

(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2005-528913

(P2005-528913A)

(43) 公表日 平成17年9月29日(2005.9.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 25/00		4 B O 2 4
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 35/00		4 B O 6 3
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00	1 O 5	4 B O 6 4
A 6 1 P 43/00	C O 7 K 14/47		4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 78 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-511486 (P2004-511486)	(71) 出願人	390023526
(86) (22) 出願日	平成15年6月9日 (2003.6.9)		メルク エンド カムパニー インコーポ レーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月3日 (2005.2.3)		MERCK & COMPANY INC OPERATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/018203		アメリカ合衆国, ニュージャージー, ロー ウエイ, イースト リンカーン アヴェニ ュー 1 2 6
(87) 国際公開番号	W02003/104426	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開日	平成15年12月18日 (2003.12.18)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	60/387, 403	(74) 代理人	100114188
(32) 優先日	平成14年6月10日 (2002.6.10)		弁理士 小野 誠
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100103920
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR , CA, JP, US		弁理士 大崎 勝真
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規動原体関連モータータンパク質をコードする単離核酸分子及びその使用

(57) 【要約】

新規セントロメア関連モータータンパク質、H s C E N P - E をコードする単離核酸を提供する。また、該核酸配列によってコードされる精製ポリペプチド、及び該ポリペプチドに免疫特異的な抗体も提供する。これらの生物学的分子は、細胞増殖のマーカーとして、特に細胞周期のG 2期及びM期における細胞の特定のために有用である。生物学的液体及び組織試料において細胞増殖を評価するため、及び該タンパク質に対する自己抗体の存在を検出するために、該核酸、タンパク質及び抗体を使用する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 配列番号 2 のアミノ酸配列、及び

b) アミノ酸残基 1 からアミノ酸残基 340 までのキネシンモータードメインを含む配列番号 1 のフラグメント

から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む精製ポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号 2 の配列を有する、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のポリペプチドと医薬適合性の賦形剤を含有する組成物。

10

【請求項 4】

該ポリペプチドが配列番号 2 の配列を有する、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

a) 請求項 1 に記載のポリペプチドを含む試料を化合物に暴露すること、及び

b) 該試料においてアゴニスト活性を検出すること

を含む、請求項 1 に記載のポリペプチドのアゴニストとしての有効性に関して化合物をスクリーニングするための方法。

【請求項 6】

a) 請求項 1 に記載のポリペプチドを含む試料を化合物に暴露すること、及び

b) 該試料においてアンタゴニスト活性を検出すること

を含む、請求項 1 に記載のポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性に関して化合物をスクリーニングするための方法。

20

【請求項 7】

配列番号 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離精製ポリヌクレオチド。

【請求項 8】

42 で 250 mM NaCl、25 mM クエン酸三ナトリウム、1% SDS、50% ホルムアミド及び 200 µg/ml ssDNA の条件、及び 68 で 15 mM NaCl、1.5 mM クエン酸三ナトリウム及び 0.1% SDS の洗浄条件下で、請求項 7 に記載のポリヌクレオチドにハイブリダイズする単離精製ポリヌクレオチド。

30

【請求項 9】

(a) 請求項 7 に記載のポリヌクレオチドを試料中の少なくとも 1 個の核酸にハイブリダイズさせ、それによってハイブリダイゼーション複合体を形成すること、及び

(b) 250 mM NaCl、25 mM クエン酸三ナトリウム、1% SDS、50% ホルムアミド及び 200 µg/ml ssDNA を含む溶液中 42 で上記ハイブリダイゼーションを実施し、次に 15 mM NaCl、1.5 mM クエン酸三ナトリウム及び 0.1% SDS を含む溶液中 68 で洗浄して、該ハイブリダイゼーション複合体を検出し、該ハイブリダイゼーション複合体の存在が該試料中の該ポリヌクレオチドの存在と相関すること

の段階を含む、ポリヌクレオチドを検出するための方法。

40

【請求項 10】

ハイブリダイゼーションの前に該ポリヌクレオチドを増幅することをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

配列番号 1 のポリヌクレオチド配列を含む単離精製ポリヌクレオチド。

【請求項 12】

請求項 7 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 14】

50

(a) ポリペプチドの発現に適した条件下で請求項 1 3 に記載の宿主細胞を培養すること、及び

(b) 該宿主細胞培養から該ポリペプチドを回収することの段階を含む、ポリペプチドを生産するための方法。

【請求項 1 5】

細胞増殖を調節するために有効な量の、医薬適合性の賦形剤、及び A T P 結合部位、モータードメイン及び配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有することを特徴とする H s C E N P - E タンパク質を含有する医薬組成物を、その必要のある哺乳類に投与することを含む、その必要のある哺乳類において細胞増殖を調節する方法。

【請求項 1 6】

a) 配列番号 1 に示す核酸配列内に含まれるヌクレオチド塩基配列領域に完全に相補的な少なくとも 1 8 個の隣接ヌクレオチド塩基を含むオリゴヌクレオチドを提供すること、及び

b) 上記オリゴヌクレオチドが培養中の細胞内に送達されて、上記ヌクレオチド塩基配列領域とハイブリダイズするような条件下で上記細胞を上記オリゴヌクレオチドに接触させ、それによって上記細胞の H s C E N P - E 仲介 / 誘導細胞増殖を阻害することの段階を含む、培養中の細胞の H s C E N P - E 仲介 / 誘導細胞増殖を阻止するための方法。

【請求項 1 7】

(a) 個体から生物学的試料を得ること、

(b) 上記生物学的試料を、配列番号 1 に示すヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされる遺伝子産物と免疫反応性である少なくとも 1 つの抗体と共にインキュベートすること、

(c) 段階 (b) のインキュベーションの結果として形成される免疫複合体を検出すること、及び

(d) 段階 (c) の免疫複合体の量を癌の存在に関係付け、上記量が閾値より大きいとき癌が存在することを含む、個体において癌の存在を検出する方法。

【請求項 1 8】

配列番号 1 のヌクレオチド配列によってコードされる実質的に精製された単離ポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願の交差参照)

本出願は、その内容全体が参照してここに組み込まれる、2 0 0 2 年 6 月 1 0 日に出願された米国特許仮出願第 6 0 / 3 8 7 , 4 0 3 号の優先権を主張する。

(連邦後援研究開発の言明)

不適。

(マイクロフィッシュ付属物の参照)

不適。

【0 0 0 2】

本発明は、一般に、組換え D N A テクノロジーを含む遺伝子工学、特に新規動原体関連モータータンパク質コードする核酸分子の特定、その遺伝子産物、及び癌及び神経障害の診断、治療及び予防におけるこれらの配列の使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

細胞内の成分の転位は、細胞の構造と機能を維持するために決定的に重要である。タンパク質及び膜結合細胞小器官などの細胞成分は、詳しく明らかにされている経路に沿って特定細胞内区画へと輸送される。細胞内輸送機構は、分子の動きを方向付けるためのレー

10

20

30

40

50

ルとして働く糸状高分子である微小管を利用する。分子輸送は、微小管依存性モータータンパク質、キネシンとダイニンによって駆動される。これらのタンパク質は、ATPの加水分解から生じるエネルギーを利用して、微小管に沿った自らの運動を単一方向的に推進し、分子の積荷を特定目的地へと輸送する。

【0004】

有糸分裂において、哺乳類細胞は、最終的に染色体の分離を生じさせる一連の複雑な段階を開始する。有糸分裂は、紡錘体微小管への染色体の動的結合を必要とする。有糸分裂における遺伝物質の分離は紡錘体の微小管によって仲介される（例えばMcIntosh, Microtubulesより、p. 413 - 434 (Hyams & Lloyd編集、1994)参照）。染色体と紡錘体微小管の相互作用は、各々の姉妹染色分体のセントロメア領域に位置する特殊な微小管結合構造であるキネトコアによって仲介される（Rieder, 1982; Mitchison, 1988に総説されている）。

10

【0005】

紡錘体は主として微小管から成る自律形成構造物である。紡錘体は、細胞周期制御シグナルに応答して一連の著しい遷移を受ける。各々の有糸細胞分裂において、紡錘体が構築され、各々の染色体への結合物を形成して、自らを細胞内に正しく方向付け、次に、極めて高い適合度で染色体分離を実施する。その後紡錘体は解体する。

【0006】

適切な紡錘体の構築と機能は、微小管動力学の調節及び少なくとも3つの異なる微小管個体群（キネトコア微小管、極微小管及び星状体微小管）の創造を含む多くの事象とプロセスの統合に関わる。さらに、種々の紡錘体微小管サブ個体群の間、紡錘体微小管と染色体の間、紡錘体微小管と微小管関連タンパク質及びモータータンパク質の間、及び紡錘体微小管と細胞表面の間、結びつきが確立されねばならない（WatersとSalmon, 1997によって総説されている）。適切な紡錘体の構築は細胞のサーベイランスシステムによって監視されており、紡錘体が正しく構築されない場合はそのサーベイランスシステムが有糸分裂チェックポイントを活性化する（Hardwick, 1998; RudnerとMurray, 1996によって総説されている）。ひとたび紡錘体が構築されれば、注意深く編成された分子事象のセットが、染色体の極への移動（後期A）と紡錘体極の分離（後期B）を生じさせる。

20

【0007】

紡錘体微小管は規定された極性を有し、紡錘体極に又は極の近くに固定された、緩やかに成長するマイナス端と、染色体及び反対側の極から発する微小管と相互作用する、動的で急速に伸びるプラス端を備える（McIntoshとEuteneur, 1984）。現在、コングレーションにおける染色体運動の責任を担うと考えられている2つの主要な反対の力は、紡錘体極付近の微小管密度の高い領域に関連する反極方向性の極斥力及び微小管依存性モーターによりキネトコアにおいて直接生じる力である。インビトロでの試験は、前中期キネトコア上でプラス端とマイナス端の両方に向かう微小管モーター活性の存在を明らかにした（MitchisonとKirschner, 1985; HymanとMitchison, 1991）。

30

【0008】

前中期の間、キネトコアは極から伸びる動的に不安定な微小管を捕獲し、安定化する（NicklasとKubai, 1985; Mitchisonら、1986）。ひとたび微小管に結合すれば、キネトコアと染色体は、極方向と反極方向運動の間を揺れ動き（Roos, 1976; Bajer, 1982; Reiderら、1986; Skibbenら、1993; KhodjakovとRieder, 1996; Watersら、1996）、中期板に整列して終わる振動運動を示す。これらの動きは集合的にコングレーションと称され、少なくとも一部には、キネトコアに局在する微小管モーターによって生じる力の結果であると思われる（RiederとSalmon, 1994）。

40

【0009】

キネトコアは細胞において少なくとも3つの機能を果たすことができる：微小管との相

50

相互作用を通しての紡錘体への染色体の結合、有糸分裂染色体運動の仲介、及び有糸分裂チェックポイントの維持。

【0010】

自己免疫血清及び生化学的分別法を用いた、セントロメア-キネトコア複合体の多くのタンパク質の特定と分子クローニングは、該複合体の生化学的構造と機能を検討するために必要な試薬を提供した。そのうち6個(CENP-AからCENP-Fまで)が現在既知である、セントロメア関連タンパク質の集合は、細胞周期の様々な時点におけるそれらの分布に基づいて、2つのクラスに有効に分類することができる。

【0011】

1つのクラスであるDNA又はクロマチン結合タンパク質は、核(おそらくセントロメアクロマチン)内の別々の位置で、又は有糸分裂の間セントロメア-キネトコア複体内に局在して、間期を通じて検出することができるので、構成的セントロメアタンパク質である。 10

【0012】

哺乳類では、4個の構成的セントロメア結合タンパク質、CENP-A、CENP-B、CENP-C及びCENP-Dが様々な程度で特性付けられており、おそらくセントロメア機能において直接的な役割を有すると示唆されている。

【0013】

外側キネトコアダメインに局在するタンパク質、CENP-Aは、ヒストンH₃タンパク質と配列相同性を示すセントロメア特異的コアヒストンであり、クロマチン構造の最も基本的レベル-ヌクレオソームにおいてセントロメアを染色体の残りの部分から識別する働きをすると考えられる(Sullivanら、1994)。 20

【0014】

霊長類 サテライト及びマウスマイナーサテライトDNAに認められるCENP-Bボックスモチーフへの結合を通してセントロメアヘテロクロマチンと結合するタンパク質、CENP-Bは、おそらくセントロメアヘテロクロマチンDNAをパッケージングする上で役割を有するが、しかしながら、このタンパク質はY染色体上では検出されず(Plutaら、1990)、二動原体染色体の不活性セントロメア上に認められるので(Earnshawら、1989)、その役割は不可欠ではないと考えられる。

【0015】

CENP-Cは、内側キネトコア板に位置することが示されており、例えば細胞内への抗CENP-C抗体の微量注入後の有糸分裂進行の阻止(Bernatら、1990; Tomkielelら、1994)から、及び二動原体染色体の活性セントロメアには結合するが不活性セントロメアには結合しないこと(Earnshawら、1989; Pageら、1995; SullivanとSchwartz、1995)からわかるように、極めて重要であるがまだ明らかにされていないセントロメア機能を有すると主張されている。 30

【0016】

最後に、CENP-D(又はRCC1)は、セントロメアに特異的でなく、明らかにされていない全般的な細胞の役割を有すると思われるグアニン交換因子である(KingwellとRattner、1987; Bischoffら、1990; Dasso、1993)。 40

【0017】

その他のクラスは、キネトコア複合体とそれらの結合の一過性の性質のゆえに、セントロメア-キネトコアタンパク質の条件的ファミリーに属する、INCENP、HsCENP-E、CENP-F及びCENP-Gなどの広く特性付けられたタンパク質を包含する(EarnshawとMackay、1994及びPlutaら、1995によって総説されている)。セントロメアにおけるその出現が一過性であり、細胞周期によって厳密に調節されるこれらのパッセンジャータンパク質は、染色体のモーター運動、紡錘体動力学の調節、核形成、核内架橋構造と機能、姉妹染色分体の付着と解離、及び細胞質分裂を含む決定的に重要な機能を提供する。

【0018】

ヒトCENP-E遺伝子は1991年に最初に特性付けられ、8371塩基の長さ及びこと、そのオープンリーディングフレームは2663アミノ酸をコードすること、及びそれぞれのタンパク質は312kDaの分子量を持つことが認められた。セントロメアを紡錘体微小管に結びつけるキネトコア冠線維の必須成分である、微小管モータータンパク質のキネシンスーパーファミリーの成員である(Yenら、1992; Yaoら、1997)。

【0019】

CENP-E分子の分子特性指摘は、それが、コイルドコイルを形成すると予想される1,500残基のヘリックスドメインによって分けられたアミノ末端とカルボキシ末端の球状ドメインから成る三元構造(tri-partite structure)を有することを示す。そのN末端領域はキネシン及びキネシン様タンパク質(KLP)の微小管モータードメインと強い配列相同性を共有し(Goldstein, 1993)、ATP依存的に微小管に結合する(Liaoら、1994)。

10

【0020】

染色体の運動と紡錘体の伸長を調節するために現われ、有糸分裂の終了時に分解するが、有糸分裂が起こる前の細胞周期のG2期にキネトコアに一過性に蓄積するキネトコアモーターである。G1期及び初期のS期の細胞はほとんど検出可能なCENP-Eを有していないが、後期S期及びG2/M期の間は該タンパク質のレベルが急激に上昇する。CENP-Eは、コングレッションの間はキネトコアと結合し、後期には紡錘体中央部に再配置されて、細胞分裂の終了時には廃棄されるか又は分解される。CENP-Eは、形成中心として働き、微小管-キネトコア相互作用を促進すると考えられる。一貫して、特異的抗体によるCENP-Eタンパク質の阻害は、中期で細胞周期の停止を引き起こす。加えて、CENP-Eは微小管形成と有糸分裂の間の染色体の連続的な動きを調節しており、それ故他のキネシン様タンパク質と同様に、細胞分裂にとって決定的に重要であると示唆されてきた。

20

【0021】

さらに、最近のデータは、CENP-Eが染色体の移動に積極的に関与することを示唆している。前中期におけるCENP-Eモノクローナル抗体の微量注入は、後期の開始を有意に遅延させた(Yenら、1991)。より最近になって、インビトロアッセイにおいて一部のCENP-E抗体が、微小管脱重合によって駆動される極方向への染色体移動を阻害することが示されたが(Lombilloら、1995)、細胞質ダイニン(後期染色体運動において役割を果たすと考えられるもう1つのモーター; Steuerら、1990; Pfarrら、1990)に対する抗体又は紫外線が誘導する細胞質ダイニンの開裂は、インビトロでこの染色体運動に影響を及ぼさなかった。実際に、CENP-Eに対する抗体の微量注入は、おそらく減数分裂キネトコアにおいてCENP-E及び/又は隣接成分の機能を破壊することにより、後期Iへの減数分裂の進行を遮断することが示された。[Duesbery NSら、「CENP-E is an essential kinetochore motor in maturing oocytes and is masked during mos-dependent, cell cycle arrest at metaphase II」、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)、94:9165-70(1997)。]

30

40

さらに、データは、哺乳類キネトコアからのCENP-Eの枯渇が、整列した染色体と未整列の染色体の混合物を伴って有糸分裂の停止を導くことを示している。抗体の微量注入によるキネトコアからのCENP-Eの枯渇が、整列した染色体においてキネトコア微小管結合を23%低下させ、及び整列していない染色体で微小管結合を大きく低下させるという所見も同様である。事実上、CENP-E機能の分断はまた、セントロメアを横切る圧力を低下させ、紡錘体極の断片化の発生率を上昇させ、及び紡錘体極の異常に近くまで接近する単一方向性染色体を生じさせる。

【0022】

50

同様に、Kullmannら、「Kinesin-like protein CENP-E is upregulated in rheumatoid synovial fibroblasts」Arthritis Res, 1(1):71-80(1999)は、慢性関節リウマチ(RA)におけるCENP-E遺伝子発現の上方調節を明らかにした。実際に、彼らの試験は、CENP-Eが、おそらく薬剤とは無関係に、上方調節されるだけでなく、RAの病態生理学にも関与しているという仮説を支持する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0023】

上述したように、紡錘体タンパク質は重要な研究対象となってきた。紡錘体タンパク質の検討は、癌の化学療法において重要な適用を有する抗有糸分裂性化合物及び真菌病原体を標的する治療薬を生み出している。

10

【0024】

実際に、タキソール及びビンカルカロイド類などの化学療法剤は、キネトコア-微小管結合を混乱させ、染色体分離を分断して、それが次には、細胞周期の進行を遅らせるチェックポイント経路を活性化し、プログラムされた細胞死を誘導することが示されている(P.K.Sorgerら(1997)Curr.Opin.Cell.Biol.9(6):807-14;C.M.Irelandら(1995)Biochem.Pharmacol.49(10):1491-99)。さらに、タキソールは、チューブリン重合と有糸分裂の停止、それに続くアポトーシスを誘導することが明らかにされている。

20

【0025】

それ故、重要な医学適用において明らかにされたこれらの抗有糸分裂性化合物の有効性は、抗有糸分裂性化合物の開発候補物質を特定し、特性付けることの必要性を示している。

【課題を解決するための手段】

【0026】

そこで、有糸分裂における染色体運動の1又はそれ以上の局面、例えば細胞周期の停止を誘導することを推進するための卓越した候補物質が、ここで開示する新規ヒトCENP-Eタンパク質である。

【0027】

重要な点として、新しいキネシン様モータータンパク質及びそれをコードするポリヌクレオチドの発見は、癌及び他のCENP-E仲介性疾患の診断、予防及び治療において有用な新しい組成物を提供することによって当技術分野における必要性を満たすものである。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

本発明は、有糸分裂において微小管形成と染色体運動を調節することに関係付けられてきた重要なヒトセントロメア-キネトコアタンパク質をコードする新規核酸分子の発見に基づく。ここで開示する該核酸分子の遺伝子産物を、ここではセントロメア関連モータータンパク質、すなわちHsCENP-Eと称する。本発明のHsCENP-E分子は、様々な細胞プロセス、例えば細胞周期を調節するための調節因子として有用である。ここで開示する核酸分子によってコードされるタンパク質は、染色体運動と紡錘体の伸長を調節する。それ自体、本発明によって特定され、特性付けられる核酸分子及びタンパク質は、癌化学療法剤、抗真菌性化合物及び他の抗有糸分裂薬のための開発候補物質として有用である。

40

【0029】

従って、1つの局面では、本発明は、HsCENP-Eタンパク質をコードする単離核酸分子、ならびにHsCENP-Eをコードする核酸の検出のためのプライマー又はハイブリダイゼーションプローブとして適する核酸フラグメントを提供する。

【0030】

50

1つの実施形態では、本発明の核酸分子をコードするH s C E N P - Eは、ここで開示するヌクレオチド配列と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%又はそれ以上同一である。好ましい実施形態では、該核酸分子は少なくとも15個の(例えば隣接する)ヌクレオチドの長さであり、ここで開示するヌクレオチド配列にストリンジェント条件下でハイブリダイズする。

【0031】

もう1つの実施形態では、該単離核酸分子は配列番号1に示すヌクレオチド配列を含む。ここで開示する核酸分子のスプライシング変異体も本発明に包含される。

【0032】

もう1つの実施形態では、核酸分子は、配列番号2のアミノ酸配列と十分に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0033】

他の好ましい実施形態では、該核酸分子は、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。

【0034】

本発明のもう1つの実施形態は、H s C E N P - E核酸分子に対してアンチセンスである単離核酸分子、例えばH s C E N P - E核酸分子のコード鎖を提供する。

【0035】

本発明のもう1つの局面は、H s C E N P - Eをコードする核酸分子を含むベクターを提供する。一部の実施形態では、該ベクターは組換え発現ベクターである。

【0036】

もう1つの実施形態では、本発明は、本発明のベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0037】

本発明の核酸分子によってコードされる遺伝子産物を生産する方法も提供する。

【0038】

配列番号2の実質的に純粋なポリペプチドも考慮する。

【0039】

その生物活性フラグメントを含む本発明のタンパク質は、非H s C E N P - Eタンパク質(例えば異種アミノ酸配列)に作動可能に連結して、融合タンパク質を形成することができる。

【0040】

本発明はさらに、本発明のタンパク質、好ましくはH s C E N P - Eタンパク質に特異的に結合する、モノクローナル又はポリクローナル抗体などの抗体を取り扱う。

【0041】

さらに、該H s C E N P - Eタンパク質又はその生物活性部分は、場合により医薬適合性の担体を含有する、医薬組成物に組み込むことができる。

【0042】

もう1つの局面では、本発明は、H s C E N P - E核酸分子、タンパク質又はポリペプチドの存在が生物学的試料において検出されるように、H s C E N P - E核酸分子、タンパク質又はポリペプチドを検出することができる物質に該生物学的試料を接触させることにより、生物学的試料においてH s C E N P - E核酸分子、タンパク質又はポリペプチドの存在を検出するための方法を提供する。

【0043】

もう1つの局面では、本発明は、H s C E N P - Eを発現することができる細胞を、該細胞におけるH s C E N P - E活性を調節するように、H s C E N P - E活性を調節する物質と接触させることを含む、H s C E N P - E活性を調節するための方法を提供する。

1つの実施形態では、該物質はH s C E N P - E活性を阻害する。もう1つの実施形態では、該物質はH s C E N P - E活性を刺激する。1つの実施形態では、該物質は、H s C E N P - Eタンパク質に特異的に結合する抗体である。もう1つの実施形態では、該物質は、H s C E N P - E遺伝子の転写又はH s C E N P - E mRNAの翻訳を調節するこ

10

20

30

40

50

とによってHsCENP-Eの発現を調節する。さらにもう1つの実施形態では、該物質は、HsCENP-E mRNA又はHsCENP-E遺伝子のコード鎖に対してアンチセンスであるヌクレオチド配列を有する核酸分子である。

【0044】

1つの実施形態では、本発明の方法は、HsCENP-Eタンパク質又は核酸分子の異常発現又は異常活性を特徴とする疾患を有する被験者を、HsCENP-E調節因子である物質を該被験者に投与することによって治療するために使用される。1つの実施形態では、該HsCENP-E調節因子はHsCENP-E核酸分子である。さらにもう1つの実施形態では、該HsCENP-E調節因子はペプチド、ペプチドミメティック又は他の低分子である。好ましい実施形態では、該疾患は、有糸分裂にとっての必須タンパク質であるCENP-Eによって不適切に増殖し、分裂する細胞を特徴とする、癌などのHsCENP-Eタンパク質又は核酸分子の異常発現によって特徴付けられる細胞増殖性疾患である。

10

【0045】

本発明はまた、(i)HsCENP-Eタンパク質をコードする遺伝子の異常修飾又は突然変異；(ii)該遺伝子の調節不全；及び(iii)該遺伝子の野生型形態がHsCENP-E活性を備えたタンパク質をコードする、HsCENP-Eタンパク質の異常翻訳後修飾、の少なくとも1つを特徴とする遺伝子変化の存在又は不在を特定するための診断アッセイを提供する。

【0046】

もう1つの局面では、本発明は、HsCENP-E活性を有するHsCENP-Eタンパク質を含むインジケータ組成物を提供すること、該インジケータ組成物を被験化合物と接触させること、及び該インジケータ組成物におけるHsCENP-E活性への被験化合物の作用を測定して、HsCENP-Eタンパク質の活性を調節する化合物を特定することにより、HsCENP-Eタンパク質に結合する又はHsCENP-Eタンパク質の活性を調節する化合物を特定するための方法を提供する。

20

【0047】

代替的实施形態は、抗有糸分裂薬のための開発候補物質として有用な組成物を考慮する。該開発候補物質は、配列番号2のアミノ酸配列又はその生物活性フラグメントを含む。

【0048】

さらなる実施形態では、本発明は、紡錘体の形成/伸長に必須の1又はそれ以上のタンパク質を使用したスクリーニング法によって特定される抗有糸分裂薬を提供する。好ましい実施形態では、上記の1又はそれ以上のタンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列又は配列番号1のHsCENP-E遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を含む。

30

【0049】

さらなる局面では、本発明は、細胞における紡錘体形成を分断する方法を提供する。該方法は、紡錘体形成に必須の1又はそれ以上のタンパク質の活性を破壊する抗有糸分裂薬を細胞に投与することを含む。上記の1又はそれ以上のタンパク質は、配列番号1のHsCENP-E遺伝子によってコードされるアミノ酸配列の少なくとも1つ及び配列番号2のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む。

40

【0050】

本発明はさらに、

a)HsCENP-Eタンパク質に特異的に結合することができる抗体と生物学的試料中のHsCENP-Eタンパク質の間で複合体の形成を可能にする条件下で、該試料を含む癌細胞を該抗体に接触させること；及び

b)段階a)で形成された複合体を検出し、該複合体の存在が、試料を含む癌細胞が紡錘体阻害因子による治療に感受性であることを指示することを含む、紡錘体阻害因子による治療に対する生物学的試料の感受性を判定するための方法を提供する。

【0051】

本発明はまた、

50

a) 癌細胞を含むことが疑われる生物学的試料を、配列番号1に由来する少なくとも15個の隣接ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドプローブに、該プローブが該試料中に存在するRNAにハイブリダイズすることを可能にする条件下で接触させること；及び

b) 上記のハイブリダイズしたプローブの存在を検出し、陽性検出が紡錘体阻害因子による治療に対する感受性を指示すること

を含む、該試料中のHsCENP-Eタンパク質の存在を検出することにより、癌細胞を含むことが疑われる生物学的試料が紡錘体阻害因子による治療に対して感受性であるかどうかを判定する方法を提供する。

【0052】

本発明はさらに、HsCENP-Eタンパク質をコードする核酸分子を、HsCENP-Eタンパク質の発現を低下させるのに有効な量で被験者に投与することを含む、被験者において過剰増殖性細胞成長疾患を抑制する方法を提供する。 10

【0053】

本発明はまた、細胞膜を通過することができ、HsCENP-Eの発現を阻害するために有効である、HsCENP-Eタンパク質をコードするmRNAに特異的にハイブリダイズすることができる配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの、該mRNAの翻訳を妨げるための量と、医薬適合性の担体を含有する、医薬組成物を提供する。

【0054】

本発明はまた、HsCENP-E遺伝子又は遺伝子産物を検出することができる核酸分子試薬を提供する。 20

【0055】

本発明はまた、HsCENP-E遺伝子又は遺伝子産物を検出することができる、適切に標識した核酸分子試薬と癌細胞を接触させることを含む、癌細胞においてHsCENP-Eをコードする核酸分子の存在を検出することにより、紡錘体阻害因子による治療に感受性であると考えられるHsCENP-E仲介性疾患の*in situ*での特定のための方法を提供する。

【0056】

本発明のさらにもう1つの局面は、配列番号1に示すヌクレオチド配列又はそれに由来する12-100ヌクレオチドの長さのフラグメントを含む精製ポリヌクレオチドと細胞を接触させる段階を含み、上記ポリヌクレオチドが、HsCENP-EをコードするmRNA内に存在する50ヌクレオチドの核酸配列領域に実質的に相補的であり(しかしUの代わりにTを有する)、上記オリゴヌクレオチドがインビボ又はインビトロで細胞の増殖を阻害する、細胞の疾患関連増殖を阻止する方法である。 30

【0057】

(a) 細胞の試料において、配列番号1に対応するヌクレオチドとハイブリダイズするヌクレオチド配列又はその相補物から発現される遺伝子産物の発現のレベルを測定すること

