccc	atcggctccc	tcatccagcg	gggcttcac	1560
cggcccaagg	actgtgatgt	cctcacagcg	gtgagccagt	tcttcaatgc	cagctgcgtg	1620
cctgtcaaca	accctaagaa	ctacccttc	gcactatgtg	cgctctgctg	gggagacgag	1680
aagggccgca	acaaatgtgt	ggggagcagc	caggagagat	actacggcta	cagcggggcc	1740
ttcaggtgcc	ttgtggagca	tgcaggggac	gtggctttcg	tcaagcacac	gactgtcttt	1800
gagaacacaa	atggtcacaa	tcctgagcct	tgggcttttc	acctcaggtg	gcaagactat	1860
gaactactgt	gccccaatgg	ggcacgggct	gaggtagacc	agttccaagc	ttgcaacctg	1920
gcacaaatgc	catcccacgc	tgtcatggtc	cgtccagaca	ccaacatctt	cactgtgtat	1980
ggacttctgg	acaaggccca	ggacctgttt	ggagacgacc	ataacaagaa	cygtttccaa	2040
atgtttgact	cctccaaata	tcacagccaa	gacctgcttt	tcaaagatgc	tacagtccga	2100
gcggtgccc	tcgggagaa	aaccacatac	ctggactggc	tgggtcctga	ctatgtggtt	2160
gcgctggagg	ggatgtttgc	tcagcagtg	tcgggtgcag	gggcccgggt	cgagcagtc	2220
cccctgctgg	ccctgctcct	gctgacctctg	gctgcaggcc	tccttctctg	cgttctctga	2280
agaccctg	ttcaggccac	gcccagagca	gggaaagcta	cagagctcaa	ccggaagaaa	2340
ccaggacatc	agctaaccct	gcaggagagc	gcggggcggg	atgaggagag	gcaaggtag	2400
aactcacaca	cacacacaag	cctccgaggt	gcgattctaa	cccaaagaga	aattttctaga	2460
atcaggatga	ttgttaaggc	caagtcttcc	cacttgctgg	agccctcaat	acctgaggcg	2520
actggcgagt	acggcagtc	ctcctcccac	accgggtggc	ccagcagcga	acctgtgcct	2580
cccacctgga	gcctcctggc	tggctgggg	ggtaagggg	ggggggggga	gagtgaagat	2640
gctgggtgcc	atggcaaccg	tggagcagct	tcagcctct	gtaccggcca	cctggtgaga	2700
tgccaaggaa	ggagcacacc	accaacctag	ggaacctgtg	cgacacacta	ccaccagca	2760
gcccctgctt	tcgctgccc	accgctcttt	cctatgggca	cttgtccacc	aaggccacac	2820
cgctggaggg	gcaaggctgc	tgagcacatc	agccttctga	tgtgacacca	accaaggagc	2880
ccagccctct	ggacagcaag	ttttgctaga	ctgggatggg	aggaaggcca	gagctgtact	2940
gtgggatga	agtcctccaa	aacctcagag	gaagggaagt	ccccacctt	ccattaaga	3000
atgttagtgt	gtgagaaact	tgatgcaggg	tggaaactat	cctgtttaac	ggctcccgtg	3060
gcaagcagga	cttgcgctgt	ctgcgctgcc	tggacctcac	tgacacatga	aactgttggc	3120
gagattctat	tgtttgctct	cctggtctca	gtctcaacat	tagttttctc	cctgccttca	3180
tatacccctt	cccacatcac	cagcaagca	cgcacgcgca	cacgcacagc	cacacacctt	3240
atccgtgtga	acatatctga	acatatctgc	ttgtctgaag	aagtaggagc	taaccocaaa	3300

```

taacttctcg tcatgagctg ggccttggga tataccacga gccaggggat tggggagagc 3360
cctgtcttcc cttcacccctg cacctgttgg gcagttgcat ctttcgagag gatccctggt 3420
tctctcgaac tgtgagagcc aaggcctagg ctgccatttt gccattgttc tctcgagaac 3480
cagaaaaagt ttccaagaac taccagctct taccacagat cttgttcctt taaaaaaaaaag 3540
taataaataa aaaggagaag aaacaggagc aaacagccat cgtcagcaca ctggaagcag 3600
cgtgggcccgg gagctatttg tgtcttggtc tgtgtggggg gcctcagatc ccaatgacag 3660
gccaggttcc cagtggctcg cccccacctg tgggcgacga cgggacagat cctttccatg 3720
gctcaccagt agagaaggtc ctggcagtgt cccagccaga gtcacacaat cctgaggaaa 3780
atcgytcacc atggtgcttg ggagagcaag cccctoctcc tcccagtaca cagccatcca 3840
ttcttctctg agctggggac ttcacagtga gaagtgtact ctgtgtgggc gactgtgctg 3900
cccaaagtgt gatgtctgtg ccgtgtgcct ttcaggtgtg actttgaaga gcgttgtgta 3960
aatgacgtct gattgccatg ggccactget gtgtttgtgc taaagaaaga cattggtttc 4020
tttttaaat aaagccatat atccctgcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4068

