

(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2005-501001**(P2005-501001A)**

(43) 公表日 平成17年1月13日(2005.1.13)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

C 07 K 16/40

C O 7 K 16/40

4 B O 2 4

A 6 1 K 39/395

A 6 1 K 39/395

D

4 B O 5 0

A 6 1 K 49/00

A 6 1 K 39/395

P

4 B O 6 4

A 6 1 K 51/00

A 6 1 K 49/00

Z N A A

4 B O 6 5

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/00

4 C O 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 109 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-589650 (P2002-589650)

(86) (22) 出願日 平成14年5月17日 (2002.5.17)

(85) 翻訳文提出日 平成15年11月17日 (2003.11.17)

(86) 国際出願番号 PCT/US2002/015814

(87) 国際公開番号 W02002/092782

(87) 国際公開日 平成14年11月21日 (2002.11.21)

(31) 優先権主張番号 09/859, 604

(32) 優先日 平成13年5月17日 (2001.5.17)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500430718

ロード アイランド ホスピタル

アメリカ合衆国 ロードアイランド州 プ

ロビデンス エディ ストリート 593

(74) 代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74) 代理人 100108774

弁理士 橋本 一憲

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(72) 発明者 ワンズ ジャック アール.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ワ

バン バリック ロード 210

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 悪性新生物の診断および処置

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物の細胞または体液をヒトアスパルチル（アスパラギニル） - ヒドロキシラーゼ（HAAH）ポリペプチドに結合する抗体と接触させることによって、哺乳動物において悪性新生物の成長を診断および阻害するための方法の特徴とする。HAAH特異的免疫応答を生じる免疫化方法もまた、本発明の範囲内である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物において腫瘍細胞に免疫応答を付与する方法であって、該哺乳動物にアスパルチル（アスパラギニル）-ヒドロキシラーゼ（HAAH）に結合する抗体を投与する工程を含む方法。

【請求項 2】

腫瘍細胞が、脳腫瘍細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

脳腫瘍細胞が、神経膠腫、膠芽細胞腫、星状細胞腫、および血管腫からなる群から選択される、請求項2記載の方法。

10

【請求項 4】

腫瘍細胞が脾臓癌細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

抗体がHAAHの細胞外ドメインに結合する、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

抗体がHAAHの触媒ドメインに結合する、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

触媒ドメインが、配列番号：2のアミノ酸660～700を含む、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

抗体がFB50またはそのフラグメントである、請求項1記載の方法。

20

【請求項 9】

抗体が、FB50、86A、5C7、および19Bからなる群から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

抗体が、FB50、86A、5C7、および19Bからなる群から選択される1つまたは複数の抗体の混合物である、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

抗体が高親和性の単鎖抗体である、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

細胞傷害剤に連結したHAAH結合抗体を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物において腫瘍成長を阻害する方法。

30

【請求項 13】

哺乳動物にHAAHポリペプチドを投与する工程を含む、哺乳動物においてHAAH特異的免疫応答を誘導する方法。

【請求項 14】

ポリペプチドが、配列番号：2のアミノ酸配列を含む、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

ポリペプチドが、HAAHの細胞外ドメインを含み、且つHAAHの細胞内ドメインを欠く、請求項13記載の方法。

【請求項 16】

ポリペプチドが、HAAHの触媒ドメインを含む、請求項13記載の方法。

40

【請求項 17】

ポリペプチドが、配列番号：2のアミノ酸650～700を含む、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

アジュバント組成物を投与する工程をさらに含む、請求項13記載の方法。

【請求項 19】

哺乳動物に、HAAHポリペプチドをコードするポリヌクレオチド組成物、または該ポリヌクレオチドの変性変異型を投与する工程を含む、哺乳動物においてHAAH特異的免疫応答を誘導する方法。

【請求項 20】

組成物が、トランスフェクション促進剤を含む、請求項19記載の方法。

50

【請求項 2 1】

ポリペプチドが、配列番号：2のアミノ酸配列を含む、請求項19記載の方法。

【請求項 2 2】

ポリペプチドが、HAAHの細胞外ドメインを含み、且つHAAHの細胞内ドメインを欠く、請求項19記載の方法。

【請求項 2 3】

ポリペプチドが、HAAHの触媒ドメインを含む、請求項19記載の方法。

【請求項 2 4】

ポリペプチドが、配列番号：2のアミノ酸650～700を含む、請求項23記載の方法。

【請求項 2 5】

哺乳動物の組織に、HAAHに結合する検出可能に標識された抗体を接触させる工程を含む、哺乳動物において新生物を診断する方法であって、正常な非新生物組織への結合レベルと比較した組織部位での抗体結合レベルの増加が、該組織部位での新生物の存在を示す方法。

【請求項 2 6】

抗体が、放射性化合物で標識されている、請求項25記載の方法。

【請求項 2 7】

放射性化合物が、 ^{125}I 、 ^{99}Tc からなる群から選択される、請求項26記載の方法。

【請求項 2 8】

抗体が、 Gd^{+++} または Fe^{++} で標識されている、請求項25記載の方法。

【請求項 2 9】

抗体が、比色剤で標識されている、請求項25記載の方法。

【請求項 3 0】

組織が、リンパ系組織である、請求項25記載の方法。

【請求項 3 1】

HAAHの細胞外ドメインを含み、且つ細胞質ドメインを欠く、HAAHのフラグメント。

【請求項 3 2】

配列番号：2の残基660～758を欠く、HAAHのフラグメント。

【請求項 3 3】

配列番号：2の残基679～697を欠く、HAAHのフラグメント。

【請求項 3 4】

配列番号：2の少なくとも1つの残基を欠き、該残基は、残基661、662、663、670、671、672、および673からなる群から選択される、HAAHのフラグメント。

【請求項 3 5】

FB50、86A、507、および19Bからなる群から選択される、抗体またはHAAHに結合するそのフラグメント。

【請求項 3 6】

NPVEDS（配列番号：2の残基286～291）のアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合する、抗体またはそのHAAH結合フラグメント。

【請求項 3 7】

QPWWTPK（配列番号：2の残基573～579）のアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合する、抗体またはそのHAAH結合フラグメント。

【請求項 3 8】

LPEDENLR（配列番号：2の残基613～620）のアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合する、抗体またはそのHAAH結合フラグメント。

【請求項 3 9】

抗体、またはHAAHに結合するそのフラグメントを含む、腫瘍細胞を検出するためのキット。

【請求項 4 0】

抗体の腫瘍細胞への結合を検出する手段をさらに含む、請求項39記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 4 1】

手段が検出可能なマーカーである、請求項40記載のキット。

【請求項 4 2】

検出可能なマーカーが放射性化合物である、請求項41記載のキット。

【請求項 4 3】

検出可能なマーカーが Gd^{+++} または Fe^{++} である、請求項41記載のキット。

【請求項 4 4】

ハイブリドーマFB501、ハイブリドーマHA386A、ハイブリドーマHA15C7A、およびハイブリドーマHA219Bからなる群から選択される、ハイブリドーマ細胞株。

【請求項 4 5】

酵素活性を欠く、HAAHのフラグメント。

10

【請求項 4 6】

ケトグルタル酸結合ドメインおよびEGF様ドメインを欠く、HAAHのフラグメント。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

(連邦政府支援研究に関する声明)

本発明は、国立衛生研究所認可CA-35711、AA-02666、AA-02169、およびAA11431による米国政府支持のもとでなされた。本政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0002】

20

(発明の背景)

原発性悪性中枢神経系(CNS)新生物(特に、神経膠芽細胞腫)は、脳の攻撃的かつ広範な浸潤および抗癌処置への耐性に起因して非常に致死性である。CNS癌ならびに他の癌タイプの根底にある病原機構の解明が進行しているが、腫瘍特異的治療アプローチおよび診断方法は、大いに捕らえどころがなかった。

【発明の開示】

【0003】

(発明の要旨)

本発明は、哺乳動物由来の体液を、ヒトアスパルチル(アスパラギニル)-ヒドロキシラーゼ(HAAH)ポリペプチドに結合する抗体を、抗原-抗体複合体を形成するのに十分な条件下で接触させ、そしてこの抗原-抗体複合体を検出することによる、哺乳動物における悪性新生物を診断するための方法の特徴とする。このようにして検出される悪性新生物は、内胚葉組織に由来する新生物、例えば、結腸癌、乳癌、膵臓癌、肝臓癌、および胆管の癌を包含する。中枢神経系(CNS)の新生物(例えば、ニューロン細胞および神経膠細胞起源の両方の原発性悪性CNS新生物ならびに転移性CNS新生物)もまた検出される。患者由来組織試料(例えば、固形腫瘍の生検)ならびに体液(例えば、CNS由来体液、血液、血清、尿、唾液、痰、肺滲出液、および腹水)は、HAAH特異的抗体と接触される。

30

【0004】

本発明は、HAAHに結合する抗体またはこのような抗体をコードするポリヌクレオチドの哺乳動物への投与によって、哺乳動物において腫瘍細胞(例えば、脳腫瘍)に対して免疫応答を惹起するか、または免疫応答を付与する方法を含む。好ましくは、この抗体は、HAAHの細胞外ドメイン中の部位(例えば、残基1~700の範囲内の部位)に結合する。この抗体は、HAAHの外部ドメイン(配列番号:2の残基19~75)に結合する。より好ましくは、この抗体は、HAAHの触媒ドメイン(例えば配列番号:2のアミノ酸650~700)に結合する。例えば、FB50は、アミノ酸配列NPVEDS(配列番号:2の残基286~291)を有するポリペプチドに結合する。モノクローナル抗体HB0H1は、アミノ酸配列QPWWTPK(配列番号:2の残基573~579)を有するポリペプチドに結合し、モノクローナル抗体HB0H-2は、アミノ酸配列LPEDENLR(配列番号:2の残基613~620)を含むポリペプチドに結合する。HAAHの上記抗原エピトープは、悪性細胞の細胞表面上に位置する。受動免疫化に適切な他のHAAH特異的抗体には、5C7、5E9、19B、48A、74A、78A、86A、HA238A、HA221、HA239、HA241、HA32

40

50

9、およびHA355が含まれる。

【0005】

投与すべき抗体は、ヘテロ二量体抗体、単鎖抗体、または高親和性単鎖抗体である。高親和性とは、抗体の抗原特異的結合親和性がナノモル範囲の K_d を有することを意味する。好ましくは、結合親和性は、100pMまたはそれ以上の親和性の範囲内である。例えば、抗体、抗体フラグメント、または単鎖抗体は、 $10^{-10} \sim 10^{-15}$ Mの範囲の抗原特異的結合親和性を有する。

【0006】

抗体またはそのフラグメントは、抗体で処置した患者の補体を活性化する。好ましくは、抗体は、抗体で処置した患者における腫瘍細胞の抗体依存性細胞障害性を媒介する。抗体またはそのフラグメントを、単独または細胞傷害剤に連結させて投与する。後者の場合、腫瘍細胞への抗体の結合により、細胞の障害または死滅をもたらす、それにより腫瘍負荷が軽減する。抗体は、結合した細胞を、照射またはレーザー媒介死に対して敏感にする、放射化学タグまたは化学タグに連結される。

【0007】

能動免疫化によって、腫瘍成長を減少させるためにHAAH特異的免疫応答を誘導する方法もまた本発明の範囲内にある。この方法は、哺乳動物にHAAHポリペプチド（例えば、配列番号：2のアミノ酸配列を含むポリペプチド）を投与する工程を含む。免疫原性HAAHフラグメントもまた、HAAHの特定の部分に対する免疫応答を生じさせるために投与される。例えば、細胞表面上でHAAHに対する抗体応答を生じさせるために、HAAHの細胞外ドメインを含む（しかし、HAAHの細胞内ドメインを欠く）ポリペプチドを投与する。HAAH活性を阻害する抗体を生じさせるために、個体をHAAHの触媒ドメイン（例えば、配列番号：2のアミノ酸650~700）を含むポリペプチドで免疫化する。選択的に、ポリペプチド組成物は、臨床的に許容されるアジュバント化合物を含む。このようなアジュバントは、当技術分野で一般に公知であり、油乳濁液、フロイント完全および不完全アジュバント、ビタミンE、アルミニウム塩またはゲル（水酸化アルミニウム、酸化アルミニウム、またはリン酸アルミニウムなど）、サポニン、ポリアクリル酸を基にしたポリマー（カルボポールなど）、非イオン性ブロックポリマー、脂肪酸アミン（アブリジンおよびDDAなど）、デキストランを基にしたポリマー（硫酸デキストランおよびDEAEデキストランなど）、ムラミールジペプチド、ISCOM（欧州特許第109942号などに記載の免疫刺激複合体）、生分解性マイクロカプセル、リポソーム、細菌免疫刺激物質（MDPおよびLPSなど）、ならびにグルカンが含まれる。他のアジュバント化合物が当技術分野で周知である（例えば、Altman and Dixon、1989、Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine 33: 301~343に記載）。ヒトの使用にはミョウバンが好ましい。

【0008】

HAAH特異的免疫応答はまた、HAAHポリペプチドをコードするポリヌクレオチド組成物、またはHAAHコードポリヌクレオチドの変性変異型の哺乳動物への投与によって誘導される。例えば、ポリヌクレオチドは、HAAHの特異的免疫原性ドメインをコードする、配列番号：3のヌクレオチド配列もしくはその変性変異体またはそのフラグメントを含む。好ましくは、ポリヌクレオチドによってコードされるHAAHポリペプチド（または直接投与されたポリペプチド）は、酵素的に機能しない。より好ましくは、HAAHポリヌクレオチドは、分泌されるHAAHポリペプチドをコードする（例えば、構築物は、細胞から細胞外空間への輸送のためのシグナル配列を含む）。HAAHポリペプチドは、必須ヒスチジンを欠く。HAAHポリペプチドは、配列番号：2の最初の650個のアミノ酸を含む短縮HAAHである。

【0009】

選択的に、ポリヌクレオチド組成物は、沈殿剤または脂質などのトランスフェクション促進剤を含む。好ましくは、コードされるHAAHポリペプチドは、HAAHの細胞外ドメインを含み、かつHAAHの細胞内ドメインを欠く、配列番号：2（全長HAAH）のアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。好ましくは、ポリヌクレオチドは、HAAHの触媒ドメインを含む。HAAHコード配列は、プロモーター、および標的細胞中におけるポリペプチド発現のため

10

20

30

40

50

の他の調節配列に、機能可能に連結される。ポリペプチドは、細胞内に指向されるか、または細胞外発現もしくは分泌のために標識される。ポリヌクレオチドは、抗原提示のための適切なアクセサリ分子（例えば、主要組織適合抗原）を発現する、標的細胞における発現を指示する。

【0010】

診断方法は、体液中の腫瘍細胞を検出する工程および組織中の腫瘍細胞を検出する工程（インビボまたはエキソビボ）を含む。例えば、生検組織を、HAAH特異的抗体と接触させ、抗体結合を測定する。従来の診断方法を使用して検出不可能な微小腫瘍を検出するために、全身画像診断を行うことができる。したがって、哺乳動物における新生物の診断方法を、哺乳動物の組織（例えば、リンパ節）をHAAHに結合する検出可能に標識した抗体と接触させることによって行う。正常な非新生物組織への結合レベルと比較した組織部位での抗体結合レベルの増加は、組織部位での新生物の存在を示す。検出目的のために、抗体（またはそのHAAH結合フラグメント）を、非放射性タグ、放射性化合物、または比色剤で標識する。例えば、抗体または抗体フラグメントを、 ^{125}I 、 ^{99}Tc 、 Gd^{+++} 、または Fe^{++} でタグ化する。緑色蛍光タンパク質を、比色タグとして使用する。

10

【0011】

本発明はまた、HAAHの可溶性フラグメントを包含する。可溶性HAAHポリペプチドは、細胞外ドメインを含み、選択的にHAAHの細胞質ドメインまたは膜貫通ドメインの一部または全てを欠く。1つの例では、フラグメントは、配列番号：2の残基660～758を欠く。別の例では、フラグメントは、配列番号：2の残基679～697（Hisモチーフ）を欠く。さらに別の例では、フラグメントは、配列番号：2の少なくとも1つの残基を欠き、この残基は、残基661、662、663、670、671、672、および673からなる群から選択される。HAAHフラグメントは、HAAHポリペプチドであり、その長さは、全長HAAHタンパク質の長さ未満である。全長HAAHタンパク質を、表1に示す。

20

【0012】

診断キットもまた、本発明に含まれる。例えば、腫瘍細胞を検出するためのキットは、HAAHに結合する抗体またはそのフラグメントを含む。このキットは、選択的に、抗体の腫瘍細胞への結合を検出するための手段を含む。例えば、このキットは、検出可能なマーカー（例えば、 Gd^{+++} もしくは Fe^{++} などの非放射性マーカー、または放射性化合物）を含む。このキットはまた、使用説明書、正の抗原結合を決定するための標準試薬、または抗体結合の欠失を決定するための負のコントロールを含む。内容物はキット中に共に包装されている。

30

【0013】

アッセイフォーマットはまた、悪性疾患の予後のために使用される時間的データを生成するために有用である。哺乳動物の悪性新生物の予後のための方法は、（a）哺乳動物由来の体液を、HAAHポリペプチドに結合する抗体と、抗原-抗体複合体を形成するのに十分な条件下で接触させる工程、およびこの抗原-抗体複合体を検出する工程；（b）この複合体の量を定量し、体液中のHAAHのレベルを決定する工程；および（c）体液中のHAAHのレベルを、HAAHの正常コントロールレベルと比較する工程によって実施される。経時的なHAAHのレベルの増大は、疾患の進行性の悪化、および従って有害な予後を示す。

40

【0014】

本発明はまた、HAAHに結合する抗体を包含する。この抗体は、好ましくは、HAAHのカルボキシ末端触媒ドメインの部位に結合する。あるいは、この抗体は、細胞の表面に露出されるエピトープに結合する。この抗体は、ポリクローナル抗血清またはモノクローナル抗体である。本発明は、インタクトなモノクローナル抗体のみならず、免疫学的に活性な抗体フラグメント（例えば、Fabまたは $(\text{Fab})_2$ フラグメント）；操作された単鎖Fv分子；またはキメラ分子（例えば、ある抗体（例えばマウス起源の）の結合特異性、および別の抗体（例えば、ヒト起源の）の残りの部分を含む抗体）もまた包含する。好ましくは、この抗体は、FB50、5C7、5E9、19B、48A、74A、78A、86A、HA238A、HA221、HA239、HA241、HA329、またはHA355のようなモノクローナル抗体である。それらのモノクローナル抗体と同じ

50

エピトープに結合する抗体もまた、本発明の範囲内にある。

【0015】

HAAH特異的イントラボディ (intrabody) は、標的細胞 (例えば、腫瘍細胞) の内部で発現される組換え単鎖HAAH特異的抗体である。このようなイントラボディは、内因性細胞内HAAHに結合し、そしてHAAH酵素活性を阻害するか、またはHAAHが細胞内リガンドに結合することを妨害する。HAAH特異的イントラボディは、細胞内シグナル伝達を阻害し、そして結果として、HAAHを過剰発現する腫瘍の増殖を阻害する。

【0016】

哺乳動物における腫瘍の診断のためのキットは、HAAH特異的抗体を含む。診断アッセイキットは、標準的な2抗体結合フォーマットで優先的に処方される。ここでは、1つのHAAH特異的抗体が、患者試料におけるHAAHを捕捉し、そして別のHAAH特異的抗体が、捕捉されたHAAHを検出するために使用される。例えば、この捕捉抗体は、固相 (例えば、アッセイプレート、アッセイウェル、ニトロセルロースメンブレン、ビーズ、ディップスティック、または溶出カラムのコンポーネント) に固定化される。二次抗体 (すなわち、検出抗体) は、代表的には、検出可能標識 (例えば、比色剤または放射性同位体) でタグ化される。

【0017】

哺乳動物における腫瘍増殖を阻害する方法もまた、本発明の範囲内にある。この方法は、哺乳動物に、HAAHの発現または酵素活性を阻害する化合物を投与することによって行われる。好ましくは、この化合物は、実質的に純粋な核酸分子 (例えば、HAAHアンチセンスDNA) であり、その配列は、HAAHのコード配列に相補的である。HAAHの発現は、哺乳動物細胞 (例えば、腫瘍細胞) を、HAAHアンチセンスDNAまたはRNA (例えば、合成HAAHアンチセンスオリゴヌクレオチド) と接触させることにより阻害される。アンチセンスの配列は、HAAH遺伝子のコードまたは非コード領域に相補的である。例えば、この配列は、HAAH遺伝子の5'非翻訳領域におけるヌクレオチド配列に相補的である。哺乳動物細胞においてHAAH発現を阻害するHAAHアンチセンスオリゴヌクレオチドの例は、配列番号: 10、11、または12を含むオリゴヌクレオチドを包含する。HAAHアンチセンス核酸は、HAAHを過剰発現する神経膠芽細胞腫細胞または他の腫瘍細胞に導入される。標的細胞におけるアンチセンス核酸のHAAH転写物への結合は、細胞によるHAAH産生の減少を生じる。用語「アンチセンス核酸」とは、mRNAの一部に相補的であり、そしてmRNAにハイブリダイズし、そしてこの翻訳を妨害する核酸 (RNAまたはDNA) を意味する。好ましくは、アンチセンスDNAは、5'調節配列またはHAAH mRNAのコード配列の5'部分 (例えば、シグナルペプチドをコードする配列またはHAAH遺伝子のエキソン1内の配列) に相補的である。アンチセンスDNAを細胞に導入するための標準的な技術が使用され得る。これらは、アンチセンスDNAが、アンチセンスRNAが転写されるテンプレートである技術を包含する。この方法は、HAAHの発現がアップギュレートされる (例えば、細胞の悪性形質転換の結果として) 腫瘍を処置するものである。オリゴヌクレオチドの長さは、少なくとも10ヌクレオチドであり、天然に生じるHAAH転写物と同程度の長さであり得る。好ましくは、この長さは、10ヌクレオチドと50ヌクレオチドとの間 (両数値を含む) である。より好ましくは、この長さは、10ヌクレオチドと20ヌクレオチドとの間 (両数値を含む) である。

【0018】

「実質的に純粋なDNAまたはRNA」とは、この核酸が、本発明のDNAが由来する生物の天然に生じるゲノムではHAAH遺伝子に隣接している遺伝子を含まないことを意味する。従って、この用語は、例えば、ベクター、自律複製プラスミドもしくはウイルス、またはその天然部位以外の部位で原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに取り込まれるか;あるいは他の配列と独立した別個の分子 (例えば、cDNA、または、PCRまたは制限エンドヌクレアーゼ消化によって生成されたゲノムもしくはcDNAフラグメント) として存在する組換え核酸を包含する。それはまた、さらなるポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換え核酸 (例えば、キメラポリペプチドをコードする核酸 (例えば、細胞傷害性ポリペプチドに連結された抗体フラグメントをコードする核酸)) を包含する。あるいは、HAAH発現は、リボザイム、またはHAAHプロモーター配列へのFosまたはJunの結合

10

20

30

40

50

を阻害する化合物を投与することにより阻害される。

【 0 0 1 9 】

HAAHの酵素活性を阻害する化合物は、哺乳動物における腫瘍増殖を阻害するために有用である。HAAHの酵素活性とは、ポリペプチドの上皮増殖因子（EGF）様ドメインの水酸化を意味する。例えば、EGF様ドメインは、コンセンサス配列CX₇CX₄CX₁₀CXCX₈C（配列番号：1）を有する。HAAHヒドロキシラーゼ活性は、細胞内で阻害される。例えば、HAAHのドミナントネガティブ変異体（またはこのような変異体をコードする核酸）が投与される。このドミナントネガティブHAAH変異体は、天然に生じるHAAH配列のヒスチジンの第一鉄の鉄結合部位を、非鉄結合アミノ酸に変更する変異を含み、それによりHAAHのヒドロキシラーゼ活性を廃止する。変異される（例えば、欠失または置換される）ヒスチジンは、HAAHのカルボキシ末端触媒ドメイン中に位置する。例えば、この変異は、ネイティブHAAH配列のアミノ酸650～700の間（例えば、Hisモチーフ、配列番号：2の下線配列）に位置する。例えば、変異は、配列番号：2の残基671、675、679、または690にある。HAAH特異的イントロポディはまた、HAAHに結合し、そして細胞内HAAH酵素活性を阻害する（例えば、HAAHの触媒ドメイン内のエピトープに結合することにより）のに有用である。他の化合物（例えば、L-ミモシン（mimosine）またはヒドロキシピリドン）は、HAAHヒドロキシラーゼ活性を阻害するために、腫瘍部位に直接、または全身的に投与される。

10

【 0 0 2 0 】

（表1）HAAHのアミノ酸配列

```

MAQRKNAKSS  GNSSSSGSGS  GSTSAGSSSP  GARRETKHGG  HKNGRKGGLS  GTSFFTWMFV  61
IALLGWTSV  AVVWFDLVDY  EEVLGKGLIY  DADGDGDFDV  DDAKVLGLK  ERSTSEPAVP  121
PEEAEPHTEP  EEQVPVEAEP  QNIEDEAKEQ  IQSLLEHMHV  AEHVEGEDLQ  QEDGPTGEPQ  181
QEDDEFMAT  DVDDRFETLE  PEVSHEETEH  SYHVEETVSQ  DCNQDMEEMM  SEQENPDSSE  241
PVVEDERLHH  DTDDVTYQVY  EEQAVYEPL  NEGIEITEVT  APPEDNPVED  SQVIVEEVS  301
FPVEEQQEV  PETNRKTDDP  EQKAKVKKKK  PKLLNKFDT  IKAELDAAEK  LRKRKIEEA  361
VNAFKELVRK  YPQSPRARYG  KAQCEDDLAE  KRRSNEVLRG  AIETYQEVAS  LPDVPADLLK  421
LSLKRSDRQ  QFLGHMRGSL  LTLQRLVQLF  PNDTSLKNDL  GVGYLLIGDN  DNAKKVYEEV  481
LSVTPNDGFA  KVHYGFILKA  QNKIAESIPY  LKEGIESGDP  GTDDGRFYFH  LGDAMQVRGN  541
KEAYKWYELG  HKRGHFASVW  QRSLYNVNGL  KAPQWTPKE  TGYTELVKSL  ERNWKILRDE  601
GLAVMDKAKG  LFLPEDENLR  EKGDSQFTL  WQGRRNENA  CKGAPKTCTL  LEKFPETTGC  661
RRGQIKYSIM  HPGTHVWPH  GPTNCRRLMH  LGLVIPKEGC  KIRCANETRT  WEEGKVLIFD  721
DSFEHEVWQD  ASSFRLLIFV  DVWHPPELTP  QRRSLPAI

```

20

（配列番号：2；GENBANKアクセス番号S83325；Hisモチーフに下線を引く；触媒ドメイン内の保存された配列は、太字で示す）。

30

【 0 0 2 1 】

例えば、HAAH水酸化を阻害する化合物は、HAAHリガンドに結合するが、細胞内シグナルを伝達しないポリペプチド、またはHAAHの触媒部位に変異を含むポリペプチドである。このようなポリペプチドは、天然に生じるHAAHアミノ酸配列またはそれらのフラグメントに少なくとも50%同一であり、そしてEGF様反復配列を含む基質のHAAH水酸化を阻害する能力を有するアミノ酸配列を含む。より好ましくは、このポリペプチドは、配列番号：2に対して、少なくとも75%、より好ましくは、少なくとも85%、より好ましくは少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 2 】

40

実質的に純粋なHAAHポリペプチドまたはHAAH由来ポリペプチド（例えば、変異HAAHポリペプチド）は、好ましくは、このポリペプチドをコードする組換え核酸の発現によって、またはタンパク質を化学合成することによって、得られる。ポリペプチドまたはタンパク質は、それが、その天然状態でこれに付随する夾雑物（タンパク質および他の天然に生じる有機分子）と分離されているとき、実質的に純粋である。代表的には、このポリペプチドは、それが、調製におけるタンパク質の少なくとも60重量%を占めるとき、実質的に純粋である。好ましくは、調製におけるタンパク質は、重量基準で、少なくとも75%、より好ましくは、少なくとも90%、および最も好ましくは、少なくとも99%のHAAHである。純度は、任意の適切な方法（例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC分析）によって測定される。従って、実質的に純粋なポリペプチドは

50

、真核生物に由来するがE.coliもしくは別の原核生物、またはこのポリペプチドが由来した以外の真核生物において産生される組換えポリペプチドを包含する。

【0023】

このようなHAAHまたはHAAH由来ポリペプチドをコードする核酸分子もまた、本発明の範囲内にある。

【0024】

(表2) HAAH cDNA配列

```

cggaccgtgc aatggccag cgtaagaatg ccaagagcag cggcaacagc agcagcagcg 61
gctccggcag cggtagcacg agtgcgggca gcagcagccc cggggcccgg agagagacaa 121
agcatggagg acacaagaat gggaggaaaag ggcgactctc gggaaacttca ttcttcacgt 181
ggtttatggg gattgcattg ctgggcgtct ggacatctgt agctgtcgtt tggtttgatc 241
ttgttgacta tgaggaagtt ctaggaaaac taggaatcta tgatgctgat ggtgatggag 301
atcttgatgt ggatgatgcc aaagttttat taggacttaa agagagatct acttcagagc 361
cagcagtcgc gccagaagag gctgagccac acactgagcc cgaggagcag gttcctgtgg 421
aggcagaacc ccagaatcgc gaagatgaag caaaagaaca aattcagtcg cttctccatg 481
aaatgggtaca cgcagaacat gttgaggagg aagacttgca acaagaagat ggaccacacg 541
gagaaccaca acaaggaggat gatgagtttc ttatggcgac tgatgtagat gatagatttg 601
agacccttga acctgaagta tctcatgaag aaaccgagca tagttaccac gtggaagaga 661
cagtttcaca agactgtaac caggatagtg aagagatgat gtctgagcag gaaaatccag 721
attccagtga accagttaga gaagatgaaa gattgcacca tgatacagat gatgtaacat 781
accaagtcta tgaggaacaa gcagtatatg aacctctaga aaatgaaggg atagaaatca 841
cagaagtaac tgctccccct gaggataatc ctgtagaaga ttcacaggta attgtagaag 901
aagtaagcat ttttcctgtg gaagaacagc aggaagtacc accagaaaca aatagaaaaa 961

cagatgatcc agaacaaaaa gcaaaagtta agaaaaagaa gcctaaactt ttaaataaat 1021
ttgataagac tattaagact gaacttgatg ctgcagaaaa actccgtaaa aggggaaaaa 1081
ttgaggaagc agtgaatgca tttaaagaac tagtacgcaa ataccctcag agtccacgag 1141
caagatatgg gaaggcgagc tgtgaggatg atttggtgga gaagaggaga agtaatgagg 1201
tgctacgtgg agccatcgag acctaccaag aggtggccag cctacctgat gtccctgcag 1261
acctgctgaa gctgagtttg aagcgtcgct cagacaggca acaatttcta ggatcatatg 1321
gaggtttccct gcttaccctg cagagattag ttcaactatt tcccaatgat acttccttaa 1381
aaaatgacct tggcgtggga tacctcttga taggagataa tgacaatgca aagaaagttt 1441
atgaagaggt gctgagtgtg acacctaatg atggctttgc taaagtccat tatggcttca 1501
tctgaaggc acagaacaaa attgctgaga gcatccata tttaaaggaa ggaatagaat 1561
ccggagatcc tggcactgat gatgggagat tttatttcca cctgggggat gccatgcaga 1621
gggttgggaa caaagaggca tataagtggg atgagcttgg gcacaagaga ggacactttg 1681
catctgtctg gcaacgctca ctctacaatg tgaatggact gaaagcacag ccttggtgga 1741
ccccaaaaga aacgggctac acagagttag taaagtcttt agaaagaaac tggaaagttta 1801
tccgagatga aggccttgca gtgatggata aagccaaagg tctcttctg cctgaggatg 1861
aaaacctgag ggaaaaagg gactggagcc agttcacgct gtggcagcaa ggaagaagaa 1921
atgaaaatgc ctgcaaaagg gctcctaaaa cctgtacctt actagaaaag ttccccgaga 1981
caacaggatg cagaagagga cagatcaaat attccatcat gcaccccgag actcacgtgt 2041
ggccgcacac agggcccaca aactgcaggg tccgaatgca cctgggcttg gtgattccca 2101
aggaaggctg caagattcga tgtgccaacg agaccaggac ctgggaggaa ggcaagggtg 2161
tcatctttga tgactccttt gagcacgagg tatggcagga tgccctcatc ttccggctga 2221
tattcatcgt ggatgtgtgg catccggaac tgacaccaca gcagagacgc agccttccag 2281
caatttagca tgaattcatg caagcttggg aaactctgga gaga

```

10

20

30

(配列番号：3；GENBANKアクセッション番号S83325；開始メチオニンをコードするコドンに下線を引く)。

【0025】

腫瘍増殖を阻害する方法はまた、NOTCHポリペプチドのHAAH水酸化を阻害する化合物を投与する工程を包含する。例えば、この化合物は、NOTCHポリペプチドにおけるEGF様システインリッチ反復配列(例えば、コンセンサス配列

40

CDXXXCXXKXGNGXCDXXCNNAACXXDGXDC(配列番号：4)

を含む配列)の水酸化を阻害する。EGF様システインリッチ反復配列を含むポリペプチドは、内因性NOTCHの水酸化をブロックするために投与される。

【0026】

HAAHを過剰発現する腫瘍の増殖はまた、インスリンレセプター基質(IRS)シグナル伝達経路を介するシグナル伝達を阻害する化合物を投与することによって阻害される。好ましくは、この化合物は、IRSリン酸化を阻害する。例えば、この化合物は、配列番号：5の残

50

基46、465、551、612、632、662、732、941、989、または1012に結合し、そしてリン酸化を阻害するペプチドまたは非ペプチド化合物である。化合物は、ポリペプチド（例えば、IRSリン酸化部位（例えば、Glu/Tyr部位）をブロックするポリペプチド）を包含する。抗体（例えば、リン酸化部位を含むIRSのカルボキシ末端ドメインに結合する抗体）は、IRSリン酸化をブロックし、そして結果としてこの経路に沿ったシグナル伝達をブロックする。IRSリン酸化の阻害は、順に、細胞増殖の阻害に至る。IRSリン酸化を阻害する他の化合物は、ビタミンDアナログEB1089およびワートマニン（Wortmannin）を包含する。

【0027】

HAAH過剰産生腫瘍細胞は、腫瘍細胞の細胞内および表面上の両方でHAAHを発現することが示された。従って、腫瘍細胞を殺傷する方法は、このような腫瘍細胞をHAAH特異的抗体に連結された細胞傷害剤と接触させることにより行われる。HAAH特異的抗体（抗体フラグメント、または細胞外HAAHに結合するリガンド）は、腫瘍細胞の表面にキメラ分子を指向させ、この細胞傷害剤が、この抗体が結合される腫瘍細胞を損傷または殺傷させることを可能にする。モノクローナル抗体は、HAAHのエピトープ（例えば、細胞の表面上もしくはHAAHの触媒部位に露出されたエピトープ）に結合する。細胞傷害性組成物は、非腫瘍細胞と比較して腫瘍細胞を優先的に殺傷する。

10

【0028】

HAAHを過剰発現する腫瘍の増殖を阻害する抗腫瘍剤を同定するためのスクリーニング方法もまた、本発明の範囲内にある。候補化合物がHAAH酵素活性を阻害するか否かを決定するために使用されるスクリーニング方法は、以下の工程を包含する：（a）HAAHポリペプチド（例えば、HAAHのカルボキシ末端触媒部位を含むポリペプチド）を提供する工程；（b）EGF様ドメインを含むポリペプチドを提供する工程；（c）HAAHポリペプチドまたはEGF様ポリペプチドを、候補化合物と接触させる工程；および（d）工程（b）のEGF様ポリペプチドの水酸化を決定する工程。候補化合物の存在下でのこの化合物の不在下に比較した水酸化の減少は、この化合物が、NOTCHのようなタンパク質におけるEGF様ドメインのHAAH水酸化を阻害することを示す。

20

【0029】

NOTCHのHAAH活性化を阻害する抗腫瘍剤は、（a）HAAHを発現する細胞を提供する工程；（b）この細胞を候補化合物と接触させる工程；および（c）この細胞の核への活性化NOTCHの転移を測定する工程によって同定される。転移は、NOTCHの110kDa活性化フラグメントに結合する抗体のような試薬を使用することによって測定される。候補化合物の存在下でのこの化合物の不在下に比較した転移の減少は、この化合物が、NOTCHのHAAH活性化を阻害し、それによりNOTCH媒介シグナル伝達およびHAAH過剰発現腫瘍細胞の増殖を阻害することを示す。

30

【0030】

本明細書中に記載のヌクレオチドおよびアミノ酸比較は、Lasergeneソフトウェアパッケージ（DNASTAR, Inc., Madison, WI）を用いて実施された。使用されるMegAlignモジュールは、Clustal V方法（Higginsら、1989、CABIOS5（2）：151-153）であった。使用されるパラメーターは、ギャップペナルティー10、ギャップ長さペナルティー10であった。