を含む、細胞の試料の発癌の潜在的可能性を予測するための診断方法。

【0058】

(a) 最初の時点で、(i) 配列番号1のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド及び(ii) 配列番号2のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドから成る群より選択されるパラメータのレベルを測定するために、被験者からの試料を検定すること； 40

(b) 第二の時点で、(a)で選択したパラメータのレベルを検定すること；及び

(c) 治療レジメンの効果の判定因子として、上記第二時点での上記レベルを(a)で測定されたレベルと比較することを含む、配列番号1に示すヌクレオチドの配列を有する単離核酸分子から発現される遺伝子産物の異常発現を特徴とする状態を緩和するために設計された治療レジメンの進行を追跡するための方法も提供する。

【0059】

代替的实施形態は、HsCENP-Eタンパク質の異常レベル又は異常活性を特徴とす 50

る疾患を有する患者から得た試料を、配列番号1のヌクレオチド配列と実質的に相同なヌクレオチド配列を有する相補的核酸ハイブリダイゼーションプローブと共にインキュベートすること、及び上記患者における上記疾患の後退、進行又は発症の判定因子として、上記プローブと上記試料中に存在しうる相補的mRNAの間の結合を測定することを含む、HsCENP-Eタンパク質の異常レベル又は異常活性を特徴とする疾患の後退、進行又は発症を判定するための方法を提供する。

【0060】

あるいは、該プローブは、配列番号2のポリペプチド又はその生物学的/免疫学的に活性なフラグメントに特異的な抗体を包含しうる。従って、上記疾患を有する患者からの試料を、本発明の単離核酸分子によって発現される遺伝子産物に特異的な検出可能プローブと、プローブ/遺伝子産物複合体の形成を促進する条件下で接触させ、該複合体の存在が、上記患者における上記疾患の後退、進行又は発症を指示することを含む、後退を測定する提示方法が導かれる。

10

【0061】

本発明の他の用途及び目的は、下記の詳細な説明に照らして当業者には明白である。そのような他の用途及び目的は特許請求の範囲内であるとみなされる。

【0062】

(発明の詳細な説明)

本発明は、新規ヒトキネシンモータータンパク質、ヒトCENP-E(HsCENP-E)の発見、HsCENP-Eをコードするポリヌクレオチド、及び癌、神経障害及び小胞輸送障害の診断、治療又は予防のためのこれらの組成物の使用に基づく。また、癌などの細胞増殖性疾患の治療のための物質を含む標的タンパク質、例えば天然CENP-Eの調節因子も提供する。ここで提供する物質及び組成物は、スプレー、粉末及び他の組成物の製剤を含む様々な適用において使用できる。癌などの細胞増殖性疾患を治療する方法、HsCENP-E活性に関連する疾患を治療するための方法、及びHsCENP-Eを阻害するための方法も提供する。

20

【0063】

特に、本発明は、約465アミノ酸のヒトCENP-Eの新規モータードメインをコードする約1395ヌクレオチドの新規DNAフラグメントの発見・クローニング及び発現に基づく。そのコードされるタンパク質フラグメントは、微小管結合活性ならびにATP結合部位とその付随するATPアーゼ活性を含むという意味で、機能性である。

30

【0064】

生じるタンパク質は、プロリン(公表配列)の代わりに300位にアラニンが存在することに基づいて、先行技術のCENP-Eと区別することができる。ここで提供する新規DNA配列に関しては、少なくとも次の位置で公表配列とは異なる：

配列番号2のアミノ酸292に対応する、塩基対876T(公表配列)>C、

300位のアミノ酸に対応する、塩基対898C(公表配列)>G、

公表配列に関するアミノ酸位置316位に対応する、塩基対948T(公表配列)>A

【0065】

重要な点として、公表配列のコードされるアミノ酸には変化をもたらさない、876位と948位の2つの変化とは異なり、898位の変化は、プロリン(公表配列)が同じ位置でアラニンに変化しているという点でコードされるタンパク質に変化を生じさせる。

40

【0066】

ここで開示する配列の292位のアミノ酸は、公表配列の292位に対応する。

【0067】

ここで開示する配列の300位のアミノ酸は、公表配列の300位に対応する。

【0068】

ここで開示する配列の316位のアミノ酸は、公表配列の316位に対応する。

【0069】

50

本発明のCENP-Eタンパク質におけるアミノ酸の番号付けは、公表されているタンパク質の番号付けに一致する。しかし、cDNA配列に関しては、ここで開示する塩基対1-1395は、公表されているCENP-E cDNAヌクレオチド配列における塩基対91-1485に相当する。先行技術のCENP-Eタンパク質のヌクレオチド及びアミノ酸配列は、Yen, T. J. ら(1991)「CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase.」EMBO J. 10(5):1245-1254;及びYen, T. J. ら(1992)「CENP-E is a putative kinetochore motor that accumulates just before mitosis.」Nature 359(6395):536-539に開示されている。これらの参考文献の各々の内容は、その全体が参照してここに組み込まれる。

10

【0070】

本発明のタンパク質、ヌクレオチド配列及び方法を説明する前に、機器、材料及び方法は変更しうるので、本発明は記述する特定の機器、材料及び方法に限定されないことが了解される。また、ここで使用する用語は、特定の実施形態を説明することだけを目的としており、特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図しないことが了解される。

【0071】

下記の説明においては、組換えDNAテクノロジーの分野において使用されるいくつもの用語を広汎に使用する。そのような用語に与えられる範囲を含めて、本明細書及び特許請求の範囲のより明瞭で一貫した理解を提供するために、下記の定義を与えるものとする。

20

【0072】

「遺伝子」は、そのヌクレオチド配列がポリペプチド分子をコードする核酸分子を指す。遺伝子は、ヌクレオチドの解釈されていない配列を含みうる又はそのような介在セグメントをイントロン、プロモーター領域、スプライス部位及び反復配列として含みうる。遺伝子はRNA又はDNAのいずれでもよい。好ましい遺伝子は、本発明のタンパク質をコードするものである。

【0073】

「核酸」、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」の語又はその文法的等価物は、リボ核酸(RNA)又はデオキシリボ核酸(DNA)、プローブ、ポリヌクレオチド、そのフラグメント又は部分、及びプライマーを意図する。DNAは、相補的DNA(cDNA)又はゲノムDNA、例えば本発明のタンパク質をコードする遺伝子のいずれでもよい。

30

【0074】

DNA分子又はポリヌクレオチドに関して、ヌクレオチド配列はデオキシリボヌクレオチドの配列を指し、及びRNA分子又はポリヌクレオチドに関して、規定されたデオキシリボヌクレオチド配列内の各々のチミジンデオキシリボヌクレオチド(T)がリボヌクレオチドウリジン(U)で置換されている、リボヌクレオチド(A、G、C及びU)の対応する配列を指す。例えば、デオキシリボヌクレオチドの略語を用いて示される配列番号1の配列を有するRNA分子への言及は、配列番号1の各々のデオキシリボヌクレオチド、A、G又はCが対応するリボヌクレオチド、A、G又はCで置換されており、及び各々のデオキシリボヌクレオチドTがリボヌクレオチドUで置換されている配列を有するRNA分子を示すことが意図されている。

40

【0075】

特に異なる指示がない限り、ヌクレオチドは、糖成分(ペントース)、リン酸基及び窒素複素環塩基から成るDNA又はRNAの単量体単位を定義する。該塩基は、グリコシド炭素(該ペントースの1'炭素)によって糖成分に結合されており、塩基と糖のその組合せがヌクレオシドである。ヌクレオシドがペントースの3'又は5'位置に結合したリン

50

酸基を含むとき、ヌクレオチドと称される。作動可能に連結されたヌクレオチドの配列を、ここでは典型的に「塩基配列」又は「ヌクレオチド配列」、及びそれらの文法的等価物と称し、ここでは、左から右への方向が従来の5'末端から3'末端への方向である式によって表わされる。

【0076】

特に異なる指示がない限り、個々の核酸分子配列は、明白に指示されている配列と同様に、その保存的に修飾された変異体（例えば縮重コドン置換）及び相補的配列も暗黙のうちに包含する。詳細には、縮重コドン置換は、1又はそれ以上の選択した（又はすべての）コドンの3番目の位置が混合塩基及び/又はデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成しうる（Batzerら、Nucleic acid molecule Res. 19:5081(1991); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605-2608(1985); Cassolら、1992; Rossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91-98(1994)）。核酸分子の語は、遺伝子、cDNA及び遺伝子によってコードされるmRNAと交換可能に使用される。

10

【0077】

核酸分子又はヌクレオチド配列の「フラグメント」は、完全長未満である核酸の部分であり、少なくとも、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で配列番号1のヌクレオチド配列と特異的にハイブリダイズすることができる最小長を含む。そのようなフラグメントの長さは、好ましくは15-17ヌクレオチド又はそれ以上である。

20

【0078】

「変異体」は、アミノ酸配列と核酸配列の両方に適用される。個々の核酸配列に関して、保存的に修飾された変異体は、同一又は基本的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸、又は該核酸がアミノ酸配列をコードしない場合は、基本的に同一の配列を指す。遺伝暗号の縮重の故に、多数の機能的に同一の核酸が所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG及びGCTはすべて、アミノ酸、アラニンをコードする。それ故、アラニンが1個のコドンによって規定されるすべての位置で、該コドンは、コードされるポリペプチドを変化させることなく上記の対応するコドンのいずれかに変更されうる。そのような核酸変異は、保存的に修飾された変異の1つの種である、「沈黙変異」である。ここではポリペプチドをコードするあらゆる核酸配列が、同時に該核酸のあらゆる可能な沈黙変異も表わす。当業者は、核酸内の各々の縮重コドンが、機能的に同一の分子を生成するように修飾されうることを認識する。従って、ポリペプチドをコードする核酸の各々の沈黙変異は、暗黙のうちに各々の記述された配列に包含される。HsCENP-Eをコードするポリヌクレオチドの特定オリゴヌクレオチドプローブを使用して容易に検出されうる又は検出できない多型、及びHsCENP-Eをコードするポリヌクレオチド配列についての正常な染色体遺伝子座以外の遺伝子座を有する、対立遺伝子変異体への不適切な又は予期せぬハイブリダイゼーションは、この定義に包含される。

30

【0079】

野生型標的タンパク質のアミノ酸配列変異体も、本発明の標的タンパク質の定義に包含される。これらの変異体は、3つのクラス：置換、挿入又は欠失変異体の1つ又はそれ以上に分類される。これらの変異体は通常、該変異体をコードするDNAを生産するために、カセット又はPCR突然変異誘発又は当技術分野で周知の他の手法を用いて、標的タンパク質をコードするDNAにおけるヌクレオチドの部位特異的突然変異誘発によって作製され、その後組換え細胞培養において該DNAを発現させる。約100-150アミノ酸残基までを有する変異体標的タンパク質フラグメントは、確立された手法を用いてインビトロ合成によって作製しうる。アミノ酸配列変異体は、あらかじめ定められた性質の変異、すなわちそれらを、標的タンパク質アミノ酸配列の天然に生じる対立遺伝子又は種間変異と区別する特徴によって特色付けられる。該変異体は、典型的には天然に生じる類似体と同じ定性的生物活性を示すが、改変された特徴を有する変異体を選択することもできる。

40

50

【0080】

アミノ酸置換は典型的には単一残基である；挿入は通常、約1 - 約20アミノ酸程度であるが、かなり長い挿入も許容されうる。欠失は約1 - 約20残基の範囲であるが、一部の場合には、欠失ははるかに長くてもよい。

【0081】

置換、欠失及び挿入又はそれらの組み合わせを使用して最終誘導体に到達しうる。一般に、これらの変化は、分子の変化を最小限に抑えるために2 - 3個のアミノ酸に関して起こる。しかし、ある種の状況ではより大きな特徴も許容されうる。

【0082】

コードされる配列内の単一アミノ酸又は低いパーセンテージのアミノ酸を変化させる1個の核酸、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質配列への個々の置換は、その変化が化学的に類似のアミノ酸によるアミノ酸の置換を生じさせる「保存的に修飾された変異体」である。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換のリストは当技術分野において周知である (HenikoffとHenikoff (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919 (1992)))。 10

【0083】

交換可能に使用される「HsCENP-E」又は「CENP-E」は、配列番号2に閉めすアミノ酸配列を有するセントロメア関連モータータンパク質又はその対立遺伝子又は生物活性フラグメントを指す。「Hs」は、ヒト (homo sapien) を指す。HsCENP-Eは、染色体を紡錘体微小管に結合する、染色体のキネトコア構造の必須成分である。HsCENP-Eは、ATPアーゼ活性、微小管結合活性、及びプラス端指向性微小管モーター活性などの活性を有する。 20

【0084】

「HsCENP-Eポリヌクレオチド」は、HsCENP-Eタンパク質又はその生物活性フラグメントをコードするヌクレオチド配列、又はここで開示するヌクレオチド配列に高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする配列を含むポリヌクレオチド (DNA又はRNA) を指す。そのような核酸分子は多くの方法で特性付けることができ、例えば、該核酸分子は、配列番号2に示すアミノ酸配列、又は配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に少なくとも75%の同一性を有するヌクレオチド配列又はその対応するフラグメント、又は配列番号1に含まれるヌクレオチド配列に十分な同一性を有するヌクレオチド配列又はその対立遺伝子変異体、そのスプライシング変異体及び/又はそれらの相補物をコードしうる。 30

【0085】

「本発明の核酸」及び「核酸分子」は交換可能に使用され、ここで述べる核酸分子を指す。

【0086】

ここで使用するとき、「スプライシング変異体」は、ゲノムDNAの一次転写産物のディファレンシャルプロセッシングによって生産され、2種類以上のmRNAの生産をもたらす、本発明のタンパク質をコードする核酸の変異体を指す。ディファレンシャルプロセッシングされた一次転写産物から誘導されるcDNAは、完全なアミノ酸同一性の領域と異なるアミノ酸配列を有する領域を含む本発明のHsCENP-Eタンパク質をコードする。それ故、同じゲノム配列が多数の関連mRNA及びタンパク質の生産を導きうる。生じるmRNAとタンパク質の両方をここでは「スプライシング変異体」と称する。 40

【0087】

ここで使用するとき、「ポリヌクレオチドプローブ」は、1又はそれ以上の種類の化学結合を通して、通常は相補的塩基対合を通して、通常は水素結合形成を通して、相補的配列の標的核酸分子に結合することができるヌクレオチド配列と定義される。現在好ましいのは、プローブとより低い程度の相同性を有する配列と区別しながら、プローブと少なくとも70%の相同性を有する配列の特定を可能にするプローブベースのスクリーニング条件である。その結果として、配列番号1に示すヌクレオチドの配列と実質的に同じヌクレ 50

オチド配列を有する核酸が得られる。

【0088】

「ハイブリダイゼーション」は、染色体DNAにおいて天然に生じる結合に類似した、水素結合を通しての核酸の相補鎖（すなわちセンス：アンチセンス鎖又はプローブ-標的DNA）の相互の結合を指す。

「ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」の語句は、ここでは、その下でポリ核酸雑種が安定である条件を指すために使用される。当業者に既知であるように、雑種の安定性はその雑種の融解温度（ T_m ）に反映される。 T_m は次の式によって概算されうる：

$81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\%G + C) - 600 / l$
 [式中、 l はヌクレオチド内の雑種の長さである]。配列相同性が1%低下するごとに T_m は約 $1^\circ - 1.5$ 低下する。一般に、雑種の安定性はナトリウムイオン濃度と温度の関数である。典型的には、ハイブリダイゼーション反応はより低いストリンジェンシーの条件下で実施し、その後様々な、但しより高いストリンジェンシーでの洗浄を行う。ハイブリダイゼーションストリンジェンシーへの言及はそのような洗浄条件に関する。

【0089】

ここで使用するとき、「中等度にストリンジェントなハイブリダイゼーション」の語句は、標的DNAが、該標的DNAに約60%の同一性、好ましくは約75%の同一性、より好ましくは約85%の同一性を有する相補的核酸に結合することを許容する条件を指す；標的DNAに約90%以上の同一性を有することが特に好ましい。好ましくは、中等度にストリンジェントな条件は、42 で50%ホルムアミド、5Xデンハルト溶液、5X SSPE、0.2% SDS中のハイブリダイゼーション、次に65 で0.2X SSPE、0.2% SDS中での洗浄に等しい条件である。当業者は、必要に応じてプローブ長等のような因子を適合させるためにいかにして温度、イオン強度等を調整するかを認識する。(Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989)。

【0090】

ここで定義する「高ストリンジェンシー条件」は、(1)洗浄に低いイオン強度と高い温度、例えば50 で0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを用いる；(2)ハイブリダイゼーションの間にホルムアミドなどの変性剤を用いる、例えば42 で0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/pH6.5の50mMリン酸ナトリウム緩衝液を添加したホルムアミド、及び750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いる；又は(3)42 で50%ホルムアミド、5xSSC(0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5xデンハルト溶液、音波破碎サケ精子DNA(50Jig/ml)、0.1%SDS及び10%硫酸デキストラン、及び55 の0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)及び50%ホルムアミド中42 で洗浄、次に55 でEDTAを含む0.1xSSCから成る高ストリンジェンシー洗浄を用いるものと特定しうる。

【0091】

「低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション」の語句は、42 で10%ホルムアミド、5Xデンハルト溶液、6XSSPE、0.2%SDS中のハイブリダイゼーション、次に50 で1XSSPE、0.2%SDS中での洗浄に等しい条件を指す。

【0092】

デンハルト溶液及びSSPE(例えば、Sambrook, Fritsch及びManiatis、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989参照)は、他の適切なハイブリダイゼーション緩衝液と同様に当業者に周知である。例えば、SSPEは、pH7.4のリン酸緩衝0.18M NaClである。SS

10

20

30

40

50

PEは、例えば、水800ml中にNaCl 175.3g、NaH₂PO₄ 27.6g及びEDTA 7.4gを溶解し、pHを7.4に調整して、次に水を加えて1リットルにすることにより、20X原液として調製することができる。デンハルト溶液(Denhardt(1966)Biochem. Biophys. Res. Commun. 23:641)は、例えば、フィコール5g(Type 400、Pharmacia LKB Biotechnology, Inc., Piscataway N.J.)、ポリビニルピロリドン5g及びウシ血清アルブミン5g(Fraction V; Sigma, St. Louis MO)を混合し、次に水を加えて500mlにして、ろ過して微粒子物を除去することにより、50X原液として調製することができる。

【0093】

本発明のポリペプチドをコードする好ましい核酸は、中等度にストリンジェントな条件下で、好ましくは高ストリンジェンシー条件で、配列番号1に示す核酸配列(HsCENP-E)の実質的に配列全体に又は実質的な部分に(すなわち典型的には少なくとも15-30ヌクレオチド)ハイブリダイズする。

【0094】

核酸配列を定義するとき、「実質的に類似のアミノ酸配列」をコードすることができるすべての対象核酸配列を、標準核酸配列、すなわちHsCENP-Eをコードする配列-配列番号1と実質的に類似であるとみなす、又は実質的に同一のヌクレオチドの配列を含むとみなす。

【0095】

實際上、「実質的に同じ配列」の語は、2個のタンパク質をコードするDNA又はRNAが、中等度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、及びアミノ酸の同じ配列を有するタンパク質又はそれらの構造又は機能を変化させない配列の変化を有するタンパク質をコードすることを意味する。

【0096】

ヌクレオチド配列の「類似性」は、2個のポリヌクレオチドが、最適に整列したとき(適切なヌクレオチド挿入又は欠失と共に)それらの配列内の対応する位置に同一ヌクレオチド塩基を有する度合の基準である。配列類似性又はパーセント類似性は、例えば、the University of Wisconsin Genetics Computer Group(UWCG)より入手可能なGAPコンピュータプログラム、バージョン6.0などの配列分析ソフトウェアを用いて配列情報を比較することによって決定できる。GAPプログラムは、SmithとWaterman(Adv. Appl. Math. 2:482, 1981)によって修正された、NeedlemanとWunsch(J. Mol. Biol. 48:443, 1970)の整列方法を利用する。

【0097】

「同一性」は、当技術分野で知られているように、配列を比較することによって決定される、場合に依りて、2個又はそれ以上のポリペプチド配列あるいは2個又はそれ以上のポリヌクレオチドの間関係である。「同一性」は、Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 編集、Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 編集、Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, 第I部、Griffin, A.M.とGriffin, H.G. 編集、Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 及びSequence Analysis Primer, Gribskov, M.とDevereux, J. 編集、M Stockton Press, New York, 1991; 及びCarillo, H.とLipman, D., SIAM J Applied Math., 48:1073(1988)に述べられているものを含むが、これ

10

20

30

40

50

らに限定されない、既知の方法によって容易に算定できる。同一性を決定する方法は、検討する配列の間で最大の一致を与えるように設計される。さらに、同一性を決定する方法は公的に入手可能なプログラムに集成されている。2個の配列間の同一性を決定するためのコンピュータプログラム法は、GCGプログラムパッケージ (Devereux, J.ら、Nucleic Acids Research 12(1):387(1984))、BLASTP、BLASTN及びFASTA (Altschul, S.F.ら、J. Mol. Biol. 215:403-410(1990))を含むが、これらに限定されない。BLAST Xプログラムは、NCBI及び他のソース (BLAST Manual, Altschul, S.ら、NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S.ら、J. Mol. Biol. 215:403-410(1990))より公的に入手可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムも同一性を決定するために使用しうる。

10

【0098】

ポリペプチド配列比較のためのパラメータは次のものを含む：

1) アルゴリズム：NeedlemanとWunsch、J. Mol. Biol. 48:443-453, (1970)

【0099】

比較行列：HentikoffとHentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919(1992)からのBLOSSUM62

20

ギャップペナルティ：12

ギャップ長ペナルティ：4

【0100】

これらのパラメータに関して有用なプログラムは、Genetics Computer Group, Madison Wis.より「gap」プログラムとして公的に入手可能である。上記パラメータはペプチド比較についての(末端ギャップについてはペナルティを伴わない)デフォルトパラメータである。

【0101】

ポリヌクレオチド比較のためのパラメータは次のものを含む：

1) アルゴリズム：NeedlemanとWunsch、J. Mol. Biol. 48:443-453, (1970)

30

比較行列：一致 = +10、不一致 = 0

ギャップペナルティ：50

ギャップ長ペナルティ：3

【0102】

Genetics Computer Group, Madison Wis.より「gap」プログラムとして入手可能。これらは核酸比較についてのデフォルトパラメータである。

【0103】

場合に応じて、ポリヌクレオチド及びポリペプチドについての「同一性」の好ましい意味を下記の(1)及び(2)に述べる。

40

【0104】

(1) ポリヌクレオチド実施形態はさらに、配列番号1の標準配列と少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97又は100%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチドを包含し、その場合、該ポリヌクレオチド配列は配列番号1の標準配列と同一であってもよく又は標準配列と比較して一定整数までのヌクレオチド変化を含んでもよく、その場合、該変化は少なくとも1個のヌクレオチド欠失、転位及び転換を含む置換、又は挿入から成る群より選択され、及び該変化は、標準ヌクレオチドの5'又は3'末端の位置で、あるいは標準配列内のヌクレオチドの間に個別に又は標準配列内の1又はそれ以上の隣接する群の中に点在して、それらの末端位置の間のい

50

れかの位置で生じてもよく、その場合、該ヌクレオチド変化の数は、配列番号1内のヌクレオチドの総数に、パーセント同一性を表わす整数を100で割ったものを乗じて、次に配列番号1内のヌクレオチドの総数からその積を差し引くことによって決定されるか、又は

$$N_n X_n - (X_n Y)$$

[式中、 N_n はヌクレオチド変化の数であり、 X_n は配列番号1内のヌクレオチドの総数であり、 Y は、50%の場合は0.50、60%の場合は0.60、70%の場合は0.70、80%の場合は0.80、90%の場合は0.90、95%の場合は0.95、97%の場合は0.97又は100%の場合は1.00であって、乗法の演算子についての記号であり、及び X_n と Y の非整数の積は、 X_n からそれを差し引く前に最も近い整数に丸める]

10

によって決定される。配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の変化は、このコード配列内にナンセンス、ミスセンス又はフレームシフト突然変異を創造することがあり、それにより、そのような変化後に該ポリペプチドによってコードされるポリペプチドを変化させうる。

【0105】

(2)ポリペプチド実施形態はさらに、配列番号2のポリペプチド標準配列と少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97又は100%の同一性を有するポリペプチド配列を含む単離ポリペプチドを包含し、その場合、該ポリペプチド配列は配列番号2の標準配列と同一であってもよく又は標準配列と比較して一定整数までのアミノ酸変化を含んでもよく、その場合、該変化は少なくとも1個のアミノ酸欠失、保存的及び非保存的置換を含む置換、又は挿入から成る群より選択され、及び該変化は、標準ポリペプチド配列のアミノ又はカルボキシ末端の位置で、あるいは標準配列内のアミノ酸の間に個別に又は標準配列内の1又はそれ以上の隣接する群の中に点在して、それらの末端位置の間のいずれかの位置で生じてもよく、その場合該アミノ酸変化の数は、配列番号2内のアミノ酸の総数に、パーセント同一性を表わす整数を100で割ったものを乗じて、次に配列番号2内のアミノ酸の総数からその積を差し引くことによって決定されるか、又は

20

$$N_a = X_a - (X_a Y)$$

[式中、 N_a はアミノ酸変化の数であり、 X_a は配列番号2内のアミノ酸の総数であり、 Y は、50%の場合は0.50、60%の場合は0.60、70%の場合は0.70、80%の場合は0.80、90%の場合は0.90、95%の場合は0.95、97%の場合は0.97又は100%の場合は1.00であって、乗法の演算子についての記号であり、及び X_a と Y の非整数の積は、 X_a からそれを差し引く前に最も近い整数に丸める]

30

によって決定される。

【0106】

例えば、70%と指定されたアミノ酸のパーセント同一性は、ここで開示する及び当業者に周知の配列比較アルゴリズムの1つを用いて又は手動整列と視覚検査によって測定される、比較ウィンドウにわたって最大的一致を与えるように整列したとき、少なくとも約70%のアミノ酸同一性を有する1又はそれ以上の配列を指す。しかし、スプライシング変異体として生じる又は保存的アミノ酸置換(又は縮重コドンの置換)によって修飾されている、上述したレベルより低い相同性を有するタンパク質(及びそのようなタンパク質をコードするDNA又はmRNA)は、本発明の範囲内であると考えられる。

40

【0107】

本発明はまた、配列番号1に示す核酸とは異なるが、同じ表現型を有する核酸を包含する。表現型上類似の核酸はまた、「機能的に等しい核酸」と称される。

【0108】

ここで使用するとき、「機能的に等しい核酸」の語句は、ここで開示する核酸と同じタンパク質産物を生産するように実質的に同じように機能する、わずかな且つ重要でない配列変異を特徴とする核酸を包含する。これらの変化は、タンパク質の三次構造を実質的に変化させないものとして当業者に認識されるものを含む。

50

【0109】

ここでは「タンパク質」とは、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド及びペプチドを含む、少なくとも2個の共有結合したアミノ酸を意味する。それ故、「アミノ酸」又は「ペプチド残基」は、ここで使用するとき、天然に生じるアミノ酸と合成アミノ酸の両方を意味する。その側鎖は(R)又は(S)立体配座のいずれでもよい。好ましい実施形態では、該アミノ酸は(S)又はL型立体配座である。非天然に生じる側鎖を使用する場合は、例えばインピボでの分解を防ぐ又は遅らせるために非アミノ酸置換基を使用しうる。

【0110】

「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」の語は、ここではアミノ酸残基のポリマーを指すために交換可能に使用される。それらの語は、1個又はそれ以上のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工的化学類似体であるアミノ酸ポリマーならびに天然に生じるアミノ酸ポリマーに適用される。標的タンパク質は、少なくとも微小管刺激性ATPアーゼ活性を有することが明らかにされており、好ましくはHsCENP-Eと選択的に免疫反応性である抗体に結合するか又はその配列が突然変異誘発及び/又は組換えによってHsCENP-Eから誘導されるポリペプチドを含む。アミノ酸は、ここではそれらの一般に知られる1文字又は3文字記号によって表わされうる。ヌクレオチドは、同様に、それらの一般的に受け入れられている1文字コードによって表わされうる。該標的タンパク質はまた、「変化して」いてもよく、沈黙変化を生じ、機能的に等しいHsCENP-E(例えばHsCENP-E変異体)をもたらすアミノ酸残基の欠失、挿入又は置換を含みうる。意図的なアミノ酸置換は、HsCENP-Eの生物学的又は免疫学的活性が保持される限り、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び/又は両親媒性に基づいて実施しうる。例えば、負に荷電したアミノ酸は、アスパラギン酸及びグルタミン酸を含み、正に荷電したアミノ酸は、リシン及びアルギニンを含み、及び類似の親水性値を有する無電荷の極性頭部を持つアミノ酸は、ロイシン、イソロイシン及びバリン；グリシンとアラニン；アスパラギンとグルタミン；セリンとトレオニン；及びフェニルアラニンとチロシンを含みうる。

【0111】

ここで使用する「アミノ酸配列」の語は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質配列、及びそのフラグメント又は部分、及び天然に生じる又は合成分子を指す。