```

<210> 2

<211> 738

<212> PRT

<213> murine

<400> 2

```

Met Arg Leu Leu Ser Val Thr Phe Trp Leu Leu Leu Ser Leu Arg Thr
1          5          10          15
Val Val Cys Val Met Glu Val Gln Trp Cys Thr Ile Ser Asp Ala Glu
20        25        30
Gln Gln Lys Cys Lys Asp Met Ser Glu Ala Phe Gln Gly Ala Gly Ile
35        40        45
Arg Pro Ser Leu Leu Cys Val Gln Gly Asn Ser Ala Asp His Cys Val
50        55        60
Gln Leu Ile Lys Glu Gln Lys Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly
65        70        75        80
Ala Ile Tyr Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly
85        90        95
Glu Val Tyr Asp Gln Asp Ile Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val
100       105       110
Val Arg Arg Asn Ser Asn Val Thr Ile Asn Thr Leu Lys Gly Val Lys
115      120      125
Ser Cys His Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val
130     135     140
Gly Tyr Leu Val Glu Ser Gly His Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val
145     150     155     160
Leu Lys Ala Val Gly Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Thr
165     170     175
Gly Glu Thr Ser His Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp
180     185     190

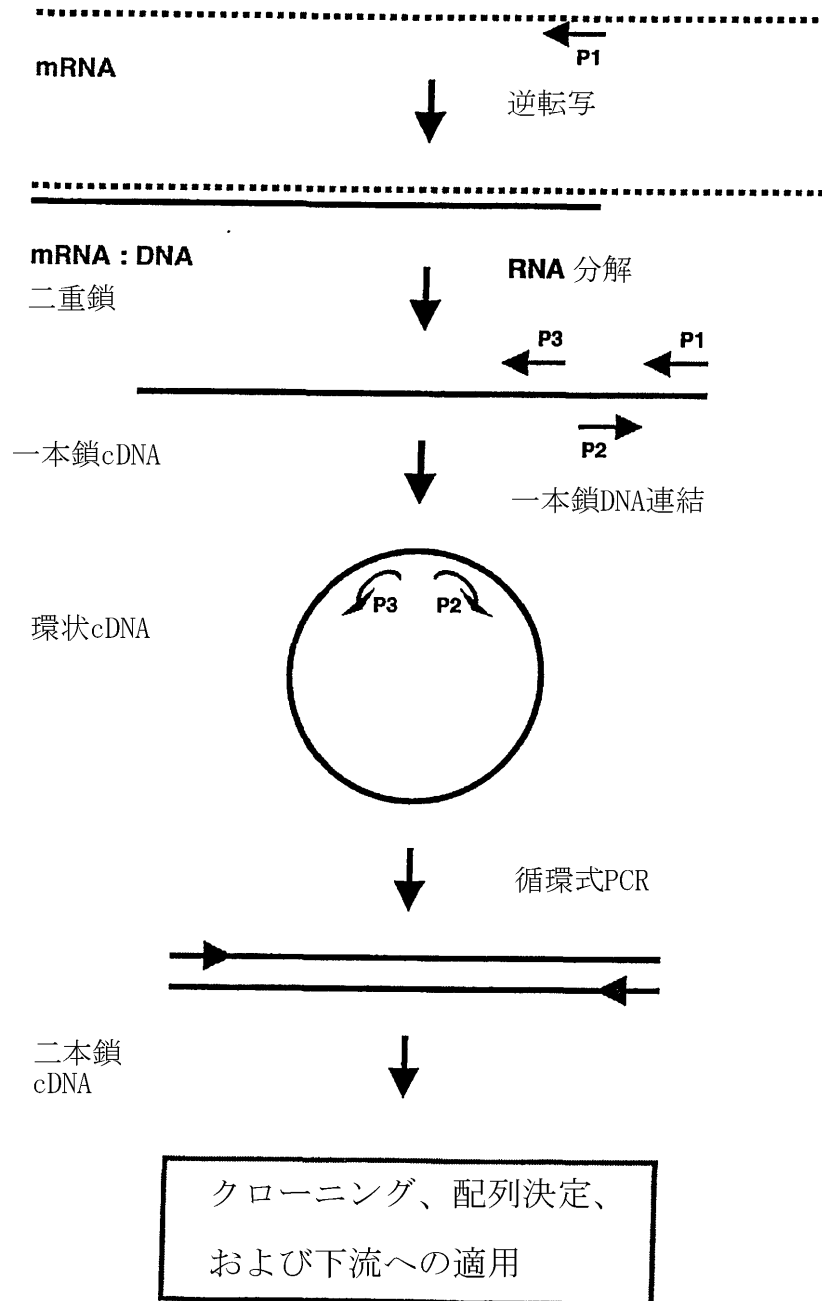
```