【0031】

ハイブリダイゼーションは、標準的な技術（例えば、Ausubelらに記載の技術（Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1989））を用いて実施される。「高いストリンジェンシー」とは、高温および低塩濃度（例えば、 $0.1 \times \text{SSC}$ の塩濃度で65 での洗浄条件）によって特徴付けられる核酸ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件をいう。「低」から「中程度の」ストリンジェンシーとは、低温および高塩濃度（例えば、 $1.0 \times \text{SSC}$ の塩濃度で60 未満での洗浄条件）によって特徴付けられるDNAハイブリダイゼーションおよび洗浄条件をいう。例えば、高いストリンジェンシー条件は、50%ホルムアミドの存在下の42 でのハイブリダイゼーション； $2 \times \text{SSC}$ および1% SDSの存在下での65 での第一の洗浄；続いて、 $0.1\% \times \text{SSC}$ の存在下での65 での第二の洗浄を包含する。HAAH遺伝子配列に対して約50%配列同一性を有するDNA配列を検出するために適したより低いスト

40

50

リンジェンシー条件は、例えば、ホルムアミドの不在下での約42 でのハイブリダイゼーション；42 、6×SSC、および1%SDSでの第一の洗浄；ならびに50 、6×SSC、および1%SDSでの第二の洗浄によって検出される。

【0032】

本発明の他の特徴および利点は、以下の好ましい実施形態の説明、および特許請求の範囲から明らかである。

【0033】

(詳細な説明)

HAAHは、コラーゲン生合成において鍵となる役割を演じるプロリルおよびリジルヒドロキシラーゼの(-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼファミリーに属するタンパク質 10
である。この分子は、第一鉄の鉄の存在下でいくつかのタンパク質のEGF様ドメインにおけるアスパラギン酸またはアスパラギン残基を水酸化する。これらのEGF様ドメインは、保存されたモチーフを含む。このモチーフは、タンパク質(例えば、凝固因子、細胞外細胞間質タンパク質、LDLレセプター、NOTCHホモログ、またはNOTCHリガンドホモログ)における反復配列を形成する。

【0034】

-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼであるアスパルチル(アスパラギニル) -ヒドロキシラーゼ(AAH)は、種々のタンパク質のEGF様ドメインにおける1つのアスパラギン酸またはアスパラギン残基を特異的に水酸化する。ヒトAspH(hAspH)をコードする4.3 kb cDNAは、形質転換細胞における2.6kbおよび4.3kb転写物とハイブリダイズし、そして 20
より大きな転写物の推定アミノ酸配列は、約85kDaのタンパク質をコードする。インビボでの転写および翻訳、ならびにウェスタンブロット分析の両方とも、触媒性C末端の翻訳後切断から生じ得る56kDaタンパク質もまた示す。

【0035】

AAHの生理的機能は、ビタミンK依存性凝血タンパク質におけるアスパラギン酸の翻訳後水酸化である。しかしながら、いくつかの悪性新生物におけるAAHの豊富な発現、および多くの正常細胞における低いレベルのAAHは、悪性におけるこの酵素の役割を示す。AAH遺伝子はまた、栄養膜細胞層において高度に発現されるが、胎盤の合胞体栄養細胞層においてはあまり発現されない。栄養膜細胞層は、胎盤移植を媒介する侵襲性細胞である。ヒト胆管癌、肝細胞癌、結腸癌、および乳癌におけるAAH発現レベルの増大は、侵襲性または 30
転移性の病変に主に関連した。さらに、AAHの過剰発現は、DNA合成の増大および細胞増殖を厳密には反映しない。なぜなら、高レベルのAAH免疫反応性が100%の胆管癌において観察されたが、胆管の再生または非新生物性増殖と関連したヒトまたは実験的疾患プロセスにおいてはそうではなかったからである。AAH過剰発現および付随する高レベルの ヒドロキシラーゼ活性は、形質転換新生物細胞の侵襲性増殖に至る。HAAH発現の増大の検出は、遺伝子産物を過剰発現するとして特徴付けられている癌タイプの早期かつ信頼性ある診断に有用である。

【0036】

(悪性腫瘍の診断)

HAAHは、正常非癌性細胞に比較して、内胚葉起源の多くの腫瘍およびCNS腫瘍の少なくとも95%において過剰発現される。患者由来組織試料(例えば、固体組織または体液)におけるHAAH遺伝子産物の増大は、標準的な方法(例えば、ウェスタンブロットアッセイ、またはELISAのような定量アッセイによって)を用いて実施される。例えば、HAAH特異的抗体を用いる標準的な競合ELISAフォーマットが、患者HAAHレベルを定量するために使用される。あるいは、捕捉抗体として第一の抗体および検出抗体として第二のHAAH特異的抗体を用いるサンドイッチELISAが使用される。 40

【0037】

HAAHを検出する方法は、体液の成分を固体基材(例えば、マイクロタイタープレート、ビーズ、ディップスティック)に結合されたHAAH特異的抗体と接触させる工程を包含する。例えば、この固体基材は、体液の患者由来試料中に浸漬され、洗浄され、そしてこの固体 50

基材は、試薬と接触されて、この固体基材に存在する免疫複合体の存在を検出する。

【0038】

試験試料におけるタンパク質は、固体基材上に固定化される（例えば、結合される）。タンパク質を固体基材に共有結合的または非共有結合的に結合するための方法および手段は、当技術分野において公知である。固体表面の性質は、アッセイフォーマットに依存して変動し得る。マイクロタイターウェルにおいて実施されるアッセイについては、固体表面は、マイクロタイターウェルまたはカップの壁である。ビーズを用いるアッセイについては、固体表面は、ビーズの表面である。ディップスティック（すなわち、繊維または紙のような有孔性または繊維性材料から作製された固形物）を用いるアッセイにおいては、この表面は、ディップスティックが作製された材料の表面である。有用な固体支持体の例は、ニトロセルロース（例えば、メンブレンまたはマイクロタイターウェル形態で）、ポリ塩化ビニル（例えば、シートまたはマイクロタイターウェル）、ポリスチレンラテックス（例えば、ビーズまたはマイクロタイタープレート）、ポリビニリジンフルオライド（IMMULON（商標）として公知）、ジアゾ化紙、ナイロンメンブレン、活性化ビーズ、およびプロテインAビーズを包含する。抗体を含む体支持体は、代表的には、試験試料との接触後、そして結合された免疫複合体の検出前に洗浄される。試験試料との抗体のインキュベーション後、検出可能標識による免疫複合体の検出が行われる。例えば、この標識は、酵素、蛍光、化学発光、放射能、または染料である。免疫複合体からのシグナルを増幅するアッセイもまた当技術分野において公知であり、このようなアッセイとして、例えば、ビオチンおよびアビジンを利用するアッセイが挙げられる。

10

20

【0039】

HAAH検出試薬（例えば、抗体）は、キットの形態でパッケージングされる。これは、1つ以上のHAAH特異的抗体、コントロール処方物（陽性および/または陰性）、および/または検出可能標識を含む。アッセイは、当技術分野において公知の標準的な2抗体サンドイッチアッセイフォーマットの形態であり得る。

【0040】

（HAAH特異的抗体の産生）

抗HAAH抗体は、当技術分野において周知の技術によって得られた。このような抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルである。ポリクローナル抗体は、標準的な方法（例えば、Ghoseら、Methods in Enzymology、Vol. 93、326-327、1983に記載の方法により）を用いて得られた。HAAHポリペプチド、またはそれらの抗原性フラグメントは、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、またはげっ歯類の抗血清においてポリクローナル抗体の産生を刺激するための免疫原として使用された。免疫原として有用なポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方の産生のための抗原性ポリペプチドは、HAAH触媒ドメインを含むポリペプチドを包含する。例えば、免疫原性ポリペプチドは、全長成熟HAAHタンパク質またはカルボキシ末端触媒ドメインを含むHAAHフラグメント（例えば、配列番号：2のHisモチーフを含むHAAHポリペプチド）である。

30

【0041】

本明細書中に開示した抗体と同じエピトープに結合する抗体は、当技術分野で公知の標準的な方法（例えば、競合結合アッセイ）を用いて同定される。

40

【0042】

モノクローナル抗体は、標準的な技術によって得られた。10 μ gの精製組換えHAAHポリペプチドは、完全フロイントアジュバント中でマウスに腹腔内投与され、次いで最初の接種の3~5ヶ月後に、静脈内で（尾静脈に）ブーストを1回行った。抗体産生ハイブリドーマは、標準的な方法を用いて作製された。HAAHポリペプチドについて高度に特異的である抗体を産生するハイブリドーマを同定するために、ハイブリドーマは、免疫に使用した同じポリペプチド免疫原を用いてスクリーニングされた。HAAH結合活性を有するとして同定された抗体はまた、以下に記載の酵素アッセイを使用してHAAH触媒活性を阻害する能力についてスクリーニングされる。好ましくは、この抗体は、少なくとも約10⁸リットル/molの結合親和力およびより好ましくは、少なくとも約10⁹リットル/molの親和力を有する。

50

【0043】

モノクローナル抗体は、当技術分野において公知の方法によってヒト化される。例えば、所望の結合特異性を有するMAbは、商業的にヒト化され得る（Scotgene、Scotland；Oxford Molecular、Palo Alto、CA）。

【0044】

HAAH特異的イントラボディは、以下のようにして産生される。適切なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの同定後、抗体をコードするDNAがクローニングされる。単鎖HAAH特異的抗体をコードするDNA（ここで、重鎖および軽鎖可変ドメインがフレキシブルなリンカーペプチドによって分離される）が、公知の方法（例えば、Marascoら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA90：7889-7893およびMarascoら、1997、Gene Therapy4：11-15）を用いて発現ベクターにクローニングされる。このような構築物は、例えば、抗体の細胞内産生のための標準的な遺伝子送達技術を用いて、細胞に導入される。細胞内抗体（すなわち、イントラボディ（intrabody））が、HAAHによるシグナル伝達を阻害するために使用される。HAAHのカルボキシ末端触媒ドメインに結合するイントラボディは、EGF様標的配列を水酸化するHAAHの能力を阻害する。

10

【0045】

腫瘍細胞の表面でHAAHの細胞表面露出エピトープに結合するHAAH特異的抗体（またはそのフラグメント）を連結する方法は、公知の方法を用いて、公知の細胞傷害剤（例えば、リシンまたはジフテリア毒素）に連結される。

【0046】

20

（生体材料の寄託）

特許手続き上の微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項に従って、ハイブリドーマFB501（モノクローナル抗体FB50を産生する）、ハイブリドーマHA386A（モノクローナル抗体86Aを産生する）、ハイブリドーマHA15C7A（モノクローナル抗体5C7を産生する）、およびハイブリドーマHA219B（モノクローナル抗体19Bを産生する）を、2001年5月17日にアメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）、10801、ブルーバード大学、Manassas、Va. 20110-2209、米国に寄託した。

【0047】

出願人の代理人は、特許が付与された場合、ATCCは、永続的な寄託および公的に容易な利用可能性を提供する寄託機関であると説明している。このようにして寄託した材料の公的利用可能性に対する全ての制限は、特許付与時に決定的に取り除かれる。この材料は、米国特許法施行規則1.14および米国特許法第122条の下で権限を有する特許庁長官によって決定された者は特許出願の係属中に利用可能である。寄託された材料は、寄託されたプラスミド試料の最近の提供請求後少なくとも5年間、ならびにいかなる場合でも、寄託日から少なくとも30年間または特許有効期間のいずれか長期の方で、生存および非汚染状態の維持に必要な全ての対処を行って保存される。出願人の代理人は、要求した際に、寄託条件が原因で寄託機関が試料を提供することができない場合に、寄託物を交換する義務を承認する。

30

【0048】

（悪性腫瘍を処置する方法）

40

HAAHを過剰発現するとして特徴付けられた腫瘍（例えば、内胚葉起源の腫瘍またはCNS腫瘍）を有する患者は、HAAHアンチセンス核酸を投与することによって処置される。

【0049】

アンチセンス療法は、肝細胞癌、胆管癌、神経膠芽細胞腫、および神経芽細胞腫を罹患する患者においてHAAHの発現を阻害するために使用される。例えば、HAAHアンチセンス鎖（RNAまたはDNAのいずれか）は、mRNA転写物に結合し得る形態で細胞に直接的に導入される。あるいは、一旦標的細胞内にあると、適切なアンチセンスmRNAに転写される配列を含むベクターが、投与され得る。標的mRNAにハイブリダイズするアンチセンス核酸は、通常一本鎖のmRNA転写物と会合し、それにより翻訳および従ってタンパク質の発現を妨害することにより、遺伝子によりコードされるポリペプチド産物の産生を減少または阻害する。例

50

えば、プロモーター（例えば、組織特異的または腫瘍特異的プロモーター）を含むDNAは、DNA配列（アンチセンステンプレート）（これは、アンチセンスRNAに転写される）に作動可能に連結される。「作動可能に連結される」とは、コード配列および調節配列（すなわち、プロモーター）が、適切な分子（例えば、転写活性化タンパク質）が調節配列に結合されたときに遺伝子発現を可能にするように接続されることを意味する。

【0050】

HAAH mRNAの種々の部分に相補的なオリゴヌクレオチドは、標準的な方法に従って、腫瘍細胞におけるHAAHの産生を減少させるその能力について、インビトロで試験された（例えば、FOCUS肝細胞癌（HCC）細胞株を用いて）。候補アンチセンス組成物と接触された細胞においてHAAH遺伝子産物の、候補組成物の不在下で培養された細胞に比較した減少は、HAAH特異的抗体または他の検出戦略を用いて検出される。インビトロでの細胞に基づくアッセイまたは無細胞アッセイにおいてHAAHの産生を減少させる配列は、次いで、悪性新生物を有する動物におけるHAAH産生の減少を確認するために、ラットまたはマウスにおいてインビボで試験される。

【0051】

アンチセンス療法は、標準的なベクターおよび/または遺伝子送達系によってアンチセンス核酸を患者に投与することによって実施される。適切な遺伝子送達系は、リボソーム、レセプター媒介送達系、裸のDNA、およびウイルスベクター（例えば、とりわけ、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）を包含し得る。HAAH産生の減少は、IRSシグナル伝達経路を介するシグナル伝達の減少を生じる。治療用核酸組成物は、薬学的に受容可能なキャリアにおいて処方される。治療用組成物はまた、上記のような遺伝子送達系を含み得る。薬学的に受容可能なキャリアは、動物への投与のために適切な生物学的に適合性のビヒクルである：例えば、生理食塩水。化合物の療有効量は、医学的に所望とされる結果（例えば、HAAH遺伝子産物の産生の減少または処置動物における腫瘍増殖の減少）を生じ得る量である。

【0052】

非経口投与（例えば、静脈内、皮下、筋内、および腹腔内送達経路）は、核酸またはHAAH阻害ペプチドまたは非ペプチド化合物を送達するために使用され得る。CNS腫瘍の処置のために、脳脊髄液への直接注入が有用である。血液脳関門は、癌患者において補償され得、全身的に投与された薬物が関門を通してCNSに通過することを可能にする。治療用化合物のリボソーム処方物もまた、血液脳関門の通過を促進し得る。

【0053】

任意の一患者のための投与量は、多くの要因（患者の大きさ、体表面積、年齢、投与される特定の核酸、性、投与時間および経路、全体的な健康、および同時に投与される他の薬物を含む）に依存する。核酸の静脈内投与のための投与量は、およそ $10^6 \sim 10^{22}$ コピーの核酸分子である。

【0054】

リボザイム療法もまた、癌患者においてHAAH遺伝子発現を阻害するために使用される。リボザイムは、特異的mRNAに結合し、次いでそれを予め決定された切断点で切断し、それによって転写物を破壊する。これらのRNA分子は、当技術分野で公知の方法に従って、HAAH遺伝子の発現を阻害するために使用される（Sullivanら、1994、J. Invest. Derm. 103: 85S-89S; Czubaykoら、1994、J. Biol. Chem. 269: 21358-21363; Mahieuら、1994、Blood 84: 3758-65; Kobayashiら、1994、Cancer Res. 54: 1271-1275）。

【0055】

（HAAH特異的抗体は腫瘍細胞成長を阻害する）

HAAH特異的抗体は、培養において腫瘍細胞の増殖を阻害する。2つの異なるHAAH特異的抗体FB-50および5C7を試験した。腫瘍細胞（肝細胞癌細胞株、肺癌細胞株、および乳癌細胞株）を、96ウェルプレートに播種し、種々の濃度の抗体と共に48時間インキュベートした。細胞を、アセトンで固定した。細胞成長を、スルホローダミンB色素結合アッセイ法を使用してモニターした。データは、FB50の存在下では、非存在下と比較して細胞の生存能

力および増殖が減少したことを示した。

【0056】

(受動免疫化)

本明細書中に記載のHAAH特異的抗体を使用して、腫瘍細胞の成長を阻害するか、または腫瘍細胞を死滅させる。

【0057】

精製抗体調製物(例えば、精製モノクローナル抗体、抗体フラグメント、または単鎖抗体)を、腫瘍または腫瘍発症の危険性を診断する患者に投与する。受動免疫化分野で公知の方法(例えば、静脈内注射または筋肉内注射)を使用して、抗体調製物を投与する。本明細書中に記載の方法で使用した抗体を、生理学的に許容される賦形剤中で処方する。このような賦形剤(例えば、生理食塩水)は、当技術分野で周知である。

10

【0058】

抗体は、好ましくは、高親和性抗体(例えば、IgGクラス抗体)またはそのフラグメントもしくは単鎖抗体である。または、抗体はIgMイソ型である。抗体は、モノクローナル抗体(例えば、マウスモノクローナル抗体もしくはそのフラグメント、またはヒト化されたマウスモノクローナル抗体)である。抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。所与のモノクローナル抗体の親和性を、公知の方法(例えば、亢進する結合能力についての選択)を使用してさらに増大させる(例えば、Boderら、2000、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97:10701から10705に記載の方法による)。選択的に、抗体、抗体フラグメント、または高親和性単鎖抗体を、投与前に有毒部分に連結する。連結に適切な有毒部分には、リシン、シュードモナス毒素、ジフテリア毒素、ならびに当技術分野で公知の放射性同位元素および化学療法剤が含まれる。このような抗体毒素は、腫瘍細胞への結合時または腫瘍細胞の細胞質への内在化時に、腫瘍細胞を損傷するかまたは死滅させる。

20

【0059】

抗体調製物または抗体-毒素調製物を、約0.01~2mL/kg体重の用量で投与する。処置個体の腫瘍負荷を減少させるために、必要に応じて投与量を毎週または毎月再投与する。

【0060】

(能動免疫化)

能動ワクチン接種は、動物を抗原に応答するように誘導するプロセスである。ワクチン接種中に、抗原を認識する細胞(B細胞または細胞障害性T細胞)をクローンとして増殖させる。さらに、抗原に特異的なヘルパーT細胞集団も増加する。ワクチン接種はまた、抗原を処理し、これを2つの経路のうちの1つを刺激することができる形態に提示することができる、特殊化抗原提示細胞を含む。抗原認識後の免疫細胞の拡大および活性化により、抗原特異的抗原が産生され、抗原特異的細胞性免疫応答が起こる。免疫化前のレベルと比較した免疫化個体の血清中のHAAH特異的抗体の力価レベルの増加によって、免疫化の成功が示される。好ましくは、HAAH特異的抗体の力価は、免疫化前よりも少なくとも10%、より好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも100%、および最も好ましくは200%高い。

30

【0061】

個体を、AAH(例えば、HAAH)ポリペプチドまたはペプチドをコードするポリヌクレオチドで免疫化する。例えば、ヒト患者を、52kDaの全長HAAHで免疫化する。免疫化ポリペプチドの免疫原性を増強するために、標準的なアジュバント製剤を同時投与してもよい。または、より短いポリペプチド(例えば、HAAHの免疫原性フラグメント)を使用する。例えば、ポリペプチドは、HAAHの細胞外触媒ドメイン(例えば、配列番号:2のアミノ酸650~700)を含む。HAAHの他の免疫原性フラグメントには、ケトグルタル酸の結合部位を含むフラグメント、ケトグルタル酸の結合部位を欠くフラグメント、カルシウム結合部位を含むフラグメント、およびEGF様ポリペプチドの結合部位を欠くフラグメントが含まれる。

40

【0062】

(DNAワクチン)

50

ペプチド抗原を使用した標準的な能動ワクチン接種に加えて、DNAワクチン接種を使用し、HAAH、同様にHAAHを過剰発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を起こす。悪性細胞上でHAAHが過剰発現されるにもかかわらず、腫瘍細胞は抗原提示のための適切なアクセサリ分子を欠くので、患者は有効な免疫応答を起こさない。本明細書中に記載のDNAワクチンにより、HAAH（および細胞表面上にHAAHを発現する細胞）に特異的な体液性および細胞性免疫が生じる。例えば、免疫化個体ではHAAH特異的抗体が産生されるだけでなく、HAAH特異的細胞傷害性T細胞が生成される。HAAH特異的細胞傷害性T細胞は腫瘍細胞を死滅させるので、免疫化個体の腫瘍負荷が低減される。

【0063】

AAHポリペプチド（全長またはAAHの免疫原性フラグメント）をコードするポリヌクレオチドを、公知の方法（例えば、微粒子銃または針による直接注入）によって個体に移入する。典型的には、抗原（または抗原をコードするDNA）は、筋肉内に送達される。抗原はまた、他の組織（例えば、腫瘍部位）に直接注入される。注入点で細胞はDNAを取り込む。細胞はタンパク質を産生し、タンパク質は免疫化個体の免疫系を刺激し、それにより例えばHAAH特異的抗体が産生される。細胞性免疫（例えば、細胞傷害性T細胞）もまた生成される。

10

【0064】

有効なDNAまたはmRNAの投与量は、一般に、約0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重～約50mg/kg体重、通常、約0.005～5mg/kg体重（例えば、0.5～5mg/kg）の範囲である。投与すべきDNAは、裸（トランスフェクション促進物質の非存在下）であるか、またはポリヌクレオチドの細胞取り込みを増強する化合物（例えば、荷電脂質、脂質複合体、またはリポソーム）と組み合わせられる。例えば、ポリヌクレオチドを、Lipofectin（商標）または CaPO_4 などの沈殿剤とともに投与する。トランスフェクションした細胞（例えば、非増殖筋細胞）は、少なくとも1ヶ月から数ヶ月（例えば、3～6ヶ月）にわたり、組換え抗原ポリペプチドを産生する。または、組織（例えば、非筋組織または腫瘍組織）へのポリヌクレオチド構築物の導入によってポリペプチドの一過性発現が達成される。後者の場合、組織の細胞は、より短期間（例えば、数日（3～5日および約20日まで））ポリペプチドを産生する。標的細胞によるタンパク質またはポリペプチドの発現レベルは、HAAH特異的抗体産生の誘導に十分である。抗体産生レベルを、標準的な方法（例えば、免疫化前後の患者の血清中の抗体力価の評価）を使用して測定する。

20

30

【0065】

ポリヌクレオチドは、筋肉もしくは皮膚などの組織の間質腔への注射、循環もしくは体腔への導入、または吸入もしくはガス注入などの標準的な方法によって投与される。ポリヌクレオチドを、注射または薬学的に許容される水性または部分的水性の液体担体（例えば、液体担体）と共に動物に注射、さもなければ送達する。ポリヌクレオチドを、リポソーム（例えば、カチオン性またはアニオン性リポソーム）と会合させる。ポリヌクレオチドは、プロモーターなどの標的細胞による発現に必要な遺伝情報を含む。

【0066】

DNAワクチン接種の1つの利点は、DNAワクチンは抗原ペプチドを長期間継続して産生することができ、追加抗原の投与量が減少するか、または追加抗原による免疫化が回避されることである。

40

【0067】

免疫応答の誘導（例えば、HAAHポリペプチドをコードするDNAでのワクチン接種による、HAAH特異的抗体応答）に加えて、抗体自体をコードするポリヌクレオチドを導入する。HAAH特異的抗体（例えば、抗体の可変領域）をコードする単離ポリヌクレオチドを、インサITCHUでの抗体産生のために導入する。その後、抗体は、細胞表面抗原（例えば、細胞外HAAH）へ結合するか、またはHAAHの触媒ドメインへ結合し、HAAH機能を阻害することによって、標的部位で治療効果を発揮する。

【0068】

（インビボ画像診断）

50

本明細書中に記載の抗体（抗体フラグメントおよび単鎖抗体）は、組織および体液中の腫瘍の存在の診断に有用である。HAAH特異的抗体を、放射性同位体または比色剤などの検出可能な標識でタグ化する。標識化抗体を、癌を発症する危険性のある個体、または以前に癌と診断された個体に投与する。例えば、抗体は、手術で切除されたか、または化学療法もしくは放射線療法によって治療された腫瘍の転移診断に有用である。この方法の感度は、リンパ節などの組織中の微小転移の検出に十分である。この様式での早期且つ感度の高い腫瘍診断は、迅速な治療介入を可能にする。

【0069】

標識化抗体を、公知の方法（例えば静脈内、または固形組織もしくは柔組織への直接注射）を使用して個体に投与する。抗体は、組織中または全身にわたって約1時間～72時間分布することができる。次いで、個体の全身を、当技術分野で公知の方法を使用して画像化する。または、身体の小部分（例えば、腫瘍を保有すると疑われる組織部位）を画像化する。標識検出の増加によって測定される、基準線結合レベル（正常組織）を超える抗体結合の増加は、結合部位での腫瘍の存在を示す。

10

【0070】

（NOTCHシグナル伝達の活性化）

NOTCHシグナル伝達は、AAHを高度に発現する細胞において活性化される。図14Aは、ウェスタンブロットを用いることによる110kDa NOTCHフラグメントの存在を示す。酵素活性AAHの過剰発現は、100kDaの切断された活性NOTCH-1の提示によって示される（レーン1、偽DNAトランスフェクトクローン；レーン2、クローン7；およびレーン3、クローン8）。対して、NOTCH-2は活性化されなかった。AAHを発現するクローンにおいて、偽DNAトランスフェクトクローンに比較した全長Jaggedリガンドの発現の増強があった。チューブリンは、タンパク質ローディングのための内部コントロールとして使用された。

20

【0071】

Hes-1（公知の下流エフェクター遺伝子）の発現は、NOTCHシグナル伝達によって活性化される（図14B）。AAH発現クローンのみが、転写因子としてNotch発現を活性化し、続いて競合RT-PCRによって明らかにされるように、Hes-1遺伝子発現を上方調節する。下のほうのパネルは、内部コントロールとして働くGAPDHのRT-PCR産物である。図14Cは、ヒトNOTCH-1（hNOTCH-1）およびJagged-1の発現を示し、ここでIRS-1シグナル伝達はドミナントネガティブ変異体（DhIRS-1）によって減少される。このような細胞は、下方調節（downregulation）AAH発現を示し、そしてウェスタンブロット分析によるNOTCH-1およびJaggedレベルの平行した減少を示す。チューブリンは、タンパク質ローディングについての内部コントロールとして使用された。

30

【0072】

（HAAH酵素活性を阻害する化合物を同定する方法）

アスパルチル（アスパラギニル）-ヒドロキシラーゼ（hydroxylasehydroxylase）（AAH）活性は、インピトロまたはインピボで測定される。例えば、HAAHは、EGF様ポリペプチドドメインのアスパルチルおよびアスパラギル残基の炭素の翻訳後修飾を触媒する。ヒドロキシラーゼ活性を阻害する化合物を同定するためのアッセイは、化合物の不在下（または予め決定されたコントロール値）での平行反応と比較して候補化合物が存在する酵素反応における水酸化のレベルを比較することにより実施される。試験管において実施される標準的なヒドロキシラーゼアッセイは、当技術分野で公知である（例えば、Lavaissierら、1996、J. Clin. Invest. 98：1313-1323；Jiaら、1992、J. Biol. Chem. 267：14322-14327；Wangら、1991、J. Biol. Chem. 266：14004-14010；またはGronkeら、1990、J. Biol. Chem. 265：8558-8565）。ヒドロキシラーゼ活性はまた、96ウェルマイクロタイタープレートフォーマットにおいて二酸化炭素を用いて測定される（ $^{14}\text{CO}_2$ 捕捉アッセイ）（Zhangら、1999、Anal. Biochem. 271：137-142）。これらのアッセイは、容易に自動化され、そしてヒドロキシラーゼ阻害活性を有する化合物を同定するための候補化合物の高処理能スクリーニングに適する。

40

【0073】

50

NOTCHのHAAH活性化を阻害する候補化合物は、HAAHを発現するかまたは過剰発現する細胞（例えば、FOCUS HCC細胞）において活性化NOTCHの減少を検出することにより同定される。細胞は、候補化合物の存在下で培養される。平行培養物が、候補化合物の不在下でインキュベートされる。この化合物がNOTCHのHAAH活性化を阻害するか否かを評価するために、細胞の核への活性化NOTCHの転移が測定される。転移は、細胞の核においてNOTCHの110kDa活性化フラグメントを検出することにより測定される。活性化フラグメントは、活性化の際に大きな（およそ300kDaの）膜貫通NOTCHタンパク質から切断される。NOTCH転移を測定する方法は、公知である（例えば、Songら、1999、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 : 6959-6963またはCapobiancoら、1997、Mol. Cell Biol. 17 : 6265-6273に記載の方法）。候補化合物の不在下に比較した候補化合物の存在下の転移の減少は、この化合物が、NOTCHのHAAH活性化を阻害し、それにより、NOTCH媒介シグナル伝達およびHAAH過剰発現腫瘍細胞の増殖を阻害することを示す。

10

【0074】

IRSのリン酸化を阻害する化合物についてのスクリーニングの方法は、候補化合物の存在および不在下でIRS発現細胞をインキュベートし、そしてこの細胞におけるIRSリン酸化レベルを評価することにより、実施される。化合物の不在下に比較した、化合物の存在下で培養した細胞におけるリン酸化の減少は、この化合物が、IRS-1リン酸化および結果としてHAAH過剰発現腫瘍の増殖を阻害することを示す。あるいは、このような化合物は、当技術分野で公知のインビトロリン酸化アッセイ（例えば、ポリ（Glu/Tyr）のような合成基質のリン酸化を測定したもの）において同定される。

20

【0075】

（実施例1：HAAHの発現増大は、悪性形質転換と関連する）

HAAHは、形質転換関連タンパク質においてEGF様ドメインを水酸化する高度に保存された酵素である。HAAH遺伝子は、多くの癌タイプ（ヒト肝細胞癌および胆管癌を含む）において過剰発現される。HAAH遺伝子発現は、胆管癌に比較して、ヒト疾患およびラットモデルの両方において胆管増殖の間に検出不能であることが見出された。NIH-3T3細胞におけるHAAHの過剰発現は、悪性表現型の生成と関連し、そして酵素活性は、細胞形質転換のために必要とされることが見出された。以下に記載のデータは、HAAHの過剰発現が胆上皮細胞の細胞形質転換に連結されることを示す。

【0076】

ヒト肝細胞起源の形質転換悪性細胞において特異的に過剰発現される分子を同定するために、FOCUS肝細胞癌（HCC）細胞株を、悪性表現型と関連したタンパク質を特異的または優先的に認識するモノクローナル抗体（mAb）を生成する免疫原として使用した。HepG2 HCC細胞由来のGT11 cDNA発現ライブラリーをスクリーニングし、そしてFOCUS細胞株に対して産生されるHAAH特異的mAbが、HAAH cDNAによりコードされるタンパク質のエピトープを認識することが見いだされた。HAAH酵素は、いくつかの異なるヒト形質転換細胞株および腫瘍組織において隣接するヒト組織対応物に比較して上方調節（upregulate）されることが見いだされた。異なるヒト悪性組織における過剰発現されたHAAH酵素は、触媒的に活性であることが見出された。

30

【0077】

HAAH遺伝子発現を、増殖胆管において、およびNIH3T3細胞において試験した。悪性表現型の生成におけるその役割を、形質転換病巣の形成、足場非依存性増殖の指標としてソフトアガーにおける増殖、およびヌードマウスにおける腫瘍形成によって測定した。形質転換表現型の誘導における酵素活性の役割を、ヒドロキシラーゼ活性を廃する触媒部位における変異を有するcDNA構築物を用いることによって測定した。この結果は、HAAH遺伝子の発現の増加が、胆管の悪性形質転換と関連することを示した。

40

【0078】

以下の材料および方法を使用して、以下に記載するデータを生成した。

【0079】

（抗体）

50

FB50モノクローナル抗体を、FOCUS HCC細胞でBalb/Cマウスを細胞免疫することによって生成した。モノクローナル抗 Deng 熱ウイルス抗体を非関連コントロールとして使用した。HB0H2モノクローナル抗体を、52kDa組換えHAAHポリペプチドに対して生成した。これは、マウスおよびヒトタンパク質由来の ヒドロキシラーゼの触媒ドメインを認識する。ポリクローナル抗HAAH抗体は、ラットヒドロキシラーゼタンパク質と交差反応する。コントロール抗体抗Erk-1をSanta CruzBiotechnology, Inc.、CAから購入した。西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したヒツジ抗マウス抗血清およびロバ抗ウサギ抗血清を、Amersham、Arlington Heights、ILから入手した。

【0080】

(構築物)

マウス全長AAH構築物 (pNH376) および触媒活性が廃止された部位指向性変異構築物 (pNH376-H660) を、真核生物発現ベクターpcDNA3 (Invitrogen Corp.、San Diego、CA) にクローニングした。全長ヒトAAHを、原核生物発現ベクターpBC-SK+ (Stratagene、LaJolla、CA) にクローニングした。全長ヒトAAH (GENBANKアクセッション番号S83325) をpcDNA3ベクターのEcoRI部位にサブクローニングした。

【0081】

(胆管増殖の動物モデル)

ラットを、グループ9を除いて各々3匹の動物の9つの別個の群に分けた。グループ9は5匹のラットを含んだ。グループ1は、非手術コントロール群であり、グループ2は、偽操作手術コントロールであった。残りのグループは、肝臓内胆管増殖を誘導するために総胆管結紮 (ligation) を受け、そして表3に示すように6、12、24、48時間、および4、8および16日目に評価した。動物をCO₂で窒息させ、そして肝臓試料を左側葉および中葉から採取し、2%パラホルムアルデヒド中に固定化し、そしてパラフィン包埋した。肝臓試料 (5m) を切断し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色して、肝臓内胆管増殖を評価した。免疫組織化学を、ラットタンパク質と交差反応するポリクローナル抗HAAH抗体を用いて実施し、タンパク質発現のレベルを決定した。

【0082】

(原発性硬化性胆管炎 (PSC) と関連した胆管増殖)

肝臓生検試料を、PSCおよび関連胆管増殖を有する7個体から得た。これらの個体を、標準的な胃腸肝臓 (gastroenterohepatological) プロトコルに従って評価した。患者は、22 ~ 46歳であり、そして男性が4人、女性が3人であった。4人は、炎症性腸疾患を伴った (3人が潰瘍性大腸炎であり、そして1人がクローン大腸炎 (Crohn'scolitis) である)。患者は全て、放射線医学評価 (腹部超音波検査および内視鏡的逆行性胆道膵管造影を含む) を受け、肝臓外胆管閉塞の診断を除いた。組織切片を、パラフィン包埋ブロックから調製し、胆管増殖についてヘマトキシリンおよびエオシン染色によって評価した。HAAHの発現を、HAAH特異的モノクローナル抗体 (例えばFB50) を用いて免疫組織化学によって決定した。

【0083】

(免疫組織化学)

肝臓組織切片 (5μm) を、キシレン中で脱パラフィンし、そして等級化アルコール (graded alcohol) 中で再水和した。内因性ペルオキシダーゼ活性を、60%メタノール中での0.6% H₂O₂での30分処理によってクエンチした。内因性ピオチンを、アビジン-ピオチンブロッキング溶液 (VectorLaboratories、Burlingame、CA) とのインキュベーションによってマスキングした。FB50mAb (PSC試料について) およびポリクローナル抗HAAHヒドロキシラーゼ抗体 (ラット肝臓試料について) を、4 で一晩、加湿チャンバーにおいてスライドに添加した。免疫組織化学染色を、色素原としてジアミノベンジジン (DAB) を有するVectastain Kitsを用いる標準的なアビジン-ピオチン西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体 (ABC) 法を用いて、製造者の指示書 (VectorLaboratories, Inc.、Burlingame、CA) に従って実施した。組織切片をヘマトキシリンで対比染色し、次いでエタノール中で脱水した。切片を、胆管増殖およびHAAHタンパク質発現について光学顕微鏡によって試験した。

10

20

30

40

50

胆管癌および胎盤のパラフィン切片を、陽性コントロールとして使用し、そして肝臓脂肪症試料 (hepatosteatosis samples) を、陰性コントロールとして使用した。抗体結合特異性についてのコントロールに、隣接切片を、一次抗体の不在下で、または Deng 熱ウイルスに対する非関連抗体を用いて免疫染色した。組織免疫反応性についての陽性コントロールとして、全ての標本の隣接切片を、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼに対するモノクローナル抗体を用いて免疫染色した。

【0084】

(ウェスタンブロット分析)

細胞溶解物を、プロテアーゼインヒビターを含む標準的な放射性免疫沈降アッセイ (RIPA) 緩衝液において調製した。溶解物中のタンパク質の総量を Bio-Rad 比色アッセイ (BioRad, Hercules, CA)、続いて 10% ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって決定し、PVDFメンブレンに転写し、そして、二次抗体としての西洋ワサビペルオキシダーゼで標識された一次ヒツジ抗マウスおよびロバ抗ウサギ抗血清としての FB50、HBOH2、抗 Erk-1 (タンパク質ローディングについての内部コントロールとして使用) を使用するウェスタンブロット分析に供した。抗体結合を、増強された化学発光試薬 (SuperSignal, Pierce Chemical Company, Rockford, IL) およびフィルムオートラジオグラフィーで検出した。免疫反応性のレベルを、NIH 画像ソフトウェアを用いる体積デンストメトリーによって測定した。