【0112】

標準タンパク質、例えば配列番号2の「フラグメント」又は「生物活性フラグメント」は、野生型又は標準タンパク質の完全なアミノ酸配列の部分を含むタンパク質を指すことが意図されている。そのような分子は、中でも特に、それらの野生型相同ポリペプチド及びポリヌクレオチドと等価の類似生物学的機能/性質を有すると予想される。さらに、本発明の好ましいポリペプチド及びポリヌクレオチドは、少なくとも1つのHsCENP-E仲介性活性を有する。

【0113】

「HsCENP-E」又は「単離HsCENP-E」又は「標的タンパク質」のいずれかに関連して使用するとき「生物活性」は、例えばATPアーゼ活性において試験したとき、微小管刺激性ATPアーゼ活性を含むがそれに限定されない、1又はそれ以上のキネシタンパク質の生物活性を有するタンパク質を指す。生物活性はまた、微小管滑走アッセイ又は微小管結合アッセイにおいても明らかにしうる。ここで使用するとき、HsCENP-Eタンパク質に付随する生物活性は、ヒトCENP-Eに特徴的な何らかの活性を指す。上記参照。

【0114】

「ATPアーゼ活性」は、ATPを加水分解する能力を指す。他の活性は、重合/脱重合(微小管動力学への作用)、紡錘体の他のタンパク質への結合、細胞周期制御に関わるタンパク質への結合、あるいはキナーゼ又はプロテアーゼなどの他の酵素に対する基質と

して働くこと、及び染色体集合、軸索輸送等のような特異的キネシン細胞活性を含む。キネシンスーパーファミリーの成員は、有糸分裂及び減数分裂紡錘体形成、染色体分離、細胞小器官及び小胞輸送、及び微小管に基づく輸送に必要な多くの他のプロセスにとって必須であると考えられている。キネシンの一般的な特徴は、微小管結合、ATP加水分解及び力の変換活性を有する保存された約350アミノ酸のモータードメインの存在である(例えばBartonら(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(5):1735-1742及びGoldstein(1993)Annu. Rev. Genet. 27:319-351参照)。キネシン(キネシンモーター)及びキネシン関連タンパク質の総説については、例えばKreisとVale(1993)Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins, Oxford University Press, Oxford及びその中の参考文献参照。キネシンの重鎖及び軽鎖は、ヒトを含む多くの種からクローン化され、配列決定されている(GenBank X65873)。

10

20

30

40

50

【0115】

「キネシンモーター阻害因子」又は「キネシンモーター活性の阻害」の語は、キネシン/微小管を介した化学エネルギー(例えばATPに貯蔵されているような)の力学的エネルギー(例えば力の生成又は運動)への変換の低下又は排除を指す。そのような低下は、例えば運動性アッセイにおけるように直接測定することができ、あるいはキネシンタンパク質のATPアーゼ活性の低下、及び/又はキネシンモータータンパク質-微小管結合相互作用の親和性及び/又は特異性の低下、及び/又は細胞(1又はそれ以上)の有糸分裂活性の低下のような代理マーカーの使用によって確認することができる。逆に、「キネシンモーターアゴニスト」又は「キネシンモーター活性の上方調節因子」は、キネシン/微小管を介した化学エネルギー(例えばATPに貯蔵されているような)の力学的エネルギー(例えば力の生成又は運動)への変換の上昇を指す。

【0116】

「被験化合物」の語は、その抗キネシンモーター活性を測定しようとする化合物を指す。そのような被験化合物は、単独又は適切な担体中の、事実上いかなる分子又は分子の混合物も包含する。

【0117】

「HsCENP-Eの調節因子」は、HsCENP-E活性に関するインビトロアッセイを用いて特定される調節分子(例えば阻害因子及び活性化因子又はエンハンサー)を指す。そのようなアッセイは、ATPアーゼ活性、微小管滑走、紡錘体構築、微小管脱重合活性、及び中期の停止を含む。試験濃度の少なくとも1つの候補物質で処理したアッセイを、対照濃度(ゼロでありうる)の候補物質を有する対照試料と比較して、調節の度合を検査する。対照試料には、100の相対的HsCENP-E活性値を割り当てる。対照に比べてHsCENP-E活性値が少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、75%、又は好ましくは少なくとも100%上昇又は低下するとき、HsCENP-Eの調節が達成される。

【0118】

「治療」は、治療的処置と予防的措置の両方を指す。治療を必要とするものとは、既にその疾患を有するものならびにその疾患に罹患しやすいもの又はその疾患を予防すべきものを包含する。

【0119】

「疾患」は、本発明のタンパク質による治療から恩恵を受けるであろう状態である。これは、哺乳類に問題の疾患への素因を与える病的状態を含む、慢性及び急性障害又は疾病を包含する。疾患は、心臓血管系、神経系の疾患及び疼痛知覚に関わるものを含むが、これらに限定されない。

【0120】

ここで使用するとき、組換え又は異種HsCENP-Eに関して「機能性」とは、本発明のタンパク質が、ここで開示する又は当業者に既知のインビトロ又はインビボアッセイ

によって評価したとき天然 C E N P - E に付随する活性を示すことを意味する。何らかのそのような活性を有することは、当業者に既知の、ここで提供する何らかの方法によって評価でき、1個のペプチドを機能性と称するのに十分である。そのような活性は上記のように検出する。

【0121】

I. 単離核酸分子

本発明は、新規ヒトセントロメア関連モータータンパク質 (H s C E N P - E) の発見、H s C E N P - E をコードするポリヌクレオチド、及び癌、神経障害及び小胞輸送障害の診断、治療又は予防のためのこれらの組成物の使用に基づく。

【0122】

1つの局面では、本発明は、キネシンスーパーファミリーモータータンパク質をコードするヌクレオチドの配列を含む単離核酸分子を提供し、該モータータンパク質は次の性質を有する：(i) 該タンパク質の活性は、微小管刺激性 A T P アーゼ活性を含む；(i i) 該タンパク質は、配列比較アルゴリズムを用いて測定したとき配列番号2に70%以上のアミノ酸配列同一性を有する配列を持つ、及び(i i i) 該タンパク質は、配列番号2に対して惹起した抗体に特異的に結合する。

10

【0123】

特定実施形態では、本発明は、本発明の H s C E N P - E をコードする、配列番号1のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を包含する。

【0124】

もう1つの実施形態では、該核酸分子は配列番号2をコードする。

20

【0125】

本発明の H s C E N P - E をコードする相補的 D N A クローンは、提供されるその D N A から作製する。同様に、本発明のポリヌクレオチドは、ゲノム D N A ライブラリーなどの天然ソースから入手するか、又は周知の市販されている手法を用いて合成できる。

【0126】

「単離 H s C E N P - E 核酸分子」は、生物活性 H s C E N P - E 又はそのフラグメントをコードするか、該 R N A 又は D N A に相補的であるか、又は該 R N A 又は D N A にハイブリダイズし、及び中等度からストリンジェントな条件下で安定に結合したままである、16個以上、好ましくは20個又はそれ以上の連続ヌクレオチド塩基を含む R N A 又は D N A である。この R N A 又は D N A は、それが天然ソースにおいて自然に結合している少なくとも1つの汚染ソース核酸分子を含まない、好ましくは他の哺乳類の R N A 又は D N A を実質的に含まない。単離 H s C E N P - E 核酸分子の一例は、天然 C E N P - E と少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも85%、さらに一層好ましくは90%、最も好ましくは95%の配列同一性を共有する生物活性 H s C E N P - E をコードする R N A 又は D N A である。

30

【0127】

本発明の特に好ましい実施形態の中に、配列番号2に示すアミノ酸配列を有する H s C E N P - E タンパク質及びその生物活性フラグメントをコードするポリヌクレオチドがある。

40

【0128】

本発明の好ましい実施形態は、配列番号2に示すアミノ酸配列を有する H s C E N P - E タンパク質をコードするポリヌクレオチドに、それらの長さ全体にわたって少なくとも80%同一であるポリヌクレオチド、及びそのようなポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドである。これに関して、それらの長さ全体にわたって上記に少なくとも80%同一であるポリヌクレオチドが特に好ましく、少なくとも90%同一であるものがとりわけ好ましい。あるいは、配列番号1に示す配列に少なくとも97%の配列同一性を有するポリヌクレオチドが極めて好ましく、少なくとも99%の配列同一性を有するものが最も好ましい。

【0129】

50

本発明はさらに、ここで上述した配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。これに関して、本発明は特に、ここで上述した配列にストリンジェント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。ここで使用するとき、「ストリンジェント条件」の語は、配列間に少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%の同一性が存在する場合にのみハイブリダイゼーションが起こることを意味する。

【0130】

当業者は、遺伝暗号の縮重の結果として、その一部が、既知であり且つ天然に生じる遺伝子のポリヌクレオチド配列に最小限の類似性を有する、H s C E N P - E をコードする多数のポリヌクレオチドが産生されうること認識する。それ故、本発明はまた、可能なコドン選択に基づいて組合せを選択することによって作製されうるポリヌクレオチド配列のあらゆる可能な変異を想定する。これらの組合せは、天然に生じるH s C E N P - E のポリヌクレオチド配列に適用される標準トリプレット遺伝子暗号に従って為され、そのようなすべての変異は特定して開示されているとみなされるべきである。

10

【0131】

ここで使用するとき、「縮重」の語は、配列番号1と少なくとも1個のヌクレオチドが異なるが、配列番号2からのヌクレオチド(H s C E N P - E)を示すものと同じアミノ酸をコードするコドンを指す。

【0132】

例えば、トリプレット「UCU」、「UCC」、「UCA」及び「UCG」によって規定されるコドンは、これら4つのコドンすべてがアミノ酸、セリンをコードするので、互いに縮重している。

20

【0133】

それ故、H s C E N P - E タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、その長さ全体にわたって配列番号1の1つに示すコード配列に同一でありうるか、又は配列番号2のポリペプチドをコードするこのヌクレオチド配列の縮重形態でありうるか、又は配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に高度に同一でありうる。

【0134】

H s C E N P - E タンパク質をコードする例示核酸分子は：

- (a) 配列番号2に示すアミノ酸配列をコードするDNA、
 - (b) 生物活性ヒトH s C E N P - E をコードする、中等度にストリンジェントな条件下で(a)のDNAにハイブリダイズするDNA、又は
 - (c) 生物活性ヒトH s C E N P - E をコードする、上記(a)又は(b)に関して縮重しているDNA
- から選択されうる。

30

【0135】

本発明のもう1つの実施形態は、配列番号2に示すものと実質的に同じアミノ酸配列をコードする標準ヌクレオチド配列と実質的に同じヌクレオチド配列を有する核酸を考慮する。

【0136】

配列番号1に含まれるヌクレオチド配列に同一であるか又は十分に同一であるポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする完全長cDNA及びゲノムクローンを単離するため、及び配列番号1に高い配列類似性を有する他の遺伝子(ヒト以外の種からのホモログ及びオーソログをコードする遺伝子を含む)のcDNA及びゲノムDNAを単離するために、cDNA及びゲノムDNAのためのハイブリダイゼーションプローブとして又は核酸増幅(PCR)反応のためのプライマーとして使用しうる。典型的にはこれらのヌクレオチド配列は、標準の配列に70%同一、好ましくは80%同一、より好ましくは90%同一、最も好ましくは95%同一である。該プローブ又はプライマーは一般に、少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30ヌクレオチドを含み、少なくとも50ヌクレオチドを有しうる。特に好ましいプローブは、30-50ヌクレオチドを有する。

40

50

【0137】

当業者は、多くの場合、単離 cDNA 配列が、本発明のヒトタンパク質をコードする領域が該 cDNA の 5' 末端で短く切断されているという意味で不完全であることを認識する。これは、1 本目の鎖の cDNA 合成の間に mRNA 鋳型の DNA コピーを完成することができない、固有の低い「処理能力 (processivity)」(酵素が重合反応の間鋳型に結合したままである能力の基準)を有する酵素、逆転写酵素の結果である。

【0138】

HsCENP-E 及びそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列は、好ましくは適切に選択されたストリンジェンシーの条件下で天然に生じる HsCENP-E のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができるが、実質的に異なるコドン使用頻度を有する HsCENP-E 又はその誘導体をコードするヌクレオチド配列を生成すること、例えば非天然に生じるコドンを含むことは有益であると考えられる。コドンは、特定コドンが宿主によって利用される頻度に従って特定原核生物又は真核生物宿主においてペプチドの発現が起こる割合を上昇させるように選択しうる。コードされるアミノ酸配列を変化させずに HsCENP-E 及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に変化させるための他の理由は、天然に生じる配列から生成される転写産物よりも長い半減期のような、より望ましい性質を有する RNA 転写産物を生産することによる。

【0139】

HsCENP-E をコードする核酸配列は、部分ヌクレオチド配列を使用し、プロモーター及び調節エレメントなどの、上流配列を検出するための当技術分野で既知の様々な PCR ベースの方法を用いて伸長しうる。上記の目的を達成するための様々なプロトコールが存在する。例えば、Sarkar, G. (1993) PCR Methods Applic. 2: 318-322; Trnglia, T. ら (1998) Nucleic Acids Res. 16: 8186; Lagerstrom, M. ら (1991) PCR Methods Applic. 1: 111-119; Parker, J. D. ら (1991) Nucleic Acids Res. 19: 3055-306 参照。完全長 cDNA を得るため又は短い cDNA を伸長するための他の方法は周知である。例えば、Frohman ら、PNAS USA 85, 8998-9002, 1988)。

【0140】

DNA 塩基配列決定のための方法は当技術分野において周知であり、本発明の実施形態のいずれかを実施するために使用しうる。それらの方法は、DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland, Ohio)、Taq ポリメラーゼ (Perkin-Elmer)、耐熱性 T7 ポリメラーゼ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway N. J.)、又は ELONGASE 増幅システム (Life Technologies, Gaithersburg Md.) に認められるようなポリメラーゼとブルーフリーディングエキソヌクラーゼの組合せなどの酵素を使用しうる。塩基配列決定は、ABI 373 又は 377 DNA 塩基配列決定システム (Perkin-Elmer) 又は MEGABACE 1000 DNA 塩基配列決定システム (Molecular Dynamics, Sunnyvale Calif.) を用いて実施しうる。生じた配列を、当技術分野で周知の様々なアルゴリズムを用いて分析する。(例えば、Ausubel, F. M. (1997) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York N. Y., unit 7.7; Meyers, R. A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, Wiley VCH, New York N. Y., p. 856-853 参照。)

【0141】

ヒト以外の種からのホモログ及びオーソログを含む、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、適切なライブラリーを、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下に配列番号 1 の配列を有する標識プローブ又はそれから誘導されるフラグメント

10

20

30

40

50

でスクリーニングすること；及び該ポリヌクレオチド配列を含む完全長 cDNA 及びゲノムクローンを単離すること、の段階を含む工程によって入手しうる。そのようなハイブリダイゼーション手法は当業者に周知である。哺乳類ライブラリーをスクリーニングした後、ハイブリダイゼーションシグナルを検出することによって陽性クローンを特定し、特定したクローンを制限酵素地図の作成及び/又は DNA 塩基配列分析によって特徴づけ、その後、ここで示す配列と比較することによって検討して、それらが本発明のタンパク質全体をコードする DNA を含むかどうかを確認する。選択したクローンが不完全である場合は、それらを使用して同じか又は異なるライブラリーを再びスクリーニングし、重複クローンを得る。所望する場合は、本発明のタンパク質全体をコードする重複クローンが得られるまで該ライブラリーを陽性クローンで再スクリーニングすることができる。該ライブラリーが cDNA ライブラリーである場合は、重複クローンはオープンリーディングフレームを含む。ライブラリーがゲノムライブラリーである場合は、重複クローンはエクソンとイントロンを含む。いずれの場合も、ここで提供する DNA 及びコードされるタンパク質との比較によって完全なクローンを特定しうる。

10

20

30

40

50

【0142】

そのようにして特定した核酸分子は、次に、そのような核酸を当業者に既知の種々のタンパク質発現系に組み込んだとき、該核酸分子によってコードされる HsCENP-E タンパク質を生産するために使用することができる。さらに、そのような核酸分子又はそのフラグメントは、容易に検出しうる置換基で標識して、所与の試料においてヒト HsCENP-E コード遺伝子又は mRNA 転写産物の存在及び/又は量を検定するためのハイブリダイゼーションプローブとして使用することができる。ここで述べる核酸分子及びそのフラグメントはまた、ここで述べる本発明のタンパク質をコードする遺伝子を増幅するための PCR 反応におけるプライマー及び/又は鋳型としても有用である。

【0143】

完全長 cDNA をスクリーニングするとき、より大きな cDNA を含むようにサイズ選択したライブラリーを使用することが望ましい。好ましいストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5xSSC (150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム (pH 7.6)、5xデンハルト溶液、10%硫酸デキストラン、及び変性してせん断したサケ精子DNAを含む溶液中、42 で一晩のインキュベーション、次に 0.1xSSC 中約 65 でのフィルターの洗浄を含む。

【0144】

本発明の1つの局面はまた、適切なライブラリーを、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下に配列番号1の配列を有する標識プローブ又はそのフラグメントでスクリーニングすることによって得られるポリヌクレオチドを含む。

【0145】

本発明の核酸は、当技術分野で周知の様々な方法によって、例えば配列番号1の様々な領域からのオリゴヌクレオチドプライマーを使用したPCR増幅を用いる、ここで述べる方法等によって生産できる。あるいは、当技術分野で周知の化学的方法を用いてHsCENP-Eをコードする配列を、全体として又は部分的に、合成しうる。(例えばCaruthers, M. H. ら (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215-223、及びHom, T. ら (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232 参照)。あるいは、HsCENP-E 自体又はそのフラグメントを、化学的方法を用いて合成してもよい。例えば、様々な固相手法を用いてペプチド合成を実施することができる。(例えば、Roberge, J. Y. ら (1995) Science 269:202-204 参照)。自動合成は、ABI 431A ペプチドシンセサイザー (Perkin-Elmer) を用いて実施しうる。

【0146】

本発明のもう1つの実施形態では、HsCENP-E タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列又はそのフラグメントを、適切な宿主細胞においてHsCENP-E 又はそ

のフラグメント又は機能的等価物の発現を指令する組換えDNA分子中にクローン化しうる。遺伝暗号の固有の縮重の故に、実質的に同じか又は機能的に等しいアミノ酸配列をコードする他のDNA配列を生産し、HsCENP-Eを発現するために使用しうる。

【0147】

本発明のヌクレオチド配列は、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング及び/又は発現の修飾を含むがこれらに限定されない様々な目的に合わせてHsCENP-Eコード配列を変化させるために、当技術分野において一般的に知られる方法を用いて構築することができる。遺伝子フラグメント及び合成ポリヌクレオチドのランダムな切断とPCR再構築によるDNAシャフリングを使用して該ヌクレオチド配列を構築しうる。例えば、オリゴヌクレオチドを介した部位指定突然変異誘発を用いて、新しい制限部位を創造する、グリコシル化パターンを変化させる、コドン使用頻度を変える、スプライシング変異体を生産する等の突然変異を導入しうる。

10

【0148】

本発明の核酸で形質転換した細胞を特定するために、数多くの方法が既知であり、当業者に使用可能である。例えば、特異的ポリクローナル又はモノクローナル抗体を用いてHsCENP-Eの発現を検出し、測定するための免疫学的方法は、当技術分野において既知である。そのような手法の例は、酵素結合免疫ソルベント検定法(ELISA)、放射免疫測定法(RIA)、及び蛍光活性化細胞分類法(FACS)を包含する。HsCENP-E上の2個の非干渉性エピトープに反応性のモノクローナル抗体を使用する、2サイト・モノクローナルベースの免疫測定法が好ましいが、競合結合測定法も使用しうる。これらや他のアッセイは当技術分野において周知である。(例えば、Hampton, R.ら(1990) Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul Minn., 第IV章; Coligan, J. E.ら(1997) Current Protocols in Immunology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York N.Y.; 及びPound, J. D.(1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa N.J. 参照)。

20

【0149】

本発明のタンパク質をコードするmRNAの翻訳を妨げるように、該mRNAのいずれかの部分と特異的に結合することができるヌクレオチド配列を有するアンチセンスポリヌクレオチドも提供する。該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするcDNAの配列のいずれかの部分と特異的に結合することができる配列を有しうる。

30

【0150】

極めて多様な標識及び複合手法が当業者に既知であり、様々な核酸及びアミノ酸検定法において使用しうる。HsCENP-Eをコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための標識ハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプローブを作製するための手段は、オリゴ標識、ニックトランスレーション、末端標識、又は標識ヌクレオチドを用いたPCR増幅を包含する。

40

【0151】

HsCENP-Eタンパク質のフラグメントは、組換え生産だけでなく、固相手法を用いた直接ペプチド合成によっても生産しうる(例えば、Creighton, 前出、p. 55-60参照)。タンパク質合成は、手動手法又は自動化法によって実施しうる。自動合成は、例えば、ABI 431Aペプチドシンセサイザー(Perkin-Elmer)を用いて実施しうる。HsCENP-Eの様々なフラグメントを別々に合成し、次にそれらを結合して完全長分子を生産してもよい。

【0152】

ここで使用するとき、「発現」は、ポリ核酸がmRNAに転写され、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に翻訳される過程を指す。ポリ核酸がゲノムDNAに由来する場合

50

、発現は、適切な真核宿主細胞又は生物を選択すれば、mRNAのスプライシングを含みうる。

【0153】

II. ベクター、宿主細胞、発現等

本発明はまた、例えば(a)配列番号2のアミノ酸配列又はその生物活性フラグメントをコードする、又は(b)配列番号1に示す配列又はその部分を含むヌクレオチド配列を有する、本発明の核酸分子を含むベクター、好ましくは発現ベクターに関する。

【0154】

発現ベクターの設計が、形質転換する宿主細胞の選択、所望するタンパク質発現のレベル等のような因子に依存しうるのは当業者に認識される。本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入し、それによって、ここで述べるような核酸によってコードされる、融合タンパク質又はペプチドを含むタンパク質又はペプチド(例えばHsCENP-Eタンパク質、HsCENP-Eタンパク質の突然変異形態、融合タンパク質等)を生産することができる。

10

【0155】

適切な発現ベクターへのクローン化DNAの組込み、プラスミドベクター又は各々が1個又はそれ以上の異なる遺伝子をコードするプラスミドDNA又は線状DNAによる真核細胞のトランスフェクション、及びトランスフェクトした細胞の選択は、当技術分野において周知である(例えば、Sambrookら(1989)Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press参照)。本発明の核酸構築物を含む発現ベクターを宿主細胞に導入(形質導入)して、形質導入組換え細胞(すなわち組換え異種核酸を含む細胞)を生産するための適切な手段は、当技術分野において周知である。詳細な総説については、例えば、各々が全体として参照してここに組み込まれる、Friedmann, 1989, Science, 244: 1275-1281; Mulligan, 1993, Science, 260: 926-932参照。

20

【0156】

ここで使用するとき、「形質転換」及び「トランスフェクション」の語は、異種核酸(例えばDNA)を宿主細胞に導入するための当技術分野で認知されている様々な手法を指すことが意図されている。宿主細胞を形質転換する又はトランスフェクトするための適切な手法は、Sambrookら(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)及び他の実験室マニュアルに認められる。

30

【0157】

本発明の組換え発現ベクターは、本発明の核酸を、宿主細胞における該核酸の発現に適した形態で含み、これは、該組換え発現ベクターが、発現すべき核酸配列に作動可能に連結された、発現のために使用される宿主細胞に基づいて選択される1又はそれ以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内で、「作動可能に連結された」とは、対象ヌクレオチド配列が、該ヌクレオチド配列の発現を可能にするように(例えばインビトロ転写/翻訳系において又はベクターが宿主細胞に導入されるときは宿主細胞において)調節配列に連結されていることを意味するものとする。「調節配列」の語は、プロモーター、エンハンサー及び他の発現制御エレメント(例えばポリアデニル化シグナル)を包含することが意図されている。そのような調節配列は、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に述べられている。調節配列は、多くの種類の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指令するもの及び特定宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指令するもの(例えば組織特異的調節配列)を含む。

40

50

【0158】

好ましくは、本発明の組換え発現ベクターは、キネシンスーパーファミリーモータータンパク質をコードする核酸分子を含み、該モータータンパク質は次の性質を有する：(i)タンパク質の活性が微小管刺激性ATPアーゼ活性を含む；及び(ii)タンパク質が、配列比較アルゴリズムを用いて測定したとき配列番号2に70%以上のアミノ酸配列同一性を有する配列を備える。

【0159】

生物活性HsCENP-Eを発現するために、HsCENP-E又はその誘導体をコードするヌクレオチド配列を適切な発現ベクター、すなわち適切な宿主細胞における挿入コード配列の転写及び翻訳制御のために必要なエレメントを含むベクターに挿入しうる。これらのエレメントは、エンハンサー、構成的及び誘導的プロモーターなどの調節配列、及びベクターにおける及びHsCENP-Eをコードするポリヌクレオチド配列における5'及び3'非翻訳領域を含む。そのようなエレメントは、それらの強さ及び特異性を変化させうる。特異的開始シグナルも、HsCENP-Eをコードする配列のより効率的な翻訳を達成するために使用しうる。そのようなシグナルは、ATG開始コドン及び隣接配列、例えばコザック配列を含む。HsCENP-Eをコードする配列及びその開始コドンと上流調節配列を適切な発現ベクターに挿入する場合、付加的な転写又は翻訳制御シグナルは必要ないと考えられる。しかし、コード配列又はそのフラグメントだけを挿入する場合は、インフレームATG開始コドンを含む外来性翻訳制御シグナルがベクターによって提供されるべきである。外来性翻訳エレメント及び開始コドンは、天然及び合成の、様々な由来のものでありうる。使用する個々の宿主細胞系に適切なエンハンサーを含めることによって発現の効率を高めうる(例えば、Scharf, D.ら(1994)Results Probl. Cell Differ. 20:125-162参照)。

【0160】

一般に、最終的に発現されるDNA配列は、該DNA配列と発現ベクターを1又はそれ以上の制限酵素で開裂し、次にそれらのフラグメントを連結することによって発現ベクターに結合される。

【0161】

制限酵素消化のための手順は当業者に周知である。異種核酸、プロモーター、ターミネーター又は他のエレメントをそれぞれ連結して、それらを複製のために必要な情報を含む適切なクローニングビヒクルに挿入するための手法は当業者に周知である(例えば、中でも特に、Sambrookら、1989参照)。

【0162】

形質導入の例示的方法は、例えば、ウイルスベクターを用いた感染(例えば、米国特許第4,405,712号及び同第4,650,764号参照)、リン酸カルシウムトランスフェクション(米国特許第4,399,216号及び同第4,634,665号)、硫酸デキストラントランスフェクション、電気穿孔法、リポフェクション(例えば、米国特許第4,394,448号及び同第4,619,794号参照)、サイトフェクション、パーティクルガン法等を包含する。異種核酸は、場合により、その染色体外(すなわちエピソーム)維持を可能にする配列を含みうるか、又は異種核酸は、宿主のゲノムに組み込まれる供与体核酸でありうる。組換え細胞を、その後、該DNAによってコードされる本発明のタンパク質が発現される条件下で培養することができる。好ましい細胞は、哺乳類細胞(例えばHEK293、CHO及びLtk⁻細胞)、酵母細胞(例えばPichia pastorisなどのメチロトロフ酵母細胞)、細菌細胞(例えば大腸菌)等を包含する。

【0163】

ここで使用するとき、「異種(heterologous又はforeign)DNA及び/又はRNA」は交換可能に使用され、それが存在する細胞のゲノムの部分としては天然に生じないDNA又はRNA、あるいは天然に生じるものとは異なるゲノム内の位置(1又はそれ以上)に認められるDNA又はRNAを指す。典型的には、異種DNA及び

10

20

30

40

50

R N A は、宿主細胞に内因性ではなく、該細胞に人為的に導入された D N A 及び R N A を指す。

【0164】

H s C E N P - E をコードする配列と適切な転写及び翻訳制御エレメントを含む発現ベクターを構築するには、当業者に周知の方法を使用しうる。これらの方法は、インビトロ組換え D N A 手法、合成手法及びインビボ遺伝子組み換えを包含する。(例えば、S a m b r o o k ら (1 9 8 9) M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s , P l a i n v i e w N . Y . , 第 4、8 及び 16 - 17 章 ; A u s h u b e l , F . M . ら (1 9 9 5) C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , J o h n W i l e y & S o n s , N e w Y o r k N . Y . , 第 9、13 及び 16 章 参照)。

10

【0165】

本発明のもう 1 つの局面は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。「宿主細胞」及び「組換え宿主細胞」の語は、ここでは交換可能に使用される。そのような語は、特定対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫又は潜在的子孫も指すことと了解される。連続する世代においては突然変異又は環境的影響のいずれかのためにある種の修飾が起こりうるので、そのような子孫は、事実上、親細胞と同一でないことがあるが、それでもここで使用する語の範囲内に包含される。