Ser Ser Gly His Asn Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr
 195 200 205
 Asp Tyr Ser Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val
 210 215 220
 Ala Phe Val Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Asn Thr
 225 230 235 240
 Leu Pro Ser Trp Gly Lys Ser Leu Met Ser Glu Asp Phe Gln Leu Leu
 245 250 255
 Cys Arg Asp Gly Ser Arg Ala Asp Ile Thr Glu Trp Arg Arg Cys His
 260 265 270
 Leu Ala Lys Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Gly Asp Met Asp
 275 280 285
 Gly Gly Leu Ile Phe Gln Leu Leu Asn Glu Gly Gln Leu Leu Phe Ser
 290 295 300
 His Glu Asp Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Lys Ala Tyr Ser Gln
 305 310 315 320
 Lys Asn Leu Leu Phe Lys Asp Ser Thr Leu Glu Leu Val Pro Ile Ala
 325 330 335
 Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Gln Glu Tyr Leu Gln Ala Met
 340 345 350
 Lys Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro His Tyr Leu Arg Trp
 355 360 365
 Cys Val Leu Ser Ala Pro Glu Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val
 370 375 380
 Ala Phe Ser Arg Gln Asn Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala
 385 390 395 400
 Glu Ser Pro Glu His Cys Met Glu Gln Ile Gln Ala Gly His Thr Asp
 405 410 415
 Ala Val Thr Leu Arg Gly Glu Asp Ile Tyr Arg Ala Gly Lys Val Tyr
 420 425 430
 Gly Leu Val Pro Ala Ala Gly Glu Leu Tyr Ala Glu Glu Asp Arg Ser
 435 440 445
 Asn Ser Tyr Phe Val Val Ala Val Ala Arg Arg Asp Ser Ser Tyr Ser
 450 455 460
 Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Pro Tyr Leu
 465 470 475 480
 Gly Ser Pro Ala Gly Trp Glu Val Pro Ile Gly Ser Leu Ile Gln Arg
 485 490 495
 Gly Phe Ile Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Gln
 500 505 510
 Phe Phe Asn Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro
 515 520 525
 Ser Ala Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Lys Gly Arg Asn Lys
 530 535 540
 Cys Val Gly Ser Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Ser Gly Ala Phe
 545 550 555 560
 Arg Cys Leu Val Glu His Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Thr
 565 570 575
 Thr Val Phe Glu Asn Thr Asn Gly His Asn Pro Glu Pro Trp Ala Ser
 580 585 590