【0085】

(酵素活性アッセイ)

AAH 活性を、標準的な方法 (例えば、Jia ら、1992、J. Biol. Chem. 267: 14322-14327; Wang ら、1991、J. Biol. Chem. 266: 14004-14010; または Gronke ら、1990、J. Biol. Chem. 265: 8558-8565 に記載の方法) に従って、 ^{14}C 標識 α -ケトグルタレートが ^{14}C 含有 CO_2 を放出するドメインを水酸化する基質としてウシプロテイン S の第一の EGF 様ドメインを用いて細胞溶解物中で測定した。インキュベーションを、 $48\text{ }\mu\text{g}$ の粗細胞抽出タンパク質および $75\text{ }\mu\text{M}$ EGF 基質を含む最終容量 $40\text{ }\mu\text{l}$ で、 37°C で 30 分間実施した。

【0086】

(細胞トランスフェクション研究)

NIH-3T3 細胞を、10% 熱不活化胎仔ウシ血清 (FCS; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、1% L-グルタミン、1% 非必須アミノ酸および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) を補充した、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Mediatech, Washington, DC) 中で培養した。サブコンフルエントな NIH-3T3 細胞 (3×10^5 細胞 / 60mm ディッシュ) を、以下のプラスミドの 1 つ ($10\text{ }\mu\text{g}$) でトランスフェクトした; 1) 非組換え pcDNA3 ベクター (Invitrogen Corp., San Diego, CA) (陰性コントロールとして); 2) pNH376-H660 (その触媒ドメインを変異させそして CMV プロモーター駆動の pcDNA3 ベクターにクローニングした、マウス AAH cDNA); 3) pNH376 (pcDNA3 ベクターにクローニングした野生型マウス AAH cDNA); 4) pCDHH (pcDNA3 ベクターにクローニングした野生型ヒト AAH cDNA); または 5) pLNCX-UP1 (v-Src オンコジーンをコードする cDNA) (ポジティブコントロール)。細胞を、製造業者 (5Prime-3 Prime, Inc., Boulder, CO) の指示書に従って、リン酸カルシウムトランスフェクションキットを用いてトランスフェクトした。細胞トランスフェクション効率の比較を、これらの種々の構築物で評価した。この手順のために、トランスフェクション後 48 時間で得たコンフルエントなプレートを分けて、12 個の別々の 6cm ディッシュに再播種した。これらの内の 6 個は、 $400\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の G-418 (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) を含有する培地の存在下で増殖させた。G-418 耐性病巣の数を、トランスフェクション後 14 日目に測定し、そしてトランスフェクション効率における任意の変動性について補正するために使用した。

【0087】

(形質転換アッセイ)

NIH-3T3 細胞を、これらの種々の構築物でトランスフェクトし、そして上記のように 48 時

10

20

30

40

50

間後にコンフルエントに到達させた。各6cmディッシュを分け、そして12個の異なる6cmディッシュに播種した。このうち6個を、トランスフェクション効率を検出するためにG-418の存在下で増殖させ、他の6個を、G418を含まない完全培地中で、4日毎に培地交換を行って増殖させた。形質転換病巣の数を、G-418を含まないこれらのプレートにおいてカウントし、そして1 μ gのトランスフェクトしたDNAあたりの形質転換病巣として表した。

【0088】

(足場非依存性細胞増殖アッセイ)

限界希釈技術(平底96ウェルプレートの1ウェルあたり0.15細胞)を、ウエスタンブロット分析およびヒドロキシラーゼ活性の酵素アッセイによって測定されるような、異なるレベルのHAAH活性を有する細胞クローンを単離するために、G-418中で増殖させたトランスフェクト体に対して行った。クローン化した細胞株(1.0×10^4 細胞)を、0.4%低融点アガロース(SeaPlaque GTG Agarose; FMCBioproducts、Rockland、Maine)を含む完全培地中に懸濁し、0.53%低融点アガロースを含む完全培地からなるボトムアガー混合物上に重層した。各クローンを、3連でアッセイした。クローンを、これらの条件下で播種し、そして10日後、病巣のサイズ(陽性の増殖>0.1mm直径)および数を測定した。

10

【0089】

(ヌードマウスにおける腫瘍形成能)

この足場非依存性増殖アッセイで評価したクローンと同じクローンを、ヌードマウスに注射し、そして腫瘍形成について観察した。腫瘍形成能を、各4グループの10匹の動物(Charles River Labs.、Wilmington、MA)を用いて評価した。グループ1には、偽DNAで安定にトランスフェクトした 1×10^7 細胞を与え、グループ2~4には、pNH376で安定にトランスフェクトしそして種々のレベルのマウスHAAHタンパク質を発現するクローンの、 1×10^7 細胞を与えた。ヌードマウスを、標準的な動物施設中、無病原体条件下で維持した。腫瘍細胞接種の30日後、動物を、イソフルオラン(isofluorane)(Acrranc、Anaquest、NJ)を含むチャンバを使用して屠殺し、そして腫瘍を注意深く取り出し、重量を測定した。

20

【0090】

(胆管増殖の動物モデル)

総胆管の結紮後、肝臓内胆管増殖が、48時間で明らかになった。総胆管結紮後8日および16日に得た組織試料は、表3に示されるように過剰な胆管の増殖を示した。

【0091】

(表3) 総胆管の結紮後の異なる間隔での胆管増殖およびHAAH発現

30

グループ	外科的処置	顕微鏡分析*	免疫組織化学
1	処置なし	正常	陰性
2	偽処置	正常	陰性
3	結紮後6時間	正常	陰性
4	結紮後12時間	正常	陰性
5	結紮後24時間	正常	陰性
6	結紮後48時間	最小の胆管増殖	陰性
7	結紮後4日	穏やかな胆管増殖	陰性
8	結紮後8日	広範な胆管増殖	陰性
9	結紮後16日	広範な胆管増殖	陰性

10

20

*ヘマトキシリンおよびエオシン染色後に光学顕微鏡下で調査した。

【0092】

免疫組織化学的染色では、いかなる時間での増殖中の胆管中にHAAHの存在を検出できなかった。偽性の外科的コントロール由来の胆管におけるHAAH発現の分析もまた陰性であったが、全ての試料は、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼに対するコントロール抗体との陽性の免疫反応性を示した。従って、胆管増殖は、この標準的な動物モデル系においてHAAH発現の増加に関連しなかった。

【0093】

30

(PSCにおけるHAAH発現)

PSCを有する患者由来の肝臓生検標本は、管周辺(periductal)線維症を伴う胆管増殖および形成異常を示さない単核炎症細胞浸潤を示した。HAAH特異的モノクローナル抗体を用いて免疫染色した隣接切片は、増殖中の胆管における検出可能なHAAH免疫反応性を有さなかった。対照的に、同じ抗体をおよび検出試薬を使用して同時に免疫染色した胆管癌の切片は、ほとんど全ての腫瘍細胞においてHAAHの免疫反応性の強力なレベルを示したが、胆管癌の隣接切片は、デング熱ウイルスに対するモノクローナル抗体でネガティブな免疫染色反応を示した。これらの知見は、HAAH発現が、肝臓内胆管の非癌性細胞増殖よりもむしろ悪性の形質転換と関連することを示す。

【0094】

40

(NIH-3T3細胞のHAAH関連形質転換)

マウスおよびヒトのAAH遺伝子、ならびに酵素活性を有さないマウスAAH変異体構築物の形質転換能力を、偽DNA(ネガティブコントロール)およびv-Src(ポジティブコントロール)をトランスフェクトしたNIH-3T3細胞に対して比較した。マウスAAHの形質転換能力は、図1に示されるように、ベクターDNAコントロールの能力の2~3倍であることが見出された。このヒト遺伝子の形質転換能力は、マウスAAHで観察された能力よりも高かった(それぞれ、 32 ± 1.5 対 13 ± 2.6 個の形質転換病巣)。マウスおよびヒトのAAHをトランスフェクトした細胞は、大きい病巣を形成し、これは、v-Srcをトランスフェクトした線維芽細胞の病巣と類似する。対して、ベクターDNAをトランスフェクトした細胞において時折はるかに小さい病巣が観察され、これは、線維芽細胞株の接触阻害を示す。酵素活性を有さな

50

い変異体pNH376-H660構築物を使用して行った並行実験は、形質転換活性を全く示さなかった。この知見は、HAAHの酵素活性が、このHAAH遺伝子によって示される形質転換活性に必要であることを示す。

【0095】

(足場非依存性細胞増殖アッセイ)

マウスAAH構築物での一過的トランスフェクション後、いくつかの異なる形質転換病巣を、希釈クローニング実験のために単離し、異なるレベルのHAAH遺伝子発現を有する安定にトランスフェクトされた細胞クローンを確立した。9個の異なるクローン化した細胞株を、さらなる研究のために選択した。HAAHタンパク質の発現レベルを、ウエスタンブロット分析によって測定した。クローン7および18は、HAAHタンパク質発現の穏やかな増加を有し、ソフトアガー中に大きいコロニーを形成した(図2)。抗Erk-1モノクローナル抗体でのこの同じ膜の免疫ブロットによって示されるように、全てのレーンにおいてタンパク質ロード量は等価であった。タンパク質発現の増加は、図3に示されるような、酵素活性の増加に関連した。これらのクローンがソフトアガー中での足場非依存性の細胞増殖を示す能力を、図3に示す。HAAH遺伝子発現の増加を有する全3個のクローンは、偽DNA単独をトランスフェクトしたクローンと比較して、足場非依存性の細胞増殖を示した。

10

【0096】

(ヌードマウスにおける腫瘍形成)

HAAH遺伝子発現の増加を有するこの3個のクローンを、ヌードマウスにおいて腫瘍を形成する能力について評価した。クローン18を与えたマウスにおける腫瘍サイズを、偽DNAをトランスフェクトしたクローンと比較した。クローン7、16および18は、このアッセイにおいて高度に形質転換され、そしてそれぞれ、2.5、0.9および1.5グラムの平均重量を有する大きい腫瘍を生じた(図4)。これらのデータは、HAAHの過剰発現が、インビボでの悪性の表現型の誘導および維持に寄与することを示す。

20

【0097】

(高レベルのHAAH発現は悪性の指標である)

HAAH発現が、細胞交替の増加よりもむしろ悪性に関連するか否かを決定するために、胆管増殖の2つのモデルを研究した。この動物モデルにおいて、総胆管の連結は、広範な肝臓内胆管増殖を誘導したが、表3に示されるように、これらの実験条件下でのHAAH遺伝子発現は見られなかった。PSCは、肝臓内および肝臓外の胆管の破壊ならびに増殖に関連する自己免疫肝臓疾患であるので、同様に、HAAH遺伝子発現を、胆管増殖に関連するヒト疾患モデルにおいて評価した。PSCは、前悪性疾患であり、そして罹患した個体の有意な割合が、結果的に胆管癌を発症する。しかし、広範な胆管増殖の存在下でのHAAH遺伝子発現の増加についての証拠は存在しなかった。

30

【0098】

HAAHタンパク質レベルが、胆管癌において上昇し、そして正常または増殖中の胆管において上昇しないことが確認されたので、悪性表現型の発生におけるHAAHの役割を研究した。HAAH遺伝子を、NIH-3T3細胞にトランスフェクトし、そして細胞変化(例えば、形質転換病巣の形成の増加、ソフトアガー中のコロニー増殖、および悪性形質転換に関連するヌードマウスにおける腫瘍形成)を評価した。全長のマウスおよびヒトのAAH遺伝子を、発現構築物にクローニングし、そしてNIH-3T3細胞に一過的にトランスフェクトした。偽DNAをトランスフェクトしたコントロールと比べて、形質転換病巣の数の増加が、マウスおよびヒトのAAH遺伝子をトランスフェクトした細胞において検出された。トランスフェクション効率を制御した後の、この形質転換病巣の数の増加は、v-Src遺伝子をトランスフェクトした細胞(ポジティブコントロールとして使用した)と比較して高くなかった。HAAH遺伝子の酵素活性は、悪性表現型に必要とされた。なぜなら、触媒部位を欠く変異体構築物は、形質転換特性を有さなかったからである。HAAHタンパク質レベルおよび酵素活性における穏やかな増加を有する、いくつかの安定なトランスフェクト体およびクローン化NIH-3T3細胞株を確立した。このような細胞株を、ソフトアガー中に置き、この悪性表現型の別の特性として、足場非依存性の細胞増殖を試験した。全ての細胞株が、偽DNAトランス

40

50

フェクトコントロールと比較して、ソフトアガー中で増殖し、そしてHAAH遺伝子発現の細胞レベルと形成されたコロニーの数およびサイズとの間に、ポジティブな相関が存在した。これらのクローン化した細胞株のうち3つが、ヌードマウスにおいて腫瘍を形成した。HAAH発現の増加を有する3つ全ての細胞株は、形質転換表現型の別の周知の特徴としての大きい腫瘍の発達によって示されるように、腫瘍形成性であった。

【0099】

HAAHの過剰発現によって誘導される細胞変化が、酵素機能に関連するか否かを決定するために、部位特異的変異誘発をこの遺伝子に導入した。この変異誘発は、マウスHAAHの鉄イオン結合部位である660番目のヒスチジンをリジンに変化し、これによって、このマウスHAAHのヒドロキシラーゼ活性を消失させた。HAAHにおける対応する変異を、HAAHヒドロキシラーゼ活性を阻害するためのドミナントネガティブ変異体として使用した。このpNH376-H660構築物は、形質転換活性を有さず、これは、過剰発現によって誘導されるこの悪性表現型の細胞変化が、このタンパク質の酵素活性に依存することを示す。

10

【0100】

Notchレセプターおよびそれらのリガンドは、 γ -水酸化についての推定コンセンサス配列を含む、N末端領域中のいくつかのEGF様ドメインを有する。Notchリガンドは、Notchシグナル伝達経路の重要なエレメントであり、このリガンドとのNotchの相互作用は、両分子のEGF様ドメインによって生じる。HAAHによる γ -水酸化の標的であるEGF様ドメインの、アスパラギン酸残基またはアスパラギン残基に及ぼされる点変異は、下流のシグナル伝達経路の活性化に關与するカルシウム結合およびタンパク質-タンパク質相互作用を減少する。HAAHの過剰発現およびHAAHによるNotchタンパク質の水酸化は、悪性に寄与する。腫瘍増殖は、HAAHによるNotchタンパク質の水酸化を減少することによって阻害される。

20

【0101】

本明細書中に示されるデータは、高レベルのHAAH発現が、悪性形質転換に関連するという証拠である。NIH-3T3細胞におけるHAAH cDNAの発現の増加は、形質転換病巣の数の増加、足場非依存性増殖、およびヌードマウス中の腫瘍形成によって表される、形質転換表現型を誘導した。さらに、インタクトなHAAH酵素が、HAAH関連形質転換に必要とされることが見出された。従って、内因性HAAHの酵素活性または発現の20%程度の少ない阻害だけで、治療的利点を付与する。例えば、臨床的利点は、未処理の癌細胞または正常な非癌性細胞に関連するレベルと比較した、HAAH阻害性化合物の投与後の50%～70%のHAAHの発現または活性の阻害によって達成される。

30

【0102】

HAAHは、転写レベルで調節される。HAAHの発現および酵素活性におけるほんの穏やかな増加が、細胞の形質転換に必要とされた。これらは、HAAHの遺伝子発現および酵素活性の増加が、形質転換表現型の発生または維持に寄与すること、およびHAAH遺伝子の転写の減少またはHAAH遺伝子産物の酵素活性の減少が、悪性の減少を導くことを示す。従って、HAAH転写は、HAAHプロモーター配列へのFosおよび/またはJun (HAAH転写を調節するエレメント) の結合を減少する化合物を投与することによって阻害される。

【0103】

HAAHは、胆管上皮の悪性形質転換を伴って上方調節され、そしてHAAH免疫反応性が、腫瘍細胞表面膜上で検出可能であるので、HAAHはまた、細胞傷害剤を標的化する(例えば、腫瘍細胞の表面上に発現されるHAAHに結合する化合物への、細胞傷害剤の連結によって)ための分子でもある。生物学的液体(例えば、胆汁)または細胞(微細なニードルでの吸引によって得られる)のいずれかにおけるHAAHタンパク質レベルのアッセイは、ヒト胆管癌の診断マーカーである。

40

【0104】

(実施例2: AAHの発現ならびに悪性CNS新生物の増殖および浸潤)

AAHは、癌腫および栄養膜細胞において豊富に発現されるが、ほとんどの正常細胞(CNS起源の細胞を含む)においては豊富に発現されない。高レベルのAAH発現が、16個の神経膠芽細胞腫のうちの15個、9個の退形成型乏突起膠腫のうちの8個、および12個の未分化神経

50

外胚葉性腫瘍 (PNET) のうちの12個において観察された。高レベルのAAH免疫反応性は、腫瘍の中央部よりもむしろ浸潤中の縁部分で主に局在される。二重標識免疫組織化学的染色は、AAHとテネイシン (AAH酵素活性の基質) との間の相互関係を実証した。ホルボールエステルミリスレートまたはレチノイン酸で処理し、ニューライト伸長および侵襲性増殖を刺激したPNET2ニューロン細胞株は、高レベルのAAH発現を示し、一方、 H_2O_2 誘導性のニューライト収縮が、AAHの下方調節を生じた。ヒトAAH cDNAを安定に過剰発現したPNET2ニューロン細胞は、PCNAおよびBcl-2のレベルを増加し、そしてp21/Waf1およびp16のレベルを減少し、これは、AAH過剰発現が、病理学的細胞増殖、細胞周期進行、およびアポトーシスに対する耐性の増強を生じることを示唆する。さらに、AAHトランスフェクト体に観察されたp16のレベルの減少は、AAH過剰発現が、新生物細胞の侵襲性の増殖の増強を付与することを示す。なぜなら、このp16遺伝子の欠失または下方調節は、神経膠芽細胞腫のより攻撃的かつ侵襲性のインビボ増殖と相関するからである。増加されたAAH免疫反応性は、原発性悪性CNS新生物の浸潤中の縁部分で検出され、これは、腫瘍侵襲性におけるHAAHの役割をさらに示す。

10

【0105】

以下の材料および方法を使用して、以下に記載のデータを作成した。

【0106】

(原発性ヒト悪性CNS新生物におけるAAH免疫反応性の分析)

AAH免疫反応性を、神経膠芽細胞腫 (N = 16)、退形成型乏突起膠腫 (N = 9)、および未分化神経外胚葉性腫瘍 (PNET; テント上神経芽細胞腫 (N = 3) および髄芽細胞腫 (N = 9)) の外科的切除標本において試験した。これらの組織病理学的切片を再評価して、標準的判断基準を使用してその診断を確かめた。それぞれの生存固形腫瘍または隣接するインタクトな組織を有する腫瘍の試料を含むブロックからのパラフィン切片を、研究した。正常な成体の死後の脳 (n = 4) 由来の切片を、ネガティブコントロールとして含んだ。AAH免疫反応性を、HAAH特異的モノクローナル抗体を使用して検出した。免疫反応性は、色素原として3-3'ジアミノベンジジン (DAB) (24) および対比染色としてヘマトキシリンを使用する、アビジン-ビオチン西洋ワサビペルオキシダーゼ複合法 (Vector ABC Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) によって明らかにした。

20

【0107】

テネイシンおよびラミニンは、おそらく、これらの分子内のEGF様反復の存在に起因して、AAHについての基質である。二重免疫染色研究を行い、テネイシンまたはラミニンと共にAAHを同時局在化した。AAH免疫反応性を、色素原としてDABを用いるABC法によって検出し、そしてテネイシンまたはラミニンの免疫反応性を、基質としてBCIP/NBTを用いるアビジン-ビオチンアルカリホスファターゼ複合法 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) によって検出した。ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールとして、隣接切片を、神経膠原線維酸性タンパク質 (GFAP) およびB型肝炎表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いて免疫染色した。全ての標本を、同じ抗体希釈度および免疫検出試薬を用いて、パッチ免疫染色した。

30

【0108】

(細胞株および培養条件)

AAH発現が、悪性新生物の浸潤性増殖と共に生じる、ニューライト (糸状足 (filopodia)) 伸長 (出芽) によって調節されるか否かを決定するために、研究を行った。ヒトPNET2CNS由来およびSH-Sy5yの神経芽細胞腫細胞を培養し、そして0、1、2、3、5または7日目に100nMのホルボール12-エステル13-アセレートまたは10 μ Mのレチノイン酸で刺激して、出芽を誘導した。さらに、AAH発現に際するニューライト収縮の効果を試験するために、サブコンフルエントな培養物を、低濃度 (10 ~ 40 μ M) の H_2O_2 で24時間処理した。両方の研究について、AAH発現を、HAAH特異的抗体を使用するウエスタンブロット分析によって評価した。

40

【0109】

(PNET2 AAHトランスフェクトクロンの作製)

50

全長ヒトAAH cDNA (配列番号: 3) を、pcDNA3.1哺乳動物発現ベクターに連結した。この発現ベクターにおいて、遺伝子発現は、CMVプロモーターの制御下にある (Invitrogen Corp., San Diego, CA)。PNET2細胞を、Cellfectin試薬 (Gibco BRL, Grand Island, NY) を使用して、pHAAHまたはpcDNA3 (ネガティブコントロール) のいずれかでトランスフェクトした。ネオマイシン耐性クローンを選択し、構成的レベルのAAHタンパク質発現が、ウエスタンブロット分析によって検出した場合に、コントロール (pcDNA3) と比較して少なくとも2倍増加したか否かを研究した。AAHの過剰発現が、その形質転換表現型を調節する遺伝子の発現をどれほど変更するかを決定するために、増殖細胞核抗原 (PCNA)、p53、p21/Waf1、Bcl-2およびp16のレベルを、AAH (N=5) およびpcDNA3 (N=5) を安定にトランスフェクトしたクローンのサブコンフルエントな培養物由来の細胞溶解調製物において測定した。PCNAを、細胞増殖のマーカーとして使用した。p53、p21/Waf1、およびBcl-2のレベルを、AAHを過剰発現する細胞が、細胞周期進行へのより高い傾向があり、かつアポトーシスに対するより高い耐性を有するか否かを決定するために試験した。p16のレベルを、AAH過剰発現が、腫瘍侵襲性における役割を有するか否かを決定するために評価した。

10

【0110】

(ウエスタンブロット分析)

10cm²ディッシュにおいて増殖させた細胞を、溶解し、そしてプロテアーゼおよびホスファターゼのインヒビターを含有する標準的な放射免疫沈降アッセイRIPA緩衝液中に均質化した。不溶性細片を除去するために試料を12,000×gで10分間の遠心分離した後に収集した上清を、ウエスタンブロット分析に使用した。タンパク質濃度を、BCAアッセイ (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) を使用して測定した。60μgのタンパク質を含む試料を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) 中で電気泳動し、そしてウエスタンブロット分析に供した。二連のブロットを、個々の抗体でプローブした。免疫反応性を、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化IgG (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) で検出し、そして化学発光試薬で増強した。タンパク質発現のレベルを定量するために、不飽和オートラジオグラフを、NIH Imageソフトウェアバージョン1.6を使用する容量デンスitometry (volumedensitometry) に供した。pHAAHとpcDNA3をトランスフェクトした細胞間の統計学的比較を、スチューデントT検定を使用して行った。

20

【0111】

(抗体)

FOCUS肝細胞癌細胞に対して作製したHAAH特異的モノクローナル抗体を使用して、AAH免疫反応性を検出した。テネシンおよび神経膠原線維酸性タンパク質に対するモノクローナル抗体、ならびにラミニンに対するウサギポリクローナル抗体を、Sigma Co. (St. Louis, MO) から購入した。ヒトp16に対するウサギポリクローナル抗体を、Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA) から購入した。B型肝炎表面抗原に対する5C3ネガティブコントロールモノクローナル抗体を、組換えタンパク質を使用して作製し、そしてネガティブコントロールとして使用した。

30

【0112】

(原発性悪性脳腫瘍におけるAAH免疫反応性)

神経膠芽細胞腫16のうち15、未分化乏突起細胞腫9のうち8、そしてPNETの12全てにおいて、AAH免疫反応性を検出した。AAH免疫反応性は、細胞質、核および細胞突起に局在した。AAH免疫反応性の組織分布は、腫瘍とインタクトな脳との間の界面に局在した強力な標識化に著しく、そして腫瘍の中央部分内の免疫反応性の目立って低いレベルであった。高いレベルのAAH免疫反応性はまた、軟膜下の領域、軟膜、フィルヒョー-ロバン血管周囲腔隙に分布した新形成細胞において、および実質組織に浸潤した新形成細胞の個体または小集団において、観察された。対照的に、AAH免疫反応性は、正常な脳では検出されなかった。有糸分裂における核の密度 (1~5%) は、腫瘍の中央部分および末端部分において類似していたので、AAH免疫反応性の分布は、DNA合成と厳密には関連していないようである。

40

【0113】

50

(神経膠芽細胞腫におけるAAHとテネイシン免疫反応性との間の関係)

テネイシンは、悪性神経膠腫において発現された細胞外細胞間質関連抗原である。テネイシンは、分子内に、HAAH水酸化の基質である、EGF様ドメインを含む。悪性脳腫瘍におけるテネイシン免疫反応性に関してAAHを局在化するため、二重標識免疫組織化学染色を実施し、ここで褐色色素原(brownchromogen)(DAB)、およびテネイシン、青色色素原(bluechromogen)(BCIP/NBT)を用いてAAHを検出した。隣接部位を同様に二重標識して、CNS中に発現された細胞外細胞間質分子を含む別のEGFドメインであるラミニンを用いてAAHを同時局在化した。血管周囲結合組織において、および内皮細胞のグロメルロイド(glomeruloid)増殖に関連して、テネイシン免疫反応性の強力なレベルが観察された。二重標識試験によって、高レベルのAAHが、低テネイシンまたは検出不能なテネイシンと関連してあり、そして低レベルのAAHが、豊富なテネイシン免疫反応性を関連しているような、AAHとテネイシンの免疫反応性の間の相反する関係が実証された。ラミニンはまた、分子内のEGF反復に起因してAAH酵素活性の基質であるようであるが、二重標識試験では、腫瘍全体を通じて、そして腫瘍とインタクトな組織との間の界面でごく低いレベルのラミニン免疫反応性が示された。

10

【0114】

(PMAまたはRAで処理したニューロン細胞株におけるAAHの分析)

ニューライト出芽/糸状仮足伸長は、新生物のニューロン細胞の侵襲性の増殖を特徴付ける。PMAは、ニューライト出芽に関与するプロテインキナーゼCシグナル伝達経路を活性化する。レチノイン酸はそれ自体のレセプターに結合し、そしてリガンド-レセプター複合体は、核に移動し、ここでニューライト成長に関与する標的遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域に存在する特定のコンセンサス配列に結合する。PNET2細胞およびSH-Sy5y細胞の両方とも、PMA(60~120nM)またはレチノイン酸(5~10 μ M)での処理によって出芽するように誘導され得る。図5A~Dは、代表的なウエスタンブロットのオートラジオグラフィからのデータを示す;棒グラフは、3つの実験から得た結果の平均 \pm S.D.に相当する。FB50抗体を用いたウエスタンブロット分析により、約85kDaの分子量を有するタンパク質に相当する二重のバンドを検出した。未処理のPNET2細胞は、比較的低レベルのAAH免疫反応性を有した(図5A)が、未処理のSH-Sy5y細胞は、容易に検出されるAAH発現を有した(図5B)。未処理のPNET2細胞は、粗い、短い半径方向細胞突起を有する多角形の形態を示したが、SH-Sy5y細胞は、わずかに伸長され、細く尖った突起を自ら伸長した。両方の細胞株とも、RA(図5Aおよび5B)またはPMA(図5C)のいずれかの刺激およびニューライト伸長後、AAH免疫反応性のレベルにおいて、時間依存性の増大を表した。PNET2細胞においては、RAまたはPMAに対する暴露の24時間後少なくとも2倍までAAHタンパク質のレベルが増大し、そして試験の7日間を通じて高いレベルのAAHが維持された。SH-Sy5y細胞においては、AAH発現において、RA刺激またはPMA刺激の増大が、より漸増的に生じ、そして処理の7日後に最高であった(図5B)。

20

30

【0115】

ニューライト収縮に対するAAH発現の効果を試験するため、PNET2およびSH-Sy5y細胞を低濃度(8~40 μ M)のH₂O₂で処理した。40 μ MまでのH₂O₂に対する暴露の24時間後、ほとんどの細胞は、生きていた(トリパンブルー色素排除)が、それらは、ニューライトの収縮および丸まりを示した。FB50抗体を用いるウエスタンブロット分析により、AAHタンパク質のレベルにおけるH₂O₂の用量依存性の減少が実証された(図5D)。

40

【0116】

(PNET2細胞におけるAAH過剰発現の効果)

悪性の表現型に対するAAH過剰発現の役割を直接評価するため、CMVプロモーター(pHAAH)の制御下で遺伝子発現を有するヒト全長cDNAを用いてPNET2細胞を安定にトランスフェクトした。ネオマイシン耐性pcDNA3偽(mock)クローンに対して少なくとも2倍高いレベルのAAH免疫反応性を有するネオマイシン耐性クローンを研究した。悪性新生物の攻撃的な挙動は、DNA合成の増大、細胞周期進行、アポトーシスに対する耐性、および侵襲的増殖に関連しているので、AAHの構成的な過剰発現に関連する表現型の変化が、PCNA、p21/

50

Waf1、p53、Bcl-2、およびp16に関して特徴づけられた。PCNAを、DNA合成および細胞増殖の係数として用いた。p21/Waf1は細胞周期のインヒビターである。p53腫瘍抑制遺伝子の発現は、アポトーシスの前に増大するが、bcl-2は、アポトーシスを阻害し、そして神経細胞の生存を増強する。p16は、しばしば、悪性新生物に対する浸潤においてダウンレギュレートされるかまたは変異されるかのいずれかである癌抑制遺伝子である。

【0117】

5つのpHAAHおよび5つのpcDNA3のクローンを研究した。PHAAHトランスフェクトしたクローンにおけるAAH発現のレベルの上昇を、ウエスタンブロット分析（図6）およびノーザンブロット分析により確認した。70～80%コンフルエントになった培養物由来の細胞溶解物を用いたウエスタンブロット分析により、pHAAHトランスフェクト細胞におけるAAH発現（約85kDa； $p < 0.05$ ）の構成的に増大したレベルがPCNA（約35kDa； $p < 0.01$ ）およびBcl-2（約25kDa； $p < 0.05$ ）の有意に増大したレベル、ならびにp21/Waf1（約21kDa； $p < 0.001$ ）およびp16（約16kDa； $p < 0.001$ ）の減少したレベルに関連することが実証された（図6）。しかし、pHAAH安定トランスフェクト体はまた、より高いレベルの野生型p53（約53～55kDa）を示した。安定なトランスフェクト体におけるAAH発現（85kDaタンパク質）は、わずか75～100%までしか増大しなかったが、p16およびp21/Waf1のレベルは、はっきり減少し、そしてPCNAは、2倍近くまで増大した（図6）。

10

【0118】

（AAH発現の増大は、悪性CNA新生物の増殖および侵襲の指標である）

本明細書に記載されるデータは、AAH過剰発現が、診断ツール（これによってニューロン細胞起源および神経膠細胞起源の両方の原発性悪性CNS新生物を同定する）であることを実証する。免疫組織化学染色研究により、AAH過剰発現が、固形腫瘍と正常組織との間の境界において、ならびに軟膜下領域、軟膜、血管周囲腔、および実質組織に分布した新生物細胞への浸潤において、主に検出可能であることが実証された。インビトロ実験において、AAH遺伝子発現がニューライト（糸状仮足）伸長および侵襲で調節され、そしてニューライト収縮でダウンレギュレートされることが実証された。さらに、AAH cDNAで安定にトランスフェクトされたPNET2細胞は、PCNAおよびbcl-2の増大を示し、そしてWaf1/p21およびp16発現の減少を示した。従って、AAH過剰発現は、細胞増殖および細胞周期進行を促進するか、アポトーシスを阻害するか、または腫瘍細胞侵襲を増強する他の遺伝子の発現を調節することによってCNS細胞の形質転換された表現型に寄与する。

20

30

【0119】

このデータは、PNET2細胞およびSH-Sy5y細胞において、ただし正常な脳にはない、容易に検出可能なAAH mRNA転写物（4.3kBおよび2.6kB）およびタンパク質（85kDaおよび50～56kDa）を実証した。これに対して、高レベルのAAH免疫反応性が、研究された悪性の原発性CNS由来新生物中において37のうち35で観察された、一方、4つの正常なコントロールの脳は、検出可能なAAH免疫反応性を有さなかった。浸潤する周辺での、そして一般には腫瘍の中央部にはない、高レベルAAH免疫反応性の存在は、AAH過剰発現がCNS新生物の侵襲的増殖に関与することを示す。AAH発現または酵素活性を減少する化合物の投与は、AAHを過剰発現するCNS腫瘍の増殖、ならびに他の組織型へのCNS腫瘍の転移を阻害する。

【0120】

AAH酵素は、多数のタンパク質のEGFドメインを水酸化する。テネイシン（悪性神経膠腫において大量に発現される細胞外細胞間質分子）は、EGF様ドメインを含む。テネイシンは腫瘍細胞侵襲を促進するので、神経膠芽細胞腫におけるテネイシンの大量の発現は、悪性神経膠細胞新生物中のEGFまたはEGF様レセプターの高頻度の過剰発現に対する腫瘍細胞増殖の増強の自己分泌機構を示す。テネイシンの機能的ドメインの分析は、このファミリーの分子の分裂促進効果が、フィブロネクチンドメインによって大きく媒介されること、およびEGF様ドメインが増殖、細胞突起伸長、および細胞間質侵襲を阻害することを示した。従って、AAHによるEGF様ドメインの水酸化は、腫瘍細胞侵襲における重要な調節要因を示す。

40

【0121】

50

二重標識免疫組織学的染色研究によって、腫瘍の周辺に存在する高レベルのAAH免疫反応性が、低レベルのテネイシンと関連しており、そして低レベルのAAHが、しばしば高レベルのテネイシンと関連しているような、AAHとテネイシンの免疫反応性の間の相反する関係が実証された。これらの関係は、テネイシンのEGF様ドメインのAAH水酸化が、テネイシンタンパク質の免疫反応性を変更すること、およびそうした場合、隣接する正常組織および血管周囲腔への悪性CNS新生物の侵襲的増殖を促進することを示した。

【0122】

PMAまたはレチノイン酸でニューライト伸長を受けるように、または低用量の H_2O_2 への暴露によってニューライト収縮を受けるように、誘導されたPNET2およびSH-Sy5y神経細胞において、AAH免疫反応性を試験した。AAH発現は、PMA誘導またはレチノイン酸誘導によるニューライト（糸状仮足）伸長によって、はっきりと増大し、そして H_2O_2 誘導性ニューライト収縮および細胞の丸まりにより阻害された。ニューライトまたは糸状仮足の伸長および細胞外細胞間質への付着は、CNSにおける腫瘍細胞侵襲に必要である。テネイシンのEGF様ドメインは、発生の間、細胞間質へのニューライトおよびグリア細胞の増殖を阻害する。

10

【0123】

形質転換された表現型に対するAAH過剰発現の役割を直接評価するため、DNA合成、細胞周期進行、アポトーシス、および腫瘍侵襲で調節された遺伝子を、ヒトAAH cDNAを安定に過剰発現する神経細胞クローン中で試験した。PCNA免疫反応性の増大およびWaf1/p21免疫反応性の減少の知見は、AAHの過剰発現が、細胞増殖および細胞周期進行を増強することを示した。さらに、Bcl-2発現の増大の知見は、AAH過剰発現がアポトーシスに対する細胞の耐性の増大によって、形質転換された表現型に寄与することを示した。AAHを過剰発現した細胞におけるより高レベルのp53という明らかに矛盾した知見は、未熟な神経細胞における高レベルの野生型p53が、アポトーシスではなくニューライト成長（侵襲）に関連しているという観察によって説明される。p16のレベルは（正常細胞に比べて）減少したか、またはAAHを構成的に過剰発現した細胞において実質的に検出不能であった；p16遺伝子の欠失変異体は、侵襲的増殖およびより迅速な悪性新生物（CNS起源のものを含む）の進行に関連していた。これらのデータは、p16発現がAAHによって調節されることを示す。

20

【0124】

（実施例3：HAAH産生の増大およびIRS媒介シグナル伝達）

30

IRS-1媒介シグナル伝達経路は、隣接する無関係の肝臓組織に比べ、ヒトHCC腫瘍の95%において活性化される。HAAHは、このシグナル伝達経路に関与する下流エフェクター遺伝子である。HAAH遺伝子アップレギュレーションは、免疫組織化学染色およびウエスタンブロット分析によって表されるように、HCC腫瘍におけるIRS-1の過剰発現に密接に関連している。高レベルのHAAHタンパク質が、正常な肝細胞および胆管に比して、HCCおよび胆管癌において発現される。これらの腫瘍の両方とも、免疫組織化学染色によって、IRS-1の高レベルの発現を示す。IRS-1のC末端短縮型ドミナントネガティブ変異体で安定にトランスフェクトしたFOCUS HCC細胞クローン（インスリンおよびIGF-1刺激シグナル伝達をブロックする）は、肝臓におけるHAAH遺伝子発現の顕著な減少に関連していた。対照的に、IRS-1を過剰発現するトランスジェニックマウスは、ウエスタンブロット分析により、HAAH遺伝子発現の増大を実証する。無血清培地におけるFOCUS HCC細胞のインスリン刺激（20および40U）および16時間後の血清枯渇により、HAAH遺伝子発現のアップレギュレーションが実証された。これらのデータは、HAAH遺伝子発現が、IRS-1シグナル伝達経路の下流エフェクターであることを示す。