【0166】

H s C E N P - E をコードする配列を含み且つ発現するために様々な発現ベクター / 宿主系が使用できる。これらは、組換えバクテリオファージ、プラスミド又はコスミド D N A 発現ベクターで形質転換した細菌 ; 酵母発現ベクターで形質転換した酵母 ; ウイルス発現ベクター (例えばバキュロウイルス) で感染させた昆虫細胞系 ; 両生類細胞 (例えばツメガエル (X e n o p u s l a e v i s) 卵母細胞) ; ウイルス発現ベクター (例えばカリフラワーモザイクウイルス、C a M V 又はタバコモザイクウイルス、T M V) 又は細菌発現ベクター (例えば T i 又は p B R 3 2 2 プラスミド) で形質転換した植物細胞系 ; 又はチャニーズハムスター卵巣細胞 (C H O) 又は C O S 細胞などの哺乳類細胞又は動物細胞系のような微生物を含むが、これらに限定されない。本発明は、使用する宿主細胞によって限定されない。注入した R N A 転写産物を発現するための例示的細胞は、ツメガエル卵母細胞を包含する。一般に、宿主細胞においてポリヌクレオチドを維持し、増殖又は発現して、ポリペプチドを生産することができるいかなる系又はベクターも使用しうる。適切なヌクレオチド配列は、例えば、S a m b r o o k ら、M O L E C U L A R C L O N I N G , A L A B O R A T O R Y M A N U A L (前出) に述べられているもののような、様々な周知の常用手法のいずれかによって発現系に挿入しうる。

20

30

【0167】

細菌系では、H s C E N P - E をコードするポリヌクレオチド配列の意図されている用途に依存して、いくつものクローニング及び発現ベクターを選択しうる。例えば、H s C E N P - E をコードするポリヌクレオチド配列の常套的クローニング、サブクローニング及び増殖は、p B L U E S C R I P T (S t r a t a g e n e , L a J o l l a C a l i f .) 又は p S P O R T 1 プラスミド (L i f e T e c h n o l o g i e s) などの多機能性大腸菌ベクターを用いて達成できる。ベクターのマルチクローニングサイトへの H s C E N P - E をコードする配列の連結は、l a c Z 遺伝子を分断し、組換え分子を含む形質転換細菌の特定のための比色スクリーニング手法を可能にする。さらに、これらのベクターは、インビトロ転写、ジデオキシ塩基配列決定、ヘルパーファージによる一本鎖レスキュー、及びクローン化配列における入れ子欠失の創造のために有用でありうる。(例えば、V a n H e e k e , G . と S . M . S c h u s t e r (1 9 8 9) J . B i o l . C h e m . 2 6 4 : 5 5 0 3 - 5 5 0 9 参照)。例えば抗体の生産のために、大量の H s C E N P - E が必要なときは、H s C E N P - E の高レベル発現を指令するベクターを使用しうる。例えば、強力な誘導的 T 5 又は T 7 バクテリオファージプロモーターを

40

50

含むベクターを使用しうる。

【0168】

大腸菌原核細胞の形質転換のための例示的発現ベクターは、pET発現ベクター（Novagen, Madison, Wis., 米国特許第4,952,496号参照）、例えば、T7プロモーター、T7ターミネーター、誘導的大腸菌lacオペレーター及びlacリプレッサー遺伝子を含むpETIIa、及びT7プロモーター、T7ターミネーター及び大腸菌ompT分泌シグナルを含むpET12a-cを包含する。もう1つのそのようなベクターは、lppプロモーター、lacUV5プロモーターオペレーター、ompA分泌シグナル及びlacリプレッサー遺伝子を含むpIN-IIIompA2である（Duffaudら、Meth. in Enzymology, 153:492-507, 1987参照）。 10

【0169】

原核生物におけるタンパク質の発現は、しばしば、融合又は非融合タンパク質の発現を指令する構成的又は誘導的プロモーターを含むベクターを用いて大腸菌において実施される。融合ベクターは、その中にコードされるタンパク質に、通常は組換えタンパク質のアミノ末端にいくつものアミノ酸を付加する。そのような誘導ベクターは、典型的には3つの目的：1)組換えタンパク質の発現を上昇させること；2)組換えタンパク質の溶解度を上昇させること；及び3)アフィニティー精製におけるリガンドとして働くことにより組換えタンパク質の精製を助けること、に役立つ。しばしば、融合発現ベクターにおいては、融合タンパク質の精製後に融合成分からの組換えタンパク質の分離を可能にするために、融合成分と組換えタンパク質の接合部にタンパク質分解性開裂部位を導入する。そのような酵素及びそれらのコグネイト認識配列は、第Xa因子、トロンピン及びエンテロキナーゼを包含する。典型的な融合発現ベクターは、標的組換えタンパク質にそれぞれグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合タンパク質又はプロテインAを融合する、pGEX（Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B.とJohnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40）、pMAL（New England Biolabs, Beverly, Mass.）及びpRIT5（Pharmacia, Piscataway, N.J.）を包含する。 20

【0170】

大腸菌における組換えタンパク質発現を最大化するための1つの戦略は、組換えタンパク質を分解開裂する能力に障害を有する宿主細菌において該タンパク質を発現させることである。（Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128）。もう1つの戦略は、各々のアミノ酸についての個々のコドンが大腸菌において選択的に使用されるものであるように、発現ベクターに挿入する核酸の核酸配列を変化させることである（Wadaら (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118）。本発明の核酸配列のそのような変更は標準DNA合成手法によって実施できる。 30

【0171】

酵母又は糸状菌類（例えばアスペルギルス属（*Aspergillus* spp.）、アカパンカビ属（*Neurospora* spp.））を含む真菌細胞は、本発明における宿主細胞として使用しうる。 40

【0172】

例示的酵母細胞は、真核微生物の中で最も一般的に使用される*Saccharomyces cerevisiae*又は一般的なパン酵母を包含する。他の菌株も使用可能であり、パン酵母の代わりに使用しうる。ここで使用するとき「酵母」の語は、厳密な分類学的意味における酵母、すなわち単細胞生物だけでなく、酵母様多細胞真菌又は糸状菌類も包含する。

【0173】

酵母において作動可能な代表的ベクターは周知である。サッカロミセス属における発現 50

のためには、例えば、プラスミド YRp7 (Stinchombら、Nature, 282: 39 (1979); Kingsmanら、Gene, 7: 141 (1979); Tschemperら、Gene, 10: 157 (1980)) が好ましい。酵母において機能性であり、酵母における異種核酸の発現のために必要な他の代表的プロモーターは、メタロチオネイン、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (Hitzemanら、J. Biol. Chem. 255, 2073 (1980)、又はエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ及びグルコキナーゼなどの他の解糖系酵素 (Hessら、J. Adv. Enzyme Req. 7, 149 (1968); 及び Hollandら、Biochemistry 17, 4900 (1978)) についてのプロモーターを包含する。

10

【0174】

酵母、例えば *S. cerevisiae* における発現のためのベクターの例は、pYepSec1 (Baldariら、EMBO J. 6: 229-234 (1987))、pMFa (Kuijanら、Cell 30: 933-943 (1982))、pJRY88 (Schultzら、Gene 54: 113-123 (1987))、及び pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) を包含する。酵母において組換えタンパク質を発現することができる多くの他のベクターが既知である。代表的な例は、YEP24、YIP5、YEP51、YEP52 及び YRP17 を包含し、それらのすべてが *S. cerevisiae* への遺伝子構築物の導入において有用な、適切なクローニング及び発現ビヒクルである。参照してここに組み込まれる、Broachら (1983) Experimental Manipulation of Gene Expression より、M. Inouye 編集、Academic Press, p. 83 参照。

20

【0175】

酵母における本発明の HsCENP-E タンパク質の発現に使用するためのさらなるベクター、プロモーター及びターミネーターは当業者に周知であり、例えば、参照してここに組み込まれる、Emr, Meth. Enzymol. 185: 231-279 (1990) によって総説されている。本発明の HsCENP-E タンパク質は *Aspergillus* 属において発現されうる (McKnight と Upshall、参照してここに組み込まれる、米国特許第 4,935,349 号に述べられている)。有用なプロモーターは、ADH3 プロモーター (McKnightら、EMBO J. 4: 2093-2099, 1985) 及び tpiA プロモーターなどの、*Aspergillus nidulans* 解糖系遺伝子から誘導されるものを包含する。適切なターミネーターの一例は ADH3 ターミネーター (McKnightら、同上) である。真菌を形質転換するための手法は文献において周知であり、例えば、各々が参照してここに組み込まれる、Beggs (同上)、Hinnenら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929-1933, 1978)、Yeltonら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1740-1747, 1984) 及び Russell (Nature 301: 167-169, 1983) によって記述されている。

30

40

【0176】

あるいは、HsCENP-E タンパク質は、バキュロウイルス発現ベクターを用いて昆虫細胞において発現することができる。培養昆虫細胞 (例えば Sf9 細胞) におけるタンパク質の発現に使用できるバキュロウイルスベクターは、pAc シリーズ (Smithら (1983) Mol. Cell Biol. 3: 2156-2165) 及び pVL シリーズ (Lucklow と Summers (1989) Virology 170: 31-39) を包含する。

【0177】

DNA 又は RNA を導入しうる真核細胞は、そのような DNA 又は RNA によってトラ

50

ンスフェクト可能な細胞又はそのようなDNA又はRNAを注入しうる細胞を包含する。好ましい細胞は、一過性に又は安定にトランスフェクトされて、DNA及びRNAを発現することができるものである。現在最も好ましい細胞は、本発明の核酸分子によってコードされる組換え又は異種HsCENP-Eを発現することができるものである。そのような細胞は、経験的に特定しうるかあるいは容易にトランスフェクトされる又は注入されることが知られているものの中から選択しうる。

【0178】

HsCENP-Eをコードするヌクレオチド配列で形質転換した宿主細胞は、細胞培養からのタンパク質の発現と回収に適した条件下で培養しうる。形質転換細胞によって生産されたタンパク質は、使用する配列及び/又はベクターに依存して分泌されるか又は細胞内に保持されうる。当業者に了解されるように、HsCENP-Eをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、分泌を指令するシグナル配列を含むように設計しうる。

10

【0179】

本発明のタンパク質は、硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿法、酸抽出、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法によって組換え細胞培養から回収し、精製することができる。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィーを精製のために用いる。ポリペプチドが単離及び/又は精製の間に変性しているときは、タンパク質リフォールディングのための周知の手法を使用して活性コンフォメーションに再生しうる。タンパク質精製の方法は当技術分野において既知であり(一般に、参照してここに組み込まれる、Scopes, R., Protein Purification, Pringer-Verlag, N.Y. (1982)参照)、HsCENP-Eタンパク質の精製、特にここで述べる組換え生産したHsCENP-Eタンパク質の精製に適用しうる。

20

【0180】

本発明の核酸分子は、当技術分野において既知の方法を用いて細胞に安定に組み込むか又は一過性に導入しうる。安定にトランスフェクトされた哺乳類細胞は、本発明のタンパク質、すなわちヒトHsCENP-Eをコードするヌクレオチドの配列を、選択マーカー遺伝子(例えばチミジンキナーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、ネオマイシン耐性等についての遺伝子など)と共に含む発現ベクターで細胞をトランスフェクトし、トランスフェクトした細胞を、該マーカー遺伝子が発現する細胞に選択的な条件下で増殖させることによって作製しうる。導入核酸で安定にトランスフェクトされた細胞は、薬剤選択によって特定できる(例えば選択マーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生存するが、その他の細胞は死滅する)。

30

【0181】

一過性トランスフェクタントを作製するためには、哺乳類細胞をレポーター遺伝子(大腸菌-ガラクトシダーゼ遺伝子など)でトランスフェクトして、トランスフェクション効率を監視する。本発明のタンパク質をコードするDNAの正確な量と割合は経験的に決定でき、個々の細胞及び検定条件について最適化しうる。トランスフェクタントは、典型的には選択条件下で増殖させずに、通常はトランスフェクション後数日以内に分析するので、典型的には選択マーカー遺伝子は一過性トランスフェクションには含まれない。

40

【0182】

「細胞」、「細胞系」及び「細胞培養」はここでは交換可能に使用され、そのような名称は、細胞又は細胞系のすべての子孫を包含する。それ故、例えば、「形質転換体」及び「形質転換細胞」のような語は、転移の数に関わりなく、一次対象細胞及びそれに由来する培養物を包含する。故意又は偶然の突然変異により、すべての子孫がDNA内容物において正確に同一でない場合がありうることも了解される。最初に形質転換した細胞においてスクリーニングしたときと同じ機能又は生物活性を有する突然変異体子孫は包含される。異なる名称が与えられる場合は、文脈から明らかである。

50

【0183】

他の実施形態では、本発明のタンパク質をコードするDNAのインビトロ転写によってmRNAを生産しうる。このmRNAを、次に、ツメガエル卵母細胞に注入することができ、そこで該RNAは本発明のタンパク質の合成を指令する。あるいは、機能的な本発明のタンパク質の発現のために、本発明のタンパク質をコードするDNAを直接卵母細胞に注入することができる。その後、トランスフェクトした哺乳類細胞又は注入した卵母細胞をここで提供する薬剤スクリーニングの方法において使用しうる。

【0184】

ここで使用するとき、「ベクター」の語は、それが連結されているもう1つ別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。1つの種類のベクターは、付加的なDNAセグメントを連結することができる環状二本鎖DNAループを指す、「プラスミド」である。もう1つの種類のベクターは、付加的なDNAセグメントをウイルスゲノムに連結することができる、ウイルスベクターである。一部のベクターは、それらが導入された宿主細胞において自律複製することができる（例えば細菌複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば非エピソーム哺乳類ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって宿主ゲノムと共に複製される。さらに、一部のベクターは、それらが作動可能に連結されている遺伝子の発現を指令することができる。そのようなベクターをここでは「発現ベクター」と称する。一般に、組換えDNA手法において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本明細書においては、プラスミドがベクターの最も一般的に使用される形態であるので、「プラスミド」と「ベクター」は交換可能に使用できる。しかし、本発明は、等価機能を果たす、ウイルスベクター（例えば複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ関連ウイルス）などの他の形態の発現ベクターを包含することが意図されている。必ずしも常に明瞭に言明されているわけではないが、これらの発現ベクターは、エピソームとして又は染色体DNAの必須部分として宿主生物において複製可能でなければならないことは了解されている。明らかに、複製能の欠如によってそれらは有効に作動可能ではなくなる。

【0185】

つまり、「発現ベクター」は機能的定義を与えられており、ここで規定する特定DNA暗号の発現を生じさせるDNA配列は、規定された配列に適用されるときこの語に包含される。一般に、組換えDNA手法において有用な発現ベクターは、しばしば、それらのベクター形態では染色体に結合していない、環状二本鎖DNAループを指す「プラスミド」の形態である。

【0186】

ここで使用するとき、「発現」の語は、核酸分子がRNAに転写され、（場合により）ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に翻訳される過程を含む多くの段階を指す。ポリ核酸がゲノムDNA由来である場合、発現は、適切な真核宿主細胞又は生物を選択すれば、RNAのスプライシングを含みうる。

【0187】

そこで、発現ベクターは、適切な宿主細胞に導入したとき、挿入DNAの発現を生じさせる、プラスミド、ファージ、組換えウイルス又は他のベクターなどの組換えDNA又はRNA構築物を指す。適切な発現ベクターは当業者に周知であり、真核細胞及び/又は原核細胞において複製可能であるもの及びエピソームのままであるもの又は宿主細胞ゲノムに組み込まれるものを包含する。

【0188】

ベクターは染色体外エレメントとして宿主細胞内に維持することができ、そこで複製して、核酸分子の付加的なコピーを生産する。あるいは、ベクターは宿主細胞ゲノムに組み込まれて、宿主細胞が複製するときに核酸分子の付加的なコピーを生産しうる。

【0189】

DNAベクターにおける改善も為されており、おそらくすべての非ウイルス送達系に適

10

20

30

40

50

用しうる。これらは、R P R G e n c e l l によって報告された超らせんミニサークル（細菌複製起点も抗生物質耐性遺伝子も持たず、それ故それらは高レベルの生物学的封じ込めを示すので、潜在的により安全である）、C o p e r n i c u s G e n e S y s t e m s I n c によって開発されたようなエピソーム発現ベクター（プラスミドが核内では増幅するが、染色体外では増幅せず、それ故ゲノム組込み事象を回避するエピソーム発現系を複製する）及びP r o g e n i t o r によって開発されたようなT7系（厳密には、ベクター自体がファージT7 RNAポリメラーゼを発現し、その治療遺伝子が、第一プロモーターによって生成されるポリメラーゼを使用して、第二T7プロモーターから駆動される細胞質発現ベクター）の使用を含む。DNAベクターテクノロジーへの他のより一般的な改善は、高レベルの発現を生じさせるシス作用性エレメント（V i c a l）、細胞周期当り1回の複製を供給するアルフォイド反復DNAから誘導される配列及び核標的配列（E B N A - 1 遺伝子より（S t a n f o r d の C a l o s , 及びM e g a b i o s）；S V 4 0 初期プロモーター/エンハンサー又は該DNAに結合したペプチド配列）の使用を含む。

10

【0190】

高等真核生物による、対象標的タンパク質又は遺伝子産物をコードする異種核酸分子（配列番号2のアミノ酸配列）の転写は、エンハンサー配列をベクターに挿入することによって上昇させることは特筆すべきである。エンハンサーは、DNAの転写を上昇させるようにプロモーターに作用する、通常約10 - 300 bpのDNAのシス作用性エレメントである。その例は、複製起点の後期側のS V 4 0 エンハンサー（100 - 270 bp）、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーを包含する。

20

【0191】

特異的ポリクローナル又はモノクローナル抗体を使用して本発明のH s C E N P - E タンパク質の発現を検出し、測定するための免疫学的方法は、当技術分野において既知である。そのような手法の例は、酵素結合イムノソルベント検定法（E L I S A）、放射免疫測定法（R I A）、及び蛍光活性化細胞分類法（F A C S）を包含する。H s C E N P - E 上の2個の非干渉性エピトープに反応性のモノクローナル抗体を使用する、2サイト・モノクローナルベースの免疫測定法が好ましいが、競合結合測定法も使用しうる。これらや他のアッセイは当技術分野において周知である。（例えば、H a m p t o n , R . ら（1990）S e r o l o g i c a l M e t h o d s , a L a b o r a t o r y M a n u a l , A P S P r e s s , S t P a u l M i n n . , 第IV章；C o l i g a n , J . E . ら（1997）C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y , G r e e n e P u b . A s s o c i a t e s a n d W i l e y - I n t e r s c i e n c e , N e w Y o r k N . Y . ; 及びP o u n d , J . D . （1998）I m m u n o c h e m i c a l P r o t o c o l s , H u m a n a P r e s s , T o t o w a N . J . 参照）。

30

【0192】

極めて多様な標識及び複合手法が当業者に既知であり、様々な核酸及びアミノ酸検定法において使用しうる。C E N P - E をコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための標識ハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプローブを作製するための手段は、オリゴ標識、ニックトランスレーション、末端標識、又は標識ヌクレオチドを用いたPCR増幅を包含する。あるいは、本発明のH s C E N P - E タンパク質をコードする配列又はそのフラグメントを、mRNAプローブの作製のためにベクターにクローン化してもよい。そのようなベクターは当技術分野において既知であり、市販されており、T7、T3又はSP6などの適切なRNAポリメラーゼと標識ヌクレオチドの添加によってインピトロでRNAプローブを合成するために使用しうる。これらの手順は、A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h , P r o m e g a (M a d i s o n W i s .) 及びU S B i o c h e m i c a l によって提供されるような様々な市販のキットを用いて実施しうる。検出を容易にするために使用しうる適切なレポーター分子又は標識は

40

50

、放射性核種、酵素、蛍光、化学発光又は色素形成物質、ならびに基質、補因子、阻害因子、磁気ビーズ等を包含する。

【0193】

トランスフェクトした宿主細胞は数多くの方法で特定できる。例えば、異種核酸分子、例えば配列番号2のアミノ酸又はその部分をコードするDNA分子の存在を、中等度にストリンジェントな条件下で該異種DNA配列の部分と複合体(雑種)を形成するために、該異種DNAのヌクレオチド配列の部分に十分に相補的な標識オリゴヌクレオチドプローブを導入することによって判定しうる。トランスフェクト細胞の特定は、雑種/複合体の特定によって達成される。

【0194】

III. 実質的に純粋なHsCENP-Eタンパク質/ポリペプチド及び抗体
本発明の1つの局面は、実質的に純粋なHsCENP-Eタンパク質及びその生物活性フラグメント、ならびに抗HsCENP-E抗体を惹起するための免疫原としての使用に適するポリペプチドフラグメントに関する。

【0195】

「抗HsCENP-E」抗体は、HsCENP-E遺伝子によってコードされるポリペプチド、そのcDNA又はサブ配列に特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントである。

【0196】

本発明のHsCENP-Eタンパク質は、ここでは、天然に生じるポリペプチド、例えば野生型HsCENP-Eの少なくとも1つの生物学的性質(下記で定義する)を有するポリペプチド配列と定義される。この定義は、天然CENP-Eソースから単離されるポリペプチドだけでなく、組換え又は合成法によって作製されるポリペプチドも包含する。また、その機能的誘導体、対立遺伝子、アイソフォーム及び類似体を含む変異形態も包含する。

【0197】

1つの局面では、HsCENP-Eは、下記の機能的及び構造的特徴の少なくとも1つ又は好ましくは2つ以上を有することによって定義される。機能的には、HsCENP-Eは、微小管刺激性ATPアーゼ活性及びATP依存性の微小管モーター活性を有する。HsCENP-E活性はまた、微小管に結合するその能力によって表わすこともできる。同様に、HsCENP-Eは、天然CENP-Eのモータードメイン、尾部ドメイン又は他のフラグメントに対して産生されるポリクローナル抗体に結合するその能力によって定義できる。

【0198】

もう1つの局面では、本発明は、配列番号2のアミノ酸配列又はそのフラグメント、より特定すると配列番号2のアミノ酸配列のモータードメイン又はそのフラグメントを含む実質的に純粋なポリペプチドを取り扱う。

【0199】

1つの実施形態では、HsCENP-Eタンパク質は、標準タンパク質精製手法を用いて適切な精製スキームによって細胞又は組織ソースから単離することができる。もう1つの実施形態では、HsCENP-Eタンパク質は組換えDNA手法によって生産される。組換え発現の代りに、HsCENP-Eタンパク質又はポリペプチドは、標準ペプチド合成手法を用いて化学合成することができる。

【0200】

「単離」又は「精製」タンパク質又はその生物活性フラグメントは、該HsCENP-Eタンパク質が由来する細胞又は組織ソースからの細胞物質又は他の汚染タンパク質を実質的に含まない、あるいは化学合成するときには化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まない。「細胞物質を実質的に含まない」との語法は、HsCENP-Eタンパク質が単離される又は組換え生産される細胞の細胞成分から分離されている、HsCENP-Eタンパク質の試料を包含する。従って、ポリペプチド又はタンパク質の修飾因子として

10

20

30

40

50

ここで用いる「単離」及び/又は「精製」の語の使用は、そのように称されるポリペプチド又はタンパク質が人の手によってそのような形態で生産されたこと、及びそれ故、それらの天然のインビボ細胞環境から切り離されていることを意味する。その結果として、本発明の組換えポリペプチド及びタンパク質は、DNA、RNA、ポリペプチド又はタンパク質が、それらが天然で生じるときには有用でない、ここで述べる方法において有用である。

【0201】

HsCENP-Eタンパク質の「生物活性フラグメント」は、天然に生じる成熟完全長HsCENP-E配列の部分又は1個又はそれ以上のアミノ酸残基が欠失している配列番号2のタンパク質である。それ自体で、フラグメントは、完全長HsCENP-Eタンパク質より少ないアミノ酸を含み、HsCENP-Eタンパク質の少なくとも1つの活性を示す、HsCENP-Eタンパク質のアミノ酸配列に十分に同一であるか又はそれから誘導されるアミノ酸配列、例えば配列番号2に示すアミノ酸配列を含むペプチドを包含する。アミノ酸残基の欠失は、N末端又はC末端又は内部を含む、ポリペプチドのいずれの場所で起こってもよい。典型的には、生物活性フラグメントは、ヒト又は野生型HsCENP-Eと共通する少なくとも1つの生物学的性質、例えばATP結合ドメイン等を有する。HsCENP-Eフラグメントは、典型的には、哺乳類から単離されたHsCENP-Eの配列と同一である少なくとも10、15、20、25、30又は40アミノ酸残基の連続配列を有する。それ故、「HsCENP-Eフラグメント」は、1個又はそれ以上のアミノ酸残基又は糖鎖単位の欠失を有する、天然に生じる成熟完全長HsCENP-E配列の部分である。

10

20

【0202】

1つの実施形態では、HsCENP-Eタンパク質の生物活性フラグメント(配列番号2の本発明のタンパク質)は、少なくとも1つのATP結合ドメインを含む。もう1つの実施形態では、本発明のHsCENP-Eタンパク質の生物活性フラグメントは、少なくとも1つのモータードメインを含む。

【0203】

好ましいフラグメントは、アミノ末端を含む連続的な一連の残基の欠失、又はカルボキシ末端を含む連続的な一連の残基の欠失、又は1つがアミノ末端を含み、もう1つがカルボキシ末端を含む2つの連続的なシリーズの残基の欠失を除いて、ここで開示するHsCENP-Eタンパク質のアミノ酸配列を有するトランケーションポリペプチドを包含する。好ましい生物活性フラグメントがATP結合ドメイン及びモータードメインを含むことは明白である。該タンパク質の他の領域が欠失している他の生物活性フラグメントは、組換え手法によって作製することができ、天然CENP-Eタンパク質の機能的活性の1つ又はそれ以上に関して評価することができる。

30

【0204】

もう1つの実施形態では、HsCENP-Eタンパク質は配列番号2に示すアミノ酸配列を有する。

【0205】

本発明はまた、HsCENP-Eタンパク質の変異体を包含する。ここで使用するとき、HsCENP-Eタンパク質の「変異体」は、本発明のタンパク質の配列と比較して1又はそれ以上のアミノ酸置換、挿入及び/又は欠失を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。一般に、相違は、標準(本発明のタンパク質)配列と変異体の配列が全体的として緊密に類似し、多くの領域において同一であるように制限される。そのような変異体は一般に生物活性であり、必ず対象ポリペプチドと100%未満の配列同一性を有する。

40

【0206】

本発明のもう1つの局面は、配列番号2のアミノ酸配列と十分に同一であるアミノ酸配列を有する、又は配列番号1と十分に同一であるヌクレオチド配列によってコードされるHsCENP-Eタンパク質を提示する。

50

【0207】

ここで使用するとき、「十分に同一」とは、第一と第二のアミノ酸又はヌクレオチド配列が共通の構造ドメイン又はモチーフ及び/又は共通の機能的活性を共有するように、第二アミノ酸又はヌクレオチド配列と十分な又は最小限の数の同一又は等価（例えば類似側鎖を有するアミノ酸残基）アミノ酸残基又はヌクレオチドを含む第一アミノ酸又はヌクレオチド配列を指す。例えば、共通の構造ドメイン又は生物学的機能を共有するアミノ酸又はヌクレオチド配列は、該ドメインのアミノ酸配列を越えて又は該ポリペプチド又はポリヌクレオチドの長さ全体にわたって少なくとも70 - 80%、さらに一層好ましくは90 - 95%の同一性を有し、ここで十分に同一であると定義される少なくとも1つ、好ましくは2つの構造ドメインを含む。

10

【0208】

アミノ酸置換は、好ましくは単一アミノ酸残基の置換である。好ましい変異体は、保存的アミノ酸置換、すなわち1個の残基が同様の特性を有するもう1つ別の残基で置換されているものによって標準から変化しているものである。典型的なそのような置換は、Ala、Val、Leu及びIleの中で；Ser及びThrの中で；酸性残基Asp及びGlu；Asn及びGlnの中で；及び塩基性残基Lys及びArgの中で；又は芳香族残基Phe及びTyrの中での置換である。特に好ましいのは、数個、5 - 10個、1 - 5個又は1 - 2個のアミノ酸が何らかの組合せで置換、欠失又は付加されている変異体である。

【0209】

上記によれば、好ましいタンパク質は、少なくとも1つのATP結合ドメイン及び好ましくは少なくとも1つの他のHsCENP-E活性を有するHsCENP-Eタンパク質である。他の好ましいタンパク質は、少なくとも1つのATP結合ドメインを有するHsCENP-Eタンパク質であり、該タンパク質は、好ましくはストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で配列番号1のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する核酸分子によってコードされる。

20

【0210】

他の実施形態では、該HsCENP-Eタンパク質は配列番号2に実質的に相同であり、配列番号2のタンパク質の機能的活性を保持するが、ここで述べるような天然の対立遺伝子変異又は突然変異誘発のためにアミノ酸配列が異なる。

30

【0211】

配列番号2のポリペプチドに少なくとも80%の同一性を有する、より好ましくは配列番号2に少なくとも85%の同一性、さらに好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに一層好ましくは少なくとも95%の同一性を有するHsCENP-Eの変異体も本発明に包含される。好ましくは、これらのポリペプチドはすべて、抗原性を含む、ここで開示するタンパク質（配列番号2）の生物活性を保持する。

【0212】

他の実施形態では、該HsCENP-Eタンパク質は配列番号2に実質的に相同であり、配列番号2のタンパク質の機能的活性を保持するが、ここで述べるような天然の対立遺伝子変異又は突然変異誘発のためにアミノ酸配列が異なる。

40

【0213】

2個のアミノ酸配列又は2個の核酸配列のパーセント同一性を決定するには、それらの配列を最適比較のために整列する（例えば、最適整列のために第一と第二のアミノ酸又は核酸配列の一方又は両方にギャップを導入することができ、及び比較目的では非相同配列を無視することができる）。好ましい実施形態では、比較のために整列する標準配列の長さは、標準配列の長さの少なくとも70%、又は80%、又は90%である。次に、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置のアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第一配列内の1つの位置が第二配列内の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドで占められているとき、それらの分子はその位置において同一である（ここで使用するときアミノ酸又は核酸の「同一性」はアミノ酸又は核酸の「相同性」と等価である）。2つ