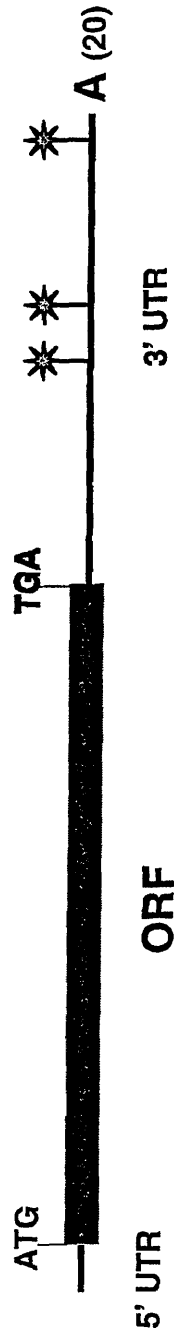
His Leu Arg Trp Gln Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg
 595 600 605
 Ala Glu Val Asp Gln Phe Gln Ala Cys Asn Leu Ala Gln Met Pro Ser
 610 615 620
 His Ala Val Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly
 625 630 635 640
 Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn
 645 650 655
 Gly Phe Gln Met Phe Asp Ser Ser Lys Tyr His Ser Gln Asp Leu Leu
 660 665 670
 Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Arg Glu Lys Thr Thr
 675 680 685
 Tyr Leu Asp Trp Leu Gly Pro Asp Tyr Val Val Ala Leu Glu Gly Met
 690 695 700
 Leu Ser Gln Gln Cys Ser Gly Ala Gly Ala Ala Val Glu Arg Val Pro
 705 710 715 720
 Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Thr Leu Ala Ala Gly Leu Leu Pro Arg
 725 730 735
 Val Leu