40

【0125】

（実施例4：悪性表現型の特徴に対するHAAH発現レベルの効果）

NIH3T3細胞におけるIRS-1の過剰発現は、形質転換を誘導する。全長マウスHAAH構築物を、pcDNA3真核生物発現ベクター中にクローニングした。第二のマウス構築物は、部位指向性変異によって触媒活性を廃したHAAHをコードした。全長ヒトHAAH cDNAをpcDNA3発現ベクター、および形質転換活性のためのポジティブコントロールとして用いられたv-srcを

50

コードするプラスミド中にクローニングした。ヌードマウスにおいて、NIH3T3細胞のトランスフェクション、トランスフェクション効率のコントロール、HAAH酵素活性のアッセイ、病巣形成の分析による形質転換、足場非依存性細胞増殖アッセイ、および腫瘍形成能の分析のためには、標準的方法を用いた。このデータは、HAAHの過剰発現が悪性の表現型の生成に関連することを示した。

【 0 1 2 6 】

(表4) 酵素的に活性なHAAHの過剰発現は悪性腫瘍を示す。

cDNA	病巣数 ± S.D. ^b	NIH 3T3 クローン	コロニーの数 ^c
pcDNA3 (偽)	6.0 ± 3.3	PcDNA (偽)	0.4 ± 0.5
マウス HAAH	14.0 ± 2.9	クローン 18 ^d	6.2 ± 2.9
変異マウス HAAH ^a	1.6 ± 1.0	クローン 16 ^c	4.7 ± 6.5
ヒト HAAH	32.0 ± 5.4		
v-scr	98.0 ± 7.1		

a. 酵素的に活性なHAAH

b. $P < 0.01$ (偽および変異マウスHAAHに比して)

c. $P < 0.01$ (偽に比して)

d. クローン18は、約2倍まで、ヒトHAAHを過剰発現する、安定なクローニングされたNIH 3T3細胞株である。

e. クローン16は、約50%までヒトHAAHを過剰発現する、安定なクローニングされたNIH 3T3細胞株である。

【 0 1 2 7 】

これらのデータは、HAAHの過剰発現が形質転換された病巣の形成に関連することを示す。酵素的活性は、細胞性の形質転換が生じるのに必要である。ヒトHAAH遺伝子発現の増大を伴うクローニングされたNIH3T3細胞株は、ヌードマウスにおける固体腫瘍と同様に増殖する。HAAHは、IRS-1シグナル伝達経路の下流エフェクター遺伝子である。

【 0 1 2 8 】

(実施例5: HAAH遺伝子発現の阻害)

FOCUS HCC細胞株(ここからヒトHAAH遺伝子が最初にクローニングされた)は、正常肝臓において見出されるレベルよりも約3~4倍高いレベルのHAAH発現レベルを有する。HAAHアンチセンス構築物を作成するため、全長ヒトHAAH cDNAを、G418耐性遺伝子を含むレトロウイルスベクター中に反対方向に挿入し、そしてアンチセンスRNAをこの細胞中で産生した。また、より短いHAAHアンチセンス核酸(例えば、HAAH遺伝子のエキソン1に対応する核酸)も用いてHAAH発現を阻害する。

【 0 1 2 9 】

FOCUS細胞をこのベクターで感染させて、ウエスタンブロット分析によりHAAHのレベルを決定した。HAAH遺伝子発現の減少を観察した。コントロールとして、これもまた反対方向に挿入された、非関連緑色(グリーン)蛍光タンパク質(nonrelevant Green Fluorescent Protein)(GFP)を含有する、レトロウイルスで感染させた細胞の増殖速度および形態学的外観(図8)。細胞(HAAHアンチセンス構築物を保有する)は、細胞質対核の比における増大により特徴付けられる形態学の実質的な変化を示し、そしてこのことは培養における正常な成体肝細胞を連想させる細胞形状の変化を仮定する。HAAHレベルが減少している細胞は、図8に示されるように、アンチセンス(GFP)を発現するレトロウイルス感染細胞

10

20

30

40

50

胞（コントロール）よりも実質的に遅い速度で増殖する。HAAH遺伝子発現の減少は、より分化した非癌性の「肝細胞様」の表現型に関連していた。HAAHアンチセンス配列の発現を用いて腫瘍増殖速度を阻害する。HAAH細胞レベルの減少は、形質転換された病巣の形成の低下により特徴付けられる表現型、ソフトアガーにおける低レベル増殖または足場非依存性増殖がないこと、光学顕微鏡および位相差顕微鏡により決定される分化した肝細胞の形態学的特徴、を生じ、そして腫瘍形成を生じない（ヌードマウスへの細胞の接種により試験した場合）。

【 0 1 3 0 】

（実施例6：AAHアンチセンスオリゴヌクレオチドによるAAH発現の阻害）

AAH遺伝子発現を阻害するオリゴヌクレオチドを、標準的な方法を用いて設計し、そして合成した。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド（20マー）を設計してAAH mRNAの5'領域に結合し、そしてAUG開始コドンと重複させた（表5）。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、それらがAUG（メチオニン）コドンの「A」から1（位置-1）、6（位置-6）、または11（位置-11）ヌクレオチド上流（前）に開始する配列に相補的であるように選択した。さらに、位置-3で開始するセンスオリゴヌクレオチドを作成した。

10

【 0 1 3 1 】

（表5）例示的オリゴヌクレオチド分子の配列

位置 (-1)

5' CAT TCT TAC GCT GGG CCA TT 3' (配列番号 :10)

位置 (-6)

5' TTA CGC TGG GCC ATT GCA CG 3' (配列番号 :11)

20

位置 (-11)

5' CTG GGC CAT TGC ACG GTC CG 3' (配列番号 :12)

センス

5' ATC ATG CAA TGG CCC AGC GTA A 3' (配列番号 :13)

【 0 1 3 2 】

図10は、AAG遺伝子の領域（これに、表5に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドが結合する）を示す。全てのオリゴヌクレオチドを、MacVector6.5.3ソフトウェアを用いて設計した。

30

【 0 1 3 3 】

試験したAAHアンチセンスオリゴヌクレオチドは、AAH遺伝子発現を阻害することが見出された。インビトロ無細胞転写翻訳アッセイ（TNTQuick Coupled System）を用い、ヒトAAH cDNA（pHAAH）を用いてAAHタンパク質を合成した。反応混合物中に含まれたウサギ赤血球溶解物を用いてインビトロ翻訳を達成した。反応緩衝液、RNAポリメラーゼ、アミノ酸混合物、およびリボヌクレアーゼインヒビター（RNAsin）の存在下で [³⁵S] メチオニンを用いて、翻訳された産物を標識した。この産物をSDS-PAGEにより、続いてオートラジオグラフィーによって分析した。ルシフェラーゼ（Luc）発現プラスミドをポジティブコントロールとして用いた。第二レーンおよび第三レーンにおいて、約85kD AAHタンパク質の合成を示す（AAH、矢印）。ここで、mRNAを生成するため、テンプレートとして1または2 μgのプラスミド、およびT7DNA依存性RNAポリメラーゼプライマー/プロモーターを用いた。100×または1000×過剰のアンチセンスオリゴヌクレオチドプライマーの添加により、AAHタンパク質合成の漸増的に増大する程度の阻害を得たが、同じ量のセンスオリゴヌクレオチドの封入は、AAHタンパク質合成には影響を有さなかった。さらなる試験により、アンチセンスオリゴヌクレオチドのみによる、AAHタンパク質合成の完全な阻害が実証された。さらに、試験した3つのアンチセンスオリゴヌクレオチド全てを用いて、遺伝子発現の効果的な阻害が観察された。図11は、AAHアンチセンスオリゴヌクレオチドのインビトロ転写/翻訳分析の結果を示し、そして試験したアンチセンスオリゴヌクレオチドが

40

50

HAAH RNAの翻訳、およびHAAHタンパク質の引き続くタンパク質合成をブロックすることを示す。

【0134】

AAH遺伝子発現の阻害をまた細胞において試験した。図11は、Microtiter In situ Luminescence Quantification (MILQ) Assayの結果を示し、そしてアンチセンスオリゴヌクレオチド含有細胞の実際の効果を実証する。HAAH遺伝子発現の実際の減少を、細胞の培養培地にアンチセンスオリゴヌクレオチドを単に添加することにより検出した。MILQアッセイは、RNA抽出の必要性なしに、培養細胞におけるインサイチュハイブリダイゼーション結合を定量する。MILQアッセイを用いて、競合的アンチセンス結合阻害を研究し、mRNAにハイブリダイズしたアンチセンスプローブがSh-SySy神経芽細胞腫内で内因性に発現したことを例証した。この図では、特定の未標識アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、FITC-標識化した位置-6のアンチセンスオリゴヌクレオチドの阻害を示す。結合の最小阻害は、非関連オリゴヌクレオチドで観察された。未標識特異的オリゴヌクレオチドは、FITC結合体化した位置-6プローブにより指定された結合部位に効率的に競合し得たが、非関連プローブは、同じ分子濃度で有意に少ない阻害を示した。FITCに対する西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化抗体を用いて、結合したプローブ（FITC標識した）を検出し、そしてルミネセンス（発光）試薬を用いて結合抗体を検出した。発光単位を細胞密度について補正したが、現実には随意である。これらのデータは、細胞が周囲の環境からアンチセンスオリゴヌクレオチドを効率的に取り入れること、そしてこの取り入れられたオリゴヌクレオチドがHAAH遺伝子発現を効率的かつ特異的に阻害することを示す。

10

20

【0135】

HAAH遺伝子発現の阻害は、細胞をHAAHアンチセンスのホスホロチオエート誘導体と接触させることによって強化される。当技術分野で周知の方法を用いてホスホロチオエートアンチセンス誘導体を作成する。図13は、SH-SySy神経芽細胞腫細胞へのアンチセンス（位置-6）オリゴヌクレオチド遺伝子送達に起因するAAH遺伝子発現の阻害を示す。MILQアッセイを用いて、アンチセンスオリゴヌクレオチド遺伝子送達から生じる遺伝子発現を測定する。細胞をAAH位置-6アンチセンスDNAと接触させ、そして当技術分野で公知の方法（例えば、MICEアッセイ（de laMonteら、1999、Biotechniques））を用いて、AAHタンパク質発現を測定して、これがオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって阻害されるか否かを決定した。MICEアッセイを用いて、タンパク質を抽出する必要なしに培養細胞中で免疫反応性を測定するかまたはゲル電気泳動を実施する。このアッセイは、ウエスタンブロット分析よりも感受性である。MICEアッセイを用いて、非関連（ランダム）オリゴヌクレオチド配列、特異的アンチセンスオリゴヌクレオチド（位置-6）、およびホスホロチオエート位置6アンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした細胞においてAAH免疫反応性を評価した。このオリゴヌクレオチドのホスホロチオエート化学修飾は、細胞内部でのDNAの安定性をより大きくすることが見出された。なぜなら、イオウ基は、ホスホロチオエート結合および細胞核で通常生じる分解からDNAを保護するからである。アンチセンスAAHオリゴヌクレオチド（位置-6）トランスフェクションは、AAH免疫反応性のレベルの減少を生じた。そしてホスホロチオエート連結位置-6アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、AAH遺伝子発現を阻害する効果は、ランダムオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした細胞において観察されたレベルにかなり比例した。ホスホロチオエート連結アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたAAH発現のより効果的な阻害は、mRNAに対する有効な結合の保持とあわせた、分子のより大きい安定性に起因するようであった。

30

40

【0136】

（実施例7：ヒトIRS-1変異体）

HCC細胞株におけるHAAHのインスリン/IGF-1刺激発現。プレクストリン（plextrin）およびホスホトリオシン（PTB）ドメインにおいて変異したドミナントネガティブIRS-1cDNA、ならびに分子のC末端に位置するGrb2、SypおよびPI3K結合モチーフを構築した。ヒトIRS-1変異体構築物を生成して、HAAH遺伝子発現がIRS-1増殖因子シグナル伝達カスケードの活性化によりどのように上方調節されるかを評価した。hIRS-1分子のC末端における特定の

50

変異は、Grb2、SypおよびPI3KのようなSH2エフェクタータンパク質に結合する種々のドメインを廃した。ヒトIRS-1タンパク質は、ラットIRS-1タンパク質と同様に、それぞれ、897YVNI（以下、表5に下線を付している）および1180YIDL（以下、表5に下線を付している）の同じGrb2およびSyp結合モチーフを含む。hIRS-1の変異体は、これらのモチーフにおいて、以下のプライマーを請うオリゴヌクレオチド指向性変異誘発の使用によって、TTTコドン（フェニルアラニン）でのTATコドン（チロシン）の置換により構築した：（それぞれ、

5'-GGGGGAATTTGTCAATA-3'（配列番号：8）

および

10

5'-GAATTTGTTAATATTG-3'（配列番号：9）

である）。hIRS-1（野生型）および変異体（チロシン897～フェニルアラニンおよびチロシン1180～フェニルアラニン）のcDNAをpBK-CMV発現ベクター中にサブクローニングして、hIRS-1-wt、897F、Grb2）、1180F、およびSypと名付けた。

【0137】

（表6）ヒトIRS-1アミノ酸配列

MASPPESDGF	SDVRKVGYL	KPKSMHKRF	VLRAASEAGG	PARLEYEENE	KKWRHKSSAP	61
KRSIPLESCF	NINKRADSKN	KHLVALYTRD	EHFAIAADSE	AEQDSWYQAL	LQLHNRAKGH	121
HDGAAALGAG	GGGGSCSGSS	GLGEAGEDLS	YGDVPPGPAF	KEVWQVILKP	KGLGQTKNLI	181
GIYRLCLTSK	TISFVKLNSE	AAAVVLQLMN	IRRCGHSENF	FFIEVGRSAV	TGPGEFWMQV	241
DDSVVAQNMH	ETILEAMRAM	SDEFPRRSKS	QSSSNCSNPI	SVPLRRHHLN	NPPPSQVGLT	301
RRSRTESITA	TSPASMVGGK	PGSFRVRASS	DGEGTMSRPA	SVDGSPVSPS	TNRTHAHRHR	361
GSARLHPPLN	HSRSIPMPAS	RCSPSATSPV	SLSSSSTSGH	GSTSDCLFPR	RSSASVSGSP	421
SDGGFISSE	YGSSPCDFRS	SFRSVTPDSL	GHTPPARGE	ELSNYICMGG	KGPSTLTAPN	481
GHIYLSRGGN	GHRCTPGTGL	GTSPALAGDE	AASAADLDNR	FRKRTHSAGT	SPTITHQKTP	541
SQSSVASIEE	YTEMMPAYPP	GGGSGGRLPG	HRHSAFVPTR	SYPEEGLEMH	PLERRGGHHR	601
PDSSTLHTDD	GYMPMSPGVA	PVPSGRKGS	DYMPMSPKSV	SAPQQIINPI	RRHPQRVDPN	661
GYMMSPSGG	CSPDIGGGPS	SSSSSSNAV	SGTSYGKLWT	NGVGGHSHV	LPHPKPPVES	721
SGGKLLPCTG	DYMNMSPVGD	SNTSSPSDCY	YGPEDPQHKP	VLSYYSILPRS	FKHTQRPGE	781
EEGARHQHLR	LSTSSGRLLY	AATADSSSS	TSSDSLGGGY	CGARLEPSLP	HPHHQVLQPH	841
LPRKVDTAQ	TNSRLARPTR	LSLGDPKAST	LPRAREQQQQ	QQPLLHPPEP	KSPGEYVNIE	901
FGSDQSGYLS	GPVAFHSSPS	VRCPSQLQPA	PREEETGTEE	YMKMDLGPR	RAAWQESTGV	961
EMGRLGPAPP	GAASICRPTR	AVPSSRGDYM	TMQMSCPRQS	YVDTSPAAPV	SYADMRTGIA	1021
AEVSLPRAT	MAAASSSSAA	SASPTGPQGA	AELAHHSSLL	GGPQGPQGM	AFTRVNLSPN	1081
RNQSARKVIRA	DPQGCRRRHS	SETFSSTPSA	TRVGNTVPFG	AGAAVGGGGG	SSSSSEDEVKR	1141
HSSASFENVW	LRPGELGGAP	KEPAKLCGAA	GGLENLNYI	DLDLVKDFKQ	CPQECTPEPQ	1201
PPPPPPPHQP	LGSGESSSTR	RSEEDLSAYA	SISFQKQPED	RQ		

20

30

（配列番号：5；GENBANKアクセッション番号JS0670；プレケストリンドメインは、11～113残基にまたがる（包括的）；リン酸結合残基は配列番号：5の46、465、551、612、632、662、732、941、989、または1012を含む）。

【0138】

（表7）ヒトIRS-1 cDNA

```

cgggcggcgcg gtcggagggg gccggcgcgcc agagccagac gccgccgctt gttttggttg 61
gggctctcgg caactctccg aggaggagga ggaggaggga ggaggggaga agtaactgca 121
gcggcagcgc cctcccagg aacaggcgtc ttcccgaac cttcccaaa cttcccccac 181
ccccctctgc ccttgtcccc tcccctctc cccagccgcc tggagcgagg ggcagggatg 241
agtctgtccc tccggccggc ccccagctgc agtggctgcc cggtatcgtt tcgcatggaa 301
aagccacttt cccacccgc cgagatgggc ccggatgggg ctgcagagga cgcgcccgcg 361
ggcgggcgga gcagcagcag cagcagcagc agcaacagca acagccgcag cgcgcgggtc 421
tctgcgactg agctggtatt tggcgggctg gtggcggtg ggacggttg ggggtgggag 481
gaggcgaagg aggagggaga accccgtgca acgttgggac ttggcaacc gcctccccct 541
gcccaggat atttaatttg cctcgggaat cgctgcttcc agaggggaac tcaggaggga 601
aggcgcgcg gcgcgcgcgc tcctggaggg gcaccgcagg gacccccgac tgcgcctcc 661
ctgtgccgga ctccagccgg ggcgacgaga gatgcattt cgtccttcc tgggtggcggc 721
ggcggtgag aggagacttg gctctcgag gatcggggt gccctaccc cggacgcact 781
gcctccccgc cggcgtgaag cgcgcgaaaa ctccggtcgg gctctctcct gggctcagca 841
gctgcgtcct ccttcagctg cccctccccg gcgcgggggg cggcgtggat ttcagagtcg 901
gggtttctgc tgcctccagc cctgtttgca tgtgccgggc cgcggcgagg agcctccgcc 961
ccccaccgg ttgtttttcg gagcctccct ctgctcagcg ttggtggtgg cgggtggcagc 1021
atggcgagcc ctccggagag cgatggcttc tcggacgtgc gcaagggtgg ctacctgcg 1081
aaacccaaga gcatgcacaa acgcttcttc gtactgcgcg cggccagcga ggctgggggc 1141
ccggcgcgcc tcgagtacta cgagaacgag aagaagtggc ggcacaagtc gagcgcccc 1201
aaacgctcga tcccccttga gagctgcttc aacatcaaca agcgggctga ctccaagaac 1261
aagcacctgg tggctctcta caccggggac gagcactttg ccacgcgggc ggacagcgag 1321
gccgagcaag acagctggta ccaggctctc ctacagctgc acaaccgtgc taagggccac 1381

```

cacgacggag ctgcggccct cggggcgggg ggtggtgggg gcagctgcag cggcagctcc 1441
 ggccttggtg aggtcgggga ggacttgagc tacggtgacg tgccccagg acccgcatte 1501
 aaagaggtct ggcaagtgat cctgaagccc aagggcctgg gtcagacaaa gaacctgatt 1561
 ggtatctacc gcctttgcct gaccagcaag accatcagct tcgtgaagct gaactcggag 1621
 gcagcggccg tgggtgctgca gctgatgaac atcaggcgct gtggccactc ggaaaacttc 1681
 ttcttcacg aggtgggccc ttctgcccgt acggggcccc gggagtctct gatgcagggt 1741
 gatgactctg tgggtggccc gaacatgcac gagaccatcc tggaggccat gcgggcccag 1801
 agtgatgagt tccgcctcgc cagcaagagc cagtcctcgt ccaactgctc taaccccatc 1861
 agcgtcccc tgccgcggca ccatctcaac aatccccgcg ccagccaggt ggggctgacc 1921
 cgcgcatcac gcactgagag catcaccgcc acctccccgg ccagcatggt gggcggggaa 1981
 ccaggctcct tccgtgtccg cgcctccagt gacggcgaag gcacatgtc ccgcccagcc 2041
 tcggtggacg gcagccctgt gagtccagc accaacagaa cccacgccc cggcatcgg 2101
 ggagcgcgcc gggtgcaccc cccgctcaac cacagccgct ccaccccat gccggcttc 2161
 cgctgctcgc cctcggccac cagccgggc agtctgtcgt ccagtagcac cagtggccat 2221
 ggctccacct cggattgtct cttcccacgg cgatctagt cttcgggtgc tggttcccc 2281
 agcgatggcg gtttcatctc ctgggatgag tatggctcca gtccctgcga tttccggagt 2341
 tccttccgca gtgtcactcc ggattccctg ggccacaccc caccagccc cggtagggag 2401
 gagctaagca actatatctg catgggtggc aaggggcct ccacctgac cggccccaac 2461
 ggtcactaca ttttgtctcg ggggtggcaat ggccaccgct gcaccccagg aacaggcttg 2521
 ggacagagtc cagccttggc tggggatgaa gcagccagt ctgcagatct ggataatcgg 2581
 ttccgaaaga gaactcactc ggcaaggaca tcccctacca ttaccacca gaagaccgcg 2641
 tcccagtcct cagtggcttc cattgaggag tacacagaga tgatgcctgc ctaccacca 2701
 ggaggtggca gtggaggccg actgccggga cacaggcact ccgcttcgt gccacccgcg 2761
 tcctaccagc agggaggtct ggaaatgcac cccttggagc gtcggggggg gcaccaccgc 2821
 ccagacagct ccacctcca caggatgat ggctacatgc ccagtcccc aggggtggcc 2881
 ccagtgcaca gtggccgaaa gggcagtggg gactatatgc ccagtggccc caagagcgt 2941
 tctgccccac agcagatcac caatccatc agacgccatc ccagagagt ggaccccaat 3001
 ggtacatga tgatgtcccc cagcgggtggc tgcctcctg acattggagg tggccccagc 3061
 agcagcagca gcagcagca cgcgctccct tccgggacca gctatggaaa gctgtggaca 3121
 aacgggtag ggggccacca ctctcatgtc ttgcctcacc ccaaaccccc agtggagagc 3181
 agcggtagga agctcttacc ttgcacaggt gactacatga acatgtcacc agtgggggac 3241
 tccaacacca gcagccctc cgactgctac tacggccctg aggacccca gcacaagcca 3301
 gtctctcct actactcatt gccaaagatcc tttaagcaca cccagcggcc cggggagccc 3361
 gaggaggggt cccggcatca gcacctccgc cttccacta gctctggctg ccttctctat 3421
 gctgcaacag cagatgattc ttctctctcc accagcagc acagcctggg tgggggatac 3481
 tgccgggcta gggtggagcc cagccttcca catccccacc atcaggttct gcagcccat 3541
 ctgcctcgaa aggtggacac agctgctcag accaatagcc gcctggccc gcccacgagg 3601
 ctgtccctgg gggatcccaa ggccagcacc ttacctcggg cccgagagca gcagcagcag 3661
 cagcagccct tgctgcaccc tccagagccc aagagcccg gggaaatagt caatattgaa 3721
 tttgggagtg atcagtctgg ctacttgtct ggcccggtgg cttccacag ctcaccttct 3781
 gtcaggtgtc catcccagct ccagccagct cccagagagg aagagactgg cactgaggag 3841
 tacatgaaga tggacctggg gccgggcccg agggcagcct ggcaggagag cactggggtc 3901
 gagatgggca gactgggccc tgcacctccc ggggctgcta gcatttgca gcctaccgcg 3961
 gcagtgcaca gcagccgggg tgactacatg accatgcaga tgagttgtcc ccgtcagagc 4021
 tacgtggaca cctcgccagc tgccctgtga agctatgtc acatgcgaac aggcattgct 4081
 gcagaggagg tgagcctgcc cagggccacc atggctgtc cctcctcatc ctacgagcc 4141
 tctgcttccc cgactgggcc tcaaggggca gcagagctgg ctgcccactc gtccctgctg 4201
 gggggccccc aaggacctgg gggcatgagc gccttcaccc ggggtgaacct cagtccctaac 4261
 cgcaaccaga gtgccaaaagt gatccgtgca gaccacaaag ggtgccggcg gaggcatagc 4321
 tccgagactt tctcctcaac acccagtgcc acccggtgg gcaacacagt gccctttgga 4381
 gcgggggagc cagtaggggg cggtggcggt agcagcagca gcagcgagga tgtgaaacgc 4441
 cacagctctg cttcctttga gaatgtgtgg ctgaggcctg gggagcttg gggagcccc 4501
 aaggagccag ccaaactgtg tggggctgct ggggggttg agaattgtct taactacata 4561
 gacctggatt tggtaagga cttcaaacag tgccctcagg agtgcacccc tgaaccgcag 4621

10

20

30

```

cctccccac ccccccccc tcatcaaccc ctgggcagcg gtgagagcag ctccaccgc 4681
cgctcaagtg aggatattaag cgctatgcc agcatcagtt tccagaagca gccagaggac 4741
cgtcagtagc tcaactggac atcacagcag aatgaagacc taaatgacct cagcaaatcc 4801
tcttctaact catgggtacc cagactctaa atatttcatg attcacaact aggacctcat 4861
atcttccctc tcagtagatg gtacgatgca tccatttcag tttgtttact ttatccaatc 4921
ctcaggattt cattgactga actgcacgtt ctatattgtg ccaagcgaaa aaaaaaaatg 4981
cactgtgaca ccagaataat gactctgcat aaacttcata ttcaacctta aggacttagc 5041
tgccacacgt gagctgatgt gccaccacc gtgtcatgag agaattgggtt tactctcaat 5101
gcattttcaa gatacatttc atctgctgct gaaactgtgt acgacaaagc atcattgtta 5161
attatttcat acaaaactgt tcacgttggg tggagagagt attaaatatt taacataggt 5221
tttgatttat atgtgtaatt ttttaaatga aaatgtaact tttcttacag cacatctttt 5281
ttttggatgt gggatggagg tatacaatgt tctgttgtaa agagtggagc aaatgcttaa 5341
aacaaggctt aaaagagtag aatagggtat gctccttggt ttaagattgt aattcagaaa 5401
acataatata agaatacatg tgccatagat ggttctcaat tgtatagtta tatttgctga 5461
tactatctct tgtcatataa acctgatgtt gagctgagtt ccttataaga attaatctta 5521
attttgtatt ttttctgta agacaatagg ccatgttaat taaactgaag aaggatatat 5581
ttggctgggt gttttcaaat gtcagcttaa aattggtaat tgaatggaag caaaattata 5641
agaagaggaa attaaagtct tccattgcat gtattgtaaa cagaaggaga tgggtgattc 5701
cttcaattca aaagctctct ttggaatgaa caatgtgggc gtttgtaaat tctggaaatg 5761
tctttctatt cataataaac tagatactgt tgatctttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5821
aaaaaaaa

```

10

(配列番号：6；GENBANKアクセッション番号NM005544)。

【0139】

制限酵素NheIおよびEcoRIを用いて1180Fの同じ領域による897Fをコードする3'配列の置換によってチロシン897および1180の二重変異体を構築し、そしてこの構築物を897F1180Fまたは Grb2 Sypと呼んだ。発現プラスミドは、CMVプロモーター (hIRS-1-wt、 Grb2、 Syp、 Grb2、 SypおよびpBK-CMV (偽)) のコントロール下であり、そしてMluI制限酵素によりポリAシグナル配列の3'末端で直線化され、次に精製された。類似のアプローチを用いて、613位置と942位置でチロシン残基をフェニルアラニンに変化し、二重PI3K変異体構築物 (PI3K) を作製した。hIRS-1変異体は、PCRによってC末端に付加されたFLAG エピトープ (DYKDDDDK (配列番号：6) + 終止コドン) を有する。この戦略により、安定にトランスフェクトした細胞株において、「野生型」hIRS-1から変異体タンパク質を識別することが可能になる。この変異体を用いてIRSシグナル伝達経路と下流エフェクター遺伝子としてのHAAHの活性化との間の連絡を規定し、そしてHAAH過剰発現により特徴付けられる腫瘍の増殖を阻害するこの経路に沿う伝達を阻害する化合物を同定する。リン酸化反応部位に結合するかまたはその部位でリン酸化反応を阻害する抗体または他の化合物を用いて、シグナル伝達を阻害し、これによりHAA過剰発現腫瘍の増殖を阻害する。

20

30

【0140】

他の実施形態は添付の特許請求の範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

【0141】

【図1】種々のアスパルチル (アスパラギニル) -ヒドロキシラーゼ (AAH) cDNAによるNIH-3T3細胞の一過性トランスフェクションにより誘導されたコロニー形成を示す棒グラフである。コロニー形成を、10 μg DNAによる一過性トランスフェクションによって誘導した。対して、酵素活性を有さない変異体マウスAAH構築物は、形質転換活性を有さない。データは、形質転換病巣平均数 ± SEMとして示す。

40

【図2】種々のマウスAAH安定トランスフェクト細胞クローンにより産生されたタンパク質のウェスタンブロットアッセイのデンシトメトリー分析の結果を示す棒グラフである。クローン7および18において、HAAH遺伝子発現の穏やかな増加があり、クローン16においては、より低い程度であったが過剰発現があった。

【図3】図3A~Bは、HAAH酵素活性に比較したHAAH安定トランスフェクトクローンにより示されたソフトアガーにおけるコロニー形成を示す棒グラフである。図3Aは、クローン7、16、および18におけるマウスAAH酵素活性の測定を示し、そして図3Bは、クローン7、16、および18により示されたコロニー形成を示す。データは、播種10日後のコロニー平均数 ± SEMとして示す。HAAH酵素活性において穏やかな増大があった (これは、タンパク質発

50

現と相関した) 3つのクローンは全て、足場非依存性増殖を示した。

【図4】マウスAAHを過剰発現するトランスフェクトクローンを注射したヌードマウスにおける腫瘍形成を示す棒グラフである。腫瘍増殖は、30日後に評価した。クローン7、16、および18を注射したマウスにおいて観察された平均腫瘍重量を偽DNAトランスフェクトクローンに対して比較した。HAAHを過剰発現するクローンを注射した全ての動物は、腫瘍を発達させた。

【図5】図5A~Dは、腫瘍細胞侵襲の間に生じるようなニューライト成長(neurite outgrowth)を誘導するためにレチノイン酸(図5A、5B)およびホルボールエステルミリステート(PMA; 図5C)で処置したPNET2(図5A、5C)およびSH-Sy5y(図5B)細胞におけるAAH発現の増大を示す棒グラフである。細胞を、0、1、2、3、4、または7日間、10Mレチノイン酸または100nM PMAで処理した。細胞溶解物を、HAAH特異的モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロット分析によって分析し、85kDa AAHタンパク質を検出した。免疫反応性のレベルは、体積デンストメトリー(任意単位)によって測定した。このグラフは、3つの別個の実験から得られた結果の平均±S.D.を示す。図5Dにおいては、PNET2細胞を、ニューライト収縮を誘導するために致死濃度のH₂O₂で24時間処理した。細胞の90%より多くの生存度が、トリパンブルー染料排除によって示された。同様の結果が、SH-Sy5y細胞について観察された。

【図6】抗アポトーシス分子(Bcl-2)、細胞周期有糸分裂インヒビター分子(p16およびp21/Waf1)、および増殖分子(増殖細胞核抗原; PCNA)のレベルに関するAAH過剰発現の効果を示す棒グラフである。PNET2ニューロン細胞をAAHをコードする全長ヒトcDNA(pHAAH)または空ベクター(pcDNA)で安定にトランスフェクトした。AAH遺伝子発現は、CMVプロモーターの制御下にあった。ウェスタンブロット分析を、70~80パーセントのコンフルエントである培養物から調製した細胞溶解物を用いて実施した。タンパク質ローディングは、各レーンにおいて等価であった。反復ブロットを、異なる抗体を用いてプローブした。棒グラフは、3つの実験において測定したタンパク質発現レベルの平均S.D.を示す。全ての差異は、スチューデントT検定分析によって統計学的に有意である(P<0.01~P<0.001)。

【図7】IRS-1シグナル伝達経路の成分を示す図である。

【図8】GFPを発現するコントロールに比較したアンチセンスHAAH発現細胞において生じた増殖曲線を示す線グラフである。

【図9】hIRS-1タンパク質の機能的ドメインおよび点変異体の構造的構成を示す図である。全ての変異体および「野生型」hIRS-1タンパク質構築物は、C末端にFLAG(F)エピトープ(DYKDDDDK; 配列番号: 7)を含む。PHおよびPTBは、それぞれ、プレックストリン(pleckstrin)相同性領域およびホスホチロシン結合領域を示す。

【図10】AAH cDNA、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが結合する位置を示す図である。示した位置は、AAH cDNAのAUG開始部位に対してである。

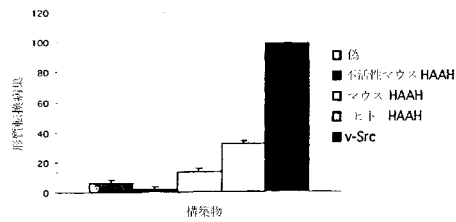
【図11】アンチセンスオリゴヌクレオチドDNA分子によるAAH遺伝子発現の阻害を示す電気泳動ゲルの写真である。

【図12】神経芽細胞腫細胞におけるAAHアンチセンスオリゴヌクレオチド結合を示す線グラフである。

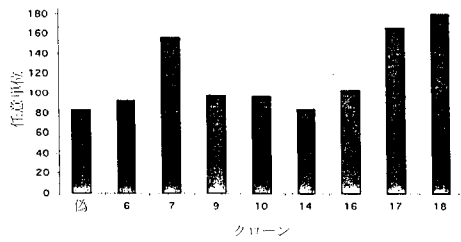
【図13】神経芽細胞腫細胞へのAAHアンチセンスオリゴヌクレオチド送達の結果としてのAAH遺伝子発現の阻害を示す棒グラフである。

【図14】図14Aは、NOTCHタンパク質のウェスタンブロットアッセイ発現の写真である。図14Bは、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により測定されるようなHes-1遺伝子発現を示す電気泳動ゲルの写真である。図14Cは、IRS-1シグナル伝達が減少する条件下でのNOTCH-1およびJagged-1の発現を示すウェスタンブロットアッセイの写真である。

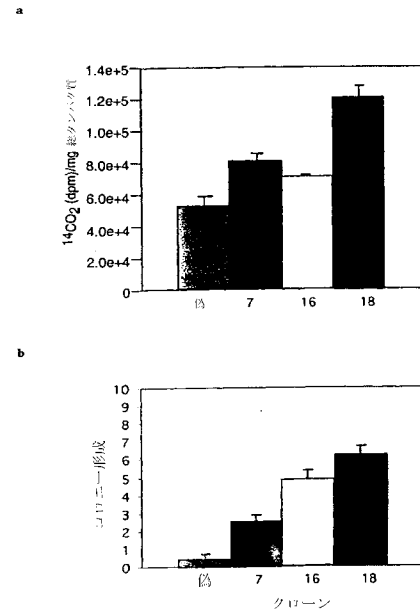
【図 1】



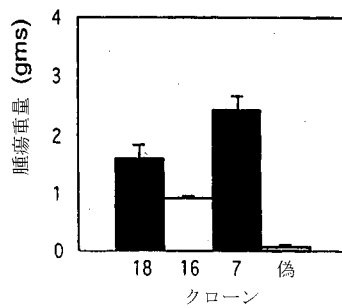
【図 2】



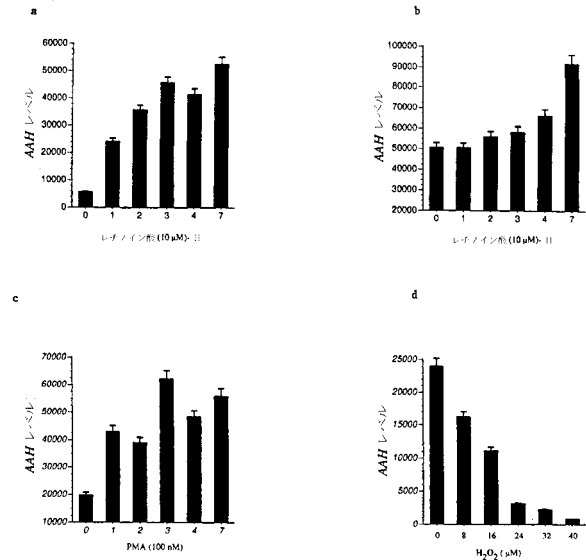
【図 3】



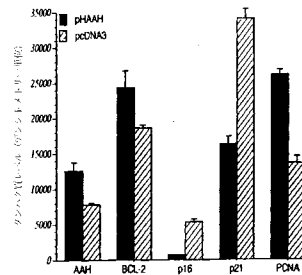
【図 4】



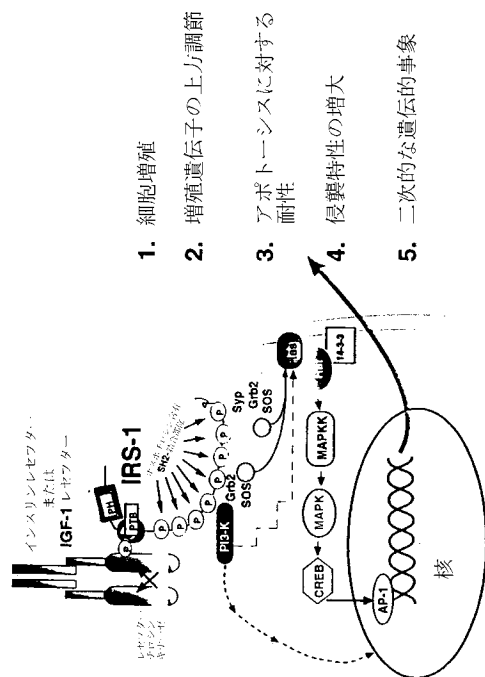
【図 5】



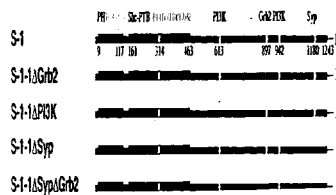
【図 6】



【 図 7 】



【 図 8 】



【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
21 November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/092782 A2

(51) International Patent Classification: C12N

(21) International Application Number: PCT/US02/15814

(22) International Filing Date: 17 May 2002 (17.05.2002)

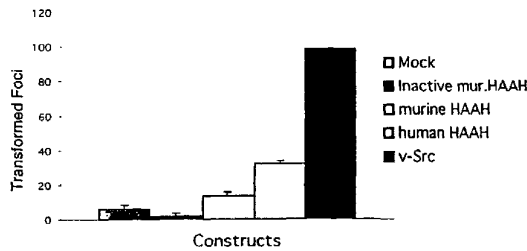
(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/859,604 17 May 2001 (17.05.2001) US

(71) Applicant: RHODE ISLAND HOSPITAL, A LIFE-
PAN PARTNER [US/US]; 593 Eddy Street, Providence,
RI 02903 (US).(81) Designated States (*national*): AI, 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, GI,
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, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, 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, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.(72) Inventors: WANDS, Jack, R.; 210 Varick Road, Waban,
MA 02168 (US); DE LA MONTE, Suzanne; 1040 High
Hawk Road, East Greenwich, RI 02818 (US); DEUTCH,
Alan, H.; 6301 Bright Plum, Columbia, MD 21044 (US);
GHANBARI, Hossein, A.; 9460 Tobon Circle, Potomac,
MD 20854 (US).(74) Agent: BEATTIE, Ingrid, A.; Mintz, Levin, Cohn,
Ferri, Glowsky and Popeo, P.C., One Financial Center,
Boston, MA 02111 (US).