50

の配列間のパーセント同一性は、2つの配列の最適整列のために導入する必要のある、ギャップの数及び各々のギャップの長さを考慮に入れた、それらの配列によって共有される同一位置の数の関数である。

【0214】

2つの配列の間での配列の比較及びパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて実施できる。好ましい実施形態では、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、B l o s u m 62行列又はP A M 250行列、及びギャップの重み16、14、12、10、8、6又は4及び長さの重み1、2、3、4、5又は6を用いて、G C Gソフトウェアパッケージ (<http://www.gcg.com>において入手可能)のG A Pプログラムに組み込まれたN e e d l e m a nとW u n s c h (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970))のアルゴリズムを使用して決定される。さらに
10
もう一つの好ましい実施形態では、2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、N E S g a p d n a . C M P行列及びギャップの重み40、50、60、70又は80及び長さの重み1、2、3、4、5又は6を用いて、G C Gソフトウェアパッケージ (<http://www.gcg.com>において入手可能)のG A Pプログラムを使用して決定される。

【0215】

もう一つの実施形態では、2つのアミノ酸又はヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、P A M 120重量残基表 (w e i g h t r e s i d u e t a b l e)、ギャップ長ペナルティー12及びギャップペナルティー4を用いて、A L I G Nプログラム (バージョン2.0)に組み込まれたE. MeyersとW. Miller (C A B I O S, 4: 11-17 (1989))のアルゴリズムを使用して決定される。
20

【0216】

本発明の核酸及びタンパク質配列はさらに、例えば他のファミリー成員又は関連配列を特定するために、公的データベースに対する検索を実施するための「問い合わせ配列」として使用することができる。そのような検索は、A l t s c h u l r a (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10のN B L A S T及びX B L A S Tプログラム (バージョン2.0)を用いて実施できる。B L A S Tヌクレオチド検索は、本発明のH s C E N P - E核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得るために、N B L A S Tプログラム、スコア=100、ワード長=12で実施することができる。B L A S Tタンパク質検索は
30
、本発明のH s C E N P - Eタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得るために、X B L A S Tプログラム、スコア=50、ワード長=3で実施することができる。比較のためのギャップを考慮した整列を得るには、A l t s c h u l r a (1997) N u c l e i c A c i d s R e s . 25 (17): 3389-3402に述べられているようにG a p p e d B L A S Tが利用できる。B L A S T及びG a p p e d B L A S Tプログラムを利用するときには、それぞれのプログラムのデフォルトパラメータ (例えばX B L A S T及びN B L A S T)が使用できる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照。

【0217】

本発明はまた、H s C E N P - Eキメラ又は融合タンパク質を提供する。ここで使用する
40
とき、H s C E N P - E「キメラタンパク質」又は「融合タンパク質」は、非H s C E N P - Eタンパク質に作動可能に連結されたH s C E N P - Eタンパク質を包含する。「H s C E N P - Eタンパク質」は上記のように定義され、一方「非H s C E N P - Eタンパク質」は、H s C E N P - Eタンパク質と実質的に相同でないタンパク質、例えばH s C E N P - Eタンパク質とは異なり、及び同じか又は異なる生物に由来するタンパク質に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。H s C E N P - E融合タンパク質においては、該H s C E N P - Eタンパク質はH s C E N P - Eタンパク質の全部又は一部に対応しうる。

【0218】

好ましい実施形態では、H s C E N P - E融合タンパク質は、H s C E N P - Eタンパ
50

ク質の少なくとも1つの生物活性部分を含む。もう1つの好ましい実施形態では、H s C E N P - E 融合タンパク質は、H s C E N P - E タンパク質の少なくとも2つの生物活性部分を含む。

【0219】

該融合タンパク質において、「作動可能に連結された」の語は、H s C E N P - E タンパク質と非H s C E N P - E タンパク質が互いにインフレーム融合していることを示すことが意図されている。該非H s C E N P - E タンパク質は該H s C E N P - E タンパク質のN末端又はC末端に融合しうる。

【0220】

もう1つの実施形態では、該融合タンパク質は、そのN末端に異種シグナル配列を含むH s C E N P - E タンパク質である。一部の宿主細胞（例えば哺乳類宿主細胞）では、異種シグナル配列の使用を通してH s C E N P - E の発現及び/又は分泌を高めることができる。

【0221】

H s C E N P - E 融合タンパク質の使用は、癌などのH s C E N P - E 関連疾患の治療のために治療上有用でありうる。

【0222】

さらに、本発明のH s C E N P - E 融合タンパク質は、被験者において抗H s C E N P - E 抗体を生産するための免疫原として、H s C E N P - E リガンドを精製するため、及びH s C E N P - E とH s C E N P - E 結合パートナー又は基質との相互作用を阻害する分子を測定するためのスクリーニングアッセイにおいて使用することができる。

【0223】

好ましくは、本発明のH s C E N P - E キメラ又は融合タンパク質は標準組換えDNA手法によって生産される。1つのそのような手法は、「Current Protocols in Molecular Biology」, Ausubelら編集、John Wiley & Sons (1992) に述べられている。

【0224】

本発明はまた、H s C E N P - E アゴニスト（ミメティック）又はH s C E N P - E アンタゴニストとして機能する、H s C E N P - E タンパク質の変異体に関する。H s C E N P - E タンパク質の変異体は、突然変異誘発、例えば不連続な点突然変異又はH s C E N P - E タンパク質のトランケーションによって作製することができる。

【0225】

H s C E N P - E タンパク質のアゴニストは、天然に生じる形態のH s C E N P - E タンパク質と実質的に同じ生物活性を保持するか又は生物活性のサブセットを保持しうる。H s C E N P - E アンタゴニストは、天然に生じる形態のH s C E N P - E タンパク質の活性の1つ又はそれ以上を阻害することができる。

【0226】

上記をさらに進めて、本発明の1つの実施形態は、天然に生じる形態の該タンパク質の生物活性のサブセットを有し、及び天然に生じる形態のH s C E N P - E タンパク質による治療に比べて被験者における副作用がより少ない変異体H s C E N P - E タンパク質で被験者を治療することを考慮する。

【0227】

H s C E N P - E 変異体の多様化ライブラリー（variegated library）は、核酸レベルでのコンビナトリアル突然変異誘発によって作製され、多様化遺伝子ライブラリーによってコードされる。H s C E N P - E 変異体の多様化ライブラリーは、例えば、潜在的H s C E N P - E 配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、あるいはその中にH s C E N P - E 配列のセットを含むより大きな融合タンパク質のセットとして（例えばファージディスプレイのための）発現されうるように、合成ポリヌクレオチドの混合物を遺伝子配列内に酵素的に連結することによって作製することができる。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的H s C E N P - E 変異体のライブラリーを作製するた

めに使用できる様々な方法が存在する。縮重ポリヌクレオチドを合成するための方法は当技術分野において既知である（例えば、Narang, S. A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakuraら (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakuraら (1984) *Science* 198:1056; Ikeら (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477参照）。

【0228】

さらに、HsCENP-Eタンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーを使用して、HsCENP-Eタンパク質の変異体のスクリーニング及びその後の選択のためのHsCENP-Eフラグメントの多様化個体群を生成することができる。

【0229】

例えば、コード配列フラグメントのライブラリーは、HsCENP-Eコード配列の二本鎖PCRフラグメントを、ニックングが1分子につき約1回だけ起こる条件下でヌクレアーゼによって処理し、二本鎖DNAを変性して、異なるニックング産物からのセンス/アンチセンス対を含みうる二本鎖DNAを形成するように該DNAを復元再生し、S1ヌクレアーゼでの処理によって再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去して、生じたフラグメントライブラリーを発現ベクターに連結することによって作製することができる。この方法により、様々な大きさのHsCENP-Eタンパク質のN末端、C末端及び内部フラグメントをコードする発現ライブラリーを誘導することができる。

【0230】

点突然変異又はトランケーションによって作製したコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、及び選択特性を有する遺伝子産物に関してcDNAライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの手法が当技術分野において知られている。そのような手法は、HsCENP-Eタンパク質のコンビナトリアル突然変異誘発によって作製した遺伝子ライブラリーの高速スクリーニングに適合させうる。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、ハイスループット分析に適合させやすい、最も広く使用されている手法は、典型的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローン化すること、生じたベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、及び所望活性の検出が、その産物を検出すべき遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下でコンビナトリアル遺伝子を発現させることを含む。ライブラリーにおける突然変異体の発生率を高める新しい手法、リクルーシブ・アンサンブル突然変異誘発 (recursive ensemble mutagenesis, REM) は、HsCENP-E変異体を特定するためのスクリーニングアッセイと組み合わせて使用することができる (ArkinとYourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgraveら (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331)。米国特許願公開第2002/0006664A1(「逆トランスフェクション」)も参照のこと。あるいは、各々が又はその集合が様々なHsCENP-E突然変異体をコードする、複数の核酸分子を使用して、Merck & Co., Incに譲渡された、2002年4月16日出願、番号不明の特許仮出願に開示されているMAGIC法に従って複数の細胞をトランスフェクトすることができる。

【0231】

代表的実施形態では、多様化HsCENP-Eライブラリーを分析するために細胞ベースのアッセイを利用することができる。例えば、発現ベクターのライブラリーを、通常HsCENP-E仲介活性を有する細胞系統にトランスフェクトすることができる。次に、HsCENP-E仲介活性へのHsCENP-E突然変異体の作用、例えば細胞増殖を、多くの慣例的アッセイのいずれかによって検出することができる。その後細胞からプラスミドDNAを回収して、阻害に関して評価し、個々のクローンをさらに特徴付けることができる。

【0232】

もう1つの局面では、本発明の実質的に純粋なHsCENP-Eタンパク質(配列番号

10

20

30

40

50

2) 又はそのフラグメントを、ポリクローナル及びモノクローナル抗体作製のための標準手法を用いてH s C E N P - Eに結合する抗体を生成するための免疫原として使用することができる。完全長H s C E N P - Eタンパク質が使用でき、あるいは本発明は、免疫原として使用するためのH s C E N P - Eの抗原性ペプチドフラグメントを提供する。

【0233】

ここで開示するH s C E N P - Eタンパク質の抗原性ペプチドフラグメントは、配列番号2に示すアミノ酸配列の少なくとも8アミノ酸残基を含み、及び該ペプチドに対して惹起した抗体がH s C E N P - Eと特異的免疫複合体を形成するようにH s C E N P - Eのエピトープを含む。好ましくは、該抗原性ペプチドは、少なくとも10アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも15アミノ酸残基、さらに一層好ましくは少なくとも20アミノ酸残基、最も好ましくは少なくとも30アミノ酸残基を含む。

10

【0234】

該抗原性ペプチドに含まれる好ましいエピトープは、該タンパク質の表面に位置するH s C E N P - Eの領域、例えば親水性領域、ならびに高い抗原性を有する領域である。

【0235】

従って、本発明の1つの局面は抗H s C E N P - E抗体に関する。「抗体」の語は最も広い意味で使用され、特に単一モノクローナル抗体(アゴニスト及びアンタゴニスト抗体を含む)及びポリエピトープ特異性を有する抗体組成物をカバーする。一般に、この語は、免疫グロブリン分子、及び抗原として活性な又は免疫学的に活性な免疫グロブリン分子のフラグメント、すなわちH s C E N P - Eなどの抗原に特異的に結合する(抗原と免疫反応する)抗原結合部位を含む分子を指す。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメントの代表的な例は、抗体をペプシンなどの酵素で処理することによって作製できるF(a b)及びF(a b')₂フラグメントを包含する。

20

【0236】

抗体を作製する方法は周知である。ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒトその他を含む様々な宿主を、抗体を産生するためにH s C E N P - E又はその「免疫学的に活性なフラグメント」で注射することによって免疫しうる。H s C E N P - Eの「免疫学的に活性なフラグメント」とは、免疫応答を誘発することができ、また本発明のH s C E N P - Eタンパク質に免疫特異的な抗体を産生するための免疫原としても使用できるフラグメントを指す。そのようなフラグメントは、標的免疫系(例えばマウス又はウサギ)においてH s C E N P - E特異的抗体を惹起することができる又はH s C E N P - E特異的抗体への結合に関して天然C E N P - Eと競合することができるタンパク質であり、それ故生物学的試料におけるH s C E N P - Eペプチドの存在についての免疫測定法において有用である。そのような免疫学的に活性なフラグメントは、典型的には8-11個の連続アミノ酸の最小サイズを有する。同様に、免疫学的に活性なフラグメントは、天然ヒトC E N P - Eタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であること及び天然に生じる低分子のアミノ酸配列全体を含むことが好ましい。あるいは、短い長さのH s C E N P - Eアミノ酸をもう1つ別のタンパク質に融合してキメラ成分を形成してもよく、その後該キメラ成分に対する抗体を作製しうる。

30

【0237】

宿主の種に依存して、免疫応答を高めるために様々なアジュバントを使用しうる。そのようなアジュバントは、フロイント、水酸化アルミニウムなどの無機物ゲル、及びリソレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、K L H及びジニトロフェノールなどの表面活性物質を含むが、これらに限定されない。ヒトにおいて使用しうるアジュバントの中で、B C G(カルメット-ゲラン杆菌)及びC o r y n e b a c t e r i u m p a r v u mが特に好ましい。

40

【0238】

適切な免疫原性製剤は、例えば、組換え発現H s C E N P - Eタンパク質又は化学合成H s C E N P - Eタンパク質を含みうる。該製剤は、フロイント完全又は不完全アジュバント、又は同様の免疫刺激性物質をさらに含みうる。免疫原性H s C E N P - E製剤によ

50

る適切な被験者の免疫は、ポリクローナル抗HsCENP-E抗体応答を誘導する。

【0239】

ポリクローナル抗HsCENP-E抗体は、適切な被験者をHsCENP-E免疫原で免疫することによって上述したように作製できる。免疫後適切な時点で、例えば抗HsCENP-E抗体力価が最も高いときに、該被験者から抗体産生細胞を入手し、KohlerとMilstein(1975)Nature 256:495-497によって最初に記述されたハイブリドーマ手法(Brownら(1981)J. Immunol. 127:539-46; Brownら(1980)J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yehら(1976)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:2927-31; 及びYehら(1982)Int. J. Cancer 29:269-75も参照のこと)、より最近のヒトB細胞ハイブリドーマ手法(Kozborら(1983)Immunol Today 4:72)、EBV-ハイブリドーマ手法(Coleら(1985), Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., p. 77-96)又はトリオーマ手法などの標準手法によってモノクローナル抗体を作製するために使用できる。一般的な手法は、不朽化細胞系(典型的には骨髓腫)を、上述したようにHsCENP-E免疫原で免疫した哺乳類からのリンパ球(典型的には脾細胞)に融合すること、次に、生じたハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングして、HsCENP-Eに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを特定することを含む。

10

20

【0240】

HsCENP-E抗原に対するヒトモノクローナル抗体の作製は従来手法では困難な場合があるので、その重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の種に由来する又は特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体中の対応配列に同一であるか又は相同であり、一方、鎖の残りの部分はもう1つ別の種に由来する又はもう1つ別の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体中の対応配列に同一であるか又は相同である「キメラ抗体」、ならびに、それらが所望生物活性を示す限り、そのような抗体のフラグメントを創造することが望ましいと考えられる(Cabillyら、前出; Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984)。一般に、マウス抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子にスプライシングして、適切な抗原特異性と生物活性を有する分子を得る。例えば、Morrison, S. L.ら(1984)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Neuberger, M. S.ら(1984)Nature 312:604-608; 及びTakeda, S.ら(1985)Nature 314:452-454参照。

30

【0241】

他の「キメラ」抗体は、由来種又は免疫グロブリンのクラス又はサブクラスの指定に関わりなく、抗HsCENP-E抗体の可変(超可変を含む)ドメインを定常ドメイン(例えば「ヒト化」抗体)でスプライシングするか、又は軽鎖を重鎖で、又は1つの種からの鎖をもう1つ別の種からの鎖で、又は融合物を異種タンパク質でスプライシングすることによって作製される雑種及び組換え抗体、ならびに、それらが所望生物活性を示す限り、抗体フラグメント(例えばFab、F(ab')₂及びFv)を包含する。例えば、Cabillyら、米国特許第4,816,567号; Mage & Lamoyi, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applicationsより、p. 79-97(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)参照。

40

【0242】

ヒト及び非ヒト部分の両方を含む、ヒト化モノクローナル抗体も本発明に包含される。そのようなキメラ及びヒト化モノクローナル抗体は、当技術分野において既知の組換えDNA手法によって、例えばRobinsonら、国際公開公報第PCT/US86/02269号; Akiraら、欧州特許願第184,187号; Taniguchi, M., 欧州特許願第171,496号; Morrisonら、欧州特許願第173,494号;

50

Neubergerら、PCT国際公開公報第WO86/01533号；Cabillyら、米国特許第4,816,567号；Cabillyら、欧州特許願第125,023号；Betterら(1988)Science 240:1041-1043；Liuら(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:3439-3443；Liuら(1987)J.Immunol.139:3521-3526；Sunら(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:214-218；Nishimuraら(1987)Canc.Res.47:999-1005；Woodら(1985)Nature 314:446-449；及びShawら(1988)J.Natl.Cancer Inst.80:1553-1559；Morrisson, S.L.(1985)Science 229:1202-1207；Oiら(1986)BioTechniques 4:214；Winter, 米国特許第5,225,539号；Jonesら(1986)Nature 321:552-525；Verhoeyanら(1988)Science 239:1534；及びBeidlerら(1988)J.Immunol.141:4053-4060に述べられている方法を用いて生産することができる。

【0243】

HsCENP-E特異的一本鎖抗体を有効に生産する、一本鎖抗体の生産のための手法も、当技術分野で既知の方法を用いて適合させうる。関連する特異性を有するが、異なるイデオタイプ組成物である抗体も、ランダムなコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーから鎖のシャフリングによって作製することができる(例えば、Burton D. R.(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:10134-10137参照)。

【0244】

従来免疫測定法を用いて所望特異性を有する抗体を特定しうる。そのようなプロトコールは、各々が参照してここに組み込まれる、米国特許第4,642,285号；同第4,376,110号；同第4,016,043号；同第3,879,262号；同第3,852,157号；同第3,850,752号；同第3,839,153号；同第3,791,932号；及びHarlowとLane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, N.Y.(1988)に述べられているものを含むが、これらに限定されない。

【0245】

試料中のHsCENP-Eのインビトロ検出のために有用な免疫学的手順は周知である。実際に、確立された特異性を有するポリクローナル又はモノクローナル抗体を使用した競合結合又は放射免疫測定法についての数多くのプロトコールが当業者に既知である。そのような免疫測定法は、例えば、当技術分野において周知である、ELISA、Pandex微小蛍光測定法、凝集反応アッセイ、フローサイトメトリー、血清診断アッセイ及び免疫組織化学染色法を包含する。典型的な免疫測定法は、HsCENP-Eとその特異的抗体の間の複合体形成の測定を含む。2個の非干渉性HsCENP-Eエピトープに反応性のモノクローナル抗体を使用する、2サイト・モノクローナルベースの免疫測定法が好ましいが、競合結合測定法も使用しうる。

【0246】

抗体は、当技術分野で周知の様々な手段によって検出可能にすることができる。例えば、検出可能なマーカーを直接又は間接的に抗体に結合することができる。有用なマーカーは、例えば、放射性核種、酵素、蛍光物質、色素形成物質及び化学発光標識を包含する。

【0247】

HsCENP-Eに対する抗体の親和性を評価するための方法も周知である。例えば、放射免疫測定法と組み合わせたScatchard分析を使用して、HsCENP-Eに対する抗体の親和性を評価しうる。親和性は、HsCENP-E-抗体複合体のモル濃度を平衡条件下での遊離抗原と遊離抗体のモル濃度で除したものと定義される、会合定数K

として表わされる。多数のHsCENP-Eエピトープに対する親和性において不均質な、ポリクローナル抗体の試料について決定した K_a は、HsCENP-Eに対する抗体の平均親和性又はアビディティを表わす。特定HsCENP-Eエピトープに関して単一特異性である、モノクローナル抗体の試料について決定した K_a は、親和性の正確な測定値を表わす。HsCENP-E-抗体複合体が厳格な操作に耐えなければならない免疫測定法における使用のためには、約 $10^9 - 10^{12}$ l/モルの範囲の K_a を有する高親和性抗体試料が好ましい。最終的に抗体からのHsCENP-Eの解離、好ましくは活性形態のHsCENP-Eの解離を必要とする免疫精製及び類似の手順における使用のためには、約 $10^6 - 10^7$ l/モルの範囲の K_a を有する低親和性抗体試料が好ましい(Catty, D. (1988) *Antibodies*, 第I巻: A Practical Approach, IRL Press, Washington D.C.; Liddell, J.E. と Cryer, A. (1991) *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*, John Wiley & Sons, New York N.Y.)。

10

【0248】

ファージディスプレイライブラリーを作製し、スクリーニングするためのキットは市販されている(例えば、the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, カタログ番号27-9400-01; 及びthe Stratagene SurfZAP, TM. Phage Display Kit, カタログ番号240612)。Ladnerら、米国特許第5,223,409号; Kangら、PCT国際公開公報第WO92/18619号; Dowerら、PCT国際公開公報第WO92/20791号; Marklandら、PCT国際公開公報第WO92/15679号; Breitlingら、PCT国際公開公報第WO93/01288号; McCaffertyら、PCT国際公開公報第WO92/01047号; Garrardら、PCT国際公開公報第WO92/09690号; Landerら、PCT国際公開公報第WO90/02809号; Fuchsら(1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hayら(1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huseら(1989) *Science* 246:1275-1281; Griffithsら(1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkinsら(1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarksonら(1991) *Nature* 352:624-628; Gramら(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garradら(1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboomら(1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; Barbasら(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; 及びMcCaffertyら、*Nature* (1990) 348:552-554も参照のこと。

20

30

【0249】

IV. 本発明の使用及び方法

ここで述べる核酸分子、タンパク質、タンパク質相同体及び抗体は、次の方法: a) スクリーニングアッセイ; b) 予測医学、例えば診断アッセイ及び薬理遺伝学; 及びc) 癌を含む過度の細胞増殖を特徴とする疾患の治療方法、の1つ又はそれ以上において使用することができる。

40

【0250】

主として、本発明のポリペプチドは、HsCENP-E又はそのフラグメントの活性又は発現を調節する薬剤又は化合物をスクリーニングするため、ならびにHsCENP-Eの過度の産生又は野生型タンパク質と比較して高い又は異常な活性を有する形態のHsCENP-Eの産生をスクリーニングするために使用できる。ここで開示する核酸分子又はそれらに由来する配列は、HsCENP-E仲介性疾患を治療するため、ヒトCENP-EをコードするmRNA又はHsCENP-Eをコードする遺伝子における突然変異を検

50

出するために遺伝子治療において使用することができる。

【0251】

A. スクリーニングアッセイ

1つの局面では、本発明は、調節因子、すなわち、HsCENP-Eタンパク質に結合し、例えばHsCENP-Eの発現又は活性に阻害作用を及ぼす候補又は試験化合物又は作用物質（例えばペプチド、ペプチドミメティック、低分子又は他の薬剤）を特定するためのスクリーニングアッセイを提供する。

【0252】

一般に、HsCENP-E（標的タンパク質）の調節因子に関して試験するために使用できるアッセイは、様々なインビトロ又はインビボアッセイ、例えば微小管滑走アッセイ、微小管結合アッセイなどの結合アッセイ、微小管解重合アッセイ及びATPアーゼアッセイを包含する（Kodamaら、J. Biochem. 99: 1465 - 1472 (1986); Stewartら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5209 - 5213 (1993); Lombilloら、J. Cell Biol. 128: 107 - 115 (1995); Valeら、Cell 42: 39 - 50 (1985)）。

10

【0253】

上記に従って、本発明の1つの実施形態は、HsCENP-E活性を有するHsCENP-Eタンパク質を含むインジケータ組成物を提供すること、該インジケータ組成物を被験化合物と接触させること、及び該インジケータ組成物におけるHsCENP-E活性への被験化合物の作用を測定して、HsCENP-Eタンパク質の活性を調節する化合物を特定することにより、HsCENP-Eタンパク質に結合する又はHsCENP-Eタンパク質の活性を調節する化合物を特定するための方法を提供する。

20

【0254】

さらにもう1つの局面では、本発明は、HsCENP-Eタンパク質又はその生物活性部分を被験化合物と接触させること、及び該被験化合物がHsCENP-Eタンパク質又はその生物活性部分に結合する能力を測定することを含む、潜在的HsCENP-E調節因子を特定するための無細胞アッセイを提供する。HsCENP-Eタンパク質への被験化合物の結合は、既知の方法によって直接又は間接的に測定できる。

【0255】

もう1つの局面では、本発明は、HsCENP-Eタンパク質又はその生物活性部分を該ポリペプチドに結合する既知の化合物と接触させてアッセイ混合物を形成すること、そのアッセイ混合物を被験化合物に接触させること、及び該被験化合物がHsCENP-Eタンパク質と相互作用する能力を測定することを提供し、その場合、該被験化合物がHsCENP-Eタンパク質と相互作用する能力を測定することは、該被験化合物が、上記の既知の化合物と比較して、HsCENP-Eタンパク質又はその生物活性部分に選択的に結合する能力を測定することを含む。

30

【0256】

あるいは、化合物が標的タンパク質、例えばHsCENP-Eの活性を調節する能力は、該標的タンパク質の活性を調節することができる候補物質をスクリーニングすることによって試験される。アッセイ様式の一例は、標的タンパク質と候補物質を混合すること及び該標的タンパク質の生物活性の変化を測定することの段階を含む。この実施形態によれば、該候補物質は該標的タンパク質に結合する可能性があり、その結果として、その生物活性又は生化学的活性を変化させる。該方法は、インビトロスクリーニング法、及び細胞周期分布、細胞生存度の変化に関する又は紡錘体の存在、形態、活性、分布又は量に関する細胞のインビボスクリーニングの両方を包含する。

40

【0257】

ここで述べるアッセイにおいて使用するための試験化合物は、生物学的ライブラリー、空間可定位平行固相 (spatially addressable parallel solid phase) 又は液相ライブラリー; デコンボリューションを必要とする合

50

成ライブラリー法；「1ピーズ・1化合物」ライブラリー法；及びアフィニティークロマトグラフィ―選択を使用する合成ライブラリー法を含む、当技術分野で既知のコンビナトリアルライブラリー法における数多くのアプローチのいずれかを用いて入手できる。生物学的ライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、その他の4つのアプローチは化合物のペプチド、非ペプチドオリゴマー又は低分子ライブラリーに適用できる(Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12: 145)。

【0258】

ADPを基質として使用する当技術分野で既知の多くの酵素アッセイが存在する。例えば、ピルビン酸キナーゼなどのキナーゼ反応が知られている。Nature 78: 632 (1956) 及び Mol. Pharmacol. 6: 31 (1970) 参照。これは、ATPの再生を可能にするという点で好ましい方法である。 10

【0259】

従って、1つの実施形態では、酵素反応の活性のレベルを直接測定する。あるいは、ADPを基質として利用する酵素反応の活性のレベルを、もう1つ別の反応と共役させることによって間接的に測定する。共役によって酵素反応を測定することは当技術分野において既知である。さらに、リン酸を利用する他のプロトコールも使用できる。例示的な反応は、直接又は間接的に測定できる、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ反応を包含する。

【0260】

本発明の1つの例示の実施形態は、例えばADP又はリン酸を検出可能な化合物に結合する又は反応させることにより、ADP又はリン酸を非酵素的に検出することを提案する。適切な例は、遊離リン酸のリンモリブデン酸複合体への変換を含むリンモリブデン酸ベースのアッセイを包含する。リンモリブデン酸を定量する1つの方法は、マラカイトグリーンを用いる。あるいは、大腸菌リン酸結合タンパク質などのリン酸結合タンパク質の蛍光標識形態を使用して、その蛍光のシフトによってリン酸を測定することができる。 20

【0261】

さらにもう1つの実施形態では、本発明は、候補物質を標的タンパク質、例えばHsCENP-Eの活性の調節因子として特定する方法を提供する。該方法は、通常ADP又はリン酸の生産を可能にする条件下で、ADP又はリン酸を直接又は間接的に生産する標的タンパク質を含む混合物に候補物質を添加することを含む。該方法はさらに、該混合物を、通常ADP又はリン酸が利用されるのを可能にする条件下で上記ADP又はリン酸を基質として利用する反応に供すること、及びADP又はリン酸の濃度の測定として該反応の活性のレベルを測定することを含む。候補物質の存在下と不在下でのレベルの変化は、標的タンパク質の調節因子を指示する。標的タンパク質とは、選択ポリペプチド、例えばHsCENP-Eが本来結合する又は相互作用する分子を指す。一部の場合、標的タンパク質はHsCENP-Eタンパク質でありうる。 30

【0262】

「ADP又はリン酸を利用する」の語句は、ADP又はリン酸が検出試薬によって直接作用を受けることを意味する。1つの場合には、ADPが、例えば、加水分解されるか又はリン酸化されうる。もう1つの例として、リン酸がもう1つの化合物に付加されうる。ここで使用するとき、これらの各々の場合において、ADP又はリン酸は基質として作用している。 40