【図1】

mp97cDNAの5'末端を増幅するための循環式RT-PCR



【図2】

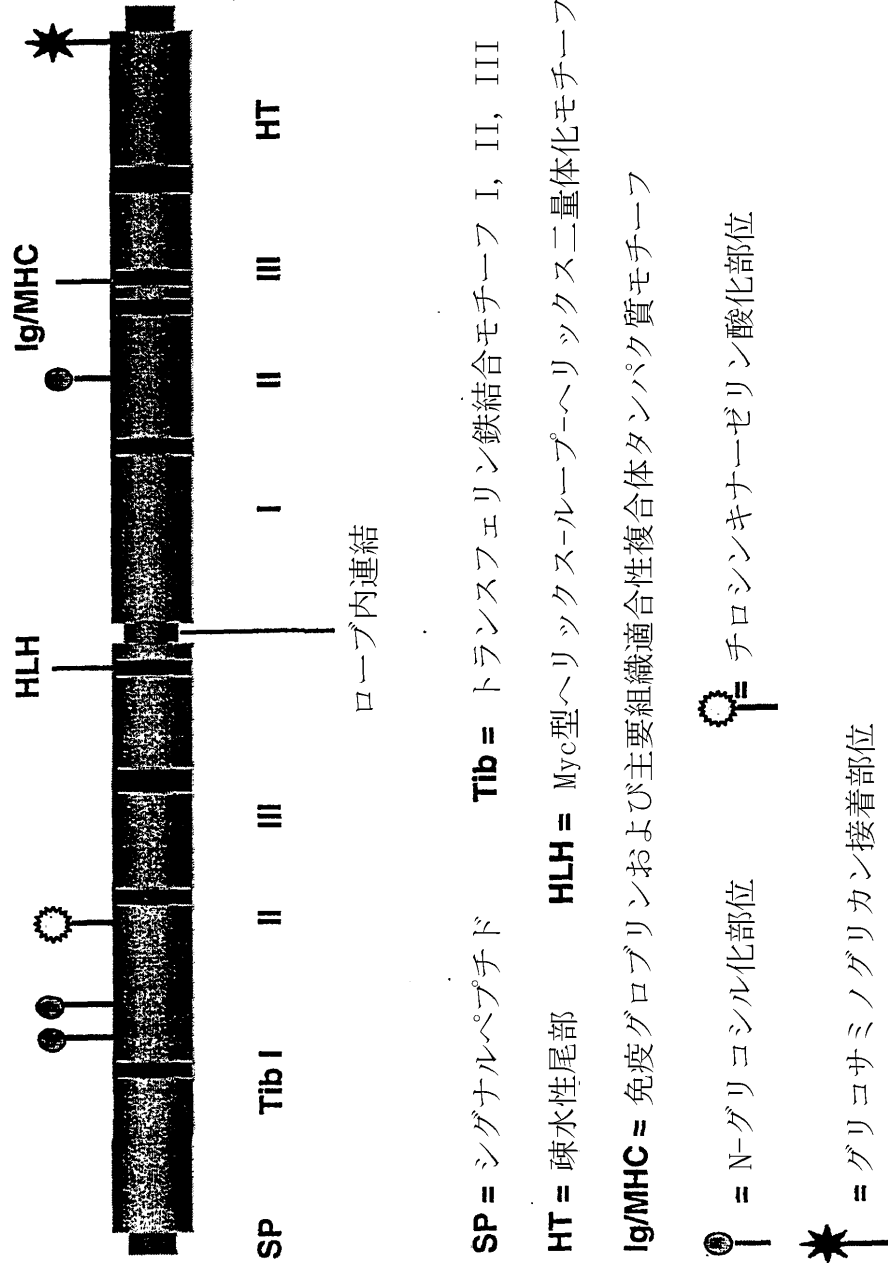


mp97 cDNAの概略図

* = 推定の選択的ポリアデニル化シグナル **AATGAA, AATAAC, AATAAA**

【図3】

mp97タンパク質構造の概略図



【図4】

マウスとヒトのp97タンパク質間の相同性

同一性 = 618/738 (83%), 陽性 = 663/738 (89%)

```

mp97: 1  MRLLSVTFWLLLSLRTVVCVMEVQWCTISDAEQKCKDMSEAFQAGIRPSLLCVQGN 60
MR S  WLLL+LRTV+ MEV+WC SD EQ KC +MSEAF+ AGI+PSLLCV+G SA
hp97: 1  MRGPGSALWLLLAALRTVLGGMEVWCATSDPEQHKCGNMSEAFREAGIQPSLLCVRG 60

mp97: 61  DHCVQLIKEQKADAITLDGGAIYEAGKEHGLKPVVGEVYDQDIGTSSYYAVAVRRNSNV 120
DHCVQLI  Q+ADAITLDGGAIYEAGKEHGLKPVVGEVYDQ++GTSYYAVAVRRR+S+VT
hp97: 61  DHCVQLLAAQEAADAITLDGGAIYEAGKEHGLKPVVGEVYDQEVGTSYYAVAVRRSSHV 120

mp97: 121 INTLKGVKSCHTGINRTVGWNVPGYLVESGHLVSMGCDVVKAVGDFGGSCVPGTGETS 180
I+TLKGVKSCHTGINRTVGWNVPGYLVESG LSVMGCDVVKAV DYFGGSCVPG GETS
hp97: 121 IDTLKGVKSCHTGINRTVGWNVPGYLVESGRLSVMGCDVVKAVSDYFGGSCVPGAGETS 180

mp97: 181 HSESLCRLCRGDSGSHNVCDKSPLERYDYSGAFRCLAEAGDVAFVKHSTVLENTDGN 240
+SESLCRLCRGDSG VCDKSPLERYDYSGAFRCLAEAGDVAFVKHSTVLENTDG T
hp97: 181 YSESLCRLCRGDSGEGVCDKSPLERYDYSGAFRCLAEAGDVAFVKHSTVLENTDGTK 240

mp97: 241 LPSWGSIMSEDFQLLCRDGSRADITEWRCHLAKVPAHAVVVRGDMGGLIFQLLNEGQ 300
LPSWG++L+S+DF+LLCRDGSRAD+TEWR+CHLA+VPAHAVVVR D DGGLIF+LLNEGQ
hp97: 241 LPSWQALLSQDFELLCRDGSRADVTEWRQCHLARVPAHAVVVRADTDGGLIFRLLNEGQ 300

mp97: 301 LLFSHEDSSFFQMFSSKAYSQKNLLEFKDSTLELVPIATQNYEAWLGQEYLQAMKGLLCDPN 360
LFSHE SSFQMFSS+AY QK+LLFKDST ELVPIATQ YEAWLG EYL AMKGLLCDPN