(54) Title: DIAGNOSIS AND TREATMENT OF MALIGNANT NEOPLASMS



(57) Abstract: The invention features a method for diagnosing and inhibiting growth of a malignant neoplasm in a mammal by contacting a cell or a bodily fluid of the mammal with an antibody which binds to an human aspartyl (asparaginyl) beta-hydroxylase (HAAH) polypeptide. Methods of immunization to generate an HAAH-specific immune response are also within the invention.

WO 02/092782 A2

WO 02/092782

PCT/US02/15814

DIAGNOSIS AND TREATMENT OF MALIGNANT NEOPLASMS5 Statement as to Federally Sponsored Research

This invention was made with U.S. Government support under National Institutes of Health grants CA-35711, AA-02666, AA-02169, and AA11431. The government has certain rights in the invention.

Background of the Invention

10 Primary malignant central nervous system (CNS) neoplasms, particularly glioblastomas, are highly fatal due to their aggressive and widespread infiltration of the brain and resistance to anti-cancer treatments. Although progress has been made in unraveling the pathological mechanisms underlying CNS cancers as well as other cancer types, tumor specific therapeutic approaches and methods of diagnosis have been largely elusive.

15 Summary of the Invention

The invention features a method for diagnosing or inhibiting the growth of a malignant neoplasm in a mammal by contacting a tissue or bodily fluid from the mammal with an antibody which binds to an human aspartyl (asparaginy) beta-hydroxylase (HAAH) polypeptide under conditions sufficient to form an antigen-antibody complex and detecting the antigen-antibody
20 complex. Malignant neoplasms detected in this manner include those derived from endodermal tissue, e.g., colon cancer, breast cancer, pancreatic cancer, liver cancer, and cancer of the bile ducts. Neoplasms of the central nervous system (CNS) such as primary malignant CNS neoplasms of both neuronal and glial cell origin and metastatic CNS neoplasms are also detected. Brain cancers include metastatic brain tumors, as well as primary brain tumors such as glioma,
25 astrocytomas, and hemangiomas. Patient derived tissue samples, e.g., biopsies of solid tumors, as well as bodily fluids such as a CNS-derived bodily fluid, blood, serum, urine, saliva, sputum, lung effusion, and ascites fluid, are contacted with an HAAH-specific antibody.

The invention includes a method of eliciting an immune response or conferring an immune response to a tumor cell, e.g., a brain tumor, in a mammal by administering to a mammal an
30 antibody which binds to HAAH or a polynucleotide encoding such an antibody. Preferably, the antibody binds to a site in an extracellular domain (e.g., a site within residues 1-700) of HAAH.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

The antibody binds to an ectodomain of HAAH (residues 19-75 of SEQ ID NO:2). More preferably, the antibody binds to a catalytic domain of HAAH, e.g., amino acids 650-700 of SEQ ID NO:2. For example, FB50 binds to a polypeptide with the amino acid sequence NPVEDS (residues 286-291 of SEQ ID NO:2). Monoclonal antibody HBOH1 binds to a polypeptide with the amino acid sequence QPWWTPK (residues 573-579 of SEQ ID NO:2), and monoclonal antibody HBOH-2 binds to a polypeptide containing the amino acid sequence LPEDENLR (residues 613-620 of SEQ ID NO:2). The foregoing antigenic epitopes of HAAH are located on the cell surface of malignant cells. Other HAAH-specific antibodies suitable for passive immunization include 5C7, 5E9, 19B, 48A, 74A, 78A, 86A, HA238A, HA221, HA 239, HA241, HA329, and HA355.

The antibody to be administered is a heterodimeric antibody, a single chain antibody, or a high affinity single chain antibody. By high affinity is meant that the antigen-specific binding affinity of the antibody has a K_d in the nanomolar range. Preferably, the binding affinity is in the range of 100 pM or higher affinity. For example, the antibody, antibody fragment, or single chain antibody has an antigen-specific binding affinity in the range of 10^{-10} to 10^{-15} molar.

The antibody, or fragment thereof, activates complement in a patient treated with the antibody. Preferably, the antibody mediates antibody-dependent cytotoxicity of tumor cells in the patient treated with the antibody. The antibody, or fragment thereof, is administered alone or conjugated to a cytotoxic agent. In the latter case, binding of the antibody to a tumor cell results in impairment or death of the cell, thereby reducing tumor load. The antibody is conjugated to a radiochemical, or a chemical tag which sensitizes the cell to which it is bound to radiation or laser-mediated killing.

Also within the invention, are methods of inducing an HAAH-specific immune response to reduce tumor growth by active immunization. The method involves administering to a mammal an HAAH polypeptide, e.g., a polypeptide containing the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. Immunogenic HAAH fragments are also administered to generate an immune response to a particular portion of HAAH. For example, to generate an antibody response to HAAH on the surface of cells, a polypeptide containing an extracellular domain of HAAH (but lacking an intracellular domain of HAAH) is administered. To generate antibodies, which inhibit HAAH activity, the individual is immunized with a polypeptide containing a catalytic domain of HAAH

WO 02/092782

PCT/US02/15814

(e.g., amino acids 650-700 of SEQ ID NO:2). Optionally, the polypeptide compositions contain a clinically-acceptable adjuvant compound. Such adjuvants are generally known in the art, and include oil-emulsions, Freund's Complete and Incomplete adjuvant, Vitamin E, aluminum salts or gels, such as aluminum hydroxide, -oxide or -phosphate, saponins, polymers based on polyacrylic acid, such as carbopols, non-ionic block polymers, fatty acid amines, such as avridin and DDA, polymers based on dextran, such as dextran sulphate and DEAE dextran, muramyl dipeptides, ISCOMs (immune stimulating complexes, e.g., as described in European Patent EP 109942), biodegradable microcapsules, liposomes, bacterial immune stimulators, such as MDP and LPS, and glucans. Other adjuvant compounds are known in the art, e.g., described in Altman and Dixon, 1989, *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* 33: 301-343). Alum is preferred for human use.

An HAAH-specific immune response is also induced by administering to a mammal a polynucleotide composition encoding an HAAH polypeptide, or a degenerate variant of the HAAH-encoding polynucleotide. For example, the polynucleotide contains the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3, or a degenerate variant thereof, or a fragment thereof encoding a specific immunogenic domain of HAAH. Preferably, the HAAH polypeptide encoded by the polynucleotide (or directly administered polypeptide) is enzymatically nonfunctional. More preferably, the HAAH polynucleotide encodes an HAAH polypeptide that is secreted, e.g., the construct contains a signal sequence for transport out of the cell and into an extracellular space. The HAAH polypeptide lacks an essential histidine. The HAAH polypeptide is a truncated HAAH, which contains the first 650 amino acids of SEQ ID NO:2.

Optionally, the polynucleotide composition contains a transfection-enhancing agent, such as a precipitating agent or a lipid. Preferably, the encoded HAAH polypeptide contains the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 (full-length HAAH) or a fragment thereof, which contains an extracellular domain of HAAH and lacks an intracellular domain of HAAH. Preferably, the polynucleotide contains a catalytic domain of HAAH. The HAAH-encoding sequences are operably-linked to a promoter and other regulatory sequences for expression of the polypeptides in target cells. The polypeptide may be directed intracellularly or marked for extracellular expression, or secretion. The polynucleotide directs expression in a target cell, which expresses appropriate accessory molecules for antigen presentation, e.g., major histocompatibility antigens.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Methods for diagnosis include detecting a tumor cell in bodily fluids as well as detecting a tumor cell in tissue (*in vivo* or *ex vivo*). For example, a biopsied tissue is contacted with an HAAH-specific antibody and antibody binding measured. Whole body diagnostic imaging may be carried out to detect microtumors undetectable using conventional diagnostic methods.

- 5 Accordingly, a method for diagnosing a neoplasm in a mammal is carried out by contacting a tissue, e.g., a lymph node, of a mammal with a detectably-labeled antibody which binds to HAAH. An increase in the level of antibody binding at a tissue site compared to the level of binding to a normal nonneoplastic tissue indicates the presence of a neoplasm at the tissue site. For detection purposes, the antibody (or HAAH-binding fragment thereof) is labeled with a non-
 10 radioactive tag, a radioactive compound, or a colorimetric agent. For example, the antibody or antibody fragment is tagged with ^{125}I , ^{99}Tc , Gd^{+++} , or Fe^{++} . Green fluorescent protein is used as a colorimetric tag.

- The invention also includes a soluble fragment of HAAH. The soluble HAAH polypeptide contains an extracellular domain and optionally lacks part or all of the cytoplasmic
 15 domain or transmembrane domain of HAAH. In one example, the fragment lacks residues 660-758 of SEQ ID NO:2. In another example, the fragment lacks residues 679-697 (His motif) of SEQ ID NO:2. In yet another example, the fragment, lacks at least one residue of SEQ ID NO:2, the residue being selected from the group consisting of residue 661, 662, 663, 670, 671, 672, and 673. An HAAH fragment is an HAAH polypeptide, the length of which is less than that of a full-
 20 length HAAH protein. The full-length HAAH protein is shown in Table 1.

- Diagnostic kits are also encompassed by the invention. For example, a kit for detecting a tumor cell contains an antibody, or fragment thereof, which binds to HAAH. The kit optionally contains a means for detecting binding of the antibody to the tumor cell. For example, the kit contains a detectable marker, e.g., a nonradioactive marker such as Gd^{+++} or Fe^{++} or a radioactive
 25 compound. The kit may also contain instructions for use, a standard reagent for determining positive antibody binding, or a negative control for determining lack of antibody binding. The components are packaged together in a kit.

- The assay format described herein is useful to generate temporal data used for prognosis of malignant disease. A method for prognosis of a malignant neoplasm of a mammal is
 30 carried out by (a) contacting a bodily fluid from the mammal with an antibody which binds to an

WO 02/092782

PCT/US02/15814

HAAH polypeptide under conditions sufficient to form an antigen-antibody complex and detecting the antigen-antibody complex; (b) quantitating the amount of complex to determine the level of HAAH in the fluid; and (c) comparing the level of HAAH in the fluid with a normal control level of HAAH. An increasing level of HAAH over time indicates a progressive
 5 worsening of the disease, and therefore, an adverse prognosis.

The invention also includes an antibody which binds to HAAH. The antibody preferably binds to a site in the carboxyterminal catalytic domain of HAAH. Alternatively, the antibody binds to an epitope that is exposed on the surface of the cell. The antibody is a polyclonal antiserum or monoclonal antibody. The invention encompasses not only an intact
 10 monoclonal antibody, but also an immunologically-active antibody fragment, e.g., a Fab or (Fab)₂ fragment; an engineered single chain Fv molecule; or a chimeric molecule, e.g., an antibody which contains the binding specificity of one antibody, e.g., of murine origin, and the remaining portions of another antibody, e.g., of human origin. Preferably the antibody is a monoclonal antibody such as FB50, 5C7, 5E9, 19B, 48A, 74A, 78A, 86A, HA238A, HA221, HA
 15 239, HA241, HA329, or HA355. Antibodies which bind to the same epitopes as those monoclonal antibodies are also within the invention.

An HAAH-specific intrabody is a recombinant single chain HAAH-specific antibody that is expressed inside a target cell, e.g., tumor cell. Such an intrabody binds to endogenous intracellular HAAH and inhibits HAAH enzymatic activity or prevents HAAH from binding to an
 20 intracellular ligand. HAAH-specific intrabodies inhibit intracellular signal transduction, and as a result, inhibit growth of tumors which overexpress HAAH.

A kit for diagnosis of a tumor in a mammal contains an HAAH-specific antibody. The diagnostic assay kit is preferentially formulated in a standard two-antibody binding format in which one HAAH-specific antibody captures HAAH in a patient sample and another HAAH-
 25 specific antibody is used to detect captured HAAH. For example, the capture antibody is immobilized on a solid phase, e.g., an assay plate, an assay well, a nitrocellulose membrane, a bead, a dipstick, or a component of an elution column. The second antibody, i.e., the detection antibody, is typically tagged with a detectable label such as a colorimetric agent or radioisotope.

Also within the invention is a method of inhibiting tumor growth in a mammal, which
 30 is carried out by administering to the mammal a compound which inhibits expression or

WO 02/092782

PCT/US02/15814

enzymatic activity of HAAH. Preferably, the compound is substantially pure nucleic acid molecule such as an HAAH antisense DNA, the sequence of which is complementary to a coding sequence of HAAH. Expression of HAAH is inhibited by contacting mammalian cells, e.g., tumor cells, with HAAH antisense DNA or RNA, e.g., a synthetic HAAH antisense

5 oligonucleotide. The sequence of the antisense is complementary to a coding or noncoding region of a HAAH gene. For example, the sequence is complementary to a nucleotide sequence in the 5' untranslated region of a HAAH gene. Examples of HAAH antisense oligonucleotides which inhibit HAAH expression in mammalian cells include oligonucleotides containing SEQ ID

10 NO:10, 11, or 12. An HAAH antisense nucleic acid is introduced into glioblastoma cells or other tumor cells which overexpress HAAH. Binding of the antisense nucleic acid to an HAAH transcript in the target cell results in a reduction in HAAH production by the cell. By the term "antisense nucleic acid" is meant a nucleic acid (RNA or DNA) which is complementary to a portion of an mRNA, and which hybridizes to and prevents translation of the mRNA. Preferably, the antisense DNA is complementary to the 5' regulatory sequence or the 5' portion of the coding

15 sequence of HAAH mRNA (e.g., a sequence encoding a signal peptide or a sequence within exon 1 of the HAAH gene). Standard techniques of introducing antisense DNA into the cell may be used, including those in which antisense DNA is a template from which an antisense RNA is transcribed. The method is to treat tumors in which expression of HAAH is upregulated, e.g., as a result of malignant transformation of the cells. The length of the oligonucleotide is at least 10

20 nucleotides and may be as long as the naturally-occurring HAAH transcript. Preferably, the length is between 10 and 50 nucleotides, inclusive. More preferably, the length is between 10 and 20 nucleotides, inclusive.

By "substantially pure DNA or RNA" is meant that the nucleic acid is free of the genes which, in the naturally-occurring genome of the organism from which the DNA of the invention is

25 derived, flank a HAAH gene. The term therefore includes, for example, a recombinant nucleic acid which is incorporated into a vector, into an autonomously replicating plasmid or virus, or into the genomic DNA of a procaryote or eucaryote at a site other than its natural site; or which exists as a separate molecule (e.g., a cDNA or a genomic or cDNA fragment produced by PCR or restriction endonuclease digestion) independent of other sequences. It also includes a

30 recombinant nucleic acid which is part of a hybrid gene encoding additional polypeptide sequence

WO 02/092782

PCT/US02/15814

such as a nucleic acid encoding a chimeric polypeptide, e.g., one encoding an antibody fragment linked to a cytotoxic polypeptide. Alternatively, HAAH expression is inhibited by administering a ribozyme or a compound which inhibits binding of Fos or Jun to an HAAH promoter sequence.

- Compounds, which inhibit an enzymatic activity of HAAH, are useful to inhibit tumor growth in a mammal. By enzymatic activity of HAAH is meant hydroxylation of an epidermal growth factor (EGF)-like domain of a polypeptide. For example an EGF-like domain has the consensus sequence CX₇CX₄CX₁₀CXCX₈C (SEQ ID NO:1). HAAH hydroxylase activity is inhibited intracellularly. For example, a dominant negative mutant of HAAH (or a nucleic acid encoding such a mutant) is administered. The dominant negative HAAH mutant contains a mutation which changes a ferrous iron binding site from histidine of a naturally-occurring HAAH sequence to a non-iron-binding amino acid, thereby abolishing the hydroxylase activity of HAAH. The histidine to be mutated, e.g., deleted or substituted, is located in the carboxyterminal catalytic domain of HAAH. For example, the mutation is located between amino acids 650-700 (such as the His motif, underlined sequence of SEQ ID NO:2) the native HAAH sequence. For example, the mutation is at residues 671, 675, 679, or 690 of SEQ ID NO:2. An HAAH-specific intrabody is also useful to bind to HAAH and inhibit intracellular HAAH enzymatic activity, e.g., by binding to an epitope in the catalytic domain of HAAH. Other compounds such as L-mimosine or hydroxypyridone are administered directly into a tumor site or systemically to inhibit HAAH hydroxylase activity.

20 **Table 1: Amino acid sequence of HAAH**

25	MAQRNNAKSS	GNSSSSSGSS	GSTSAGSSSP	GARRETKHGG	HNKGRKGGLS	GTSTFTWFMV	61
	IALLGVWTVS	AVVWFDLV	EEVLGKGIY	DADGDDFDV	DDAKVLLGLK	ERSTSEPAVP	121
	PEEAPHTPEP	EEQVPVEAEP	QNIIDEAKBQ	IQSLHEMVH	AEHVEGEDLQ	QEDGPTGEPQ	181
	QEDDEFLMAT	DVDDRFEETLE	FEVSHEETEH	SYHVEETVSQ	DCNQDMEEMM	SEQENPDSSSE	241
25	PVVEDERLHH	DTDDVTYQVY	EEQAVYEPL	NEGIEITEVT	APPEDNPVED	SQVIVEVSI	301
	FPVEEQQVEP	PETNRKTDDP	EQKAKVKKKK	PKLLNKFDKT	IKAEIDAAEK	LRKRGKIEEA	361
	VNAFKELVRK	YPQSPRARYG	KAQCEDDLAE	KRRSNEVLRG	AIETYQEVAS	LPDVPAADLLK	421
	LSLKRRLSDRQ	QFLGHMRGSL	LTLQRLVQLF	PNDTSLKNDL	GVUYLLIGDN	DNAKKVYEEV	481
	LSVTNPDGFA	KVHYGFILKA	QNKIAESIPY	LKEGTIESGDP	GTDDGRFYFH	LGDAMQVRGN	541
30	KEAYKWYELG	HKRGHFASVM	QRSLYNVNGL	KAQFWWTPE	TSYTELVKSL	ERNWKLIRDE	601
	GLAVMDKAG	LFLPEDENLR	EKGDSQFTL	WQQRRENENA	CKGAPKCTTL	LEKFPETTGC	661
	RRGQIKYSIM	HPGTHVWPH	GPTNCRRLRMH	LGLVIEKEGC	KIRCANBTRT	WEGKVLIFD	721
	DSFEHEVWD	ASSFRLIFIV	DVWHPELTPQ	QRRSLPAI	(SEQ ID NO:2; GENBANK Accession No. S83325; His motif is underlined; conserved sequences within the catalytic domain are designated by bold type)		

- 35 For example, a compound which inhibits HAAH hydroxylation is a polypeptide that binds a HAAH ligand but does not transduce an intracellular signal or a polypeptide which

WO 02/092782

PCT/US02/15814

contains a mutation in the catalytic site of HAAH. Such a polypeptide contains an amino acid sequence that is at least 50% identical to a naturally-occurring HAAH amino acid sequence or a fragment thereof and which has the ability to inhibit HAAH hydroxylation of substrates containing an EGF-like repeat sequence. More preferably, the polypeptide contains an amino acid sequence that is at least 75%, more preferably at least 85%, more preferably at least 95% identical to SEQ ID NO:2.

A substantially pure HAAH polypeptide or HAAH-derived polypeptide such as a mutated HAAH polypeptide is preferably obtained by expression of a recombinant nucleic acid encoding the polypeptide or by chemically synthesizing the protein. A polypeptide or protein is substantially pure when it is separated from those contaminants which accompany it in its natural state (proteins and other naturally-occurring organic molecules). Typically, the polypeptide is substantially pure when it constitutes at least 60%, by weight, of the protein in the preparation. Preferably, the protein in the preparation is at least 75%, more preferably at least 90%, and most preferably at least 99%, by weight, HAAH. Purity is measured by any appropriate method, e.g., column chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis, or HPLC analysis. Accordingly, substantially pure polypeptides include recombinant polypeptides derived from a eucaryote but produced in *E. coli* or another procaryote, or in a eucaryote other than that from which the polypeptide was originally derived.

Nucleic acid molecules which encode such HAAH or HAAH-derived polypeptides are also within the invention.

Table 2: HAAH cDNA sequence

```

cggaccgtgc aatggccag cgtagaatg ccaagagcag cggcaacagc agcagcagcg 61
gctccggcag cggtagcacg agtcgggca gcagcagccc cggggcccg agagagacaa 121
agcatggagg acacaagaat gggaggaaag gcggactctc ggaacttca ttcttcacgc 181
25 ggtttatggg gattgcattg ctggcggtct ggaatctgt agctgtcggt tggtttgatc 241
ttgttgacta tgaggaggtt ctaggaaaac taggaatcta tgatgctgat ggtgatggag 301
atttgatgt ggtgatgccc aaagttttat taggacttaa agagagatct acttcagagc 361
cagcagtcgc gccagaagag gctgagccac aactgagcc cgaggagcag gttcctgtgg 421
aggcagaaac ccagaatatt gaagatgaag caaagaaca aattcagtc ctctccatg 481
30 aatgggtaca cgcagaacat gttgagggag aagacttgca acaagaagat ggaccacag 541
gagaaccaca acaagaggat gatgagttt ttatggcgac tgatgtgat gatagatttg 601
agaccctgga acctgaagta tctcatgaag aaaccgagca tagttaccac gtggagagaa 661
cagtttcaca agactgtaat caggatatgg aagagatgat gtctgagcag gaaaatccag 721
attccagtag accagttaga gaagatgaaa gattgcacca tgatcacagat gatgtaacat 781
35 accaagtcta tgaggaaaca gcagtatatg aacctctaga aaatgaagg atagaaatca 841
cagaagtaac tgctccccct gaggataatc ctgtagaaga ttcacaggta attgtagaag 901
aagtaagcat ttttctctgt gaagaacagc aggaagtacc accagaaca aatagaaaa 961

```


WO 02/092782

PCT/US02/15814

cagatgatcc agaacaacaa gcaaaagtta agaaaaagaa gcctaaactt ttaataaat 1021
 ttgataagac tattaaagct gaacttgatg ctgcagaaaa actccgtaaa aggggaaaaa 1081
 ttgaggaaac agtgaatgca tttaaagaac tagtacgcaa ataccctcag agtccacgag 1141
 caagatatgg gaaggcgagc tgtgaggatg atttggctga gaagaggaga agtaatgagg 1201
 5 tgcctacgtgg agccatcgag acctaccaag aggtggccag cctaccctgat gtcctgcag 1261
 acctgctgaa gctgagtttg aagcgtcgct cagacaggca acaatttcta ggtcatatga 1321
 gaggttccct gcttaccctg cagagattag ttcaactat tcccaatgat acttccctaa 1381
 aaaatgacct tggcgtggga tacctcttga taggagataa tgacaatgca aagaaagtgt 1441
 atgaagaggt gctgagtggt acacctaatg atggcttgc taaagtccat tatggcttca 1501
 10 tcttgaaggc acagaacaaa attgctgaga gcatcccata ttaaaaggaa ggaatagaat 1561
 ccggagatcc tggcactgat gatgggagat tttatttcca cctgggggat gccatgcaga 1621
 ggggtgggaa caaagaggca tataagtgtt atgagcttgg gcacaagaga ggacactttg 1681
 catctgtctg gcaacgctca ctctacaatg tgaatggact gaaagcacag cctgggtgga 1741
 ccccaaaaga aacgggctac acagagllag taaagtcttt agaaagaaac tggaggttaa 1801
 15 tccagatga aggccttgca gtgatggata aagcacaagg tctcttctg cctgaggatg 1861
 aaaaacctgag ggaacaaagg gactggagcc agttcacgct gtggcagcaa ggaagaagaa 1921
 atgaaaatgc ctgcaaaagg gctctcaaaa cctgtacctt actagaaaag ttcccgcaga 1981
 caacgggatg cagaagaggc agatcaaat attcoactat goaccccggt actcactgtg 2041
 ggccgcacac agggcccaca aactgcagge tccgaatgca cctgggcttg gtgattccca 2101
 20 aggaaggctg caagatttga tggcccaacg agaccaggac ctggaggaaa ggcaaggtgc 2161
 tcatcttcta tgactccttt gacacagagg tatggcagga tgcctcatct ttccggtcga 2221
 tattcatcgt ggaatgtgtg catccggaac tgacaccaca gcagagacgc agccttccag 2281
 caatttagca tgaattcatg caagcttggg aaactctgga gaga
 (SEQ ID NO:3 ; GENBANK Accession No. S83325; codon encoding initiating methionine is underlined).

25 Methods of inhibiting tumor growth also include administering a compound which inhibits HAAH hydroxylation of a NOTCH polypeptide. For example, the compound inhibits hydroxylation of an EGF-like cysteine-rich repeat sequence in a NOTCH polypeptide, e.g., one containing the consensus sequence CDXXXCXXKXGNGXCDXXCNNAACXXDXDC (SEQ ID NO:4). Polypeptides containing an EGF-like cysteine-rich repeat sequence are administered to block hydroxylation of endogenous NOTCH.

30 Growth of a tumor which overexpresses HAAH is also inhibited by administering a compound which inhibits signal transduction through the insulin receptor substrate (IRS) signal transduction pathway. Preferably the compound inhibits IRS phosphorylation. For example, the compound is a peptide or non-peptide compound which binds to and inhibits phosphorylation at residues 46, 465, 551, 612, 632, 662, 732, 941, 989, or 1012 of SEQ ID NO:5. Compounds include polypeptides such those which block an IRS phosphorylation site such as a Glu/Tyr site. Antibodies such as those which bind to a carboxyterminal domain of IRS containing a phosphorylation site block IRS phosphorylation, and as a consequence, signal transduction along the pathway. Inhibition of IRS phosphorylation in turn leads to inhibition of cell proliferation.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Other compounds which inhibit IRS phosphorylation include vitamin D analogue EB1089 and Wortmannin.

HAAH-overproducing tumor cells were shown to express HAAH both intracellularly and on the surface of the tumor cell. Accordingly, a method of killing a tumor cell is carried out by contacting such a tumor cell with a cytotoxic agent linked to an HAAH-specific antibody. The HAAH-specific antibody (antibody fragment, or ligand which binds to extracellular HAAH) directs the chimeric polypeptide to the surface of the tumor cell allowing the cytotoxic agent to damage or kill the tumor cell to which the antibody is bound. The monoclonal antibody binds to an epitope of HAAH such as an epitope exposed on the surface of the cell or in the catalytic site of HAAH. The cytotoxic composition preferentially kills tumor cells compared to non-tumor cell.

Screening methods to identify anti-tumor agents which inhibit the growth of tumors which overexpress HAAH are also within the invention. A screening method used to determine whether a candidate compound inhibits HAAH enzymatic activity includes the following steps: (a) providing a HAAH polypeptide, e.g., a polypeptide which contains the carboxyterminal catalytic site of HAAH; (b) providing a polypeptide comprising an EGF-like domain; (c) contacting the HAAH polypeptide or the EGF-like polypeptide with the candidate compound; and (d) determining hydroxylation of the EGF-like polypeptide of step (b). A decrease in hydroxylation in the presence of the candidate compound compared to that in the absence of the compound indicates that the compound inhibits HAAH hydroxylation of EGF-like domains in proteins such as NOTCH.

Anti-tumor agents which inhibit HAAH activation of NOTCH are identified by (a) providing a cell expressing HAAH; (b) contacting the cell with a candidate compound; and (c) measuring translocation of activated NOTCH to the nucleus of the cell. Translocation is measured by using a reagent such as an antibody which binds to a 110 kDa activation fragment of NOTCH. A decrease in translocation in the presence of the candidate compound compared to that in the absence of the compound indicates that the compound inhibits HAAH activation of NOTCH, thereby inhibiting NOTCH-mediated signal transduction and proliferation of HAAH-overexpressing tumor cells.

Nucleotide and amino acid comparisons described herein were carried out using the Lasergene software package (DNASTAR, Inc., Madison, WI). The MegAlign module used was

WO 02/092782

PCT/US02/15814

the Clustal V method (Higgins et al., 1989, CABIOS 5(2):151-153). The parameter used were gap penalty 10, gap length penalty 10.

Hybridization is carried out using standard techniques, such as those described in Ausubel et al. (*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1989). "High stringency" refers to nucleic acid hybridization and wash conditions characterized by high temperature and low salt concentration, e.g., wash conditions of 65°C at a salt concentration of 0.1 X SSC. "Low" to "moderate" stringency refers to DNA hybridization and wash conditions characterized by low temperature and high salt concentration, e.g., wash conditions of less than 60°C at a salt concentration of 1.0 X SSC. For example, high stringency conditions include hybridization at 42°C in the presence of 50% formamide; a first wash at 65°C in the presence of 2 X SSC and 1% SDS; followed by a second wash at 65°C in the presence of 0.1% x SSC. Lower stringency conditions suitable for detecting DNA sequences having about 50% sequence identity to an HAAH gene sequence are detected by, for example, hybridization at about 42°C in the absence of formamide; a first wash at 42°C, 6 X SSC, and 1% SDS; and a second wash at 50°C, 6 X SSC, and 1% SDS.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following description of the preferred embodiments thereof, and from the claims.

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 is a bar graph showing colony formation induced by transient transfection of NIH-3T3 cells with various aspartyl (asparaginyl) beta-hydroxylase (AAH) cDNAs. Colony formation was induced by transient transfection with 10 µg DNA. In contrast, the mutant murine AAH construct without enzymatic activity has no transforming activity. The data is presented as mean number of transformed foci ± SEM.

Fig. 2 is a bar graph showing the results of a densitometric analysis of a Western blot assay of proteins produced by various murine AAH stably transfected cell clones. In clones 7 and 18, there was a modest increase in HAAH gene expression, while the overexpression was to a lesser degree in clone 16.

Figs. 3A-B are bar graphs showing colony formation in soft agar exhibited by HAAH stably transfected clones compared to HAAH enzymatic activity. Fig. 3A shows a measurement

WO 02/092782

PCT/US02/15814

of murine AAH enzymatic activity in clones 7, 16 and 18, and Fig. 3B shows colony formation exhibited by clones 7, 16 and 18. Data is presented as mean number of colonies 10 days after plating \pm SEM. All three clones with modest increases in HAAH enzymatic activity, that correlated with protein expression, exhibited anchorage independent growth.

5 Fig. 4 is a bar graph showing tumor formation in nude mice injected with transfected clones overexpressing murine AAH. Tumor growth was assessed after 30 days. Mean tumor weight observed in mice injected with clones 7, 16 and 18 as compared to mock DNA transfected clone. All animals, which were injected with clones overexpressing HAAH, developed tumors.

Figs. 5A-D are bar graphs showing increased AAH expression in PNET2 (Fig. 5A, 10 5C) and SH-Sy5y (Fig. 5B) cells treated with retinoic acid (Figs. 5A, 5B) or phorbol ester myristate (PMA; Fig. 5C) to induce neurite outgrowth as occurs during tumor cell invasion. The cells were treated with 10 μ M retinoic acid or 100 nM PMA for 0, 1, 2, 3, 4, or 7 days. Cell lysates were analyzed by Western blot analysis using an HAAH-specific monoclonal antibody to detect the 85 kDa AAH protein. The levels of immunoreactivity were measured by volume 15 densitometry (arbitrary units). The graphs indicate the mean \pm S.D. of results obtained from three separate experiments. In Fig. 5D, PNET2 cells were treated for 24 hours with sub-lethal concentrations of H₂O₂ to induce neurite retraction. Viability of greater than 90% of the cells was demonstrated by Trypan blue dye exclusion. Similar results were obtained for SH-Sy5y cells.

Fig. 6 is a bar graph showing the effects of AAH over-expression on the levels of 20 anti-apoptosis (Bcl-2), cell cycle-mitotic inhibitor (p16 and p21/Waf1), and proliferation (proliferating cell nuclear antigen; PCNA) molecules. PNET2 neuronal cells were stably transfected with the full-length human cDNA encoding AAH (pHAAH) or empty vector (pcDNA). AAH gene expression was under control of a CMV promoter. Western blot analysis was performed with cell lysates prepared from cultures that were 70 to 80 percent confluent. 25 Protein loading was equivalent in each lane. Replicate blots were probed with the different antibodies. Bar graphs depict the mean S.D.'s of protein expression levels measured in three experiments. All differences are statistically significant by Student T-test analysis ($P < 0.01$ - $P < 0.001$).

Fig. 7 is a diagram of showing the components of the IRS-1 signal transduction 30 pathway.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Fig. 8 is a line graph showing growth curves generated in cells expressing the antisense HAAH compared to controls expressing GFP.

Fig. 9 is a diagram of the functional domains of the hIRS-1 protein and structural organization of the point mutants. All mutant and "wild type" hIRS-1 proteins construct contain a
5 FLAG (F) epitope (DYKDDDDK; SEQ ID NO:7) at the C-terminus. PH and PTB indicate pleckstrin homology and phosphotyrosine binding, regions, respectively.

Fig. 10 is a diagram showing AAH cDNA and the location at which antisense oligonucleotides bind. The locations shown are relative to the AUG start site of the AAH cDNA.

Fig. 11 is a photograph of an electrophoretic gel showing inhibition of AAH gene
10 expression by antisense oligonucleotide DNA molecules.

Fig. 12 is a line graph showing AAH antisense oligonucleotide binding in neuroblastoma cells.

Fig. 13 is a bar graph showing inhibition of AAH gene expression as a result of AAH antisense oligonucleotide delivery into neuroblastoma cells.

Fig. 14A is a photograph of a Western blot assay expression of NOTCH proteins.
15

Fig. 14B is a photograph of an electrophoretic gel showing Hes-1 gene expression as measured by reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR).

Fig. 14C is a photograph of a Western blot assay showing expression of NOTCH-1 and Jagged-1 under conditions in which IRS-1 signalling is reduced.

20 Detailed Description

HAAH is a protein belonging to the alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase family of prolyl and lysyl hydroxylases which play a key role in collagen biosynthesis. This molecule hydroxylates aspartic acid or asparagine residues in EGF-like domains of several proteins in the presence of ferrous iron. These EGF-like domains contain conserved motifs, that form repetitive
25 sequences in proteins such as clotting factors, extracellular matrix proteins, LDL receptor, NOTCH homologues, or NOTCH ligand homologues.

The alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase aspartyl (asparaginyl) beta-hydroxylase (AAH) specifically hydroxylates one aspartic or asparagine residue in EGF-like domains of various proteins. The 4.3-kb cDNA encoding the human AspH (hAspH) hybridizes
30 with 2.6 kb and 4.3 kb transcripts in transformed cells, and the deduced amino acid sequence of

WO 02/092782

PCT/US02/15814

the larger transcript encodes an protein of about 85 kDa. Both *in vitro* transcription and translation and Western blot analysis also demonstrate a 56-kDa protein that may result from posttranslational cleavage of the catalytic C-terminus.