【0263】

好ましくは、標的タンパク質は、直接又は間接的にADP又はリン酸を生産し、及びモータードメインを含む。より好ましくは、標的タンパク質は上述したようなキネシンスーパーファミリーモータータンパク質を含み、最も好ましくは、標的タンパク質はHsCENP-E又はそのフラグメントを含む。

【0264】

もう1つの実施形態では、HsCENP-Eタンパク質の発現の調節因子は、細胞を候補化合物に接触させ、細胞中の選択mRNA又はタンパク質(すなわち、本発明のポリペ 50

プチド又は核酸に対応する mRNA 又はタンパク質)の発現を測定する方法において特定される。候補化合物の存在下での選択 mRNA 又はタンパク質の発現のレベルを、候補化合物の不在下での選択 mRNA 又はタンパク質の発現のレベルと比較する。次に、この比較に基づいて候補化合物を H s C E N P - E タンパク質の発現の調節因子として特定することができる。例えば、候補化合物の存在下での選択 mRNA 又はタンパク質の発現が候補化合物の不在下よりも高い(統計的に有意に高い)とき、その候補化合物は選択 mRNA 又はタンパク質発現の刺激因子として特定される。あるいは、候補化合物の存在下での選択 mRNA 又はタンパク質の発現が候補化合物の不在下よりも低い(統計的に有意に低い)とき、その候補化合物は選択 mRNA 又はタンパク質発現の阻害因子として特定される。細胞における選択 mRNA 又はタンパク質発現のレベルは、ここで述べる方法によって測定することができる。 10

【0265】

上記で述べたように特定した化合物(物質)を適切な動物モデルにおいてさらに使用することも本発明の範囲内である。例えば、ここで述べたように特定した物質(例えば H s C E N P - E 調節物質、アンチセンス H s C E N P - E 核酸分子、H s C E N P - E 特異的抗体又は H s C E N P - E 結合パートナー)は、そのような化合物による治療の効果、毒性又は副作用を調べるために動物モデルにおいて使用することができる。

【0266】

代替的实施形態では、本発明によって提供されるスクリーニングアッセイは、その生殖細胞及び体細胞が H s C E N P - E タンパク質又はその選択部分 - 配列番号 2 をコードするヌクレオチド配列を含むトランスジェニック哺乳類に関する。例えば H s C E N P - E をコードする配列を非ヒト哺乳類胚に導入しうるいくつかの手段が存在し、その一部は、例えば、参照してここに組み込まれる、米国特許第 4,736,866 号、Jaenisch, Science 240:1468-1474(1988)及び Westphal ら、Annu. Rev. Cell Biol. 5:181-196(1989)に述べられている。該動物の細胞は、次に、その受容体を発現し、それ故選択アゴニスト又はアンタゴニストを試験する又はスクリーニングするための好都合なモデルとして使用しうる。 20

【0267】

本発明はさらに、上述したスクリーニングアッセイによって特定される新規物質及びここで述べるような治療のためのその使用に関する。 30

【0268】

B. 予測医学

ここで開示するポリヌクレオチド又はポリペプチドはまた、診断アッセイ及び薬理遺伝学におけるツールとして、ならびに H s C E N P - E 仲介性疾患に罹患した個体を治療するために使用しうる。

【0269】

一般に、ここで述べる方法は、H s C E N P - E タンパク質の異常発現又は活性に関連する疾患又は障害を有する又は発症する危険性の高い被験者を特定するための診断又は予後アッセイとして使用できる。例えば、ここで述べるアッセイは、H s C E N P - E タンパク質の異常発現又は活性に関連する障害を有する又は発症する危険性の高い被験者を特定するために使用できる。あるいは、該アッセイは、そのような疾患又は障害を有する又は発症する危険性の高い被験者を特定するために使用できる。 40

【0270】

上記に従って、1つの代表的実施形態は、被験者から被験試料を入手して、本発明のポリペプチド又は核酸(例えば mRNA、ゲノム DNA)を検出する方法を提供し、その場合、該ポリペプチド又は核酸の存在は、該ポリペプチドの異常発現又は活性に関連する疾患又は障害を有する又は発症する危険性の高い被験者についての診断である。ここで使用するとき、「被験試料」は、対象被験者から得た生物学的試料を指す。例えば、被験試料は生物学的液体(例えば血清)、細胞試料又は組織でありうる。

【0271】

これらや他の作用物質を下記の項でさらに詳細に説明する。

【0272】

1. 診断アッセイ

従って、1つの局面では、本発明は、個体が上記で言及したパラメータの1つ又はそれ以上に関連する疾患又は障害に罹患しているかどうか又は障害を発症する危険性が高いかどうかを判定するために、(i) H s C E N P - Eタンパク質をコードする遺伝子の異常修飾又は突然変異；(ii) 遺伝子の調節不全；又は(iii) H s C E N P - Eタンパク質の異常翻訳後修飾によって例示される遺伝子変化の存在又は不在を特定するための診断アッセイを提供する。

【0273】

例えば、H s C E N P - Eをコードする遺伝子内の突然変異を生物学的試料において検定し、その後、H s C E N P - Eタンパク質の異常発現又は活性を特徴とする又は関連する障害の発症の前に個体を予防的に治療するための予後又は予測目的に使用することができる。

【0274】

本発明の検出方法は、インビトロならびにインビボで生物学的試料中のmRNA、タンパク質又はゲノムDNAを検出するために使用できる。

【0275】

生物学的試料においてH s C E N P - Eをコードするポリペプチド又は核酸の存在又は不在を検出するための例示的な方法は、被験対象から生物学的試料を得ること、及び生物学的試料においてポリペプチド又は核酸の存在が検出されるように、該生物学的試料中を、ポリペプチド又は核酸(例えばmRNA、ゲノムDNA)を検出することができる化合物又は物質と接触させることを含む。

【0276】

H s C E N P - Eタンパク質をコードするmRNA又はゲノムDNAを検出するための好ましい物質は、H s C E N P - Eタンパク質をコードするmRNA又はゲノムDNAにハイブリダイズすることができる標識核酸プローブである。該核酸プローブは、例えば、配列番号1の核酸などの完全長cDNA、又は少なくとも15、30、50、100、250又は500ヌクレオチドの長さの、中等度にストリンジェントな条件下でH s C E N P - Eタンパク質をコードするmRNA又はゲノムDNAに特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドなどの、それらから誘導される部分でありうる。本発明の診断アッセイにおける使用のための他の適切なプローブをここで述べる。一部の実施形態では、ここで述べるポリヌクレオチド配列から誘導されるポリヌクレオチド又はより長いフラグメントは、H s C E N P - E仲介性疾患の存在を検出するための様々な診断アッセイにおいて使用しうる。診断のための核酸は、H s C E N P - Eを発現することが知られている体液又は細胞抽出物から入手しうる。

【0277】

プローブは、標準方法によって標識し、ハイブリダイゼーション複合体の形成に適した条件下で患者からの体液又は組織試料に添加しうる。適切なインキュベーション期間後、該試料を洗浄し、シグナルを定量して、標準値と比較する。患者試料中のシグナルの量が対照と比較して有意に変化している場合、試料中のH s C E N P - Eをコードするヌクレオチド配列のレベル変化の存在が関連疾患の存在を示す。そのようなアッセイはまた、動物試験、臨床試験において特定治療処置レジメンの効果を評価するため、又は個々の患者の治療を監視するためにも使用しうる。

【0278】

1つの局面では、ヒトC E N P - Eタンパク質又は緊密に関連する分子をコードするゲノム配列を含む、ポリヌクレオチド配列を検出することができるPCRプローブによるハイブリダイゼーションを使用して、H s C E N P - Eタンパク質をコードする核酸配列を特定しうる。プローブの特異性、高度に特異的な領域、例えば5'調節領域から作製されているか又はあまり特異的でない領域、例えば保存されたモチーフから作製されているか

10

20

30

40

50

どうか、及びハイブリダイゼーション又は増幅のストリンジェンシー（最高、高、中間又は低）が、該プローブがH s C E N P - Eをコードする天然に生じる配列、対立遺伝子変異体又は関連配列だけを特定するかどうかを決定する。

【0279】

プローブはまた、関連配列の検出にも使用でき、好ましくはH s C E N P - Eコード配列のいずれかに少なくとも50%の配列同一性を有するべきである。本発明のハイブリダイゼーションプローブはDNA又はRNAのいずれでもよく、配列番号1の配列から又はH s C E N P - E遺伝子のプロモーター、エンハンサー及びイントロンを含むゲノム配列から誘導されうる。

【0280】

H s C E N P - EをコードするDNAについての特異的ハイブリダイゼーションプローブを作製するための手段は、H s C E N P - E又はH s C E N P - E誘導体をコードするポリヌクレオチド配列を、mRNAプローブの作製のためのベクターにクローン化することを含む。そのようなベクターは当技術分野において既知であって、市販されており、適切なRNAポリメラーゼと適切な標識ヌクレオチドの添加によってインビトロでRNAプローブを合成するために使用しうる。ハイブリダイゼーションプローブは、様々なレポーター群によって、例えば³²P又は³⁵Sなどの放射性核種によって、又はアビジン/ビオチン結合系を通してプローブに結合するアルカリホスファターゼなどの酵素標識によって標識しうる。

10

【0281】

H s C E N P - Eの発現に関連する疾患の診断のための根拠を提供するために、発現についての正常又は標準プロフィールを確立する。これは、動物又はヒトの正常被験者から採取した体液又は細胞抽出物を、ハイブリダイゼーション又は増幅に適した条件下で、H s C E N P - Eをコードする配列又はそのフラグメントと混合することによって達成しうる。正常被験者から得た値を、実質的に精製されたポリヌクレオチドの既知量を使用した実験からの値と比較することによって標準ハイブリダイゼーションを数量化しうる。このようにして得た標準値を、疾患に関して症候性である患者の試料から得た値と比較しうる。標準値からの偏差を使用して疾患の存在が確立される。

20

【0282】

上記に対応する一般的な方法は、対照被験者から生物学的試料を得ること、生物学的試料においてH s C E N P - Eタンパク質又は該タンパク質をコードするmRNA又はゲノムDNAの存在が検出されるように、該対照試料を、H s C E N P - Eタンパク質又はH s C E N P - Eタンパク質をコードするmRNA又はゲノムDNAを検出することができる化合物又は物質と接触させること、及び対照試料における該ポリペプチド又はH s C E N P - Eタンパク質をコードするmRNA又はゲノムDNAの存在を、被験試料における該タンパク質又は該ポリペプチドをコードするmRNA又はゲノムDNAの存在と比較することを含む。ひとたび疾患の存在が確立され、治療プロトコールが開始されれば、患者における発現のレベルが正常被験者で認められるレベルに近づき始めているかどうかを調べるために定期的なペースでハイブリダイゼーションアッセイを反復しうる。連続的なアッセイから得た結果を使用して、数日間から数ヶ月間にわたる治療の効果を明らかにすることができる。

30

40

【0283】

配列番号2のアミノ酸配列又はその生物学的に等価の変異体をコードするポリヌクレオチド又はそれらから誘導される配列を含む配列番号1に示すヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを使用して、H s C E N P - Eの異常な又は変化した発現から生じる疾患の診断又は疾患への感受性の診断を裏付ける又は定義することができる診断ツールを最終的に提供する、機能不全に結びつくH s C E N P - E遺伝子の突然変異形態を検出しうる。

【0284】

突然変異は、1) 遺伝子からの1又はそれ以上のヌクレオチドに欠失；2) 遺伝子への

50

1又はそれ以上のヌクレオチドの付加；3) 遺伝子の1又はそれ以上のヌクレオチドの置換；4) 遺伝子の染色体再編成；5) 遺伝子のメッセンジャーRNA転写産物のレベルの変化；6) ゲノムDNAのメチル化パターンなどの、遺伝子の異常修飾；7) 遺伝子のメッセンジャーRNA転写産物の非野生型スプライシングパターンの存在；8) 遺伝子によってコードされるタンパク質の非野生型レベル；9) 遺伝子の対立遺伝子の喪失；及び10) 遺伝子によってコードされるタンパク質の不適切な翻訳後修飾、の少なくとも1つの存在を確認することによって検出できる。ここで述べるように、遺伝子内の病変を検出するために使用できる、当技術分野で既知の数多くのアッセイ手法が存在する。

【0285】

従って、HsCENP-Eをコードするポリヌクレオチドを使用して、生検組織においてHsCENP-E遺伝子発現を検出し、定量することができ、その場合、HsCENP-Eの発現は疾患と相関しうる。該診断アッセイは、HsCENP-Eの不在、存在及び過剰発現を測定するため、及び治療処置の間のHsCENP-Eレベルの調節を監視するために使用しうる。HsCENP-Eの発現を数量化するための方法は、放射標識、ヌクレオチドをビオチニル化すること、対照核酸の共増幅、及び標準曲線からの結果を補間することを包含する(例えば、Melby, P. C.ら(1993) J. Immunol. Methods 159:235-244; Duplaa, C.ら(1993) Anal. Biochem. 229-236参照)。対象オリゴマーを様々な希釈で提供し、分光測光又は熱量測定応答が迅速な定量を与える、ELISA方式でアッセイを実施することによって多数の試料の定量の速度を加速しうる。

【0286】

癌に関しては、個体からの生検組織におけるHsCENP-Eタンパク質をコードする転写産物の異常量の存在、好ましくは高いレベルの転写産物の存在は、該疾患の発症への素因を示しうる又は急性臨床徴候の出現の前に該疾患を検出するための手段を提供しうる。この種のより決定的な診断は、医療専門家がより早期に予防的措置又は積極的治療を使用し、それによって癌の発症又はさらなる進行を予防することを可能にすると考えられる。

【0287】

例えば、増幅したDNAを標識HsCENP-Eヌクレオチド配列にハイブリダイズすることによって点突然変異を特定することができる。RNAアーゼ消化によって又は融解温度の相違によって、完全に一致する配列をミスマッチ二本鎖から区別することができる。DNA配列の相違はまた、変性剤を含む又は含まないゲル中でのDNAフラグメントの電気泳動移動度の変化によって又は直接DNA塩基配列決定によっても検出しうる。例えば、Myersら、Science(1985)230:1242参照。特定位置における配列の変化も、RNAアーゼ及びS1保護などのヌクレアーゼ保護アッセイによって又は化学的開裂法によって明らかにしうる。Cottonら、Proc Natl Acad Sci USA(1985)85:4397-4401参照。

【0288】

好ましい実施形態では、該方法は、被験者からの細胞の試料において、HsCENP-Eタンパク質をコードする遺伝子の完全性に影響を及ぼす変化又はHsCENP-Eタンパク質をコードする遺伝子の誤発現の少なくとも1つによって特徴付けられる突然変異の存在又は不在を検出することを含む。

【0289】

一部の実施形態では、突然変異の検出は、アンカーPCR又はRACE PCRなどのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(例えば、米国特許第4,683,195号及び同第4,683,202号)において、あるいは、リガーゼ連鎖反応(LCR)(例えば、Landegranら(1988) Science 241:1077-1080;及びNakazawaら(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:360-364参照)においてプローブ/プライマーを使用することを含み、後者は遺伝子における点突然変異を検出するために特に有用でありうる(例えば、Abravayaら

(1995) *Nucleic Acids Res.* 23: 675 - 682 参照)。この方法は、患者から細胞の試料を採集すること、該試料の細胞から核酸（例えばゲノム、mRNA 又はその両方）を単離すること、該核酸試料を、遺伝子（もし存在する場合は）のハイブリダイゼーションと増幅が起こるような条件下で選択遺伝子に特異的にハイブリダイズする 1 又はそれ以上のプライマーと接触させること、及び増幅産物の存在又は不在を検出すること、又は増幅産物の大きさを検出し、その長さを対照試料と比較することの段階を含みうる。ここで述べる突然変異を検出するために使用される手法のいずれかと組み合わせ、PCR 及び / 又は LCR を予備増幅段階として使用することが望ましいであろうと考えられる。他の増幅方法は周知である。

【0290】

代替的实施形態では、選択遺伝子、例えば試料細胞からの HsCENP-E コード遺伝子における突然変異は、制限酵素開裂パターンの変化によって特定できる。例えば、試料と対照の DNA を単離し、増幅して（場合により）、1 又はそれ以上の制限エンドヌクレアーゼで消化し、フラグメント長の大きさをゲル電気泳動によって測定して比較する。試料と対照 DNA の間のフラグメントの長さの差が試料 DNA における突然変異を示す。さらに、配列特異的リボザイム（例えば米国特許第 5,498,531 号参照）を使用して、リボザイム開裂部位の出現又は喪失によって特異的突然変異の存在を評価することができる。

【0291】

他の実施形態では、試料と対照の核酸、例えば DNA 又は RNA を、数百又は数千のポリヌクレオチドプローブを含む高密度アレイにハイブリダイズすることによって遺伝子突然変異を特定することができる（Cronin ら (1996) *Human Mutation* 7: 244 - 255; Kozal ら (1996) *Nature Medicine* 2: 753 - 759)。例えば、Cronin ら、前出が述べたような発光 DNA プローブを含む二次元アレイにおいて遺伝子突然変異を特定することができる。簡単に述べると、プローブの第一ハイブリダイゼーションアレイを使用して試料及び対照中の DNA の長い範囲全体にわたって走査し、連続的重複プローブの線状アレイを作製することによって配列の間の塩基変化を特定することができる。この段階は点突然変異の特定を可能にする。この段階に続いて、第二ハイブリダイゼーションアレイは、検出されたすべての変異体又は突然変異に相補的な、より小さい特殊なプローブのアレイを使用することにより、特定突然変異の特性指摘を可能にする。各々の突然変異アレイは、一方は野生型遺伝子に相補的であり、他方は突然変異体遺伝子に相補的な、平行プローブセットから成る。

【0292】

さらにもう 1 つの実施形態では、当技術分野で既知の様々な配列決定反応のいずれかを使用して、選択遺伝子を直接配列決定し、試料核酸の配列を対応する野生型（対照）配列と比較することによって突然変異を検出することができる。配列決定反応の例は、Maxim と Gilbert ((1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 560) 又は Sanger ((1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463) によって開発された手法に基づくものを包含する。また、質量分析法による配列決定（例えば、PCT 国際公開公報第 WO94/16101 号; Cohen ら (1996) *Adv. Chromatogr.* 36: 127 - 162; 及び Griffinn ら (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38: 147 - 159 参照) を含む、様々な自動配列決定手順のいずれかが、診断アッセイを実施するときに利用できる ((1995) *Bio/Techniques* 19: 448) と考えられる。

【0293】

HsCENP-E 遺伝子における突然変異を検出するための他の方法は、開裂物質からの保護を使用して、RNA/RNA 又は RNA/DNA ヘテロ二本鎖におけるミスマッチ塩基を検出する方法を包含する（Myers ら (1985) *Science* 230: 1242）。一般に、ミスマッチ開裂の手法は、野生型配列を含む（標識）RNA 又は DN

10

20

30

40

50

Aを組織試料から得た潜在的突然変異型RNA又はDNAとハイブリダイズすることによって形成したヘテロ二本鎖を提供することを含む。その二本鎖を、対照と試料の鎖の塩基対ミスマッチのために存在するような二重鎖分子の一本鎖領域を開裂する物質で処理する。RNA/DNA二本鎖は、ミスマッチ領域を消化するためにRNAアーゼで処理することができ、DNA/DNA雑種は、S1ヌクレアーゼで処理してミスマッチ領域を消化することができる。他の実施形態では、DNA/DNA又はRNA/DNA二本鎖を、ミスマッチ領域を消化するためにヒドロキシルアミン又は四酸化オスミウム及びピペリジンで処理することができる。ミスマッチ領域の消化後、生じた物質を変性ポリアクリルアミドゲル上で大きさによって分離し、突然変異の部位を決定する。例えば、Cottonら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397; Saleebaら(1992) Methods Enzymol. 217:286-295参照。好ましい実施形態では、対照DNA又はRNAを検出のために標識することができる。米国特許第5,459,039号も参照のこと。

【0294】

他の実施形態では、電気泳動移動度の変化を使用して遺伝子における突然変異を特定する。例えば、一本鎖立体配座多型(SSCP)を使用して、突然変異体と野生型核酸の間の電気泳動移動度の差を検出する(Oritaら(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2766; Cotton(1993) Mutat. Res. 285:125-144; Hayashi(1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9:73-79も参照のこと)。試料と対照核酸の一本鎖DNAフラグメントを変性し、復元させる。一本鎖核酸の二次構造は配列によって変化し、生じる電気泳動移動度の変化は、単一塩基変化の検出さえも可能にする。該DNAフラグメントは標識するか又は標識プローブで検出する。二次構造が配列の変化に対してより感受性であるRNA(DNAではなく)を使用することによってアッセイの感受性を高めうる。好ましい実施形態では、本発明の方法は、電気泳動移動度の変化に基づいてヘテロ二本鎖分子を分離するためのヘテロ二本鎖分析法を利用する(Keenら(1991) Trends Genet. 7:5)。

【0295】

さらにもう1つの実施形態では、変性剤の勾配を含むポリアクリルアミドゲル中での突然変異型又は野生型フラグメントの移動を、変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)(Myersら(1985) Nature 313:495)を用いて検定する。DGGEを分析方法として使用するとき、例えばPCRによって約40bpの高融解温度のGCに富むDNAの'GCクランプを添加することにより、DNAを、それが完全に変性しないことを保証するように修飾する。さらなる実施形態では、対照と試料DNAの移動度の差を特定するために変性勾配の代わりに温度勾配を使用する(RosenbaumとReisner(1987) Biophys. Chem. 265:12753)。

【0296】

点突然変異を検出するための他の適切なプロトコールは、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択増幅、又は選択的プライマー伸長を含むが、これらに限定されない。例えば、Saikiら(1986) Nature 324:163); Saikiら(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230参照。

【0297】

HsCENP-E分子及びそれに対する抗体を得ることにより、様々な診断アッセイが提供される。抗体は、治療のため又はここで述べる配列同一性特徴を有するHsCENP-Eタンパク質の存在を特定するために使用できる。さらに、抗体を使用して、下記でさらに説明するような抗体とHsCENP-Eタンパク質の間の相互作用の調節因子を特定することができる。

【0298】

下記の考察は結合アッセイの使用における抗体の使用を対象とするが、「非競合」又は

「競合」アッセイについて述べられているのと同じ一般的アッセイ様式が、微小管等のようなHsCENP-Eタンパク質に結合する化合物に関して使用できることは了解される。免疫学的及び免疫測定法の手順の総説に関しては、Basic and Clinical Immunology (Stites & Terr編集、第7版、1991)参照。さらに、本発明の免疫測定法は、Enzyme Immunoassay (Maggio編集、1980)；及びHarlow & Lane、前出において広汎に総説されている、いくつかの立体配置のいずれかで実施することができる。

好ましくは、HsCENP-Eタンパク質は、いくつもの十分に認識されている免疫学的結合アッセイのいずれかを用いて検出及び/又は定量される(例えば、米国特許第4,366,241号；同第4,376,110号；同第4,517,288号；及び同第4,837,168号参照)。一般的な免疫測定法の総説については、Methods in Cell Biology 第37巻: Antibodies in Cell Biology (Asai編集、1993)；Basic and Clinical Immunology (Stites & Terr編集、第7版、1991)も参照のこと。

10

【0299】

免疫学的結合アッセイ(又は免疫測定法)は、典型的には、HsCENP-Eタンパク質又はその抗原活性フラグメントと比較して、選択タンパク質又は抗原に特異的に結合する抗体を使用する。抗体、例えば抗HsCENP-Eタンパク質は、当業者に周知であり、上述したような多くの手段のいずれかによって作製しうる。

20

【0300】

それ故、本発明の1つの代表的な実施形態は、HsCENP-Eの発現を特徴とする疾患の診断のために、又はHsCENP-E又はHsCENP-Eのアゴニスト、アンタゴニスト又は阻害因子で治療されている患者を監視するためのアッセイにおいて、HsCENP-Eタンパク質に特異的に結合する抗体を使用することを提案する。好ましくは、該抗体は、配列番号1の遺伝子産物又は配列番号2のポリペプチド又はその抗原活性フラグメントに対して結合特異性を有する。

【0301】

HsCENP-Eを測定するのに適する様々なプロトコールが存在する。代表的な例は、ELISA、RIA及びFACSを包含し、それらの各々が変化した又は異常なレベルHsCENP-E発現を診断するための根拠を提供する。

30

【0302】

HsCENP-E発現についての正常又は標準値は、正常哺乳類被験者、好ましくはヒトから採取した体液又は細胞抽出物を、HsCENP-Eに対する抗体と、それらの複合体の形成を促進する条件下で混合することによって確立できる。標準複合体形成の量は、様々な方法によって定量しうる。生検組織からの被験者、対照及び疾患試料において発現されるHsCENP-Eの量を、その後、標準値と比較することができる。標準と被験者の数値の間の偏差が、今度は、疾患を診断するためのパラメータを提供する。

【0303】

1つのアッセイ様式では、高レベルのHsCENP-Eを発現することが知られている体組織と反応性である標識抗体、好ましくはモノクローナル抗体を使用すること及びそれに対する特異的結合を測定することによってHsCENP-Eタンパク質を特定及び/又は定量し、該アッセイは、典型的には免疫複合体形成を誘導する条件下で実施する。非標識一次抗体を、受容体を検出するために一次抗体と反応性の標識と組み合わせて使用することができる。

40

【0304】

免疫測定法はまた、抗体と抗原によって形成される複合体に特異的に結合してそれを標識するための標識物質をしばしば使用する。標識物質は、それ自体、抗体/抗原複合体を含む成分の1つでありうる。それ故、標識物質は、標識HsCENP-Eタンパク質ポリペプチド又は標識抗HsCENP-Eタンパク質抗体でありうる。あるいは、標識物質は

50

、抗体 / H s C E N P - E タンパク質複合体に特異的に結合する二次抗体などの第三の成分でありうる（二次抗体は、典型的には一次抗体が由来する種の抗体に特異的である）。プロテイン A 又はプロテイン G などの、免疫グロブリン定常領域に特異的に結合することができる他のタンパク質も、標識物質として使用しうる。これらのタンパク質は、様々な種からの免疫グロブリン定常領域と強い非免疫原性反応性を示す（一般に、Kronvalら、J. Immunol. 111: 1401 - 1406 (1973); Akerstromら、J. Immunol. 135: 2589 - 2542 (1985) 参照）。標識物質は、ストレプトアビジンなどのもう1つ別の分子が特異的に結合しうる、ビオチンなどの検出可能な成分で修飾することができる。様々な検出可能成分が当業者に周知である。

【0305】

非競合アッセイ様式 - 試料中の H s C E N P - E タンパク質を検出するための免疫測定法は、競合的又は非競合的のどちらでもよい。非競合免疫測定法は、抗原の量を直接測定するアッセイである。1つの好ましい「サンドイッチ」アッセイでは、例えば、抗 H s C E N P - E タンパク質抗体を固体基質に直接結合して、その上に固定化することができる。これらの固定化抗体が、次に、被験試料中に存在する H s C E N P - E タンパク質を捕獲する。このようにして H s C E N P - E タンパク質を固定化し、その後、標識を担う第二 H s C E N P - E タンパク質抗体などの標識物質に結合する。あるいは、第二抗体は標識を持たなくてもよいが、次に、第二抗体が由来する種の抗体に特異的な標識第三抗体によって結合されうる。第二又は第三抗体は、典型的には、検出可能成分を提供するために、ストレプトアビジンなどのもう1つ別の分子が特異的に結合する、ビオチンなどの検出可能な成分で修飾される。

10

20

【0306】

代替的様式、例えば競合アッセイ様式では、試料中に存在する未知の H s C E N P - E タンパク質によって抗 H s C E N P - E タンパク質から置換された（競合排除された）、既知の添加（外因性）H s C E N P - E タンパク質の量を測定することにより、試料中に存在する H s C E N P - E タンパク質の量を間接的に測定する。1つの競合アッセイでは、既知量の H s C E N P - E タンパク質を試料に添加し、次に該試料を、H s C E N P - E タンパク質に特異的に結合する抗体と接触させる。該抗体に結合した外因性 H s C E N P - E タンパク質の量は、試料中に存在する H s C E N P - E タンパク質の濃度に逆比例する。特に好ましい実施形態では、該抗体を固体基質に固定化する。抗体に結合した H s C E N P - E タンパク質の量は、H s C E N P - E タンパク質 / 抗体複合体中に存在する H s C E N P - E タンパク質の量を測定することによって、あるいは残存する非複合タンパク質の量を測定することによって決定しうる。H s C E N P - E タンパク質の量は、標識 H s C E N P - E タンパク質分子を提供することによって検出しうる。

30

【0307】

ハプテン阻害アッセイはもう1つの好ましい競合アッセイである。このアッセイでは、既知の H s C E N P - E タンパク質を固体基質上に固定化する。既知量の抗 H s C E N P - E タンパク質抗体を試料に添加し、次に該試料を H s C E N P - E タンパク質と接触させる。既知の固定化 H s C E N P - E タンパク質に結合した抗 H s C E N P - E タンパク質抗体の量は、試料中に存在する H s C E N P - E タンパク質の量に逆比例する。やはり、固定化抗体の量は、抗体の固定化分画又は溶液中に残存する抗体の分画のいずれかを検出することによって検出しうる。検出は、抗体が標識されている場合は直接的であるか、又は上述したような抗体に特異的に結合する標識成分のその後の添加によって間接的でありうる。