hp97: 301 RLFSHEGSSFFQMFSSSEAYGQKDLLEFKDSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAMKGLLCDPN 360

mp97: 361 RLPHYLRWCVLSAPEIQKCGDMAVAFSRQNLKPEIQCVSAESPEHCMEQIQAGHTDAVTL 420
RLP YLRWCVLS PEIQKCGDMAVAF RQ LKPEIQCVSA+SE+HCME+IQA DAVTL
hp97: 361 RLPPYLRWCVLSPEIQKCGDMAVAFRRQRLKPEIQCVSAKSPQHCMEQIQAEQVDAVTL 420

mp97: 421 RGEDYRAGKVYGLVPAAGELYAEEDRSNSYFVVAVARRDSSYSFTLDELRGKRSCHPYL 480
GEDYI AGK YGLVPAAGE YA ED SNSY+VVAV RRDSS++FTLDELRGKRSCH
hp97: 421 SGEDIYTAGKKYGLVPAAGEHYAPEDSSNSYFVVAVARRDSSSHAFTLDELRGKRSCHAGF 480

mp97: 481 GSPAGWEVPIGSLIQRFIRPKDCDVLTAVSQFFNASCVPVNNPKNYPSALCALCVGDEK 540
GSPAGW+VP+G+LIQRFIRPKDCDVLTAVS+FFNASCVPVNNPKNYPS+LCALCVGDE+
hp97: 481 GSPAGWDVPVGLIQRFIRPKDCDVLTAVSEFFNASCVPVNNPKNYPSLALCALCVGDEQ 540

mp97: 541 GRNKCVGSSQERYYGYSAGFRCLVEHAGDVAFVKHTTVFENTNGHNPEPWASHLRWQDYE 600
GRNKCVG+SQERYYGYS GAFRCLVE+AGDVAFV+HTTVF+NTNGHN EPWA+ LR +DYE
hp97: 541 GRNKCVGNSQERYYGYRGAFRCLVENAGDVAFVVRHTTVFDNTNGHNSEPWAAELRSEDYE 600

mp97: 601 LLCPNGARAEVDQFQACNLAQMPHSHAVMVRPDTNIFTVYGLLDKAQDLFGDDHNKNGFQM 660
LLCPNGARAEV QF ACNLAQ+P HAVMVRPDTNIFTVYGLLDKAQDLFGDDHNKNGF+M
hp97: 601 LLCPNGARAEVSQFAACNLAQIPPHAVMVRPDTNIFTVYGLLDKAQDLFGDDHNKNGFKM 660

mp97: 661 FDSSKYHSQDLEFKDATVRAVPVREKTTYLDWLGPDYVVALEGMSSQQCSGAGAAVERVP 720
FDSS YH QDLEFKDATVRAVPV EKTTY WLG DYV ALEGM SQCSGA A P
hp97: 661 FDSSNYHGQDLEFKDATVRAVPVGEKTTYRGWLGLDYVVALEGMSSQQCSGAAAPAPGAP 720

mp97: 721 LLALLLLTLAAGLLPRVL 738
LL LLL LAA LLP L
hp97: 721 LLPLLLPALAARLLPPAL 738