- A physiological function of AAH is the post-translational beta-hydroxylation of aspartic acid in vitamin K-dependent coagulation proteins. However, the abundant expression of AAH in several malignant neoplasms, and low levels of AAH in many normal cells indicate a role for this enzyme in malignancy. The AAH gene is also highly expressed in cytotrophoblasts, but not syncytiotrophoblasts of the placenta. Cytotrophoblasts are invasive cells that mediate placental implantation. The increased levels of AAH expression in human cholangiocarcinomas, hepatocellular carcinomas, colon cancers, and breast carcinomas were primarily associated with invasive or metastatic lesions. Moreover, overexpression of AAH does not strictly reflect increased DNA synthesis and cellular proliferation since high levels of AAH immunoreactivity were observed in 100 percent of cholangiocarcinomas, but not in human or experimental disease processes associated with regeneration or nonneoplastic proliferation of bile ducts. AAH overexpression and attendant high levels of beta hydroxylase activity lead to invasive growth of transformed neoplastic cells. Detection of an increase in HAAH expression is useful for early and reliable diagnosis of the cancer types which have now been characterized as overexpressing this gene product.

Diagnosis of malignant tumors

- HAAH is overexpressed in many tumors of endodermal origin and in at least 95% of CNS tumors compared to normal noncancerous cells. An increase in HAAH gene product in a patient-derived tissue sample (e.g., solid tissue or bodily fluid) is carried out using standard methods, e.g., by Western blot assays or a quantitative assay such as ELISA. For example, a standard competitive ELISA format using an HAAH-specific antibody is used to quantify patient HAAH levels. Alternatively, a sandwich ELISA using a first antibody as the capture antibody and a second HAAH-specific antibody as a detection antibody is used.

Methods of detecting HAAH include contacting a component of a bodily fluid with an HAAH-specific antibody bound to solid matrix, e.g., microtiter plate, bead, dipstick. For example, the solid matrix is dipped into a patient-derived sample of a bodily fluid, washed, and

WO 02/092782

PCT/US02/15814

the solid matrix is contacted with a reagent to detect the presence of immune complexes present on the solid matrix.

Proteins in a test sample are immobilized on (e.g., bound to) a solid matrix. Methods and means for covalently or noncovalently binding proteins to solid matrices are known in the art.

- 5 The nature of the solid surface may vary depending upon the assay format. For assays carried out in microtiter wells, the solid surface is the wall of the microtiter well or cup. For assays using beads, the solid surface is the surface of the bead. In assays using a dipstick (i.e., a solid body made from a porous or fibrous material such as fabric or paper) the surface is the surface of the material from which the dipstick is made. Examples of useful solid supports include
- 10 nitrocellulose (e.g., in membrane or microtiter well form), polyvinyl chloride (e.g., in sheets or microtiter wells), polystyrene latex (e.g., in beads or microtiter plates, polyvinylidene fluoride (known as IMMULON™), diazotized paper, nylon membranes, activated beads, and Protein A beads. The solid support containing the antibody is typically washed after contacting it with the test sample, and prior to detection of bound immune complexes. Incubation of the antibody with
- 15 the test sample is followed by detection of immune complexes by a detectable label. For example, the label is enzymatic, fluorescent, chemiluminescent, radioactive, or a dye. Assays which amplify the signals from the immune complex are also known in the art, e.g., assays which utilize biotin and avidin.

- An HAAH-detection reagent, e.g., an antibody, is packaged in the form of a kit, which
- 20 contains one or more HAAH-specific antibodies, control formulations (positive and/or negative), and/or a detectable label. The assay may be in the form of a standard two-antibody sandwich assay format known in the art.

Production of HAAH-specific antibodies

- Anti-HAAH antibodies were obtained by techniques well known in the art. Such
- 25 antibodies are polyclonal or monoclonal. Polyclonal antibodies were obtained using standard methods, e.g., by the methods described in Ghose et al., Methods in Enzymology, Vol. 93, 326-327, 1983. An HAAH polypeptide, or an antigenic fragment thereof, was used as the immunogen to stimulate the production of polyclonal antibodies in the antisera of rabbits, goats, sheep, or rodents. Antigenic polypeptides for production of both polyclonal and monoclonal antibodies
- 30 useful as immunogens include polypeptides which contain an HAAH catalytic domain. For

WO 02/092782

PCT/US02/15814

example, the immunogenic polypeptide is the full-length mature HAAH protein or an HAAH fragment containing the carboxyterminal catalytic domain e.g., an HAAH polypeptide containing the His motif of SEQ ID NO:2.

- Antibodies which bind to the same epitopes as those antibodies disclosed herein are
- 5 identified using standard methods, e.g., competitive binding assays, known in the art.

- Monoclonal antibodies were obtained by standard techniques. Ten μ g of purified recombinant HAAH polypeptide was administered to mice intraperitoneally in complete Freund's adjuvant, followed by a single boost intravenously (into the tail vein) 3-5 months after the initial inoculation. Antibody-producing hybridomas were made using standard methods. To identify
- 10 those hybridomas producing antibodies that were highly specific for an HAAH polypeptide, hybridomas were screened using the same polypeptide immunogen used to immunize. Those antibodies which were identified as having HAAH-binding activity are also screened for the ability to inhibit HAAH catalytic activity using the enzymatic assays described below. Preferably, the antibody has a binding affinity of at least about 10^8 liters/mole and more
- 15 preferably, an affinity of at least about 10^9 liters/mole.

Monoclonal antibodies are humanized by methods known in the art, e.g., MAbs with a desired binding specificity can be commercially humanized (Scotgene, Scotland; Oxford Molecular, Palo Alto, CA).

- HAAH-specific intrabodies are produced as follows. Following identification of a
- 20 hybridoma producing a suitable monoclonal antibody, DNA encoding the antibody is cloned. DNA encoding a single chain HAAH-specific antibody in which heavy and light chain variable domains are separated by a flexible linker peptide is cloned into an expression vector using known methods (e.g., Marasco et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893 and Marasco et al., 1997, Gene Therapy 4:11-15). Such constructs are introduced into cells, e.g., using standard
- 25 gene delivery techniques for intracellular production of the antibodies. Intracellular antibodies, i.e., intrabodies, are used to inhibit signal transduction by HAAH. Intrabodies which bind to a carboxyterminal catalytic domain of HAAH inhibit the ability of HAAH to hydroxylate EGF-like target sequences.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Methods of linking HAAH-specific antibodies (or fragments thereof) which bind to cell surface exposed epitopes of HAAH on the surface of a tumor cell are linked to known cytotoxic agents, e.g. ricin or diphtheria toxin, using known methods.

Deposit of Biological Materials

- 5 Under the terms of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure, hybridoma FB501 (which produces monoclonal antibody FB50), hybridoma HA386A (which produces monoclonal antibody 86A), hybridoma HA15C7A (which produces monoclonal antibody 5C7), and hybridoma HA219B (which produces monoclonal antibody 19B) were deposited on May 17, 10 2001, with the American Type Culture Collection (ATCC) of 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 USA..

- Applicants' assignee represents that the ATCC is a depository affording permanence of the 15 deposit and ready accessibility thereto by the public if a patent is granted. All restrictions on the availability to the public of the material so deposited will be irrevocably removed upon the granting of a patent. The material will be available during the pendency of the patent application to one determined by the Commissioner to be entitled thereto under 37 CFR 1.14 and 35 U.S.C. 122. The deposited material will be maintained with all the care necessary to keep it viable and 20 uncontaminated for a period of at least five years after the most recent request for the furnishing of a sample of the deposited plasmid, and in any case, for a period of at least thirty (30) years after the date of deposit or for the enforceable life of the patent, whichever period is longer. Applicant's assignee acknowledges its duty to replace the deposit should the depository be unable to furnish a sample when requested due to the condition of the deposit.

25 Methods of treating malignant tumors

Patients with tumors characterized as overexpressing HAAH as such tumors of endodermal origin or CNS tumors are treated by administering HAAH antisense nucleic acids.

Antisense therapy is used to inhibit expression of HAAH in patients suffering from hepatocellular carcinomas, cholangiocarcinomas, glioblastomas and neuroblastomas. For

- 30 example, an HAAH antisense strand (either RNA or DNA) is directly introduced into the cells in

WO 02/092782

PCT/US02/15814

a form that is capable of binding to the mRNA transcripts. Alternatively, a vector containing a sequence which, which once within the target cells, is transcribed into the appropriate antisense mRNA, may be administered. Antisense nucleic acids which hybridize to target mRNA decrease or inhibit production of the polypeptide product encoded by a gene by associating with the

5 normally single-stranded mRNA transcript, thereby interfering with translation and thus, expression of the protein. For example, DNA containing a promoter, e.g., a tissue-specific or tumor specific promoter, is operably linked to a DNA sequence (an antisense template), which is transcribed into an antisense RNA. By "operably linked" is meant that a coding sequence and a regulatory sequence(s) (*i.e.*, a promoter) are connected in such a way as to permit gene expression

10 when the appropriate molecules (*e.g.*, transcriptional activator proteins) are bound to the regulatory sequence(s).

Oligonucleotides complementary to various portions of HAAH mRNA were tested *in vitro* for their ability to decrease production of HAAH in tumor cells (*e.g.*, using the FOCUS hepatocellular carcinoma (HCC) cell line) according to standard methods. A reduction in HAAH

15 gene product in cells contacted with the candidate antisense composition compared to cells cultured in the absence of the candidate composition is detected using HAAH-specific antibodies or other detection strategies. Sequences which decrease production of HAAH in *in vitro* cell-based or cell-free assays are then be tested *in vivo* in rats or mice to confirm decreased HAAH production in animals with malignant neoplasms.

20 Antisense therapy is carried out by administering to a patient an antisense nucleic acid by standard vectors and/or gene delivery systems. Suitable gene delivery systems may include liposomes, receptor-mediated delivery systems, naked DNA, and viral vectors such as herpes viruses, retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses, among others. A reduction in HAAH production results in a decrease in signal transduction via the IRS signal transduction

25 pathway. A therapeutic nucleic acid composition is formulated in a pharmaceutically acceptable carrier. The therapeutic composition may also include a gene delivery system as described above. Pharmaceutically acceptable carriers are biologically compatible vehicles which are suitable for administration to an animal: *e.g.*, physiological saline. A therapeutically effective amount of a compound is an amount which is capable of producing a medically desirable result such as

30 reduced production of an HAAH gene product or a reduction in tumor growth in a treated animal.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Parenteral administration, such as intravenous, subcutaneous, intramuscular, and intraperitoneal delivery routes, may be used to deliver nucleic acids or HAAH-inhibitory peptides or non-peptide compounds. For treatment of CNS tumors, direct infusion into cerebrospinal fluid is useful. The blood-brain barrier may be compromised in cancer patients, allowing systemically administered drugs to pass through the barrier into the CNS. Liposome formulations of therapeutic compounds may also facilitate passage across the blood-brain barrier.

Dosages for any one patient depends upon many factors, including the patient's size, body surface area, age, the particular nucleic acid to be administered, sex, time and route of administration, general health, and other drugs being administered concurrently. Dosage for intravenous administration of nucleic acids is from approximately 10^6 to 10^{22} copies of the nucleic acid molecule.

Ribozyme therapy is also be used to inhibit HAAH gene expression in cancer patients. Ribozymes bind to specific mRNA and then cut it at a predetermined cleavage point, thereby destroying the transcript. These RNA molecules are used to inhibit expression of the HAAH gene according to methods known in the art (Sullivan et al., 1994, J. Invest. Derm. 103:85S-89S; Czubayko et al., 1994, J. Biol. Chem. 269:21358-21363; Mahieu et al, 1994, Blood 84:3758-65; Kobayashi et al. 1994, Cancer Res. 54:1271-1275).

HAAH-specific antibodies inhibit tumor cell growth

HAAH-specific antibodies inhibit the proliferation of tumor cells in culture. Two different HAAH-specific antibodies, FB-50 and 5C7, were tested. Tumor cells (a hepatocarcinoma cell line, a lung carcinoma cell line, and a breast carcinoma cell line) were seeded in a 96 well plate and incubated with varying concentrations of antibody for 48 hours. The cells were fixed with acetone. Cell growth was monitored using a sulforhodamine B dye binding assay. The data indicated a reduction in cell viability and proliferation in the presence of FB50 compared to its absence.

Passive Immunization

The HAAH-specific antibodies described herein are used to inhibit the growth of a tumor cell or kill the tumor cell.

Purified antibody preparations (e.g., a purified monoclonal antibody, an antibody fragment, or single chain antibody) is administered to an individual diagnosed with a tumor or at

WO 02/092782

PCT/US02/15814

risk of developing a tumor. The antibody preparations are administered using methods known in the art of passive immunization, e.g., intravenously or intramuscularly. The antibodies used in the methods described herein are formulated in a physiologically-acceptable excipient. Such excipients, e.g., physiological saline, are known in the art.

- 5 The antibody is preferably a high-affinity antibody, e.g., an IgG-class antibody or fragment or single chain thereof. Alternatively, the antibody is an IgM isotype. Antibodies are monoclonal, e.g., a murine monoclonal antibody or fragment thereof, or a murine monoclonal antibody, which has been humanized. The antibody is a human monoclonal antibody. The affinity of a given monoclonal antibody is further increased using known methods, e.g., by selecting for
- 10 increasingly higher binding capacity (e.g., according to the method described in Boder et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:10701-10705). Optionally, the antibody, antibody fragment, or high affinity single chain antibody is conjugated to a toxic moiety prior to administration. Toxic moieties suitable for conjugation include ricin, Psuedomonas toxin, Diphtheria toxin as well as radioisotopes and chemotherapeutic agents known in the art. Such
- 15 antibody toxins damage or kill a tumor cell upon binding to the tumor cell or upon internalization into the cytoplasm of the tumor cell.

Antibody preparations or antibody-toxin preparations are administered at doses of approximately 0.01-2 mL/kg of body weight. Doses are readministered weekly or monthly as necessary to reduce tumor load in a treated individual.

20 Active Immunization

- Active vaccination is the process of inducing an animal to respond to an antigen. During vaccination, cells, which recognize the antigen (B cells or cytotoxic T cells), are clonally expanded. In addition, the population of helper T cells specific for the antigen also increase. Vaccination also involves specialized antigen presenting cells, which can process the antigen and
- 25 display it in a form which can stimulate one of the two pathways. Antigen recognition followed by immune cell expansion and activation leads to the production of antigen-specific antibodies and antigen-specific cellular immune responses. Successful immunization is indicated by an increase in the level of HAAH-specific antibody titer in serum of an immunized individual compared to the level prior to immunization. Preferably, the HAAH-specific antibody titer is at

WO 02/092782

PCT/US02/15814

least 10%, more preferably at least 50%, more preferably at least 100%, and most preferably 200% greater than the titer prior to immunization.

- An individual is immunized with an AAH (e.g., HAAH) polypeptide or a polynucleotide encoding the peptide. For example, a human patient is immunized with full-length 52 kDa
- 5 HAAH. Standard adjuvant formulations may be simultaneously administered to enhance immunogenicity of the immunizing polypeptide. Alternatively, shorter polypeptides, e.g., immunogenic fragments of HAAH, are used. For example, a polypeptide contains an extracellular catalytic domain of HAAH (e.g., amino acids 650-700 of SEQ ID NO:2). Other immunogenic fragments of HAAH include a fragment contains a binding site for alpha-
- 10 ketoglutarate, a fragment that lacks a binding site for alpha-ketoglutarate, one which contains a calcium binding site, and one which lacks a binding site for an EGF-like polypeptide.

DNA vaccine

- In addition to standard active vaccination using a peptide antigen, DNA vaccination is used to generate an immune response to HAAH, and in turn to tumor cells, which overexpress
- 15 HAAH. Although HAAH is overexpressed on malignant cells, an effective immune response is not made by the patient because tumor cells lack appropriate accessory molecules for antigen presentation. The DNA vaccines described herein result in generation of a humoral as well as cellular immunity specific for HAAH (and cells expressing HAAH on their cell surface). For example, not only is an HAAH-specific antibody produced in the immunized individual, HAAH-
- 20 specific cytotoxic T cells are generated. HAAH-specific cytotoxic T cells kill tumor cells, thereby reducing tumor load in the immunized individual.

- A polynucleotide encoding an AAH polypeptide (full-length or an immunogenic fragment of AAH) is introduced into an individual by known methods, e.g., particle bombardment or direct injection via needle. Typically, the antigen (or DNA encoding the antigen) is delivered
- 25 intramuscularly. The antigen is also directly injected into other tissues, e.g., tumor sites. DNA is taken up by cells at the point of injection. The cell produces proteins, and the proteins stimulate the immune system of the immunized individual resulting, e.g., in generation of an HAAH-specific antibody. Cellular immunity, e.g., cytotoxic T cells, are also generated.

- An effective DNA or mRNA dosage is generally be in the range of from about 0.05
- 30 micrograms/kg to about 50 mg/kg, usually about 0.005-5 mg/kg of body weight, e.g., 0.5 to 5

WO 02/092782

PCT/US02/15814

mg/kg. The DNA to be administered is naked (in the absence of transfection-facilitating substances) or complexed with compounds, which enhance cellular uptake of the polynucleotide (e.g., charged lipids, lipid complexes or liposomes). For example, the polynucleotide is administered with LipofectinTM or precipitating agents such as CaPO₄. The transfected cells, e.g.,

5 non-proliferating muscle cells, produce the recombinant antigenic polypeptide for at least one month and up to several months, e.g. 3-6 months. Alternatively, transitory expression of a polypeptide is achieved by introducing the polynucleotide construct into a tissue (e.g., non-muscular tissue or tumor tissue). In the latter case, cells of the tissue produce the polypeptide for a shorter period of time, e.g., several days (3-5 days and up to about 20 days). The level of

10 protein or polypeptide expression by target cells is sufficient to induce production of HAAH-specific antibodies. The level of antibody production is measured using standard methods, e.g., evaluation of antibody titer in patient serum, before and after immunization.

The polynucleotides are administered by standard methods, such as by injection into the interstitial space of tissues such as muscles or skin, introduction into the circulation or into body

15 cavities or by inhalation or insufflation. Polynucleotides are injected or otherwise delivered to the animal with a pharmaceutically acceptable liquid carrier, e.g., a liquid carrier, which is aqueous or partly aqueous. The polynucleotides are associated with a liposome (e.g., a cationic or anionic liposome). The polynucleotide includes genetic information necessary for expression by a target cell, such as a promoters.

20 One advantage of DNA vaccination is that DNA vaccines can result in longer lasting production of the antigenic protein, thereby booster shots reducing or avoiding booster immunizations.

In addition to inducing an immune response, e.g., an HAAH-specific antibody response, by vaccinating with DNA encoding an HAAH polypeptide, a polynucleotide encoding the

25 antibody itself is introduced. An isolated polynucleotide encoding an HAAH-specific antibody, e.g., variable regions of the antibody, is introduced for production of the antibody *in situ*. The antibody in turn exerts a therapeutic effect at the target site by binding a cell surface antigen, e.g., extracellular HAAH, or by binding to a catalytic domain of HAAH, to inhibit HAAH function.

In vivo diagnostic imaging

WO 02/092782

PCT/US02/15814

The antibodies (antibody fragments, and single chain antibodies) described herein are useful to diagnose the presence of a tumor in tissues as well as bodily fluids. HAAH-specific antibodies are tagged with a detectable label such as a radioisotope or colorimetric agent. The labeled antibody is administered to an individual at risk of developing cancer or an individual who

5 has previously been diagnosed with cancer. For example, the antibodies are useful to diagnose metastases of a tumor, which has been surgically excised or treated by chemotherapeutic or radiotherapeutic methods. The sensitivity of the method is sufficient to detect micrometastases in tissues such as lymph nodes. Early and sensitive diagnosis of tumors in this manner allows prompt therapeutic intervention.

10 The labeled antibody is administered to an individual using known methods, e.g., intravenously, or direct injection into solid or soft tissues. The antibody is allowed to distribute throughout the tissue or throughout the body for a period of approximately 1 hour to 72 hours. The whole body of the individual is then imaged using methods known in the art. Alternatively, a small portion of the body, e.g., a tissue site suspected of harboring a tumor, is imaged. An

15 increase in antibody binding, as measured by an increase in detection of the label, over the level of baseline binding (to normal tissue) indicates the presence of a tumor at the site of binding.

Activation of NOTCH signaling

NOTCH signalling is activated in cells highly expressing AAH. Fig. 14A. shows the presence of a 110 kDa NOTCH fragment as revealed by using Western blot. Overexpression of

20 enzymatically active AAH is shown by a display of the 100 kDa cleaved, active NOTCH-1 (Lane 1, Mock DNA transfected clone; Lane 2, clones 7; and Lane 3, clone18). In contrast, NOTCH-2 was not activated. There was enhanced expression of the full length Jagged ligand in clones expressing AAH as compared to the mock DNA transfected clone. Tubulin was used as internal control for protein loading.

25 Expression of the Hes-1, a known downstream effector gene, is activated by NOTCH signaling (Fig. 14B). Only AAH-expressing clones activate Notch expression as a transcription factor and subsequently unregulates Hes-1 gene expression as revealed by competitive RT-PCR. Lower panel is an RT-PCR product of GAPDH that served as internal control. Fig. 14C shows expression of human NOTCH-1 (hNOTCH-1) and Jagged-1 where IRS-1 signaling is reduced by

30 a dominant negative mutant (DhIRS-1). Such cells demonstrate downregulation AAH expression

WO 02/092782

PCT/US02/15814

and demonstrate a parallel decrease in NOTCH-1 and Jagged levels by Western blot analysis. Tubulin was used as an internal control for protein loading.

Methods of identifying compounds that inhibit HAAH enzymatic activity

Aspartyl (asparaginyl) beta-hydroxylase (AAH) activity is measured *in vitro* or *in vivo*. For example, HAAH catalyzes posttranslational modification of β carbon of aspartyl and asparaginyl residues of EGF-like polypeptide domains. An assay to identify compounds which inhibit hydroxylase activity is carried out by comparing the level of hydroxylation in an enzymatic reaction in which the candidate compound is present compared to a parallel reaction in the absence of the compound (or a predetermined control value). Standard hydroxylase assays carried out in a testtube are known in the art, e.g., Lavaissiere et al., 1996, J. Clin. Invest. 98:1313-1323; Jia et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:14322-14327; Wang et al., 1991, J. Biol. Chem. 266:14004-14010; or Gronke et al., 1990, J. Biol. Chem. 265:8558-8565. Hydroxylase activity is also measured using carbon dioxide ($^{14}\text{CO}_2$ capture assay) in a 96-well microtiter plate format (Zhang et al., 1999, Anal. Biochem. 271:137-142. These assays are readily automated and suitable for high throughput screening of candidate compounds to identify those with hydroxylase inhibitory activity.

Candidate compound which inhibit HAAH activation of NOTCH are identified by detecting a reduction in activated NOTCH in a cell which expresses or overexpresses HAAH, e.g., FOCUS HCC cells. The cells are cultured in the presence of a candidate compound. Parallel cultures are incubated in the absence of the candidate compound. To evaluate whether the compound inhibits HAAH activation of NOTCH, translocation of activated NOTCH to the nucleus of the cell is measured. Translocation is measured by detecting a 110 kDa activation fragment of NOTCH in the nucleus of the cell. The activation fragment is cleaved from the large (approximately 300 kDa) transmembrane NOTCH protein upon activation. Methods of measuring NOTCH translocation are known, e.g., those described by Song et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 96:6959-6963 or Capobianco et al., 1997, Mol. Cell Biol. 17:6265-6273. A decrease in translocation in the presence of the candidate compound compared to that in the absence of the compound indicates that the compound inhibits HAAH activation of NOTCH, thereby inhibiting NOTCH-mediated signal transduction and proliferation of HAAH-overexpressing tumor cells.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Methods of screening for compounds which inhibit phosphorylation of IRS are carried out by incubating IRS-expressing cells in the presence and absence of a candidate compound and evaluating the level of IRS phosphorylation in the cells. A decrease in phosphorylation in cells cultured in the presence of the compound compared to in the absence of the compound indicates that the compound inhibits IRS-1 phosphorylation, and as a result, growth of HAAH-overexpressing tumors. Alternatively, such compounds are identified in an *in vitro* phosphorylation assay known in the art, e.g., one which measured phosphorylation of a synthetic substrate such as poly (Glu/Tyr).

Example 1: Increased expression of HAAH is associated with malignant transformation

HAAH is a highly conserved enzyme that hydroxylates EGF-like domains in transformation associated proteins. The HAAH gene is overexpressed in many cancer types including human hepatocellular carcinomas and cholangiocarcinomas. HAAH gene expression was found to be undetectable during bile duct proliferation in both human disease and rat models compared to cholangiocarcinoma. Overexpression of HAAH in NIH-3T3 cells was associated with generation of a malignant phenotype, and enzymatic activity was found to be required for cellular transformation. The data described below indicate that overexpression of HAAH is linked to cellular transformation of biliary epithelial cells.

To identify molecules that are specifically overexpressed in transformed malignant cells of human hepatocyte origin, the FOCUS hepatocellular carcinoma (HCC) cell line was used as an immunogen to generate monoclonal antibodies (mAb) that specifically or preferentially recognize proteins associated with the malignant phenotype. A lambda GT11 cDNA expression library derived from HepG2 HCC cells was screened, and a HAAH-specific mAb produced against the FOCUS cell line was found to recognize an epitope on a protein encoded by an HAAH cDNA. The HAAH enzyme was found to be upregulated in several different human transformed cell lines and tumor tissues compared to adjacent human tissue counterparts. The overexpressed HAAH enzyme in different human malignant tissues was found to be catalytically active.

HAAH gene expression was examined in proliferating bile ducts and in NIH 3T3 cells. Its role in the generation of the malignant phenotype was measured by the formation of transformed foci, growth in soft agar as an index of anchorage independent growth and tumor formation in nude mice. The role of enzymatic activity in the induction of transformed phenotype

WO 02/092782

PCT/US02/15814

was measured by using a cDNA construct with a mutation in the catalytic site that abolished hydroxylase activity. The results indicated that an increase in expression of HAAH gene is associated with malignant transformation of bile ducts.

The following materials and methods were used to generate the data described below.

5 Antibodies

The FB50 monoclonal antibody was generated by cellular immunization of Balb/C mice with FOCUS HCC cells. A monoclonal anti-Dengue virus antibody was used as a non-relevant control. The HBOH2 monoclonal antibody was generated against a 52 kDa recombinant HAAH polypeptide and recognizes the catalytic domain of beta-hydroxylase from mouse and
10 human proteins. Polyclonal anti-HAAH antibodies cross-react with rat hydroxylase protein. Control antibody anti-Erk-1 was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA. Sheep anti-mouse and donkey anti-rabbit antisera labeled with horseradish peroxidase were obtained from Amersham, Arlington Heights, IL.

Constructs

15 The murine full length AAH construct (pNH376) and the site-directed mutation construct (pNH376-H660) with abolished catalytic activity were cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3 (Invitrogen Corp., San Diego, CA). The full length human AAH was cloned into prokaryotic expression vector pBC-SK+ (Stratagene, La Jolla, CA). The full length human AAH (GENBANK Accession No. S83325) was subcloned into the EcoRI site of the
20 pcDNA3 vector.

Animal model of bile duct proliferation

Rats were divided into 9 separate groups of 3 animals each except for group 9, which contained 5 rats. Group 1 was the non-surgical control group, and group 2 was the sham-operated surgical control. The remaining groups underwent common bile duct ligation to induce
25 intrahepatic bile duct proliferation and were evaluated at 6, 12, 24, 48 hours and 4, 8 and 16 days as shown in Table 3. Animals were asphyxiated with CO₂, and liver samples were taken from left lateral and median lobes, fixed in 2 % paraformaldehyde and embedded in paraffin. Liver samples (5 µm) were cut and stained with hematoxylin and eosin to evaluate intrahepatic bile duct proliferation. Immunohistochemistry was performed with polyclonal anti-HAAH antibodies that
30 cross-react with the rat protein to determine levels of protein expression.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Bile duct proliferation associated with primary sclerosing cholangitis (PSC)

Liver biopsy samples were obtained from 7 individuals with PSC and associated bile duct proliferation. These individuals were evaluated according to standard gastroenterohepatological protocols. Patients were 22-46 years of age and consisted of 4 males and 3 females. Four had associated inflammatory bowel disease (3 ulcerative colitis and 1 Crohn's colitis). All patients underwent a radiological evaluation including abdominal ultrasonography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography to exclude the diagnosis of extrahepatic biliary obstruction. Tissue sections were prepared from paraffin embedded blocks and were evaluated by hematoxylin and eosin staining for bile duct proliferation. Expression of HAAH was determined by immunohistochemistry using an HAAH-specific monoclonal antibody such as FB50.

Immunohistochemistry

Liver tissue sections (5 μ m) were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohol. Endogenous peroxidase activity was quenched by a 30-minute treatment with 0.6 % H_2O_2 in 60% methanol. Endogenous biotin was masked by incubation with avidin-biotin blocking solutions (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The FB50 mAb (for PSC samples) and polyclonal anti-HAAH-hydroxylase antibodies (for rat liver samples) were added to slides in a humidified chamber at 4°C overnight. Immunohistochemical staining was performed using a standard avidin-biotin horseradish peroxidase complex (ABC) method using Vectastain Kits with diaminobenzidine (DAB) as the chromogen according to manufacturer's instructions (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Tissue sections were counterstained with hematoxylin, followed by dehydration in ethanol. Sections were examined by a light microscopy for bile duct proliferation and HAAH protein expression. Paraffin sections of cholangiocarcinoma and placenta were used as positive controls, and hepatosteatosis samples were used as a negative controls. To control for antibody binding specificity, adjacent sections were immunostained in the absence of a primary antibody, or using non-relevant antibody to Dengue virus. As a positive control for tissue immunoreactivity, adjacent sections of all specimens were immunostained with monoclonal antibody to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Western blot analysis

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Cell lysates were prepared in a standard radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer containing protease inhibitors. The total amount of protein in the lysates was determined by Bio-Rad colorimetric assay (Bio Rad, Hercules, CA) followed by 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to PVDF membranes, and
 5 subjected to Western blot analysis using FB50, HBOH2, anti-Erk-1 (used as an internal control for protein loading) as primary, sheep anti-mouse and donkey anti-rabbit antisera labeled with horseradish peroxidase as secondary antibodies. Antibody binding was detected with enhanced chemiluminescence reagents (SuperSignal, Pierce Chemical Company, Rockford, IL) and film autoradiography. The levels of immunoreactivity were measured by volume densitometry using
 10 NIH Image software.

Enzymatic activity assay

AAH activity was measured in cell lysates using the first EGF-like domain of bovine protein S as substrate where ^{14}C -labeled alpha-ketoglutarate hydroxylates the domain releasing ^{14}C containing CO_2 according to standard methods, e.g., those described by Jia et al., 1992, J.
 15 Biol. Chem. 267:14322-14327; Wang et al., 1991, J. Biol. Chem. 266:14004-14010; or Gronke et al., 1990, J. Biol. Chem. 265:8558-8565. Incubations were carried out at 37°C for 30 min in a final volume of 40 μl containing 48 μg of crude cell extract protein and 75 μM EGF substrate.

Cell transfection studies

The NIH-3T3 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Mediatech, Washington, DC) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Sigma Chemical Co., St.Louis, MO), 1% L-glutamine, 1% non-essential amino acids and 1% penicillin-streptomycin (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). Subconfluent
 20 NIH-3T3 cells (3×10^5 cells/60-mm dish) were transfected with 10 μg of one of the following plasmids: 1) non-recombinant pcDNA3 vector (Invitrogen Corp., San Diego, CA) as a negative control; 2) pNH376-H660, the murine AAH cDNA that was mutated in the catalytic domain and
 25 cloned into the pcDNA3 vector driven by a CMV promoter; 3) pNH376, the wild type murine AAH cDNA cloned into the pcDNA3 vector; 4) pCDHH, wild type human AAH cDNA cloned into the pcDNA3 vector; or 5) pLNCX-UP1, a cDNA that encodes v-Src oncogene (positive control). Cells were transfected using the calcium phosphate transfection kit according to
 30 manufacturer's instructions (5 Prime - 3 Prime, Inc., Boulder, CO). Comparison of cellular

WO 02/092782

PCT/US02/15814

transfection efficiency was assessed with the various constructs. For this procedure, confluent plates obtained 48 hours after transfection were split and reseeded into 12 separate 6-cm dishes, and 6 of them were made to grow in the presence of 400 µg/ml G-418 (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Grant Island, NY) containing medium. The number of G-418 resistant foci was determined at 14 days after transfection and used to correct for any variability in transfection efficiency.

Transformation assay

The NIH-3T3 cells were transfected with the various constructs and allowed to reach confluence after 48 hours as described above. Each 6 cm dish was split and seeded into 12 different 6 cm dishes. While 6 of them were made to grow in the presence of G-418 to detect transfection efficiency, the other six were grown in complete medium without G-418 and with a medium change every 4th day. The number of transformed foci were counted in these plates without G-418 and expressed as transformed foci per µg transfected DNA.

Anchorage-independent cell growth assay

15 A limiting dilution technique (0.15 cell/well of a flat bottom 96-well-plate) was performed on transfectants grown in G-418 in order to isolate cell clones with different levels of HAAH activity as measured by Western blot analysis and enzymatic assay of hydroxylase activity. Cloned cell lines (1.0×10^4 cells) were suspended in complete medium containing 0.4 % low-melting agarose (SeaPlaque GTG Agarose; FMC Bioproducts, Rockland, Maine) and laid over a bottom agar mixture consisting of complete medium with 0.53 % low-melting agarose. 20 Each clone was assayed in triplicate. The clones were seeded under these conditions and 10 days later the size (positive growth > 0.1 mm in diameter) and number of foci were determined.

Tumorigenicity in nude mice

The same clones as assessed in the anchorage independent growth assay were injected 25 into nude mice and observed for tumor formation. Tumorigenicity was evaluated using 10 animals in each of 4 groups (Charles River Labs., Wilmington, MA). Group 1 received 1×10^7 cells stably transfected with mock DNA, Group 2-4 received 1×10^7 cells of clones stable transfected with pNH376 and expressing various levels of murine HAAH protein. Nude mice were kept under pathogen-free conditions in a standard animal facility. Thirty days after tumor

WO 02/092782

PCT/US02/15814

cell inoculation, the animals were sacrificed using isoflurane (Aerrane, Anaquest, NJ) containing chambers and the tumors were carefully removed and weight determined.

Animal model of bile duct proliferation

Following ligation of the common bile duct, intrahepatic bile duct proliferation was
 5 evident at 48 hours. Tissue samples obtained 8 and 16 days following common bile duct ligation revealed extensive bile duct proliferation as shown in Table 3.

Table 3: Bile duct proliferation and HAAH expression
 at different intervals after common bile duct ligation

Group	Surgical Procedure	Microscopy*	Immunohistochemistry
1	no surgery	normal	negative
2	sham surgery	normal	negative
3	6 hours post ligation	normal	negative
4	12 hours post ligation	normal	negative
5	24 hours post ligation	normal	negative
6	48 hours post ligation	minimal bile duct prolif.	negative
7	4 days post ligation	moderate bile duct prolif.	negative
8	8 days post ligation	extensive bile duct prolif.	negative
9	16 days post ligation	extensive bile duct prolif.	negative

*Investigation was performed under light microscopy following a hematoxylin and eosin staining.

10

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Immunohistochemical staining failed to detect presence of HAAH in proliferating bile ducts at any time. Analysis of HAAH expression in bile ducts derived from sham surgical controls was also negative, while all samples exhibited positive immunoreactivity with control antibodies to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Thus, bile duct proliferation was not associated with increased HAAH expression in this standard animal model system.

HAAH expression in PSC

The liver biopsy specimens from patients with PSC exhibited bile duct proliferation accompanied by periductal fibrosis and a mononuclear inflammatory cell infiltrate without evidence of dysplasia. Adjacent sections immunostained with the an HAAH-specific monoclonal antibody had no detectable HAAH immunoreactivity in proliferating bile ducts. In contrast, sections of cholangiocarcinoma that were immunostained simultaneously using the same antibody and detection reagents manifested intense levels of HAAH immunoreactivity in nearly all tumor cells, whereas adjacent sections of the cholangiocarcinomas exhibited a negative immunostaining reaction with monoclonal antibody to Dengue virus. These findings indicate that HAAH expression was associated with malignant transformation rather than non-cancerous cellular proliferation of intrahepatic bile ducts.

HAAH associated transformation of NIH-3T3 cells

The transforming capability of the murine and human AAH genes, as well as the murine AAH mutant construct without enzymatic activity were compared to mock DNA (negative control) and v-Src transfected NIH-3T3 cells (positive control). The transforming capability of murine AAH was found to be 2-3 times that of vector DNA control as shown in Fig. 1. The transforming capacity of the human gene was greater than that observed with the murine AAH (32 ± 1.5 versus 13 ± 2.6 transformed foci, respectively). The murine and human AAH transfected cells formed large foci, resembling those of v-Src transfected fibroblasts, compared to the occasional much smaller foci observed in cells transfected with vector DNA that displayed the contact inhibition of fibroblast cell lines. Parallel experiments performed using the mutant pNH376-H660 construct without enzymatic activity revealed no transforming activity. This finding indicates that the enzymatic activity of HAAH is required for the transforming activity exhibited by the HAAH gene.