40

【0308】

試料中の H s C E N P - E タンパク質の存在を検出し、定量するために、ウエスタンブロット分析が使用できる。その手法は一般に、分子量に基づきゲル電気泳動によって試料タンパク質を分離すること、分離したタンパク質を適切な保持体（ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター又は誘導体化ナイロンフィルターなど）に移すこと、及び該試料を、H s C E N P - E タンパク質に特異的に結合する抗体と共にインキュベートする

50

ことを含む。抗HsCENP-Eタンパク質抗体は、保持体上のHsCENP-Eタンパク質に特異的に結合する。これらの抗体は、直接標識するか、あるいはその後、抗HsCENP-Eタンパク質抗体に特異的に結合する標識抗体（例えば標識ヒツジ抗マウス抗体）を用いて検出する。他のアッセイ様式は、特定分子（例えば抗体）に結合して、被包された試薬又はマーカーを放出するように設計されたリポソームを使用する、リポソーム免疫測定法（LIA）を包含する。放出された化学物質は、その後、標準手法に従って検出される（Monroeら、Amer. Clin. Prod. Rev. 5: 34-41（1986）参照）。

【0309】

非特異的結合の低減 - 免疫測定法においてはしばしば非特異的結合を最小限に抑えることが望ましいことは認識されよう。特に、該測定法が固体基質に固定化された抗原又は抗体を含む場合は、基質への非特異的結合の量を最小限に抑えることが望ましい。そのような非特異的結合を低減する手段は当業者に周知である。典型的には、この手法は、基質をタンパク様組成物で被覆することを含む。特に、ウシ血清アルブミン（BSA）、脱脂粉乳及びゼラチンなどのタンパク質組成物は広く使用されており、脱脂粉乳が最も好ましい。

10

【0310】

プローブ又は抗体に関して、「標識」の語は、検出可能な物質をプローブ又は抗体に結合すること（すなわち物理的結合）によるプローブ又は抗体の直接標識、ならびに直接標識されたもう1つ別の試薬との反応性によるプローブ又は抗体の間接標識を包含することが意図されている。ここで開示するアッセイにおいて使用される特定標識又は検出可能基は、特定アッセイで使用される抗体の特異的結合に有意に干渉しない限り、決定的に重要ではない。検出可能基は、検出可能な物理的又は化学的性質を有するいかなる物質でもよい。そのような検出可能標識は免疫測定法の分野で広く開発されており、一般に、そのような方法において有用なほとんどの標識が本発明に適用できる。

20

【0311】

ここで使用する「生物学的試料」は、標的タンパク質、例えばHsCENP-E又はそのフラグメント、あるいは標的タンパク質又はそのフラグメント、例えばHsCENP-Eをコードする核酸を含む生物組織又は体液の試料である。生物学的試料はまた、組織学的検査のために採取された凍結切片などの組織の切片を包含する。この語は、被験者から単離された組織、細胞及び生物学的液体、ならびに被験者の体内に存在する組織、細胞及び液体を包含することが意図されている。

30

【0312】

本発明はまた、生物学的試料（被験試料）における本発明のポリペプチド又は核酸の存在を検出するためのキットを包含する。そのようなキットは、被験者が、HsCENP-Eタンパク質の異常発現に関連する疾患（例えばHsCENP-E仲介性又は関連性の癌）に罹患している又は疾患を発症する危険性が高いかどうかを判定するために使用できる。例えば、該キットは、生物学的試料において該ポリペプチド又は該ポリペプチドをコードするmRNAを検出することができる標識化合物又は物質、及び該試料中のHsCENP-Eタンパク質又はmRNAの量を測定するための手段（例えば、該ポリペプチドに結合する抗体又は該ポリペプチドをコードするDNA又はmRNAに結合するオリゴヌクレオチドプローブ）を含みうる。キットはまた、該ポリペプチド又は該ポリペプチドをコードするmRNAの量が正常値以上又は以下である場合、試験する被験者が、該ポリペプチドの異常発現に関連する疾患に罹患している又は疾患を発症する危険性が高いことを認識するための指示書を含みうる。

40

【0313】

抗体ベースのキットに関しては、該キットは、例えば（1）HsCENP-Eタンパク質に結合する第一抗体（例えば保持体に結合した）；及び場合により（2）該ポリペプチド又は第一抗体のいずれかに結合し、検出可能物質に複合している第二の異なる抗体を含みうる。

50

【0314】

オリゴヌクレオチドベースのキットに関しては、該キットは、例えば(1) H s C E N P - E タンパク質をコードする核酸にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、例えば検出可能に標識されたオリゴヌクレオチド又は(2) H s C E N P - E タンパク質をコードする核酸分子を増幅するために有用な一対のプライマーを含みうる。

【0315】

該キットはまた、例えば緩衝剤、防腐剤又はタンパク質安定剤も含みうる。該キットはまた、検出可能物質(例えば酵素又は基質)を検出するために必要な成分を含みうる。該キットはまた、検定して、含まれる被験試料と比較することができる対照試料又は一連の対照試料も含みうる。キットの各々の成分は、通常、個別の容器内に納められ、様々な容器全部が、試験する被験者が該ポリペプチドの異常発現に関連する疾患に罹患している又は疾患を発症する危険性が高いかどうかを認識するための指示書と共に単一包装内に納められる。

10

【0316】

他の実施形態では、例えば、診断核酸は配列番号1から誘導される。考慮される診断システムは、本発明のタンパク質をコードするゲノムDNA又は転写核酸(mRNA又はcDNAなど)において本発明のタンパク質をコードする核酸の存在又は不在を検定するために有用である。

【0317】

適切な診断システムは、少なくとも1個の本発明の核酸分子又はそれから誘導されるフラグメント、好ましくは2個又はそれ以上の本発明の核酸を、少なくとも1回のアッセイに十分な量で別々に包装された化学試薬として含む。典型的には、包装された試薬の使用のための指示書も含まれる。当業者は、ここで述べる本発明の方法の実施のために適切な緩衝液及び溶液と組み合わせて、本発明の核酸プライマーローブ及び/又はプライマーをキットの形態に容易に組み込むことができる。

20

【0318】

「本発明のタンパク質」は、それらすべてが配列番号2のアミノ酸配列又は生物活性H s C E N P - E をコードする、配列番号1の遺伝子産物又はその変異体又はフラグメントを指す。

【0319】

2. 薬理遺伝学

本発明はさらに、個体にとって適切な治療又は予防薬を選択するための、個体における核酸又はH s C E N P - E タンパク質の発現又はH s C E N P - E タンパク質の活性のための方法(ここでは「薬理遺伝学」と称する)を提供する。

30

【0320】

ここで使用するとき「薬理遺伝学」は、遺伝子の塩基配列決定、統計遺伝学及び臨床開発中及び市販されている薬剤に対する遺伝子発現分析などのゲノムテクノロジーの適用を指す。より特定すると、この語は、患者の遺伝子が薬剤に対する応答(例えば患者の「薬剤応答表現型」又は「薬剤応答遺伝子型」)をどのようにして決定するかについての試験を指す。例えば、L i n d e r (1 9 9 7) C l i n . C h e m . 4 3 (2) : 2 5 4 - 2 6 6 参照。

40

【0321】

それ故、本発明の1つの局面は、個体の予防又は治療処置を、その個体の薬剤応答遺伝子型に従って本発明のH s C E N P - E 分子又はH s C E N P - E 調節因子に適合させるための方法を提供する。

【0322】

従って、ここで述べるスクリーニングアッセイのいずれか1つによって特定されたH s C E N P - E タンパク質の活性又は発現を阻害する調節因子を、該ポリペプチドの異常活性に関連する疾患を治療する(予防的又は治療的に)ために個体に投与することができる。そのような治療と共に、該個体の薬理遺伝学(すなわち、個体の遺伝子型とその個体の

50

外来化合物又は薬剤に対する応答との間の関係の試験)考慮しうる。それ自体で、本発明の提示する方法は、臨床家又は医師が、患者がその治療から最も恩恵を受ける予防又は治療処置を患者に有効に標的すること、及び患者が有害な薬剤関連副作用を経験する治療を有効に回避することを可能にする。

【0323】

そのような薬理遺伝学はさらに、適切な用量及び治療レジメンを決定するために使用できる。その結果、個体におけるHsCENP-Eタンパク質の活性、該ポリペプチドをコードする核酸の発現、又は該ポリペプチドをコードする遺伝子の突然変異含量を測定し、それによって該個体の治療又は予防処置のための適切な薬剤を選択することができる。

【0324】

例えば、HsCENP-E遺伝子発現、HsCENP-Eタンパク質レベル又はそのタンパク質活性を低下させることに関係付けられてきた、ここで特定する薬剤の有効性を、高い遺伝子発現、タンパク質レベル又はタンパク質活性を示す被験者の臨床試験において監視することができる。

【0325】

例えば、限定ではなく、HsCENP-Eポリペプチドの活性又は発現を調節する物質(例えばここで述べるスクリーニングアッセイにおいて特定されるような)(例えば化合物、薬剤又は低分子)による治療によって細胞において調節される、配列番号1に対応する又は配列番号2のタンパク質をコードする、本発明の遺伝子を含む遺伝子が特定できる。

【0326】

それ故、例えば臨床試験において、特定HsCENP-E仲介性又は関連性の癌、例えばタキソールに抵抗性のもの又は他の薬剤抵抗性腫瘍を含む、過剰増殖性細胞によって特徴付けられるものへの作用物質(例えば抗有糸分裂薬)の作用を検討するために、細胞を単離し、mRNAを作製して、本発明の遺伝子及び該疾患に関係付けられる他の遺伝子の発現のレベルに関して分析することができる。遺伝子発現のレベル(すなわち遺伝子発現パターン)を、ここで述べるようなノーザンプロット分析又はRT-PCRによって、あるいはここで述べる方法の1つを用いて、産生されるタンパク質の量を測定することによって、又は本発明の遺伝子又は他の遺伝子の活性のレベルを測定することによって定量することができる。このように、遺伝子発現パターンは作用物質に対する細胞の生理的応答を指示するマーカーとして使用できる。従って、この応答状態を、作用物質による個体の治療の前及び治療中の様々な時点で測定しうる。

【0327】

その結果、本発明の1つの例示的な実施形態は、(i)作用物質の投与前に被験者から投与前試料を得ること；(ii)投与前試料において本発明のポリペプチド又は核酸のレベルを検出すること；(iii)被験者から1又はそれ以上の投与後試料を得ること；(iv)投与後試料において本発明のポリペプチド又は核酸のレベルを検出すること；(v)投与前試料における本発明のポリペプチド又は核酸のレベルを投与後試料(1又はそれ以上)における本発明のポリペプチド又は核酸のレベルと比較すること；及び(v)それらに従って被験者への作用物質の投与を変化させること、を含む、作用物質(例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティック、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子又はここで述べるスクリーニングアッセイによって特定される他の薬剤候補物質)による被験者の治療の有効性を監視するための方法を提供する。例えば、作用物質の投与量の上昇は、該ポリペプチドの発現又は活性を低下させる、すなわち作用物質の有効性を上昇させるために望ましいと考えられる。

【0328】

C. 治療方法

本発明はまた、異常HsCENP-E発現又は活性に関連する疾患の危険性が高い(又は疾患に感受性がある)又は疾患を有する被験者を処置する、予防的及び治療的方法を提供する。処置の予防的及び治療的方法の両方に関して、そのような処置は、薬理遺伝学の

10

20

30

40

50

分野から得られる知識に基づいて、特異的に適合させうる又は改変しうる。

【0329】

1. 予防的方法

上記に従って、本発明は、被験者に H s C E N P - E、あるいは H s C E N P - E の発現又は少なくとも1つの H s C E N P - E 活性を調節する物質を投与することにより、該被験者において異常 H s C E N P - E 発現又は活性に関連する疾患又は状態を予防するための方法を提供する。異常 H s C E N P - E 発現又は活性によって引き起こされる又は異常 H s C E N P - E 発現又は活性が寄与する疾患の危険性が高い被験者は、例えば、ここで述べる診断又は予後アッセイのいずれか又はそれらの組合せによって特定することができる。予防物質の投与は、該疾患又は障害が予防されるように、あるいはその進行が遅延するように、H s C E N P - E 異常を特徴とする症状の発現の前に実施できる。H s C E N P - E 異常のタイプに依存して、例えば、被験者を処置するために H s C E N P - E アゴニスト又は H s C E N P - E アンタゴニストを使用することができる。適切な作用物質は、ここで述べるスクリーニングアッセイに基づいて決定することができる。

10

【0330】

2. 治療的方法

例えば配列及びモチーフに関して、H s C E N P - E とキネシンのモータードメインの領域間に化学的及び構造的類似性が存在することは周知である。同様に、例えば癌のような過剰増殖細胞を伴う疾患状態に H s C E N P - E の発現が関与することは数多くの先行技術が教示している。それ故、高い H s C E N P - E 活性を特徴とする疾患状態の治療においては、H s C E N P - E の発現又は活性を低下させることが望ましい。あるいは、H s C E N P - E 活性の低下を伴う病的状態の治療では、該タンパク質を提供すること又は H s C E N P - E の発現を上昇させることが望ましい。

20

【0331】

一般に、H s C E N P - E 活性の阻害は、H s C E N P - E が異常に上方調節される及び/又は低い H s C E N P - E 活性が有益な作用を及ぼすと考えられる状態において望ましい。好ましくは、作用物質は1又はそれ以上の H s C E N P - E 活性を阻害する。そのような阻害物質の例は、アンチセンス H s C E N P - E 核酸分子、抗 H s C E N P - E 抗体及び H s C E N P - E 阻害因子を包含する。これらの調節方法は、インビトロで(例えば細胞を作用物質と共に培養することによって)、あるいはインビボで(例えば作用物質を被験者に投与することによって)実施することができる。

30

【0332】

H s C E N P - E タンパク質の高発現は、H s C E N P - E のアンタゴニストを、H s C E N P - E の高い発現又は活性に関連する疾患を治療する又は予防するのに有効な量で被験者に投与することによって治療できる。そのような疾患は、上記で述べたものを含みうるが、それらに限定されない。

【0333】

H s C E N P - E に特異的に結合する抗体は、アンタゴニストとして直接使用しうるか又は H s C E N P - E を発現する細胞又は組織に医薬物質を供給する標的又は送達機構として間接的に使用しうる。本発明の1つの好ましい実施形態は、治療上有効な量の H s C E N P - E 抗体を被験者に投与する段階を含む、疾患又は障害に関連する H s C E N P - E の治療のための方法を包含する。

40

【0334】

ここで定義するように、抗体の治療有効量(すなわち有効投与量)は、約 0.001 - 30 mg / kg 体重、好ましくは約 0.01 - 25 mg / kg 体重、より好ましくは約 0.1 - 20 mg / kg 体重、さらに一層好ましくは約 1 - 10 mg / kg 体重、2 - 9 mg / kg、3 - 8 mg / kg、4 - 7 mg / kg 又は 5 - 6 mg / kg 体重の範囲である。当業者は、疾患又は障害の重症度、過去の治療、被験者の全般的健康状態及び/又は年齢、及び他の疾患の存在を含むがこれらに限定されないいくつかの因子が、被験者を有効に治療するために必要な用量に影響を及ぼしうることを認識する。さらに、治療有効量の

50

抗体による被験者の治療は、単回治療を含みうるか、又は好ましくは、一連の治療を含みうる。好ましい一例では、被験者を約 0.1 - 20 mg / kg 体重の範囲内の抗体で、約 1 - 10 週間、好ましくは 2 - 8 週間、より好ましくは約 3 - 7 週間、さらに一層好ましくは約 4、5 又は 6 週間にわたって週に 1 回治療する。また、治療のために使用する抗体の有効用量は、個々の治療期間中に増加又は低減させうることも認識されよう。用量の変更は、ここで述べる診断アッセイの結果によって生じうる。

【0335】

上述したように、内因性ヒト CENP - E タンパク質をコードする遺伝子の発現は、発現遮断手法を用いて阻害することができる。

【0336】

その結果、インピボで適切な宿主細胞によって取り込まれるが、発現されず、その代わりにある種の遺伝子の発現を遮断するアンチセンス構築物 - DNA 又は RNA も、本発明の方法によって考慮される。

【0337】

既知のそのような手法は、内的に生成される又は別途に投与されるアンチセンス配列の使用を含む。例えば、O'Connor, J Neurochem (1991) 56: 560、Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression、CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988) 参照。あるいは、遺伝子と三重らせんを形成するポリヌクレオチドを供給することができる。例えば、Leeら、Nucleic Acids Res (1979) 6: 3073; Cooneyら、Science (1988) 241: 456; Dervanら、Science (1991) 251: 1360 参照。これらのオリゴマーはそのまま投与ことができ、又は関連オリゴマーをインピボで発現させることができる。

【0338】

先行技術には、短いアンチセンスオリゴヌクレオチドが、細胞膜によるそれらの取り込みが限られているために生じる低い細胞内濃度にもかかわらず、細胞内に輸送されて、ここで阻害因子と働くことを示す教示が豊富に存在する。(Zamecnikら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4143 - 4146 [1986])。該ポリヌクレオチドは、例えばそれらの負に荷電したホスホジエステル基を無電荷の基で置換することによって、取り込みを高めるように修飾することができる。

【0339】

上記に従って、本発明の1つの局面は、どちらの方法もDNA又はRNAへのポリヌクレオチドの結合に基づく、三重らせん形成あるいはアンチセンスDNA又はRNAを通して、遺伝子発現を制御するために使用しうる、アンチセンステクノロジーの使用によって作製したアンチセンス構築物の導入を導く。

【0340】

本発明のために、細胞のDNAに関して意図されている目的は、その複製及び転写に干渉することである。同様に、RNAに関しては、例えばタンパク質翻訳の部位へのRNAの転位、RNAからのタンパク質の翻訳、1又はそれ以上のmRNA種を生成するためのRNAのスプライシング、及びRNAが関与しうる又はRNAによって促進されうる触媒作用などの、すべての生命機能に干渉することが本発明の目的である。上記実施形態に関連して提示する作用の全体的効果は、宿主細胞における標的核酸の発現の調節である。この実施形態に関連して使用するとき、「標的核酸」は、その複製又は転写を阻害することが意図されているDNA又はRNAをカバーするものとする。それ自体で、上記で言及する実施形態に関する「調節」は、「標的核酸」の発現の低下又は完全な阻害を意味する。

【0341】

上記実施形態のための手法は、標的とするmRNAの転写に関与する遺伝子の領域に相補的であるようにオリゴヌクレオチドを構築することを詳述する。その後、本発明の方法に従って及びその取り込みとその後の発現を促進する条件下で、アンチセンスRNAポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドを疑わしい宿主細胞に導入し、それによって該ポリヌクレオチドはインビボで mRNA にハイブリダイズして、mRNA 分子のタンパク質への翻訳を阻止する（三重らせん - Lee ら、*Nucl. Acids Res.*, 6:3073 (1979); Cooney ら、*Science*, 241:456 (1988); 及び *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988) 参照）。

【0342】

それ自体で、本発明の実施形態は、上述したものを含むがそれらに限定されない、HsCENP-E の高い発現又は活性に関連する疾患を治療する又は予防するために、HsCENP-E をコードするポリヌクレオチドの相補物を発現するベクターを被験者に投与することを提案する。

10

【0343】

上記実施形態を実施するために、アンチセンス DNA 配列は、天然ヌクレオチド又は当技術分野で既知の非天然ヌクレオチドミミックを使用しうる。

【0344】

本発明のもう 1 つの実施形態では、HsCENP-E をコードするポリヌクレオチドの相補物は、mRNA の転写を遮断することが望ましい状況において使用しうる。特に、HsCENP-E をコードするポリヌクレオチドに相補的な配列で細胞を形質転換しうる。それ故、相補的分子又はフラグメントは、HsCENP-E 活性を調節するため又は遺伝子機能の調節を達成するために使用しうる。そのようなテクノロジーは現在当技術分野において周知であり、センス又はアンチセンスポリヌクレオチド又はより大きなフラグメントを、HsCENP-E をコードする配列のコード領域又は制御領域に沿った様々な位置から設計することができる。

20

【0345】

レトロウイルス、アデノウイルス、あるいはヘルペス又はワクシニアウイルスから、又は様々な細菌プラスミドから誘導される発現ベクターは、標的器官、組織又は細胞群へのヌクレオチド配列の送達のために使用しうる。当業者に周知の方法が、HsCENP-E をコードするポリヌクレオチドに相補的な核酸配列を発現するベクターを構築するために使用できる（例えば、Sambrook、前出；Ausubel, 1995, 前出参照）

30

【0346】

HsCENP-E をコードする遺伝子は、HsCENP-E をコードするポリヌクレオチド又はそのフラグメントの高レベルを発現する発現ベクターで細胞又は組織を形質転換することによって排除されうる。そのような構築物は、翻訳不能のセンス又はアンチセンス配列を細胞に導入するために使用しうる。DNA の組込みが存在しない場合でも、そのようなベクターは、内因性ヌクレアーゼによって無能化されるまで RNA 分子を転写し続けることができる。非複製ベクターによる一過性発現は 1 ヶ月又はそれ以上持続することができ、適切な複製エレメントがベクター系の一部である場合はさらに長く持続しうる。

【0347】

上述したように、遺伝子発現の修飾は、HsCENP-E をコードする遺伝子の制御、5' 又は調節領域に相補的な配列又はアンチセンス分子 (DNA、RNA 又は PNA) を設計することによって実施できる。転写開始部位から、例えば開始部位より -10 の位置から +10 の位置までの間から誘導されるポリヌクレオチドが好ましい。同様に、三重らせん塩基対合法を用いて阻害を達成することができる。三重らせん対合は、二重らせんがポリメラーゼ、転写因子又は調節分子の結合のために十分に開く能力の阻害を引き起こすので、有用である。三重鎖 DNA を使用した最近の治療上の進歩が文献に記述されている（例えば、Gee, J. E. ら (1994) Huber, B. E. と B. I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing, Mt. Kisco N. Y., p. 163 - 177 参照

40

50

）。相補的配列又はアンチセンス分子はまた、転写産物がリボソームに結合するのを妨げることによって mRNA の翻訳を遮断するように設計することもできる。

【0348】

酵素的 RNA 分子、リボザイムも、RNA の特異的開裂を触媒するために使用しうる。リボザイム作用の機序は、相補的な標的 RNA へのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションとそれに続くエンドヌクレアーゼによる切断を含む。例えば、構築したハンマーヘッドモチーフリボザイム分子は、H s C E N P - E をコードする配列のエンドヌクレアーゼによる切断を特異的且つ効率的に触媒しうる。

【0349】

最初に、次の配列：G U A、G U U 及び G U C を含む、リボザイム開裂部位に関して標的分子を走査することにより、潜在的 RNA 標的内の特異的リボザイム開裂部位を特定する。ひとたび特定されれば、開裂部位を含む標的遺伝子の領域に対応する、15 - 20 リボヌクレオチドの間の短い RNA 配列を、オリゴヌクレオチドを作動不能にしうる二次構造特徴に関して評価することができる。候補標的の適合性はまた、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補的ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの容易性（アクセシビリティ）を試験することによって評価しうる。

【0350】

本発明の相補的リボ核酸分子及びリボザイムは、核酸分子の合成のための当技術分野で既知の何らかの方法によって作製しうる。これらは、固相ホスホルアミダイト化学合成などの、ポリヌクレオチドを化学合成するための手法を包含する。あるいは、RNA 分子は、H s C E N P - E をコードする DNA 配列のインビトロ及びインビボ転写によって生成しうる。そのような DNA 配列を、T7 又は SP6 などの適切な RNA ポリメラーゼプロモーターと共に多様なベクターに組み込むことができる。あるいは、構成的又は誘導的に相補的 RNA を合成するこれらの cDNA 構築物を、細胞系統、細胞又は組織に導入することができる。

【0351】

RNA 分子は、細胞内での安定性及び半減期を高めるように修飾しうる。可能な修飾は、分子の 5' 及び / 又は 3' 末端における隣接配列の付加、あるいは分子の骨格内のホスホジエステラーゼ結合に代るチオリン酸塩又は 2' O - メチルの使用を含むが、これらに限定されない。この概念は PNA の生産に固有であり、イノシン、クエオシン及びワイプトシンなどの非伝統的塩基、ならびに内因性エンドヌクレアーゼによって容易に認識されないアセチル、メチル、チオ及び同様の修飾形態のアデニン、シチジン、グアニン、チミン及びウリジンの含有によってこれらの分子すべてに拡大することができる。

【0352】

ベクターを細胞又は組織に導入するための多くの方法が使用可能であり、インビボ、インビトロ及び半ビボでの使用に等しく適する。半ビボ治療のためには、患者から採取した幹細胞にベクターを導入し、同じ患者への自家移植のためにクローン増殖させることができる。トランスフェクション、リボソーム注入又はポリカチオン型アミノポリマーによる送達は、当技術分野において周知の方法を用いて達成しうる（例えば Goldman, C. K. ら (1997) Nature Biotechnology 15: 462 - 466 参照）。

【0353】

上述した治療法のいずれもが、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サルなどの哺乳類、最も好ましくはヒトを含む、そのような治療を必要とする被験者に適用しうる。

【0354】

あるいは、標的細胞を、二本鎖 RNA 分子 (dsRNA) を発現するように構築し、宿主細胞における内因性 RNA へのその作用を従来手段によって評価することができる。dsRNA を導入するための手法は当業者に既知である。Fire A. (1999) Trends Genet. 15: 358 - 363; Sharp P. A. (1999) Genes Dev 13: 139 - 141; 及び Hunter C. (1999) Curr 50

. Biol. 9: R440 - R442 参照。そこで、上述した dsRNA アプローチ (例えば RNAi) は、クローン化遺伝子を不活性化することならびに遺伝子発現プロファイルを確立すること等において有用であることが証明されよう。Fire ら (1998) Nature 391: 80681 (1); 及び Montgomery ら (1998) PNAS 95: 15502 - 15507 参照。代替的实施形態では、本発明の方法は、薬剤についての受容体をコードする mRNA にアンチセンスである DNA フラグメントを導入するために使用しうる。アンチセンス異種 DNA は、薬剤受容体タンパク質の発現を有効に低下させ、それによってアンチセンス DNA を含む細胞への薬剤結合の低下を生じさせ、潜在的標的をさらに特徴付けること等を可能にする。他の用途は当業者には明白である。

10

【0355】

本発明はまた、異種核酸が逆方向でベクター内にクローン化されているが、アンチセンス RNA の転写を可能にする調節配列に作動可能に連結されているベクターを包含する。そこで、アンチセンス転写産物は、コード及び非コード領域の両方を含む標的核酸の全部又は一部を生産することができる。

【0356】

さらにもう1つの実施形態では、本発明の方法において使用するための、配列番号2のタンパク質又はそのフラグメントをコードする異種又は外来核酸分子を、分子の安定性、ハイブリダイゼーション又は溶解度を改善するために塩基部分、糖部分又はリン酸骨格で修飾することができる。例えば、核酸分子のデオキシリボースリン酸骨格を、ペプチド核酸を生成するように修飾することができる (Hyrup B. ら (1996) Bioorganic & Medicinal Chemistry 4 (1): 5 - 23 参照)。

20

【0357】

ここで使用するとき、「ペプチド核酸」又は「PNA」の語は、デオキシリボースリン酸骨格が偽ペプチド骨格によって置換されており、4個の天然核酸塩基だけが保持されている核酸ミミック、例えば DNA ミミックを指す。PNA の中性骨格は、低イオン強度の条件下で DNA 及び RNA への特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNA オリゴマーの合成は、Hyrup B. ら (1996) 前出; Perry - O'Keefe ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 14670 - 675 に述べられているような標準固相ペプチド合成プロトコルを用いて実施できる。

30

【0358】

従って、標的核酸分子の PNA は治療及び診断適用において使用することができる。例えば、PNA は、例えば転写又は翻訳の停止を誘導すること又は複製を阻害することによる遺伝子発現の配列特異的修飾のためのアンチセンス物質として使用できる。

【0359】

V. 医薬製剤及び投与方法

本発明の新規 HsCENP - E をコードする核酸分子、そのアンチセンス配列、配列番号2のポリペプチド又は少なくとも1つの HsCENP - E 活性を有するそのフラグメント、ここで開示するタンパク質に対する抗体、及び HsCENP - E のミメティック、アゴニスト、アンタゴニスト又は阻害因子を含有する製薬上有用な組成物は、医薬適合性の担体の混合などによる既知の方法に従って製剤しうる。そのような担体及び製剤方法の例は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.) に見出しうる。有効な投与に適した医薬適合性の組成物を形成するために、そのような組成物は、ここで述べるタンパク質、DNA、RNA 又は調節因子の有効量を含有する。

40

【0360】

治療有効用量は、ヒト CENP - E 仲介性疾患を治療する又は診断するのに十分な量で個体に投与される本発明の組成物を指す。有効量は、個体の状態、体重、性別及び年齢などの様々な因子に従って変化しうる。他の因子は、投与方法を包含する。有効であるが非

50

毒性の量の所望化合物をヒトCENP-E調節剤として使用することができる。

【0361】

ここで開示する方法に従って特定される化合物は、潜在的毒性を最小限に抑えながら、CENP-Eポリペプチド又はその活性の最適調節を得るために常用試験によって定義される適切な用量で単独使用しうる。さらに、他の薬剤の同時投与又は連続投与が望ましい場合もありうる。