```

注: BlastP バージョン 2.0.9 マトリックス: BLOSUM62. ギャップ・ペナルティー: 存在:9, 伸長:2

【図5】

マウス p97



SP

Tib I

II

III

I

II

III

HT



ヒト p97

マウスとヒトのp97タンパク質間で保存された構造的特徴

マウスおよびヒトのp97タンパク質の全体的な構造は、高度に保存されている。両タンパク質は、シグナルペプチドで始まり疎水性尾部で終わる、2つの相同的なN末端ローブおよびC末端ローブを有する。タンパク質の各ローブは、3つのよく保存されたトランスフェリン鉄結合モチーフを含む。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Classification No PCT/CA 01/00133
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 A61K67/027 C07K14/79 C07K16/18		
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 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 01463 A (JEFFERIES WILFRED A ;ROTHENBERGER SYLVIA (CA); UNIV BRITISH COLUMB) 20 January 1994 (1994-01-20) cited in the application	1-3
X	abstract; claim 7 --- -/--	8-12
<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 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
11 February 2002		05.04.02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 331 851 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, B

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/CA 01/00133
--

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NAKAMASU K ET AL: "MEMBRANE-BOUND TRANSFERRIN-LIKE PROTEIN (MTF): STRUCTURE, EVOLUTION AND SELECTIVE EXPRESSION DURING CHONDROGENIC DIFFERENTIATION OF MOUSE EMBRYONIC CELLS" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, AMSTERDAM, NL, vol. 1447, 28 October 1999 (1999-10-28), pages 258-264, XP002934313 ISSN: 0006-3002 abstract -& DATABASE EMBL [Online] ID/AC: Q9R0R1, "Membrane-bound transferrin-like protein p97" XP002189421 abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-3,8-12
A	<p>WO 97 08560 A (UNIV BRITISH COLUMBIA ;JEFFERIES WILFRED A (CA); KENNARD MALCOLM) 6 March 1997 (1997-03-06) cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	8-12
A	<p>ZHONG MING QIAN ET AL: "EXPRESSION OF IRON TRANSPORT PROTEINS AND EXCESSIVE IRON ACCUMULATION IN THE BRAIN IN NEURODEGENERATIVE DISORDERS" BRAIN RESEARCH REVIEWS, ELSEVIER, XX, vol. 27, no. 3, 1998, pages 257-267, XP001031265 ISSN: 0165-0173 abstract page 259, right-hand column, paragraph 2 -page 260, right-hand column, paragraph 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-3,8-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inter application No.
 PCT/CA 01/00133
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-12

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-12

Screening for therapeutic agents for Alzheimer using mp97 as target

2. Claims: 13-18

Mouse being transgenic for p97

3. Claims: 19-29

Isolated protein having at least 80% sequence identity with amino acid sequence of SEQ ID NO:2 and derivatives therefrom

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9401463	A	20-01-1994	AU 4553793 A	31-01-1994
			WO 9401463 A1	20-01-1994
			DE 69331100 D1	13-12-2001
			EP 1018343 A1	12-07-2000
			EP 1143253 A1	10-10-2001
			EP 0651768 A1	10-05-1995
			US 5981194 A	09-11-1999

WO 9708560	A	06-03-1997	US 5981194 A	09-11-1999
			AU 717198 B2	23-03-2000
			AU 6783496 A	19-03-1997
			WO 9708560 A1	06-03-1997
			CN 1198214 A	04-11-1998
			EP 0847530 A1	17-06-1998
			JP 11511257 T	28-09-1999
			JP 3259963 B2	25-02-2002
			NZ 315997 A	30-08-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 1 2 Q	1/68	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/15		33/50	Z
	33/50		33/53	S
	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A

(81)指定国 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), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ガーグニーア リアネ
カナダ国 プリティッシュ コロンビア州
バンクーバー アキタニア プレイス
8527

(72)発明者 ジェフリーズ ウィルフレッド エイ.
カナダ国 プリティッシュ コロンビア州
サウス サリー 第23 アベニュー
12596

Fターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 BB05 BB07
BB10 BB20 BB29 BB46 BB50
CB17 DA13 DA36 FB01 FB02
FB03
4B024 AA01 AA11 BA10 BA36 CA04
CA07 DA02 EA04 GA14 HA12
4B063 QA19 QA20 QQ08 QQ43 QR08
QR42 QR56 QS25 QS34 QX02
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA41 DA75 EA20 EA28 EA50
EA51 FA72 FA74

专利名称(译)	用于筛选治疗剂的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2003525038A	公开(公告)日	2003-08-26
申请号	JP2001558738	申请日	2001-02-08
[标]申请(专利权)人(译)	英属哥伦比亚大学		
申请(专利权)人(译)	英属哥伦比亚大学		
[标]发明人	チェンニック ガーグニーアリアネ ジェフリーズウィルフレッドエイ		
发明人	チェンニック ガーグニーアリアネ ジェフリーズウィルフレッドエイ		
IPC分类号	A01K67/027 C07K14/82 C07K16/32 C07K19/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2500/00 G01N2800/2821		
FI分类号	A01K67/027 C07K14/82 C07K16/32 C07K19/00 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.S C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB05 2G045/BB07 2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/BB29 2G045/BB46 2G045/BB50 2G045/CB17 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/BA36 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA14 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/181091 2000-02-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

跨血脑屏障转运药物的方法和模型，抗体和反义寡核苷酸的制备，研究小鼠p97的实验系统，调节小鼠p97表达和/或活性的物质的方法 描述了小鼠p97核酸序列及其蛋白质和修饰物在分离以及诊断和治疗应用中的用途。