Anchorage-independent cell growth assay

WO 02/092782

PCT/US02/15814

After transient transfection with the murine AAH construct, several different transformed foci were isolated for dilutional cloning experiments to establish stable transfected cell clones with different levels of HAAH gene expression. Nine different cloned cell lines were selected for further study. The expression level of the HAAH protein was determined by Western blot analysis. Clones 7 and 18 had a modest increase in HAAH protein expression, yet formed large colonies in soft agar (Fig. 2). Protein loading was equivalent in all lanes as shown by immunoblotting of the same membranes with an anti-Erk-1 monoclonal antibody. The increased protein expression was associated with increased enzymatic activity as shown in Fig. 3. The capability of these clones to exhibit anchorage independent cell growth in soft agar is presented in Fig. 3. All 3 clones with increased HAAH gene expression demonstrated anchorage independent cell growth compared to the mock DNA transfected clone.

Tumor formation in nude mice

The 3 clones with increased HAAH gene expression were evaluated for the ability to form tumors in nude mice. Tumor size in the mouse given clone 18 was compared to a mock DNA transfected clone. Clones 7, 16 and 18 were highly transformed in this assay and produced large tumors with a mean weight of 2.5, 0.9 and 1.5 grams, respectively (Fig. 4). These data indicate that overexpression of HAAH contributes to induction and maintenance of the malignant phenotype *in vivo*.

High level HAAH expression is indicative of malignancy

In order to determine if HAAH expression was associated with malignancy rather than increased cell turnover, two models of bile duct proliferation were studied. In the animal model, ligation of the common bile duct induced extensive intrahepatic bile duct proliferation, yet there was no evidence of HAAH gene expression under these experimental conditions as shown in Table 3. Similarly, HAAH gene expression was assessed in a human disease model associated with bile duct proliferation since PSC is an autoimmune liver disease associated with destruction as well as proliferation of the intra and extrahepatic bile ducts. PSC is premalignant disease, and a significant proportion of affected individuals will eventually develop cholangiocarcinoma. However, no evidence for increased HAAH gene expression in the presence of extensive bile duct proliferation.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Having established that HAAH protein levels were elevated in cholangiocarcinoma and not in normal or proliferating bile ducts, the role of HAAH in the generation of a malignant phenotype was studied. The HAAH gene was transfected into NIH-3T3 cells and cellular changes, e.g., increased formation of transformed foci, colony growth in soft agar and tumor formation in nude mice associated with malignant transformation, were evaluated. The full-length murine and human AAH genes were cloned into expression constructs and transiently transfected into NIH-3T3 cells. An increased number of transformed foci was detected in cells transfected both with the murine and human AAH genes as compared to mock DNA transfected controls. The increased number of transformed foci, after controlling for transfection efficiency, was not as high compared to v-Src gene transfected cells used as a positive control. The enzymatic activity of the HAAH gene was required for a malignant phenotype because a mutant construct which abolished the catalytic site had no transforming properties. Several stable transfectants and cloned NIH-3T3 cell lines with a modest increase in HAAH protein levels and enzymatic activity were established. Such cell lines were placed in soft agar to examine anchorage independent cell growth as another property of the malignant phenotype. All cell lines grew in soft agar compared to mock DNA transfected control, and there was a positive correlation between the cellular level of HAAH gene expression and the number and size of colonies formed. Three of these cloned cell lines formed tumors in nude mice. All three cell lines with increased HAAH expression were oncogenic as shown by the development of large tumors as another well-known characteristic of the transformed phenotype.

To determine whether cellular changes induced by overexpression of HAAH were related to the enzymatic function, a site-directed mutation was introduced into the gene that changed the ferrous iron binding site from histidine to lysine at 660th position of mouse HAAH thereby abolishing hydroxylase activity of the murine HAAH. A corresponding mutation in HAAH is used as a dominant negative mutant to inhibit HAAH hydroxylase activity. The pNH376-H660 construct had no transformation activity indicating cellular changes of the malignant phenotype induced by overexpression depends on the enzymatic activity of the protein.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Notch receptors and their ligands have several EGF-like domains in the N-terminal region that contain the putative consensus sequence for beta-hydroxylation. Notch ligands are important elements of the Notch signal transduction pathway and interaction of Notch with its ligands occurs by means of EGF-like domains of both molecules. Point mutations affecting aspartic acid or asparagine residues in EGF-like domains that are the targets for beta-hydroxylation by HAAH reduce calcium binding and protein-protein interactions involved in the activation of downstream signal transduction pathways. Overexpression of HAAH and Notch protein hydroxylation by HAAH contributes to malignancy. Tumor growth is inhibited by decreasing Notch protein hydroxylation by HAAH.

10 The data presented herein is evidence that high-level HAAH expression is linked to malignant transformation. An increase in expression of the HAAH cDNA in NIH-3T3 cells induced a transformed phenotype manifested by increased numbers of transformed foci, anchorage-independent growth, and tumorigenesis in nude mice. In addition, intact HAAH-enzyme was found to be required for HAAH-associated transformation. Accordingly, 15 inhibition of as little as 20% of endogenous HAAH enzymatic activity or expression confers a therapeutic benefit. For example, clinical benefit is achieved by 50%-70% inhibition of HAAH expression or activity after administration of an HAAH inhibitory compound compared to the level associated with untreated cancer cell or a normal noncancerous cell.

HAAH is regulated at the level of transcription. Only modest increases in HAAH 20 expression and enzyme activity were required for cellular transformation. These results indicate that increased HAAH gene expression and enzyme activity contribute to the generation or maintenance of the transformed phenotype and that decreasing transcription of the HAAH gene or decreasing enzymatic activity of the HAAH gene product leads to a decrease in malignancy. Accordingly, HAAH transcription is inhibited by administering compounds which decrease 25 binding of Fos and/or Jun (elements which regulate HAAH transcription) to HAAH promoter sequences.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Since HAAH is up-regulated with malignant transformation of bile duct epithelium, and HAAH immunoreactivity is detectable on tumor cell surface membranes, HAAH is also a molecule to which to target a cytotoxic agent, e.g., by linking the cytotoxic agent to a compound that binds to HAAH expressed on the surface of a tumor cell. Assay of HAAH protein levels in
5 either biological fluids such as bile, or cells obtained by fine needle aspiration is a diagnostic marker of human cholangiocarcinoma.

Example 2: Expression of AAH and growth and invasiveness of malignant CNS neoplasms

AAH is abundantly expressed in carcinomas and trophoblastic cells, but not in most normal cells, including those of CNS origin. High levels of AAH expression were observed in
10 of 16 glioblastomas, 8 of 9 anaplastic oligodendrogliomas, and 12 of 12 primitive neuroectodermal tumors (PNETs). High levels of AAH immunoreactivity were primarily localized at the infiltrating edges rather than in the central portions of tumors. Double-label immunohistochemical staining demonstrated a reciprocal relationship between AAH and tenascin, a substrate for AAH enzyme activity. PNET2 neuronal cell lines treated with phorbol ester
15 myristate or retinoic acid to stimulate neurite extension and invasive growth exhibited high levels of AAH expression, whereas H₂O₂-induced neurite retraction resulted in down-regulation of AAH. PNET2 neuronal cells that stably over-expressed the human AAH cDNA had increased levels of PCNA and Bcl-2, and reduced levels of p21/Waf1 and p16, suggesting that AAH overexpression results in enhanced pathological cell proliferation, cell cycle progression, and
20 resistance to apoptosis. In addition, the reduced levels of p16 observed in AAH-transfectants indicate that AAH over-expression confers enhanced invasive growth of neoplastic cells since deletion or down-regulation of the p16 gene correlates with more aggressive and invasive in vivo growth of glioblastomas. Increased AAH immunoreactivity was detected at the infiltrating margins of primary malignant CNS neoplasms, further indicating a role of HAAH in tumor
25 invasiveness.

The following materials and methods were used to generate the data described below.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Analysis of AAH Immunoreactivity in Primary Human Malignant CNS Neoplasms:

AAH immunoreactivity was examined in surgical resection specimens of glioblastoma
 5 (N=16), anaplastic oligodendroglioma (N=9), and primitive neuroectodermal tumor (PNET;
 supratentorial neuroblastomas (N=3) and medulloblastomas (N=9). The histopathological
 sections were reviewed to confirm the diagnoses using standard criteria. Paraffin sections from
 blocks that contained representative samples of viable solid tumor, or tumor with adjacent intact
 tissue were studied. Sections from normal adult postmortem brains (N=4) were included as
 10 negative controls. AAH immunoreactivity was detected using qn HAAH-specific monoclonal
 antibody. Immunoreactivity was revealed by the avidin-biotin horseradish peroxidase complex
 method (Vector ABC Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) using 3-3'
 diaminobenzidine (DAB) as the chromogen (24) and hematoxylin as a counterstain.

Tenascin and laminin are likely substrates for AAH due to the presence of EGF-like
 15 repeats within the molecules. Double-immunostaining studies were performed to co-localize
 AAH with tenascin or laminin. The AAH immunoreactivity was detected by the ABC method
 with DAB as the chromogen, and tenascin or laminin immunoreactivity was detected by the
 avidin-biotin alkaline phosphatase complex method (Vector Laboratories, Burlingame, CA) with
 BCIP/NBT as the substrate. As positive and negative controls, adjacent sections were
 20 immunostained with monoclonal antibody to glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Hepatitis
 B surface antigen. All specimens were batch immunostained using the same antibody dilutions
 and immunodetection reagents.

25

Cell Lines and Culture Conditions

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Studies were conducted to determine whether AAH expression was modulated with neurite (filopodia) extension (sprouting) as occurs with invasive growth of malignant neoplasms. Human PNET2 CNS-derived and SH-Sy5y neuroblastoma cells were cultured and stimulated for 0, 1, 2, 3, 5, or 7 days with 100 nM phorbol 12-ester 13-acetate or 10 μ M retinoic acid to induce sprouting. In addition, to examine the effects of neurite retraction on AAH expression, subconfluent cultures were treated for 24 hours with low concentrations (10–40 μ M) of H₂O₂. For both studies, AAH expression was evaluated by Western blot analysis using the an HAAH-specific antibody.

Generation of PNET2 AAH-transfected Clones

The full-length human AAH cDNA (SEQ ID NO:3) was ligated into the pcDNA3.1 mammalian expression vector in which gene expression was under the control of a CMV promoter (Invitrogen Corp., San Diego, CA). PNET2 cells were transfected with either pHAAH or pcDNA3 (negative control) using Cellfectin reagent (Gibco BRL, Grand Island, NY). Neomycin-resistant clones were selected for study if the constitutive levels of AAH protein expression were increased by at least two-fold relative to control (pcDNA3) as detected by Western blot analysis. To determine how AAH overexpression altered the expression of genes that modulate the transformed phenotype, the levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), p53, p21/Waf1, Bcl-2, and p16 were measured in cell lysates prepared from subconfluent cultures of AAH (N=5) and pcDNA3 (N=5) stably transfected clones. PCNA was used as marker of cell proliferation. p53, p21/Waf1, and Bcl-2 levels were examined to determine whether cells that over-expressed AAH were more prone to cell cycle progression and more resistant to apoptosis. The levels of p16 were assessed to determine whether AAH over-expression has a role in tumor invasiveness.

Western blot analysis

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Cells grown in 10 cm² dishes were lysed and homogenized in a standard radioimmunoprecipitation assay RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors. The supernatants collected after centrifuging the samples at 12,000 x g for 10 minutes to remove insoluble debris were used for Western blot analysis. Protein concentration was measured using the BCA assay (Pierce Chemical Co, Rockford, IL). Samples containing 60 µg of protein were electrophoresed in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and subjected to Western blot analysis. Replicate blots were probed with the individual antibodies. Immunoreactivity was detected with horseradish peroxidase conjugated IgG (Pierce Chemical Co, Rockford, IL) and enhanced chemiluminescence reagents. To quantify the levels of protein expression, non-saturated autoradiographs were subjected to volume densitometry using NIH Image software, version 1.6. Statistical comparisons between pHAAH and pcDNA3 transfected cells were made using Student T tests.

Antibodies

HAAH-specific monoclonal antibody generated against the FOCUS hepatocellular carcinoma cells were used to detect AAH immunoreactivity. Monoclonal antibodies to tenascin, and glial fibrillary acidic protein, and rabbit polyclonal antibody to laminin were purchased from Sigma Co. (St. Louis, MO). Rabbit polyclonal antibody to human p16 was purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). The 5C3 negative control monoclonal antibody to Hepatitis B surface antigen was generated using recombinant protein and used as a negative control.

25

AAH immunoreactivity in primary malignant brain tumors

WO 02/092782

PCT/US02/15814

AAH immunoreactivity was detected in 15 of 16 glioblastomas, 8 of 9 anaplastic oligodendrogliomas, and all 12 PNETs. AAH immunoreactivity was localized in the cytoplasm, nucleus, and cell processes. The tissue distribution of AAH immunoreactivity was notable for the intense labeling localized at the interfaces between tumor and intact brain, and the conspicuously lower levels of immunoreactivity within the central portions of the tumors. High levels of AAH immunoreactivity were also observed in neoplastic cells distributed in the subpial zones, leptomeninges, Virchow-Robin perivascular spaces, and in individual or small clusters of neoplastic cells that infiltrated the parenchyma. In contrast, AAH immunoreactivity was not detectable in normal brain. The distribution of AAH immunoreactivity appeared not to be strictly correlated with DNA synthesis since the density of nuclei in mitosis (1-5%) was similar in the central and peripheral portions of the tumors.

Relationship between AAH and tenascin immunoreactivity in glioblastomas

Tenascin is an extracellular matrix-associated antigen expressed in malignant gliomas. Tenascin contains EGF-like domains within the molecule, a substrate for HAAH hydroxylation. To localize AAH in relation to tenascin immunoreactivity in malignant brain tumors, double-label immunohistochemical staining was performed in which AAH was detected using a brown chromogen (DAB), and tenascin, a blue chromogen (BCIP/NBT). Adjacent sections were similarly double-labeled to co-localize AAH with laminin, another EGF domain containing extracellular matrix molecule expressed in the CNS. Intense levels of tenascin immunoreactivity were observed in perivascular connective tissue and in association with glomeruloid proliferation of endothelial cells. The double-labeling studies demonstrated a reciprocal relationship between AAH and tenascin immunoreactivity such that high levels of AAH were associated with low or undetectable tenascin, and low levels of AAH were associated with abundant tenascin immunoreactivity. Although laminins are also likely substrates for AAH enzyme activity due to the EGF repeats within the molecules, double labeling studies revealed only low levels of laminin immunoreactivity throughout the tumors and at interfaces between tumor and intact tissue.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

5

Analysis of AAH expression in neuronal cell lines treated with PMA or RA

- 10 Neuritic sprouting/filopodia extension marks invasive growth of neoplastic neuronal cells. PMA activates protein kinase C signal transduction pathways that are involved in neuritic sprouting. Retinoic acid binds to its own receptor and the ligand-receptor complex translocates to the nucleus where it binds to specific consensus sequences present in the promoter/enhancer regions of target genes involved in neuritic growth. Both PNET2 and SH-Sy5y cells can be
- 15 induced to sprout by treatment with PMA (60-120 nM) or retinoic acid (5-10 μ M). Figs. 5A-D depict data from representative Western blot autoradiographs; the bar graphs correspond to the mean \pm S.D. of results obtained from three experiments. Western blot analysis with the FB50 antibody detected doublet bands corresponding to protein with an molecular mass of approximately 85 kDa. Untreated PNET2 cells had relatively low levels of AAH
- 20 immunoreactivity (Fig. 5A), whereas untreated SH-Sy5y cells had readily detected AAH expression (Fig. 5B). Untreated PNET2 cells exhibited polygonal morphology with coarse, short radial cell processes, whereas SH-Sy5y cells were slightly elongated and spontaneously extend fine tapered processes. Both cell lines manifested time-dependent increases in the levels of AAH immunoreactivity following either RA (Figs. 5A and 5B) or PMA (Fig. 5C) stimulation and
- 25 neurite extension. In PNET2 cells, the levels of AAH protein increased by at least two-fold 24 hours after exposure to RA or PMA, and high levels of AAH were sustained throughout the 7 days of study. In SH-Sy5y cells, the RA- or PMA-stimulated increases in AAH expression occurred more gradually and were highest after 7 days of treatment (Fig. 5B).

WO 02/092782

PCT/US02/15814

To examine the effect of AAH expression on neurite retraction, PNET2 and SH-Sy5y cells were treated with low concentrations (8-40 μ M) of H_2O_2 . After 24 hours exposure to up to 40 μ M H_2O_2 , although most cells remained viable (Trypan blue dye exclusion), they exhibited neurite retraction and rounding. Western blot analysis using the FB50 antibody demonstrated

5 H_2O_2 dose-dependent reductions in the levels of AAH protein (Fig. 5D).

Effects of AAH over-expression in PNET2 cells

To directly assess the role of AAH overexpression in relation to the malignant phenotype, PNET2 cells were stably transfected with the human full-length cDNA with gene expression under control of a CMV promoter (pHAAH). Neomycin-resistant clones that had at

10 least two-fold higher levels of AAH immunoreactivity relative to neomycin-resistant pcDNA3 (mock) clones were studied. Since aggressive behavior of malignant neoplasms is associated with increased DNA synthesis, cell cycle progression, resistance to apoptosis, and invasive growth, the changes in phenotype associated with constitutive over-expression of AAH were characterized in relation to PCNA, p21/Waf1, p53, Bcl-2, and p16. PCNA was used as an index of DNA synthesis

15 and cell proliferation. p21/Waf1 is a cell cycle inhibitor. Expression of the p53 tumor-suppressor gene increases prior to apoptosis, whereas bcl-2 inhibits apoptosis and enhances survival of neuronal cells. p16 is an oncosuppressor gene that is often either down-regulated or mutated in infiltrating malignant neoplasms.

Five pHAAH and 5 pcDNA3 clones were studied. Increased levels of AAH

20 expression in the pHAAH transfected clones was confirmed by Western (Fig. 6) and Northern blot analyses. Western blot analysis using cell lysates from cultures that were 70 to 80 percent confluent demonstrated that constitutively increased levels of AAH expression (approximately 85 kDa; $P<0.05$) in pHAAH-transfected cells were associated with significantly increased levels of PCNA (approximately 35 kDa; $P<0.01$) and Bcl-2 (approximately 25 kDa; $P<0.05$), and reduced

25 levels of p21/Waf1 (approximately 21 kDa; $P<0.001$) and p16 (approximately 16 kDa; $P<0.001$) (Fig. 6). However, the pHAAH stable transfectants also exhibited higher levels of wild-type p53 (approximately 53-55 kDa). Although AAH expression (85 kDa protein) in the stable transfectants was increased by only 75 to 100 percent, the levels of p16 and p21/Waf1 were sharply reduced, and PCNA increased by nearly two-fold (Fig. 6).

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Increased AAH expression is indicative of growth and invasiveness of malignant CNS neoplasms

The data described herein demonstrates that AAH overexpression is a diagnostic tool by which to identify primary malignant CNS neoplasms of both neuronal and glial cell origin.

- 5 Immunohistochemical staining studies demonstrated that AAH overexpression was detectable mainly at the interfaces between solid tumor and normal tissue, and in infiltrating neoplastic cells distributed in the subpial zones, leptomeninges, perivascular spaces, and parenchyma. *In vitro* experiments demonstrated that AAH gene expression was modulated with neurite (filopodium) extension and invasiveness and down-regulated with neurite retraction. In addition, PNET2 cells
- 10 stably transfected with the AAH cDNA exhibited increased PCNA and bcl-2, and reduced Waf1/p21 and p16 expression. Therefore, AAH overexpression contributes to the transformed phenotype of CNS cells by modulating the expression of other genes that promote cellular proliferation and cell cycle progression, inhibit apoptosis, or enhance tumor cell invasiveness.

- The data demonstrated readily detectable AAH mRNA transcripts (4.3 kDa and 2.6 kDa)
- 15 and proteins (85 kDa and 50-56 kDa) in PNET2 and SH-Sy5y cells, but not in normal brain. Correspondingly, high levels of AAH immunoreactivity were observed in 35 of the 37 in malignant primary CNS-derived neoplasms studied, whereas the 4 normal control brains had no detectable AAH immunoreactivity. The presence of high-level AAH immunoreactivity at the infiltrating margins and generally not in the central portions of the tumors indicates that AAH
- 20 overexpression is involved in the invasive growth of CNS neoplasms. Administration of compounds which decrease AAH expression or enzymatic activity inhibits proliferation of CNS tumors which overexpress AAH, as well as metastases of CNS tumors to other tissue types.

- The AAH enzyme hydroxylates EGF domains of a number of proteins. Tenascin, an extracellular matrix molecule that is abundantly expressed in malignant gliomas, contains
- 25 EGF-like domains. Since tenascin promotes tumor cell invasion, its abundant expression in glioblastomas represents an autocrine mechanism of enhanced tumor cell growth vis-a-vis the frequent overexpression of EGF or EGF-like receptors in malignant glial cell neoplasms. Analysis of the functional domains of tenascins indicated that the mitogenic effects of this family of molecules are largely mediated by the fibronectin domains, and that the EGF-like domains

WO 02/092782

PCT/US02/15814

inhibit growth, cell process elongation, and matrix invasion. Therefore, hydroxylation of the EGF-like domains by AAH represents an important regulatory factor in tumor cell invasiveness.

Double-label immunohistochemical staining studies demonstrated a reciprocal relationship between AAH and tenascin immunoreactivity such that high levels AAH immunoreactivity present at the margins of tumors were associated with low levels of tenascin, and low levels of AAH were often associated with high levels of tenascin. These observations indicated that AAH hydroxylation of EGF-like domains of tenascin alters the immunoreactivity of tenascin protein, and in so doing, facilitates the invasive growth of malignant CNS neoplasms into adjacent normal tissue and perivascular spaces.

AAH immunoreactivity was examined in PNET2 and SH-Sy5y neuronal cells induced to undergo neurite extension with PMA or retinoic acid, or neurite retraction by exposure to low doses of H_2O_2 . AAH expression was sharply increased by PMA- or retinoic acid-induced neurite (filopodium) extension, and inhibited by H_2O_2 -induced neurite retraction and cell rounding. Neurite or filopodium extension and attachment to extracellular matrix are required for tumor cell invasion in the CNS. The EGF-like domains of tenascin inhibit neuritic and glial cell growth into the matrix during development.

To directly examine the role of AAH overexpression in relation to the transformed phenotype, genes modulated with DNA synthesis, cell cycle progression, apoptosis, and tumor invasiveness were examined in neuronal cell clones that stably over-expressed the human AAH cDNA. The findings of increased PCNA and reduced Waf1/p21 immunoreactivity indicated that AAH overexpression enhances cellular proliferation and cell cycle progression. In addition, the finding of increased Bcl-2 expression indicated that AAH overexpression contributes to the transformed phenotype by increasing cellular resistance to apoptosis. The apparently contradictory finding of higher levels of p53 in the cells that overexpressed AAH is explained by the observation that high levels of wildtype p53 in immature neuronal cells were associated with neuritic growth (invasiveness) rather than apoptosis. Levels of p16 were reduced (compared to normal cells) or virtually undetectable in cells that constitutively overexpressed AAH; a deletion mutation of the p16 gene has been correlated with invasive growth and more rapid progression of malignant neoplasms, including those of CNS origin. These data indicate that p16 expression is modulated by AAH.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Example 3: Increased HAAH production and IRS-mediated signal transduction

IRS-1 mediated signal transduction pathway is activated in 95% of human HCC tumors compared to the adjacent uninvolved liver tissue. HAAH is a downstream effector gene involved in this signal transduction pathway. HAAH gene upregulation is closely associated with overexpression of IRS-1 in HCC tumors as revealed by immunohistochemical staining and Western blot analysis. A high level of HAAH protein is expressed in HCC and cholangiocarcinoma compared to normal hepatocytes and bile ducts. Both of these tumors also exhibit high level expression of IRS-1 by immunohistochemical staining. FOCUS HCC cell clones stably transfected with a C-terminal truncated dominant negative mutant of IRS-1, which blocks insulin and IGF-1 stimulated signal transduction, was associated with a striking reduction in HAAH gene expression in liver. In contrast, transgenic mice overexpressing IRS-1 demonstrate an increase in HAAH gene expression by Western blot analysis. Insulin stimulation of FOCUS HCC cells (20 and 40 U) in serum free medium and after 16 hr of serum starvation demonstrated upregulation of HAAH gene expression. These data indicate that HAAH gene expression is a downstream effector of the IRS-1 signal transduction pathway.

Example 4: Effects of HAAH expression levels on the characteristics of the malignant phenotype

Overexpression of IRS-1 in NIH 3T3 cells induces transformation. The full-length murine HAAH construct was cloned into the pcDNA3 eukaryotic expression vector. A second murine construct encoded HAAH with abolished catalytic activity due to a site directed mutation. The full-length human HAAH cDNA was cloned into the pcDNA3 expression vector as well as a plasmid that encodes v-src which was used as a positive control for transformation activity. Standard methods were used for transfection of NIH 3T3 cells, control for transfection efficiency, assays of HAAH enzymatic activity, transformation by analysis of foci formation, anchorage-independent cell growth assays and analysis of tumorigenicity in nude mice. The data indicated that HAAH overexpression is associated with generation of a malignant phenotype.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Table 4: Overexpression of enzymatically active HAAH
indicates malignancy

cDNA	# of foci \pm S.D. ^b	NIH 3T3 clone	# of colonies ^c
pcDNA3 (mock)	6.0 ± 3.3	PcDNA (mock)	0.4 ± 0.5
murine HAAH	14.0 ± 2.9	clone 18 ^d	6.2 ± 2.9
mutant murine HAAH ^a	1.6 ± 1.0	clone 16 ^e	4.7 ± 6.5
human HAAH	32.0 ± 5.4		
v-scr	98.0 ± 7.1		

a. enzymatically inactive HAAH

b. $P < 0.01$ compared to mock and mutant murine HAAH

5 c. $P < 0.001$ compared to mock

d. Clone 18 is a stable cloned NIH 3T3 cell line that overexpresses human HAAH by approximately two fold.

e. Clone 16 is a stable cloned NIH 3T3 cell line that overexpresses human HAAH by about 50%.

These data indicate that overexpression of HAAH is associated with formation of

- 10 transformed foci. Enzymatic activity is required for cellular transformation to occur. Cloned NIH 3T3 cell lines with increased human HAAH gene expression grew as solid tumors in nude mice. HAAH is a downstream effector gene of the IRS-1 signal transduction pathway.

Example 5: Inhibition of HAAH gene expression

- 15 The FOCUS HCC cell line from which the human HAAH gene was initially cloned has a level of HAAH expression that is approximately 3-4 fold higher than that found in normal liver. To make an HAAH antisense construct, the full length human HAAH cDNA was inserted in the opposite orientation into a retroviral vector containing a G418 resistant gene, and antisense RNA was produced in the cells. Shorter HAAH antisense nucleic acids, e.g., those corresponding to exon 1 of the HAAH gene are also used to inhibit HAAH expression.

- 20 FOCUS cells were infected with this vector and the level of HAAH was determined by Western blot analysis. A reduction in HAAH gene expression was observed. Growth rate and morphologic appearance of cells infected with a retrovirus containing a nonrelevant Green

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Fluorescent Protein (GFP) also inserted in the opposite orientation as a control (Fig. 8). Cells (harboring the HAAH antisense construct) exhibited a substantial change in morphology characterized by an increase in the cytoplasm to nuclear ratio as well as assuming cell shape changes that were reminiscent of normal adult hepatocytes in culture. Cells with reduced HAAH levels grew at a substantially slower rate than retroviral infected cells expressing antisense (GFP) (control) as shown in Fig. 8. A reduction in HAAH gene expression was associated with a more differentiated noncancerous "hepatocyte like" phenotype. Expression of HAAH antisense sequences are used to inhibit tumor growth rate. Reduction of HAAH cellular levels results in a phenotype characterized by reduced formation of transformed foci, low level or absent anchorage independent growth in soft agar, morphologic features of differentiated hepatocytes as determined by light and phase contrast microscopy, and no tumor formation (as tested by inoculating the cells into nude mice).

Example 6: Inhibition of AAH expression by AAH antisense oligonucleotides

Oligonucleotides that inhibit AAH gene expression were designed and synthesized using standard methods. For example, antisense oligonucleotides (20 mers) were designed to bind to the 5' region of the AAH mRNA and overlap with the AUG initiation codon (Table 5). The antisense oligonucleotides were selected such that they were complementary to sequences beginning 1 (Location -1), 6 (Location -6), or 11 (Location -11) nucleotides upstream (prior to) the "A" of the AUG (methionine) codon. In addition, a sense oligonucleotide beginning at Location -3 was made.

Table 5: Sequence of exemplary oligonucleotide molecules

Location (-1)
5' CAT TCT TAC GCT GGG CCA TT 3' (SEQ ID NO:10)

25 Location (-6)
5' TTA CGC TGG GCC ATT GCA CG 3' (SEQ ID NO:11)

Location (-11)
5' CTG GGC CAT TGC ACG GTC CG 3' (SEQ ID NO:12)

30 Sense
5' ATC ATG CAA TGG CCC AGC GTA A 3' (SEQ ID NO:13)

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Fig. 10 shows the region of the AAH gene to which the antisense oligonucleotides described in Table 5 bind. All of the oligonucleotides were designed using MacVector 6.5.3 software.

AAH antisense oligonucleotides tested were found to inhibit AAH gene expression. Using an *in vitro* cell free transcription translation assay (TNT Quick Coupled System), the human AAH cDNA (pHAAH) was used to synthesize AAH protein. *In vitro* translation was achieved with rabbit reticulocyte lysate included in the reaction mixture. The translated product was labeled with [³⁵S] methionine in the presence of reaction buffer, RNA polymerase, amino acid mixture, and ribonuclease inhibitor (RNAsin). The products were analyzed by SDS-PAGE followed by autoradiography. A luciferase (Luc) expressing plasmid was used as a positive control. In the second and third lanes, synthesis of the ~85 kD AAH protein is shown (AAH, arrow) using 1 or 2 micrograms of plasmid as the template and the T7 DNA-dependent RNA polymerase primer/promoter to generate mRNA. The addition of 100x or 1000x excess antisense oligonucleotide primer resulted in progressively greater degrees of inhibition of AAH protein synthesis, whereas the inclusion of the same amounts of sense oligonucleotide had no effect on AAH protein synthesis. Further studies demonstrated complete inhibition of AAH protein synthesis only with the antisense oligonucleotides. In addition, effective inhibition of gene expression was observed using all three antisense oligonucleotides tested. Fig. 11 shows the results of an *in vitro* transcription/translation analysis of AAH antisense oligonucleotides and shows that the antisense oligonucleotides tested block translation of the HAAH RNA and subsequent protein synthesis of HAAH protein.

Inhibition of AAH gene expression was also tested in cells. Fig. 11 shows the results of a Microtiter In situ Luminescence Quantification (MILQ) Assay and demonstrates the actual effect of the antisense oligonucleotides inside cells. Substantial reduction in HAAH gene expression was detected by simply adding the antisense oligonucleotides to the culture medium of the cells. The MILQ assay quantifies *in situ* hybridization binding in cultured cells without the need for RNA extraction. The MILQ assay was used to study competitive antisense binding inhibition to illustrate that the antisense probe hybridized to the mRNA expressed endogenously within the Sh-SySy neuroblastoma cells. In this figure, inhibition of FITC-labeled Location -6 antisense oligonucleotide binding using specific unlabeled antisense oligonucleotides is shown.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

- Minimal inhibition of binding was observed using non-relevant oligonucleotides. The unlabeled specific oligonucleotide was capable of effectively competing for the binding site designated by the FITC-conjugated Location -6 probe, whereas the non-relevant probe exhibited significantly less inhibition at the same molar concentration. Bound probe (FITC-labeled) was detected using
- 5 horseradish peroxidase conjugated antibodies to FITC, and luminescence reagents were used to detect the bound antibody. Luminescence units were corrected for cell density and are arbitrary in nature. These data indicate that cells effectively take up antisense oligonucleotides in the surrounding environment and that the oligonucleotides taken up effectively and specifically inhibit HAAH gene expression.
- 10 Inhibition of HAAH gene expression is enhanced by contacting cells with a phosphorothioate derivative of the HAAH antisense. Phosphorothioate antisense derivatives are made using methods well known in the art. Fig. 13 shows inhibition of AAH gene expression due to antisense (Location -6) oligonucleotide gene delivery into SH-Sy5y neuroblastoma cells. The MILQ assay was used to measure gene expression resulting from antisense oligonucleotide gene
- 15 delivery. Cells were contacted with AAH Location -6 antisense DNA, and AAH protein expression was measured using methods known in the art, e.g., the MICE assay (de la Monte, et al, 1999, Biotechniques), to determine if it was inhibited by hybridization with the oligonucleotide. The MICE assay is used to measure immunoreactivity in cultured cells without the need to extract proteins or perform gel electrophoresis. This assay is more sensitive than
- 20 Western blot analysis. Using the MICE assay, AAH immunoreactivity was assessed in cells transfected with non-relevant (random) oligonucleotide sequences, specific antisense oligonucleotides (Location -6), and a phosphorothioate Location -6 antisense oligonucleotide. Phosphorothioate chemical modification of the oligonucleotide was found to permit greater stability of the DNA inside the cell since the sulfur group protects the DNA from the degradation
- 25 that normally occurs with phosphodiester bonds and cellular nucleases. Antisense AAH oligonucleotide (Location -6) transfection resulted in reduced levels of AAH immunoreactivity, and using the phosphorothioate linked Location -6 antisense oligonucleotide, the effect of inhibiting AAH gene expression was substantial relative to the levels observed in cells transfected with the random oligonucleotide. The more effective inhibition of AAH expression using the
- 30 phosphorothioate-linked antisense oligonucleotide was likely due to the greater stability of the

WO 02/092782

PCT/US02/15814

molecule combined, with retained effective binding to mRNA.

Example 7: Human IRS-1 mutants

- Insulin/IGF-1 stimulated expression of HAAH in HCC cell lines. Dominant-negative IRS-1 cDNAs mutated in the plextrin and phosphotyrosine (PTB) domains, and Grb2, Syp and
- 5 PI3K binding motifs located in the C-terminus of the molecule were constructed. Human IRS-1 mutant constructs were generated to evaluate how HAAH gene expression is upregulated by activation of the IRS-1 growth factor signal transduction cascade. Specific mutations in the C terminus of the hIRS-1 molecule abolished the various domains which bind to SH2-effector proteins such as Grb2, Syp and PI3K. The human IRS-1 protein contains the same Grb2 and Syp
- 10 binding motifs of 897YVNI (underlined in Table 5, below and 1180YIDL (underlined in Table 5, below), respectively, as the rat IRS-1 protein. Mutants of hIRS-1 were constructed by substitution of a TAT codon (tyrosine) with a TTT codon (phenylalanine), in these motifs by use of oligonucleotide-directed mutagenesis using the following primers:
- (5'-GGGGGAATTTGTCAATA-3' (SEQ ID NO:8) and 5'-GAATTTGTTAATATTG-3' (SEQ ID
- 15 NO:9), respectively). The cDNAs of hIRS-1 (wild-type) and mutants (tyrosine 897-to-phenylalanine and tyrosine 1180-to-phenylalanine) were subcloned into the pBK-CMV expression vector and designated as hIRS-1-wt, 897F, ΔGrb2, 1180F, and ΔSyp.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Table 6: Human IRS-1 amino acid sequence

	MASPPESDGF	SDVRKVGYL	KPKSMHRRFF	VLRAASEAGG	PARLEYVENE	KKWRHKSSAP	61
	KRSIPLESCF	NINKRADSKN	KHLVALYTRD	EHFAIAADSE	AEQDSWYQAL	LQLHNRAKGH	121
5	HDGAAALGAG	GGGSCSGSS	GLGEAGEDLS	YGDVPPCPAF	KEVWQVILKP	KGLGQTKNLI	181
	QIVRLCLTSK	TISFVKLNSE	AAAVVLQLMN	IRRCGHSENF	FFIEVGRSAV	TGPGEFQMQLV	241
	DDSVVAQNMH	ETILEAMRAM	SDEFPRPSKS	QSSSNCSNFI	SVPLRRHHLL	NPPPSQVGLT	301
	RRSRTESITA	TSPASMVGGK	PGSFRVRASS	DQEGTMSRPA	SVDSGSPVSPS	TNRTHAHRHR	361
	GSARLHPPLN	HSRGIIMPAS	RCSPSATSPV	SLSSSSTSGH	GSTSDCLFPR	RSSASVSGSP	421
10	SDGGFISSDE	YGSSPCDFRS	SFRSVTPDSL	GHTPPARGEE	ELSNYICMGG	KGPSTLTAPN	481
	CHYLIRSGGN	GHRCTFQDGL	QTSFALAGDE	AASAADLDNR	FRKRTHSAGT	SPTITHQKTE	541
	SQSSVASIEE	YTEMMPAYPP	GGGSGRLPG	HRHSAPVPTP	SYPEEGLEMH	PLERRGGHHR	601
	PDSSTLTHDD	GYPMSPGVA	PVPSGRKGSQ	DYMPMSPKSV	SAPQIINPI	RRHPQVDPFN	661
	GYMMSPSGG	CSPDIGGGPS	SSSSSNNAV	SOTSYGKLWT	NGVGGHSHV	LPHKPPVPS	721
15	SGGKILPCTG	DYMNSPVGD	SNTSSPSDCY	YGPEDPQHKP	VLSYYSLFRS	FKHTQPGEP	781
	EGARHGHRL	LSTSSGRLLY	AATADSSSS	TSDSLGGGY	CGARLEPSLP	HPHQVQLPH	841
	LPRKVDIAQ	TNSRIARPTR	LSLGDPKAST	LPRARQQQQ	QQPLLEHPEP	KSPGEVYVIE	901
	FGSDQSGYLS	GPVAFHSSPS	VRCPSQLQPA	PRESETGTTEE	YMKMDLGPGR	RAAWQESTGV	961
	EMGRLGPAAP	GAASICRPR	AVPSRQDYM	TQMCSQPRQS	YVDTSPAAPV	SYADMRTGIA	1021
20	AEVSLPRAT	MAAASSSSAA	SASPTGPQGA	AELAAHSSLL	GGPCGPGGMS	AFTRVNLSPN	1081
	RNQSASVIRA	DPQGCRRRHS	SETFSTPSA	TRVNTVPFG	AGAAVGGGGG	SSSSSEEDVKR	1141
	HSSASFENW	LRPGELGGAP	KEPAKLCGAA	CGLENLNYI	DLDLVKDFKQ	CPQECTPEPQ	1201
	PPPPPPHQP	LGSSESSSTR	RSSEDLAAYA	SISFQKQPED	RO (SEQ ID NO:5)	GENBANK Accession	
	No. JS0670; pleckstrin domain spans residues 11-113, inclusive; Phosphate-binding residues						
25	include 46, 463, 551, 612, 632, 662, 732, 941, 989, or 1012 of SEQ ID NO:5)						

Table 7: Human IRS-1 cDNA

	cgcgcgcgcgc	gtcggagggg	gccgcgcgcgc	agagccagac	gccgcgcgcgc	gttttggttg	61
30	gggctctcgc	caactctccg	aggaggagga	ggaggaggga	ggaggaggga	agtaactgca	121
	gcggcagcgc	cctcccaggg	aacaggcgct	ttcccgaac	cctcccgaac	ccctcccgaac	181
	ccccctcgcg	ccttgcctcc	tcccctcctc	cccagccgac	tggagcgagg	ggcaggatg	241
	agctcgtccc	tccggccggg	ccccagctgc	agtggtgccc	cggtatcggt	tcgcatggaa	301
	aagccacttt	ctccaccgcg	cgagatgggc	ccggtatggg	ctgcagagga	cgcccccgcg	361
35	ggcggcgagg	gcagcagcag	cagcagcagc	agcaacagca	acagcccgag	cgcccgcggtc	421
	tctgcgactg	agctggtatt	tggcgcgctg	gtggcgcgctg	ggacggttgg	ggggtgggag	481
	gagggcgagg	aggaggagga	accccgctga	acgttgggac	ttggcaaccc	gcctcccctc	541
	gcccaaggat	atttaatttg	cctcgggaat	cgctgcttcc	agaggggaac	tcaggaggga	601
	aggcgcgcg	gcgcgcgcgc	tcccgagggg	gcacgcgagg	gaccccgagc	tgtcgcctcc	661
40	ctgtgcccga	ctccagccgc	ggcgacgaga	gatgcattct	cgctccttcc	tgttggcggc	721
	ggcggctcga	aggagacttg	gctctcggag	gatcggggct	gcccctaccc	cggaagcact	781
	gctccccgcg	cgccgtgaag	cgcccgaaaa	ctccggtcgg	gctctctcct	gggctcagca	841
	gctcgtcctc	ccttcagctg	cccccccccg	gcgcgggggg	cgccgtggat	ttcagagtcg	901
	gggtttctgc	tgcctccagc	cctgtttgca	tgtgcggggc	cgccgagagg	agcctccgac	961
45	cccccccgcg	ttgtttttcg	gagcctccct	ctgctcagcg	ttgtgtgtgg	cggtggcagc	1021
	atggcgagcc	ctccggagag	cgatggtctc	tcggacgtgc	gcaaggtggg	ctacctgcgc	1081
	aaacccaaga	gcattgcacaa	acgtttcttc	gtactgcgcg	cgcccgagca	ggctgggggc	1141
	ccggcgccgc	tcgagtaact	cgagaacgag	aagaagtggc	ggcacaagtc	gagcgccccc	1201
	aaacgctcga	tcccccttga	gagctgcttc	aacatcaaca	agcgggctga	ctcccaagaac	1261
50	aagcaccctg	tggtctctca	caccggggac	gagcactttg	ccatcgcggc	ggacagcgag	1321
	gccgagcaag	acagctggta	ccaggctctc	ctacagctgc	acaaccgctg	taaggggccac	1381

WO 02/092782

PCT/US02/15814

cagcagcgag ctgcggccct cggggcgagg ggtggtgggg gcagctgcag cggcagctcc 1441
 ggccttggtg aggtctggga ggacltgagc tacggtgagc tgccccagag acccgcatcc 1501
 aaagaggtct ggcaagtgat cctgaagccc aagggccctg gtccagacaa gaacctgatt 1561
 ggtatctacc gctttgctct gaccagcaag accatcagct togtgaagct gaactcggag 1621
 5 gcagcgcccg tgggtgctga gctgalgaac atcaggcgct gtggccaact ggaaacttc 1681
 ttcttcatcg aggtgggccc ttctgcctgt acggggcccg gggagttctg gatgcaggtg 1741
 gatgactctg tgggtggccc gaacatgcac gagaccatcc tggaggccat gcgggcatg 1801
 agtgatgagt tccgcccctg cagcaagagc cagtcctcgt ccaactgctc taacccatcc 1861
 agcgtccccc tgcgcccga ccatctcaac aatccccgc ccagccaggt ggggctgacc 1921
 10 ccgcgatcac gcactgagag catcacgcc acctccccg ccagcatggt gggcggaag 1981
 ccaggtcctc tccgtgtccg cgcctccagt gaaggcgagg gcaccatgtc ccgcccagcc 2041
 tccgtggagc gcagccctgt gactcccaag accaacagaa cccacgccc ccgcatcgg 2101
 ggcagcgccc ggtgcaaccc cccgctcaac cagacccgtt ccatcccat gccggcttcc 2161
 cgtctgctcg cttcgcccac cagcccggtc agtctgtgt ccagtagcac cagtggcat 2221
 15 ggcctccact cggattgtct cttcccagg cgtctcagtc cttcggtgtc tgggtccccc 2281
 agcgtggggc gtttcatctc ctcggatgag tatggctcca gtccctgca tttccggagt 2341
 tccctccgca ggtcactccc ggaattccct ggccacaccc caccagccc cggtagggag 2401
 gagctaaaga actatattct catgggtggc aagggccctt cccactgac gcccccac 2461
 20 ggtcactaca tttgtctcgc ggggggcaat ggccacccgt gcacccagag aacaggcttg 2521
 ggcacagagc cagccttggc tggggatgaa gcagccagtg ctgcagatct ggataatcgg 2581
 ttccgaaaga gaactcaact ggcaggcaca tccctcaaca ttaccacaa gaagaccgcc 2641
 tcccagctct cagtggtctc catlgaggag taacacagaa tgatgctgtc ctaccacaa 2701
 ggaagtggca gtggaggccg actgcccggg caacggcaact ccgcttggag gccaccgcc 2761
 tccatccagg agggagggtc ggaatggcac cccttggag gtccgggggg gccaccgcc 2821
 25 ccagacagct ccaccccca cagggatgat ggtcacatgc ccatgtcccc aggggtggcc 2881
 ccagtgccca gtggccgaaa gggcagtgga gactatatgc ccatgagccc caagagcgt 2941
 totgcccac agcagatcat caatccatc agacgccatc ccacagaggt ggaccccaat 3001
 ggcataatga tgatgtcccc cagcgtggc tgcctcctg acattggagg tggcccccag 3061
 agcagcagca gcagcagcaa ccgcgtccct tccgggacca gctatggaaa gctgtggaca 3121
 30 aacggggtgag gggccacaa cttcatgtc ttgcctcacc ccaaccccc agtgagagag 3181
 agcgggtgta agctcttacc ttgcacaggt gactacatga acatgtcacc agtgggggag 3241
 tccaacacca gcagcccctc cgaactgtac tacggccctg aggaccccca gccacagcca 3301
 gtccctccct actactcatt gccagatcc ttaagcaca cccagcccc cggggagccg 3361
 gaggaggggt cccggcatca gcaactccgc cttccacta gctctggtg cttctctat 3421
 35 gclgcaacag cagatgattc ttctcttccc accagcagcg acagcctggg tgggggatac 3481
 tgcggggcta ggctggagcc cagccttcca catccccac atcaggttct gcagcccat 3541
 ctgctccgaa aggtggacac agctgtctag accaatagcc gcttggccc gccccagagg 3601
 ctgctccgag gggatcccaa gccacgaccc ttacctcggg ccgagagca gccagcagc 3661
 cagcagccct tgcgtcacc cccagagccc aagagcccg ggggaatgt caatattgaa 3721
 40 tttgggagtg atcagctctg ctacttgtct ggcccgggtg cttccacag ctacacttct 3781
 gtcaggtgtc catccagct ccagccagct cccagagag aagagactgg cactgaggag 3841
 tacatgaaga tggacctggg gccgggcccg agggcagcct ggcaggagag cactgggtc 3901
 gagatgggca gactgggccc tgaccctccc ggggctgcta gcatttgag gccctaccgg 3961
 ccagtgccca gcagccgggg tgactacatg accatgcaga tgagttgtcc ccgtcagagc 4021
 45 taactggaca cctgcgcagc tgcccctgta agctatgctg acatgcgaac aggcattgct 4081
 gcagaggagg tgagcctgcc caggccccc atggctgctg cctcctcat ctcagcagcc 4141
 totgctcccc cagctgggccc tcaaggggca gcagagctgg ctgcccact gtcctctgt 4201
 gggggccccc aaggacctgg gggcatgagc gccttcaccc ggggtgaact cagtcctaac 4261
 cgcacacaga gtgcaaaagt gatccgtgca gaccacaag ggtgcggcg gaggcatagc 4321
 50 tccagacatt tctcctcaac acccagtgcc acccgggtgg gcaacacagt gccctttgga 4381
 gcccggggag cagtgggggg cgggtggcgt agcagcagca gcagcagga tgtgaaacg 4441
 cccagctctg cttcctttga gaatgtgtgg ctgaggcctg gggagcttgg gggagccccc 4501
 aaggagccag ccaactgtg tggggctgct ggggggttgg agaattggtc taactacata 4561
 gacctgatt tggccaagga cttcaaacag tgcctcagg agtgacccc tgaaccgag 4621

WO 02/092782

PCT/US02/15814

```

cctccccac cccaccccc tcatcaacce ctgggcagcg gtgagagcag ctcacccgc 4681
cgtcaagtg aggatttaag cgcctatgcc agcatcagtt tccagaagca gccagaggac 4741
cgtcagtagc tcaactggac atcacagcag aatgaagacc taaatgacct cagcaaatcc 4801
ctcttctaact catgggtacc cagactctaa atatttcag attcacaact aggacctcat 4861
5 atcttctca tcagtagatg gtacagtgca tccatttcag ttgttttaac ttatccaac 4921
ctcaggattt cattgactga sctgcaagtt ctatattgtg ccaagcgaaa aaaaaaaatg 4981
cactgtgaca ccagaataat gagtctgcat aaacttcac ttcaacctta aggaccttagc 5041
tggccacagt gagctgatgt gccaccacc gtgtcatgag agaattgggt tactctcaat 5101
gcattttcaa gatcacattc atctgctgct gaaactgtgt acgacaaagc atcattgtta 5161
10 attatttcat acaaaactgt tcaagttggg tggagagagt attaaatatt taacataggt 5221
tttgatttat atgtgtaatt tttaaatga aaatgttaact ttctttacag cacatctttt 5281
tttgatgtgt gggatggagg tatcaaatgt tctgtgttaa agagtggagc aaatgcttaa 5341
aacaaggctt aaaagagtag aataggggtat gatcctgttt ttaagattgt aattcagaaa 5401
acataatata agaatacatg tggcatagat ggttctcaat tgtatagtta tatttgctga 5461
15 tactatctct tgtcatataa acctgatgtt gagctgagtt cctataaga atcaatctta 5521
attttgtatt ttctcctgta agacaatagg ccatgttaat taaactgaag aaggatatat 5581
tggctgggtt gttttcaaat gtcagcttaa aattggtta tgaatggaag caaaattata 5641
agaaggagaa attaaagtct tccatgcat gtattgttaa cagaaggaga tgggtgatc 5701
cttcaattca aaagctctct ttggaatgaa caatgtgggc gtttgttaac tctggaaatg 5761
20 cttctctatc cataataaac tagatactgt tgatctttta aaaaaaaaaa 5821
aaaaaaaa (SEQ ID NO:6; GENBANK Accession No. NM 005544)

```

The double mutation of tyrosine 897 and 1180 was constructed by replacement of 3'-sequences coding 897F by the same region of 1180F using restriction enzymes NheI and EcoRI, and this construct was called 897F1180F or ΔGrb2 ΔSyp. The expression plasmids were under control of a CMV promoter (hIRS-1-wt, ΔGrb2, ΔSyp, ΔGrb2, ΔSyp and pBK-CMV (mock) and linearized at the 3'-end of poly A signal sequences by MluI restriction enzymes followed by purification. A similar approach was used to change the tyrosine residue to phenylalanine at positions 613 and 942 to create the double PI3K mutant construct (ΔPI3K). The hIRS-1 mutants have a FLAG epitope (DYKDDDDK (SEQ ID NO:6) + stop codon) added to the C-terminus by PCR. This strategy allows to distinguish the mutant protein from "wild type" hIRS-1 in stable transfected cell lines. The mutants are used to define the link between the IRS signal transduction pathway and activation of HAAH as a downstream effector gene and identify compounds to inhibit transduction along the pathway to inhibit growth of tumors characterized by HAAH overexpression. Antibodies or other compounds which bind to phosphorylation sites or inhibit phosphorylation at those sites are used to inhibit signal transduction and thus proliferation of HAA-overexpressing tumors.

Other embodiments are within the following claims.

What is claimed is:

WO 02/092782

PCT/US02/15814

What is claimed is:

1. A method of conferring an immune response to a tumor cell in a mammal, comprising administering to said mammal an antibody which binds to aspartyl (asparaginy) beta hydroxylase (HAAH).
- 5 2. The method of claim 1, wherein said tumor cell is a brain tumor cell.
3. The method of claim 2, wherein said brain tumor cell is selected from the group consisting of a glioma, a glioblastoma, an astrocytoma, and a hemangioma.
- 10 4. The method of claim 1, wherein said tumor cell is a pancreatic carcinoma cell.
5. The method of claim 1, wherein said antibody binds to an extracellular domain of HAAH.
- 15 6. The method of claim 1, wherein said antibody binds to a catalytic domain of HAAH.
7. The method of claim 6, wherein said catalytic domain comprises amino acids 660-700 of SEQ ID NO:2.
- 20 8. The method of claim 1, wherein said antibody is FB50 or a fragment thereof.
9. The method of claim 1, wherein said antibody is selected from the group consisting of FB50, 86A, 5C7 and 19B.
- 25 10. The method of claim 1, wherein said antibody is a mixture of one or more antibodies selected from the group consisting of FB50, 86A, 5C7 and 19B.
11. The method of claim 1, wherein said antibody is a high affinity single chain antibody.
- 30 12. A method of inhibiting tumor growth in a mammal, comprising administering to said mammal an HAAH-binding antibody conjugated to a cytotoxic agent.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

13. A method of inducing an HAAH-specific immune response in a mammal, comprising administering to said mammal an HAAH polypeptide.
- 5 14. The method of claim 13, wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.
15. The method of claim 13, wherein said polypeptide comprises an extracellular domain of HAAH and lacks an intracellular domain of HAAH.
- 10 16. The method of claim 13, wherein said polypeptide comprises a catalytic domain of HAAH.
17. The method of claim 16, wherein said polypeptide comprises amino acids 650-700 of SEQ ID NO:2.
- 15 18. The method of claim 13, further comprising administering an adjuvant composition.
19. A method of inducing an HAAH-specific immune response in a mammal, comprising administering to said mammal a polynucleotide composition encoding an HAAH polypeptide, or a degenerate variant of said polynucleotide.
- 20 20. The method of claim 19, wherein said composition comprises a transfection-enhancing agent.
- 25 21. The method of claim 19, wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.
22. The method of claim 19, wherein said polypeptide comprises an extracellular domain of HAAH and lacks an intracellular domain of HAAH.
- 30

WO 02/092782

PCT/US02/15814

23. The method of claim 19, wherein said polypeptide comprises a catalytic domain of HAAH.
24. The method of claim 23, wherein said polypeptide comprises amino acids 650-700 of SEQ ID NO:2.
25. A method for diagnosing a neoplasm in a mammal, comprising contacting a tissue of said mammal with a detectably-labeled antibody which binds to HAAH, wherein an increase in the level of antibody binding at a tissue site compared to the level of binding to a normal nonneoplastic tissue indicates the presence of a neoplasm at said tissue site.
26. The method of claim 25, wherein said antibody is labeled with a radioactive compound.
27. The method of claim 26, wherein said radioactive compound is selected from the group consisting of ^{125}I , ^{99}Tc .
28. The method of claim 25, wherein said antibody is labeled with Gd^{+++} or Fe^{++} .
29. The method of claim 25, wherein said antibody is labeled with a colorimetric agent.
30. The method of claim 25, wherein said tissue is a lymphoid tissue.
31. A fragment of HAAH comprising an extracellular domain and lacking a cytoplasmic domain of said HAAH.
32. A fragment of HAAH, wherein said fragment lacks residues 660-758 of SEQ ID NO:2.
33. A fragment of HAAH, wherein said fragment lacks residues 679-697 of SEQ ID NO:2.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

34. A fragment of HAAH, wherein said fragment lacks at least one residue of SEQ ID NO:2, wherein said residue is selected from the group consisting of residue 661, 662, 663, 670, 671, 672, and 673.
- 5 35. An antibody or fragment thereof, which binds to HAAH, wherein said antibody is selected from the group consisting of FB50, 86A, 5C7 and 19B.
36. An antibody or HAAH-binding fragment thereof, wherein said antibody binds to a polypeptide comprising the amino acid sequence of NPVEDS (residues 286-291 of SEQ ID
10 NO:2).
37. An antibody or HAAH-binding fragment thereof, wherein said antibody binds to a polypeptide comprising the amino acid sequence of QPWWTPK (residues 573-579 of SEQ ID
15 NO:2).
38. An antibody or HAAH-binding fragment thereof, wherein said antibody binds to a polypeptide comprising the amino acid sequence of LPEDENLR (residues 613-620 of SEQ ID
NO:2).
- 20 39. A kit for detecting a tumor cell, comprising an antibody, or fragment thereof, which binds to HAAH.
40. The kit of claim 39, further comprising a means for detecting binding of said antibody to said tumor cell.
- 25 41. The kit of claim 40, wherein said means is a detectable marker.
42. The kit of claim 41, wherein said detectable marker is a radioactive compound.
- 30 43. The kit of claim 41, wherein said detectable marker is Gd^{+++} or Fe^{++} .

WO 02/092782

PCT/US02/15814

44. A hybridoma cell line selected from the group consisting of hybridoma FB501, hybridoma HA386A, hybridoma HA15C7A, and hybridoma HA219B.

45. A fragment of HAAH, wherein said fragment lacks enzymatic activity.

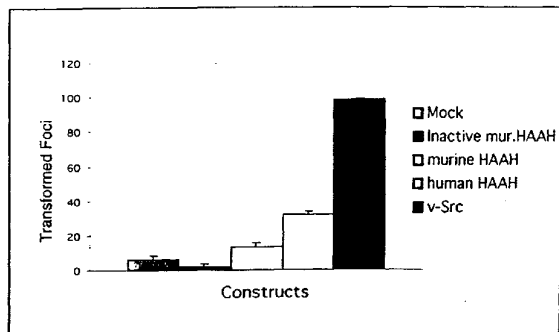
5

46. A fragment of HAAH, wherein said fragment lacks an alpha-ketoglutarate binding domain and an EGF-like domain.

WO 02/092782

PCT/US02/15814

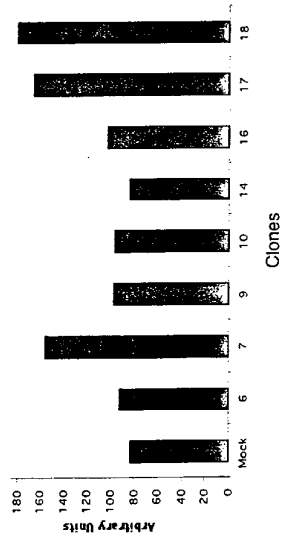
Fig. 1



WO 02/092782

PCT/US02/15814

Fig. 2



WO 02/092782

PCT/US02/15814

Fig. 3a

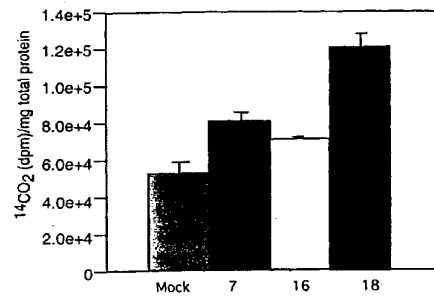
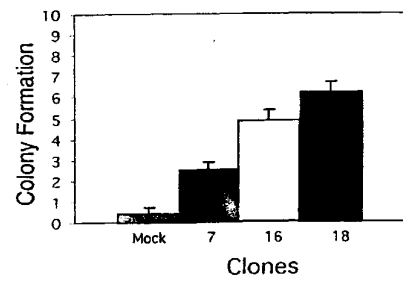


Fig. 3b



WO 02/092782

PCT/US02/15814

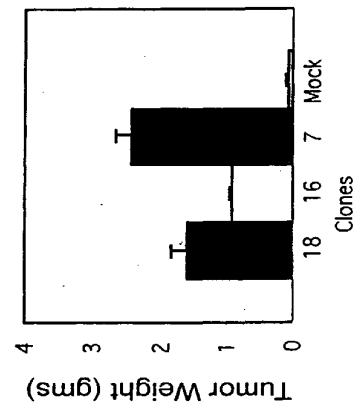


Fig. 4

WO 02/092782

PCT/US02/15814

Fig. 5b

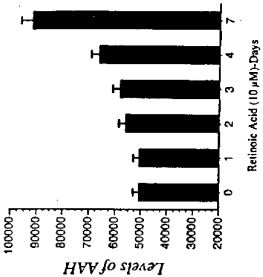


Fig. 5d

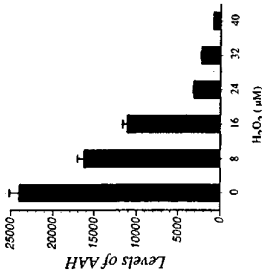


Fig. 5a

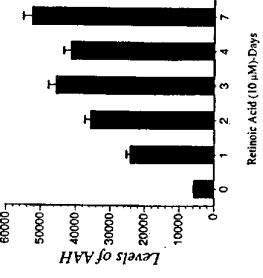
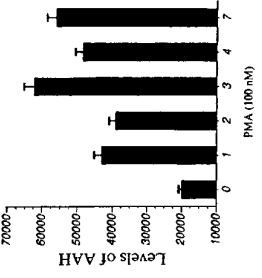


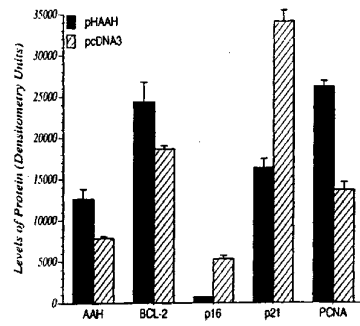
Fig. 5c



WO 02/092782

PCT/US02/15814

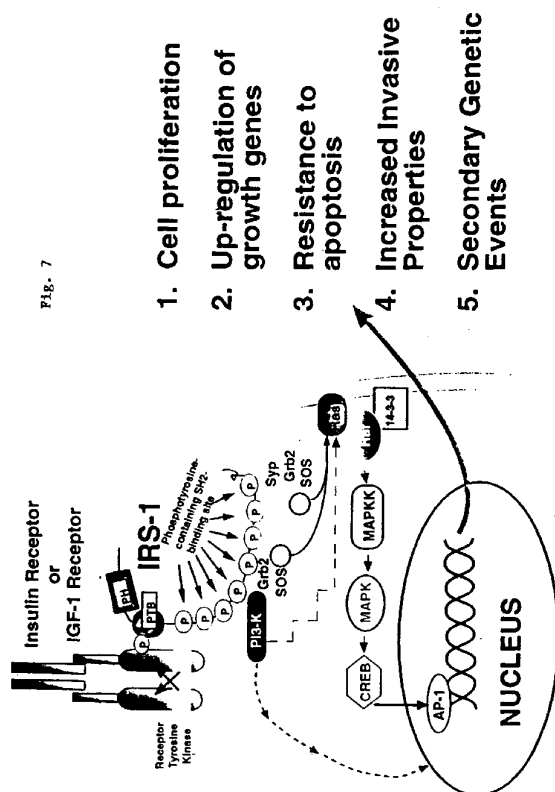
Fig. 6



WO 02/092782

PCT/US02/15814

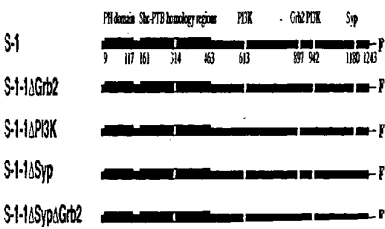
Fig. 7



WO 02/092782

PCT/US02/15814

Fig. 8



【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
21 November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2002/092782 A3

- (51) International Patent Classification: **A61K 38/00**
- (21) International Application Number:
PCT/US2002/015814
- (22) International Filing Date: 17 May 2002 (17.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09/859,604 17 May 2001 (17.05.2001) US
- (71) Applicant: RHODE ISLAND HOSPITAL, A LIFES-
PAN PARTNER [US/US]; 593 Eddy Street, Providence,
RI 02903 (US).
- (72) Inventors: WANDS, Jack, R.; 210 Varick Road, Waban,
MA 02168 (US); DE LA MONTE, Suzanne; 1040 High
Hawk Road, East Greenwich, RI 02818 (US); DEUTCH,
Alan, H.; 6301 Bright Plume, Columbia, MD 21044 (US);
GHANBARI, Hossein, A.; 9460 Toben Circle, Potomac,
MD 20854 (US).
- (74) Agent: BEATTIE, Ingrid, A.; Mintz, Levin, Cohn,
Fieris, Glovsky and Popeo, P.C., One Financial Center,
Boston, MA 02111 (US).
- (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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments
- (88) Date of publication of the international search report:
22 April 2004
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 2002/092782 A3

(54) Title: DIAGNOSIS AND TREATMENT OF MALIGNANT NEOPLASMS

(57) Abstract: The invention features a method for diagnosing and inhibiting growth of a malignant neoplasm in a mammal by contacting a cell or a bodily fluid of the mammal with an antibody which binds to an human aspartyl (asparaginy) beta-hydroxylase (HAAH) polypeptide. Methods of immunization to generate an HAAH-specific immune response are also within the invention.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/15814																								
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 38/00, 39/395; C07K 5/00, 16/00; US CL : 514/2, 424/1.11, 130.1, 178.1; 435/7.1; 530/300, 387.1 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) U.S. : 514/2, 424/1.11, 130.1, 178.1; 435/7.1; 530/300, 387.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Medline, Biosis, Scisearch, Cancerlit, Lifesci, Biotechline, Caphus, PCTfull, USpatfull, Europatfull																										
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JINCE et al. Overexpression of Human Aspartyl (Asparaginyl) Beta-Hydroxylase Is Associated with Malignant Transformation. Cancer Research. 01 March 2000, Vol. 60, pages 1261-1266, see entire document.</td> <td>25, 29, 35, 39, 40, 41</td> </tr> <tr> <td>---</td> <td></td> <td>1-24, 26-28, 30-34, 36-38, 42-46</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>DE LA MONTE et al. Aspartyl (Asparaginyl) Beta Hydroxylase (AAH) Expression Marks Invasiveness of Primary Malignant CNS Neoplasms. Laboratory Investigation. January 1999, Vol. 79, No. 1, abstract number 1000.</td> <td>25, 29, 39-41</td> </tr> <tr> <td>---</td> <td></td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>LAVASSIERE et al. Overexpression of Human Aspartyl (Asparaginyl) Beta-Hydroxylase in Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma. Journal of Clinical Investigation. September 1996, Vol. 98, No. 6, pages 1313-1323, see entire article.</td> <td>25, 29, 35, 39-41</td> </tr> <tr> <td>---</td> <td></td> <td>1, 5, 8-12, 26-28, 42-44</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>KORIOTH et al. Cloning and characterization of the human gene encoding aspartyl beta-hydroxylase. Gene. 1994, Vol. 130, pages 395-399, see entire article.</td> <td>6, 7, 13-24, 31-34, 45, 46</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	JINCE et al. Overexpression of Human Aspartyl (Asparaginyl) Beta-Hydroxylase Is Associated with Malignant Transformation. Cancer Research. 01 March 2000, Vol. 60, pages 1261-1266, see entire document.	25, 29, 35, 39, 40, 41	---		1-24, 26-28, 30-34, 36-38, 42-46	Y	DE LA MONTE et al. Aspartyl (Asparaginyl) Beta Hydroxylase (AAH) Expression Marks Invasiveness of Primary Malignant CNS Neoplasms. Laboratory Investigation. January 1999, Vol. 79, No. 1, abstract number 1000.	25, 29, 39-41	---		1-3	X	LAVASSIERE et al. Overexpression of Human Aspartyl (Asparaginyl) Beta-Hydroxylase in Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma. Journal of Clinical Investigation. September 1996, Vol. 98, No. 6, pages 1313-1323, see entire article.	25, 29, 35, 39-41	---		1, 5, 8-12, 26-28, 42-44	Y	KORIOTH et al. Cloning and characterization of the human gene encoding aspartyl beta-hydroxylase. Gene. 1994, Vol. 130, pages 395-399, see entire article.	6, 7, 13-24, 31-34, 45, 46
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																								
X	JINCE et al. Overexpression of Human Aspartyl (Asparaginyl) Beta-Hydroxylase Is Associated with Malignant Transformation. Cancer Research. 01 March 2000, Vol. 60, pages 1261-1266, see entire document.	25, 29, 35, 39, 40, 41																								
---		1-24, 26-28, 30-34, 36-38, 42-46																								
Y	DE LA MONTE et al. Aspartyl (Asparaginyl) Beta Hydroxylase (AAH) Expression Marks Invasiveness of Primary Malignant CNS Neoplasms. Laboratory Investigation. January 1999, Vol. 79, No. 1, abstract number 1000.	25, 29, 39-41																								
---		1-3																								
X	LAVASSIERE et al. Overexpression of Human Aspartyl (Asparaginyl) Beta-Hydroxylase in Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma. Journal of Clinical Investigation. September 1996, Vol. 98, No. 6, pages 1313-1323, see entire article.	25, 29, 35, 39-41																								
---		1, 5, 8-12, 26-28, 42-44																								
Y	KORIOTH et al. Cloning and characterization of the human gene encoding aspartyl beta-hydroxylase. Gene. 1994, Vol. 130, pages 395-399, see entire article.	6, 7, 13-24, 31-34, 45, 46																								
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																										
* Special categories of cited documents: <table border="1"> <tbody> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"Z" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed															
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																									
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																									
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																									
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family																									
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																										
Date of the actual completion of the international search 07 January 2004 (07.01.2004)		Date of mailing of the international search report 17 FEB 2004																								
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Anthony Caputo Telephone No. 703-308-0196																								

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1996)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/15814

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JIA et al. A fully active catalytic domain of bovine aspartyl (asparaginyl) Beta-hydroxylase expressed in Escherichia coli: Characterization and evidence for the identification of an active-site region in vertebrate alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A. July 1994, Vol. 91, pages 7227-7231, see entire document.	6, 7, 13-24, 31-34, 45, 46

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/06 B	4 H 0 4 5
C 1 2 N 9/06	G 0 1 N 33/543 5 4 1 B	
C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/543 5 4 1 Z	
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/574 D	
G 0 1 N 33/574	A 6 1 K 49/02 B	
// C 1 2 P 21/08	A 6 1 K 49/02 C	
	C 1 2 N 15/00 A	
	C 1 2 N 5/00 B	
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, GQ, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 デ ラ モンテ スザンヌ

アメリカ合衆国 ロードアイランド州 イースト グリーンウィッチ ハイ ホーク ロード 1
0 4 0

(72) 発明者 ドイチェ アラン エイチ .

アメリカ合衆国 メリーランド州 コロンビア ブライト ブルーム 6 3 0 1

(72) 発明者 ガーンバリ ホセイン エイ .

アメリカ合衆国 メリーランド州 ボトマック トボン サークル 9 4 6 0

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA12 BA08 BA61 CA04 CA05 CA06 DA02 EA04 FA02

FA10 GA05 GA11 GA18 HA08 HA14 HA17

4B050 CC01 CC04 DD11 LL01 LL03

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA05 DA14

4B065 AA93X AA94X AB06 AC14 BA08 BA24 CA44 CA46

4C085 AA13 AA14 BB22 CC04 DD23 HH03 HH20 KA03 KA04 KB08

KB09 KB12 KB18 LL18

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA28 EA51 FA72 FA74

专利名称(译)	恶性肿瘤的诊断和治疗		
公开(公告)号	JP2005501001A	公开(公告)日	2005-01-13
申请号	JP2002589650	申请日	2002-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	罗得岛医院		
申请(专利权)人(译)	罗德岛医院		
[标]发明人	ワンズジャックアール デラモンテスザンヌ ドイチェアランエイチ ガーンバリホセインエイ		
发明人	ワンズ ジャック アール. デ ラ モンテ スザンヌ ドイチェ アラン エイチ. ガーンバリ ホセイン エイ.		
IPC分类号	G01N33/543 A61K31/00 A61K31/4412 A61K31/45 A61K31/7088 A61K38/43 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61K49/00 A61K49/16 A61K51/00 A61K51/10 A61P35/00 C07K14/47 C07K16 /40 C12N5/10 C12N9/02 C12N9/06 C12N15/09 C12N15/113 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/26 G01N33 /53 G01N33/573 G01N33/574 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/40 A61K31/00 A61K31/4412 A61K47/6865 A61K49/16 A61K51/1093 A61K2039/505 C07K14 /47 C12N9/0071 C12N15/1137 C12N2310/111 C12N2310/315 C12N2799/027 C12Q1/26 C12Y114 /11016 G01N33/574 G01N33/57484 G01N2500/00 G01N2500/10		
FI分类号	C07K16/40 A61K39/395.D A61K39/395.P A61K49/00.ZNA.A A61P35/00 C12N9/06.B G01N33/543.541. B G01N33/543.541.Z G01N33/574.D A61K49/02.B A61K49/02.C C12N15/00.A C12N5/00.B C12P21 /08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA08 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024 /DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA08 4B024/HA14 4B024/HA17 4B050/CC01 4B050/CC04 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B064 /AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA93X 4B065/AA94X 4B065/AB06 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085 /AA14 4C085/BB22 4C085/CC04 4C085/DD23 4C085/HH03 4C085/HH20 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/KB08 4C085/KB09 4C085/KB12 4C085/KB18 4C085/LL18 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045 /AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	09/859604 2001-05-17 US		
其他公开文献	JP2005501001A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了通过使哺乳动物细胞或体液与结合人天冬氨酰（天冬酰胺酰）β-羟化酶（HAAH）多肽的抗体接触来诊断和抑制哺乳动物恶性肿瘤生长的方法。以该方法为特征。产生HAAH特异性免疫应答的免疫方法也在本发明的范围内。

特許2005-501001 (P2005-501001A)		
(43) 公表日 平成17年1月13日 (2005. 1. 13)		
(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/40	C O 7 K 16/40	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 5 0
A 6 1 K 49/00	A 6 1 K 39/395 P	4 B O 6 4
A 6 1 K 51/00	A 6 1 K 49/00 Z N A A	4 B O 6 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 109 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2002-589650 (P2002-589650)	(71) 出願人 500430718	
(86) (22) 出願日 平成14年5月17日 (2002. 5. 17)	ロード アイランド ホスピタル	
(85) 翻訳文提出日 平成15年11月17日 (2003. 11. 17)	アメリカ合衆国 ロードアイランド州 プ	
(86) 国際出願番号 PCT/US2002/015814	ロビザンス エディ ストリート 5 9 3	
(87) 国際公開番号 W02002/092782	(74) 代理人 100102978	
(87) 国際公開日 平成14年11月21日 (2002. 11. 21)	弁理士 清水 初志	
(31) 優先権主張番号 09/858, 604	(74) 代理人 100108774	
(32) 優先日 平成13年5月17日 (2001. 5. 17)	弁理士 橋本 一彦	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(74) 代理人 100128048	
	弁理士 新見 浩一	
	(72) 発明者 ワンズ ジャック アール、	
	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ワ	
	バン バリック ロード 2 1 0	
最終頁に続く		
P A 1 7 2 0 0 5 5 0 1 0 0 1 A 第 1 0 9 頁 中 1 0 9 頁		