【0362】

そのような化合物の毒性と治療効果は、例えばLD₅₀（個体群の50%に対する致死用量）及びED₅₀（個体群の50%における治療有効用量）を決定するための、細胞培養又は実験動物における標準製薬手順によって判定することができる。毒性作用と治療効果の間の用量比が治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀比で表わすことができる。大きい治療指数を示す化合物が好ましい。これらの細胞培養アッセイ及び動物試験から得たデータは、ヒトにおける使用のための用量範囲を規定するのに使用することができる。そのような化合物の用量は、好ましくはほとんど又は全く毒性を伴わないED₅₀を含む循環濃度の範囲内である。用量は、使用する投与形態及び使用する投与経路に依存してこの範囲内で変化させうる。

【0363】

正確な製剤、投与経路及び用量は、患者の状態に鑑みて個々の医師によって選定されうる。例えば、Fingler, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1975, 第1章、p.1参照。主治医は、どのようにして及びいつ、毒性又は臓器不全のために投与を終了する、中断する又は調節するかを認識することに留意すべきである。逆に、主治医はまた、臨床応答が十分でない場合、より高い（毒性をあらかじめ排除する）レベルに治療を調整することを認識する。対象とする疾患の管理における投与用量の程度は、治療する状態の重症度及び投与経路によって変化する。状態の重症度は、例えば、一部には、標準予後評価方法によって評価しうる。さらに、用量及びおそらくは投与頻度も、個々の患者の年齢、体重及び応答に従って変化する。獣医学においても、上記で論じたものに匹敵するプログラムが使用できる。用量は、望ましくない交差反応、アナフィラキシー反応等のような有害副作用を引き起こさない大きさにすべきである。

【0364】

一般に、用量は、患者の年齢、状態、性別及び疾患の程度、もし存在する場合は禁忌、及び個々の医師によって調整されるべき他のそのような変数によって異なる。用量は、本発明のアゴニスト又はアンタゴニスト0.001mg/kg - 50mg/kg、好ましくは0.1mg/kg - 1.0mg/kgの1日1回又はそれ以上の投与を1日又は数日間に変化しうる。

【0365】

経口投与については、該組成物は、好ましくは、治療する患者への用量を対症的に調節するために0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0及び50.0ミリグラムの有効成分を含有する割線入り又は割線なし錠剤の形態で提供される。薬剤の有効量は、通常、約0.0001mg/kg - 約100mg/kg体重/日の用量レベルで供給される。その範囲は、より特定すると、約0.0001mg/kg - 10mg/kg体重/日である。さらに一層特定すると、その範囲は約0.05mg/kg - 約1mg/kgである。言うまでもなく、用量レベルは個々の化合物の効力に依存して変化する。ある種の化合物は他の化合物よりも強力である。さらに、用量レベルは化合物のバイオアベイラビリティに依存して変化する。化合物のバイオアベイラビリティがより高く、より強力であるほど、経口送達を含むがこれに限定されない送達経路を通して投与する必要のある化合物の量はより少なくなる。所望効果を達成するために組み合わせるときには、HsCENP-Eの用量を調節する。他方で、これらの様々な薬剤の用量を独立して最適化し、いずれかの薬剤を単独で使用した場合よりも疾病をさらに軽減させる相乗作用を達成するように組み合わせてもよい。当業者は、ヌクレオ

10

20

30

40

50

チドに関してはタンパク質又はそれらの阻害因子とは異なる製剤を使用する。同様に、ポリヌクレオチド又はポリペプチドの送達は個々の細胞及び状態に特異的である。

【0366】

例えば、細胞培養で決定した IC_{50} （すなわち、ポリペプチド複合体の半最大破壊又は複合体成分の細胞レベル及び/又は活性の半最大阻害を達成する被験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するための用量を動物モデルにおいて規定することができる。そのような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えばHPLCによって測定しうる。

【0367】

医薬組成物は、皮下、局所、経口及び筋肉内などの様々な経路によって個体に提供されうる。医薬組成物の投与は経口的又は非経口的に実施される。非経口的送達の方法は、局所、動脈内（組織に直接的に）、筋肉内、皮下、髄内、髄腔内、心室内、静脈内、腹腔内又は鼻内投与を含む。本発明はまた、本発明の新規治療方法における使用のための適切な局所、経口、全身及び非経口的医薬製剤を提供するという目的を有する。HSCENPEの調節における使用のために本発明に従って特定される化合物を有効成分として含有する組成物は、投与のための従来のピヒクル中の様々な治療投与形態として投与することができる。例えば、該化合物は、錠剤、カプセル（各々時限放出型及び持続放出型製剤を含む）、丸剤、散剤、可粒剤、エリキシル、チンキ剤、溶液、懸濁液、シロップ及び乳剤などの経口投与形態として又は注射によって投与することができる。同様に、それらはまた、すべて製薬技術分野における当業者に周知の形態を使用する、静脈内（ボラス及び持続注入の両方）、腹腔内、皮下、閉鎖を伴う又は伴わない局所、又は筋肉内形態でも投与しうる。

【0368】

注射のためには、本発明の作用物質を水溶液中で、好ましくはハンクス溶液、リンガー溶液又は生理食塩水などの生理適合性緩衝液中で製剤しうる。そのような経粘膜的投与に関しては、透過すべき障壁に適した浸透剤を製剤中で使用する。そのような浸透剤は当技術分野で一般的に知られている。

【0369】

本発明の実施のためにここで開示する化合物を全身投与に適した剤型に製剤するための、医薬適合性の担体の使用は、本発明の範囲内である。適切な担体の選択と適切な製造の実施により、本発明の組成物、特に溶液として製剤した組成物は、静脈内注射などによって非経口的に投与しうる。該化合物は、当技術分野で周知の医薬適合性の担体を使用して、経口投与に適した剤型に容易に製剤することができる。そのような担体は、治療する患者による経口摂取のために、本発明の化合物を錠剤、丸剤、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液等として製剤することを可能にする。

【0370】

細胞内に投与することを意図される薬剤は、当業者に周知の手法を用いて投与しうる。例えば、そのような薬剤をリポソーム内に被包し、その後上述したように投与しうる。リポソームは、水性の内部を有する球状脂質二重層である。リポソーム形成時点で水溶液中の存在するすべての分子が水性内部に組み込まれる。リポソームの内容物は、外部微小環境から保護され、またリポソームは細胞膜と融合するので、細胞質内に効率的に送達される。加えて、それらの疎水性の故に、低有機分子を細胞内に直接投与しうる。

【0371】

有効成分に加えて、これらの医薬組成物は、活性化合物を医薬的に使用できる製剤へと加工することを容易にする賦形剤及び補助剤を含む適切な医薬適合性の担体を含有しうる。経口投与用に製造される製剤は、錠剤、カプセル又は溶液の形態でありうる。本発明の医薬組成物は、それ自体既知である方法で、例えば従来の混合、溶解、造粒、浮揚化（levitating）、乳化、被包、捕捉（entrapping）又は凍結乾燥工程によって製造しうる。

【0372】

10

20

30

40

50

非経口投与用の医薬製剤は、水溶性形態の活性化合物の水溶液を含む。加えて、活性化合物の懸濁液は、適切な油性注射用懸濁液として製造しうる。適切な親油性溶媒又はビヒクルは、ゴマ油などの脂肪油、又はオレイン酸エチル又はトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、又はリポソームを包含する。水性注射用懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール又はデキストランなどの、懸濁液の粘度を上昇させる物質を含有しうる。場合により、懸濁液はまた、高度濃縮溶液の製造を可能にするために化合物の溶解度を上昇させる適切な安定剤又は作用物質を含有しうる。

【0373】

経口投与用の医薬製剤は、活性化合物を固体賦形剤と組み合わせること、場合により生じた混合物を摩砕すること、及び所望に応じて適切な補助剤を添加した後、顆粒の混合物を加工して錠剤又は糖衣丸のコアを得ることによって入手できる。適切な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトール又はソルビトールを含む糖類；例えばトウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム及び/又はポリビニルピロリドン（PVP）などのセルロース製剤のような充填剤である。所望する場合は、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、あるいはアルギン酸又はアルギン酸ナトリウムなどのその塩のような崩壊剤を添加しうる。

【0374】

下記の実施例は本発明を例示するために提供するものであり、本発明を限定することを意図しない。

【実施例】

【0375】

I. cDNAライブラリーの構築及び/又はcDNAクローンの単離

MRC-5ヒト二倍体肺線維芽細胞ポリA RNAを市販のソース（Ambion）から入手し、HsCENP-EモータードメインcDNAフラグメントのRT-PCRを介した単離のために使用した。HsCENP-Eモータードメインのアミノ酸1-465に対応する長いモータードメインフラグメントの増幅のために、次のRT-PCRプライマーを使用した：

5'増幅プライマー：5'GCCCATGGCGGAGGAAGGAGCCGT3'。

【0376】

HsCENP-Eヌクレオチド配列に加えて、このプライマーは、発現ベクターへのサブクロニングを容易にするためにGC-クランプ及びそれに続くATG開始コドン付近で入れ子にしたNcoI制限部位を含む。

【0377】

3'増幅プライマー：

5'GCGGTACCGACAGATTTCATCAATTTCTCG3'。

【0378】

HsCENP-Eヌクレオチド配列に加えて、このプライマーは、発現ベクターへのサブクロニングを容易にするためにGC-クランプとKpnI制限部位を含む。

【0379】

Titan One Tube RT-PCR System（Roche）を製造者の指示に従って使用して、cDNAを逆転写し、増幅した。簡単に述べると、MRC-5ポリA RNA 200ngに関して50 で30分間逆転写酵素反応を実施した。この反応の前に、RNA鋳型とプライマーを水中で1分間95 に加熱し、次に氷上で直ちに冷却してRNA鋳型の5'末端の二次構造を変性した。

【0380】

cDNAへの逆転写後、GeneAmp PCR System 9700熱サイクラー（PE Applied Biosystems）において試料をPCR増幅に供した。試料を最初に94 で2分間変性し、次に94 、15秒間、52 、30秒間及び68 、2分間の温度サイクルの30ラウンドに供した。最後に68 で5分間の伸長を実

10

20

30

40

50

施した後、保存のために試料を4℃に冷却した。

【0381】

HsCENP-E cDNAフラグメントのPCR増幅後、試料を過剰のプライマーとヌクレオチドから精製し、NcoI及びKpnI制限酵素で消化した。モータードメインフラグメントをInvitrogenからのpTrcHis2Cベクターにサブクローニングした。

【0382】

対応するプラスミドをpTrcHis2C/HsCENP-E465と称した。

【0383】

アミノ酸1-340に対応するHsCENP-Eのより小さなモータードメインフラグメントの機能分析のために、Expand High Fidelity PCR System (Roche)を製造者の指示に従って使用して、プラスミドDNA (pTrcHis2C/HsCENP-E465)からのHsCENP-Eモータードメインの1020塩基対フラグメントを増幅した。 10

【0384】

次の増幅プライマーを使用した：

5'増幅プライマー：

5'GCCCATGGCGGAGGAAGGAGCCGT3'。

このプライマーは上述した5'増幅プライマーと同じである。

3'増幅プライマー：

5'GCGTCGACAGTTGATACCTCATTAAAC3'。 20

【0385】

HsCENP-Eヌクレオチド配列に加えて、このプライマーは、発現ベクターへのサブクローニングを容易にするためにGC-クランプとSalI制限部位を含む。簡単に述べると次の増幅条件を使用した：プラスミド鋳型DNA5gを、94℃で2分間のPCR反応の初期変性及びそれに続く94℃、15秒間、55℃、30秒間及び72℃、1分間の温度サイクルの25ラウンドによって増幅した。最後に72℃で5分間の伸長を実施した後、保存のために試料を4℃に冷却した。PCR増幅は、GeneAmp PCR System 9700熱サイクラー (PE Applied Biosystems)で実施した。 30

【0386】

PCR後、増幅した物質を過剰のプライマーとヌクレオチドから精製し、NcoI及びSalI制限酵素による消化に供した。アミノ酸1-340に対応するHsCENP-Eモータードメインフラグメントを、NovagenからのpET23D細菌発現ベクターにサブクローニングした。

【0387】

生じたプラスミドをpET23D/HsCENP-E340と称した。fpET23Dベクター内に存在するヒスチジンリンカーへのHsCENP-E cDNAのインフレームでの挿入は、発現されたタンパク質のC末端に6ヒスチジン残基(6X His Tag)のシリーズを創造する。この6X His Tagは、発現タンパク質の精製と免疫学的検出のために有用である。 40

【0388】

PCRを介した配列の誤りが存在しないことを確認するために、個々の細菌形質転換体からのプラスミドDNAを配列分析に供した。

【0389】

II. 塩基配列決定及び分析

上記プラスミドDNAを配列分析に供した。クローン化HsCENP-Eモータードメインのコード鎖と非コード鎖の両方を配列確認した。HsCENP-Eの公表ヌクレオチド配列 (Genbank登録Z15005)又はHsCENP-Eの翻訳アミノ酸配列 (NCBI Entrez Protein [www.ncbi.nlm.nih.gov 50

/entrez/query.fcgi?db=Protein]登録:CAA78727、S28261、NP001804、Q02224、1819485A)に対する整列を、GCGアラインメントパッケージを使用して実施した。各々の場合に、ここで述べるHsCENP-Eモータードメインフラグメントのヌクレオチド及びアミノ酸配列は、上記に列挙した登録に述べられているようにアミノ酸300位にプロリン残基ではなくアラニン残基が存在することと一致した。

【0390】

III. 単離cDNAクローンの部位指定突然変異誘発

アミノ酸300位のHsCENP-Eにおけるアラニン残基の機能的重要性をその位置のプロリン残基と比較して検討するために、pET23D/HsCENP-E340発現プラスミドに関して、ヌクレオチドコード配列をHsCENP-Eモータードメインのアミノ酸300位のプロリンを規定する配列に変更する部位指定突然変異誘発を実施した。

【0391】

StratageneからのQuickChange Site-Directed Mutagenesis Kitを製造者の指示に従って使用した。簡単に述べると、pET23D/HsCENP-E340プラスミドDNA 5ngのPCR増幅を、所望ヌクレオチド変化を含み、該プラスミドの反対側の鎖上の同じ配列にアニーリングした2個の突然変異誘発性ヌクレオチドプライマー各々125ngの存在下で実施した。次の突然変異誘発性オリゴヌクレオチドを使用した:

Mut35A: 5' CCTTGGGAGGA AATCCAAAGACACGTATTA
TCTGC3'

Mut35B: 5' GCAGATAATAACGTGTCTTTGGATTTCTCC
CAAGG3'。

【0392】

該プラスミドDNAを、GeneAmp PCR System 9700熱サイクラー(PE Applied Biosystems)において、最初に95で30秒間変性し、次に95、30秒間、55、1分間及び68、9分間の温度サイクルの12ラウンドに供した。

【0393】

反応物を4に冷却した後、DpnI制限酵素10単位を各々のPCR反応物50μlに加えて、混合し、37で1時間インキュベートして親(非突然変異)超らせん二本鎖DNAを消化した。DpnI処理したDNA1μlを、製造者の指示に従ってXL-1 Blue Supercompetent細胞に形質転換した。細胞をLB-アンピシリン寒天平板に塗布し、37で16時間以上インキュベートした。

【0394】

個々の細菌形質転換体コロニーを37で液体選択培地において増殖させ、PromegaからのWizard Plus SV Miniprep DNA Purification Systemを用いてプラスミドミニプレップDNAを単離した。その後試料を配列分析に供して、所望ヌクレオチド変化の存在を確認した。

【0395】

所望突然変異だけがpET23D/HsCENP-E340発現ベクターに組み込まれたこと及び他のPCR誘発の誤りが存在しないことを確実にするために、正しいヌクレオチド変化を含む配列確認した発現ベクターをHpaI及びSalI制限酵素で消化し、対象突然変異を担う158塩基対フラグメントを単離した。このフラグメントを、事前のPCR増幅に供していないpET23D/HsCENP-E340プラスミドに再導入した。生じたプラスミド発現ベクター、pET23D/HsCENP-E340A300Pを、下記の第VII章、「HsCENP-Eの発現」の中で述べる誘導条件「A」の下でタンパク質発現のためにBL21(DE3)pLysS細胞に形質転換した。

【0396】

IV. ノーザンプロット分析

ノーザンブロット分析は、遺伝子の転写産物の存在を検出するために使用される実験室手法であり、特定細胞型又は組織からのRNAが結合している膜への標識ヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを含む（例えば、Sambrook、前出、第7章；Ausubel, 1995、前出、第4及び16章参照）。

【0397】

V. 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識と使用

配列番号1から誘導されるハイブリダイゼーションプローブを、cDNA、ゲノムDNA又はmRNAをスクリーニングするために使用する。約20塩基対から成るポリヌクレオチドの標識を詳細に述べるが、より大きなヌクレオチドフラグメントに関しても基本的に同じ手順を使用する。OLIGO4.06ソフトウェア(National Biosciences)などの技術水準のソフトウェアを使用してポリヌクレオチドを設計し、適切な量のオリゴマー、例えば各々のオリゴマー50 pmol、³²P-アデノシン三リン酸250 µCi (Amersham Pharmacia Biotech)及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ(DuPont NEN, Boston Mass.)を混合することによって標識した。SEPHADEX G-25超微細サイズ排除デキストランビーズカラム(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて標識ポリヌクレオチドを実質的に精製する。10⁷ 計数/分の標識プローブを含むアリコート、次のエンドヌクレアーゼ: AseI、BglII、EcoRI、PstI、XbaI又はPcuII (DuPont NEN)の1つで消化したヒトゲノムDNAの典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション分析において使用する。

【0398】

各々の消化産物からのDNAを0.7%アガロースゲル上で分画し、ナイロン膜(Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham N. H.)に移す。ハイブリダイゼーションを40°Cで16時間実施する。非特異的シグナルを除去するために、ブロットを、0.1xクエン酸ナトリウム及び0.5%ドデシル硫酸ナトリウムまでの漸増するストリンジェント条件下に室温で連続的に洗浄する。XOMAT-ARフィルム(Eastman Kodak, Rochester N. Y.)をブロットに露光して数時間撮影し、ハイブリダイゼーションパターンを視覚的に比較する。

【0399】

VI. マイクロアレイ

一般に、化学的カップリング手順及びインクジェット装置を用いて、基質の表面上にアレイエレメントを合成することができる（例えばBaldeschweiler、前出参照）。ドット又はスロットブロットに類似のアレイも、熱、紫外線、化学物質又は機械的結合手法を用いて基質の表面にエレメントを配置し、結合させるために使用しうる。典型的なアレイは、手によって又は使用可能な方法と機器を用いて作製することができ、適切な数のエレメントを含みうる。ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイズしていないプローブを除去し、スキャナーを使用して蛍光のレベルとパターンを測定する。マイクロアレイ上のエレメントにハイブリダイズする各々のプローブの相補性の程度と相対的存在率を、走査した画像の分析を通して評価しうる。

【0400】

完全長cDNA、発現配列タグ(EST)又はそのフラグメントは、マイクロアレイのエレメントを含みうる。ハイブリダイゼーションに適するフラグメントは、LASERGENEソフトウェア(DNA STAR)などの当技術分野で周知のソフトウェアを用いて選択することができる。本発明のヌクレオチド配列の1つに対応する、あるいは本発明に関連するcDNAライブラリーからランダムに選択した完全長cDNA、EST又はそのフラグメントを、適切な基質、例えばスライドガラス上に整列する。例えば紫外線架橋とそれに続く熱及び化学的処理及びその後の乾燥を用いてcDNAをスライドガラスに固定する（例えばSchena, M.ら(1995) Science 270: 467-470; Shalton, D.ら(1996) Genome Res. 6: 639-645参照）。蛍光プローブを作製し、基質上のエレメントへのハイブリダイゼーションのために使

10

20

30

40

50

用する。該基質を上述した手順によって分析する。

【0401】

V I I . 相補的ポリヌクレオチド

H s C E N P - Eコード配列に相補的な配列又はその部分は、天然に生じるH s C E N P - Eの発現を検出する、低下させる又は阻害するために使用される。約15 - 30塩基対を含むポリヌクレオチドの使用を述べるが、より小さい又はより大きい配列フラグメントに関しても基本的に同じ手順を使用する。O L I G O 4 . 0 6ソフトウェア(N a t i o n a l B i o s c i e n c e s)とH s C E N P - Eのコード配列を使用して適切なポリヌクレオチドを設計する。転写を阻害するために、最もユニークな5'配列から相補的オリゴヌクレオチドを設計し、コード配列へのプロモーター結合を妨げるために使用する。翻訳を阻害するためには、H s C E N P - Eコード転写産物へのリボソーム結合を妨げるように相補的オリゴヌクレオチドを設計する。

10

【0402】

V I I I . H s C E N P - Eの発現

細菌における340アミノ酸のH s C E N P - Eモータードメインの発現のための最適条件を調べるために、p E T 2 3 D / H s C E N P - E 3 4 0構築物に関するパイロット発現試験を実施した。簡単に述べると、p E T 2 3 D / H s C E N P - E 3 4 0発現構築物を、条件「A」、「B」及び「C」としてここで述べる3つの異なる誘導条件下で、N o v a g e nからのB L 2 1 (D E 3)及びB L 2 1 (D E 3) p L y s S細菌株において試験した。

20

【0403】

誘導条件Aに関しては、該発現プラスミドを担う細菌形質転換体を、持続的に振とうしながら37で液体選択培地においてO . D . 6 0 0が0 . 4になるまで増殖させた。ひとたび適切な光学密度が達成されれば、細胞培養物にI P T Gを添加して最終濃度100 μ Mとし、持続的に振とうしながら25で18 - 20時間、H s C E N P - E 3 4 0発現の誘導を進行させた。

【0404】

誘導条件Bについては、p E T 2 3 D / H s C E N P - E 3 4 0発現プラスミドを担う細菌形質転換体を、持続的に振とうしながら37で液体選択培地においてO . D . 6 0 0が0 . 6 - 1 . 0になるまで増殖させた。その後培養物にI P T Gを添加して最終濃度0 . 5 m Mとし、持続的に振とうしながら25で4時間、H s C E N P - E 3 4 0タンパク質発現の誘導を進行させた。

30

【0405】

誘導条件Cについては、p E T 2 3 D / H s C E N P - E 3 4 0発現プラスミドを担う細菌形質転換体を、持続的に振とうしながら37で液体選択培地においてO . D . 6 0 0が0 . 6になるまで増殖させた。その後培養物にI P T Gを添加して最終濃度0 . 4 m Mとし、37で3時間、H s C E N P - E 3 4 0タンパク質発現を誘導した。

【0406】

I P T Gの添加前と添加後の細菌試料を各々の誘導条件から採集し、免疫検出のための6 X H i s T a g抗体(S i g m aからのペルオキシダーゼ複合モノクローナル抗ポリヒスチジン抗体、C l o n e H I S - 1)を使用したウエスタン分析法によってH s C E N P - E 3 4 0タンパク質の発現を評価した。簡単に述べると、細菌細胞ペレットを、P i e r c eからのB - P E R B a c t e r i a l P r o t e i n E x t r a c t i o n R e a g e n tで抽出した。不溶性物質を遠心分離によってペレット化し、可溶性物質を新しい試験管に移した。不溶性物質をR I P A緩衝液(新鮮添加したプロテアーゼ阻害因子錠剤[C o m p l e t e M i n i , R o c h eからのE D T A不含プロテアーゼ阻害因子カクテル錠剤]を含むP B S中、1% N P 4 0、0 . 5%デオキシコール酸ナトリウム、0 . 1% S D S)でさらに抽出し、分析のために使用した。

40

【0407】

可溶性及び不溶性物質の抽出物から総タンパク質濃度を、B i o - R a d D c P r

50

rotein Assay Reagents (Bio-Rad Laboratories) を製造者の指示に従って使用することによって測定した。各々の試料からの等量のタンパク質をウエスタン法によって分析し、可溶性の生物活性 HsCENP-E340 タンパク質の高レベルを発現するためにどの誘導条件が最良であるかを判定した。誘導条件 A の下で細菌株 BL21 (DE3) pLysS の使用が、可溶性の生物活性 HsCENP-E340 タンパク質を大量に発現するための最良且つ最も好都合な手段を提供すると判定された。

【0408】

タンパク質発現及び精製のための方法は、Ausubel (1995、前出、第10及び16章) に述べられている。これらの方法によって得た精製 HsCENP-E は、下記の活性測定法において直接使用することができる。

10

【0409】

IX. HsCENP-E 活性の実証

HsCENP-E 活性に関する微小管運動性アッセイは、モータードメインの機能を測定する。このアッセイでは、組換え HsCENP-E をスライドガラス又は同様の基質上に固定化する。ATP 及び細胞質ゾル抽出物を含む溶液中のタキソール安定化ウシ脳微小管 (市販されている) をスライド上に流す。HsCENP-E モーター活性によって駆動される微小管の運動を、ビデオ強化型光学顕微鏡と画像分析手法を用いて視覚化し、数量化することができる。HsCENP-E 活性は微小管運動の頻度と速度に直接比例する。

20

【0410】

X. 機能的アッセイ

哺乳類細胞培養系において HsCENP-E をコードする配列を生理的に高いレベルで発現することによって HsCENP-E 機能を評価する。cDNA を、高レベルの cDNA 発現を駆動する強力なプロモーターを含む哺乳類発現ベクターにサブクローニングする。選択ベクターは、いずれもサイトメガロウイルスプロモーターを含む、pCMVSPORT (Life Technologies) 及び pCR3.1 (Invitrogen, Carlsbad Calif.) を包含する。組換えベクター 5-10 µg を、リポソーム製剤又は電気穿孔法を用いてヒト細胞系統、好ましくは内皮又は造血系由来のヒト細胞系統に一過性にトランスフェクトする。マーカータンパク質をコードする配列を含む付加的なプラスミド 1-2 µg をコトランスフェクトする。マーカータンパク質の発現は、トランスフェクト細胞を非トランスフェクト細胞から区別する手段を提供し、組換えベクターからの cDNA 発現の信頼しうる予測因子である。使用のマーカータンパク質は、市販のマーカー、例えばグリーン蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、CD64 又は CD64-GFP 融合タンパク質のいずれかを包含する。レーザー光学に基づく自動化手法であるフローサイトメトリー (FCM) が、GFP 又は CD64-GFP を発現するトランスフェクト細胞を特定するため、及び細胞特性、例えばそれらのアポトーシス状態を評価するために使用される。FCM は、細胞死に先立つ又は細胞死と同時に起こる事象を診断する、蛍光分子の取り込みを検出し、定量する。これらの事象は、ヨウ化プロピジウムによる DNA の染色によって測定される核内 DNA 含量の変化；前方光散乱と 90° 側方光散乱によって測定される細胞の大きさや粒状度の変化；プロモデオキシウリジンの取り込みの低下によって測定される DNA 合成の下方調節；特異的抗体との反応性によって測定される細胞表面及び細胞内タンパク質の発現の変化；及び細胞表面へのフルオレセイン複合アネキシン V タンパク質の結合によって測定される形質膜組成物の変化を包含する。フローサイトメトリーにおける方法は、Ormerod, M.G. (1994) Flow Cytometry, Oxford, New York N.Y. の中で論じられている。

30

40

【0411】

遺伝子発現への HsCENP-E の影響は、HsCENP-E をコードする配列でトランスフェクトした細胞の高度精製個体群及び CD64 又は CD64-GFP のいずれかをを用いて評価することができる。CD64 及び CD64-GFP は、トランスフェクトした

50

細胞の表面で発現され、ヒト免疫グロブリン G (I g G) の保存された領域に結合する。トランスフェクト細胞は、ヒト I g G 又は C D 6 4 に対する抗体 (D Y N A L , L a k e S u c c e s s N . Y .) のいずれかで被覆した磁気ビーズを用いて非トランスフェクト細胞から効率的に分離される。m R N A は、当業者に周知の方法を用いて細胞から精製することができる。H s C E N P - E 及び他の対象遺伝子をコードする m R N A の発現は、ノーザンブロット分析又はマイクロアレイ手法によって分析することができる。

【 0 4 1 2 】

X I . H s C E N P - E 特異的抗体の作製

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (P A G E ; 例えば H a r r i n g t o n , M . G . (1 9 9 0) M e t h o d s E n z y m o l . 1 8 2 : 4 8 8 - 4 9 5) 又は他の精製手法を用いて実質的に精製した H s C E N P - E を使用してウサギを免疫し、標準プロトコールを用いて抗体を作製する。

10

【 0 4 1 3 】

あるいは、L A S E R G E N E ソフトウェア (D N A S T A R) を用いて H s C E N P - E アミノ酸配列を分析して、高い免疫原性の領域を決定し、対応するオリゴペプチドを合成して、当業者に既知の手段によって抗体を惹起するために使用する。C 末端の近く又は親水性領域内にあるものなどの、適切なエピトープの選択のための方法は当技術分野において広く記述されている (例えば A u s u b e l , 1 9 9 5 , 前出、第 1 1 章参照) 。

【 0 4 1 4 】

典型的には、15 残基の長さのオリゴペプチドを、A B I 4 3 1 A ペプチドシンセサイザー (P e r k i n - E l m e r) において f m o c 化学を用いて合成し、N - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシニミドエステル (M B S) との反応によって K L H (S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s M o .) に結合して、免疫原性を上昇させる (例えば A u s u b e l , 1 9 9 5 , 前出参照) 。完全フロイントアジュバント中のオリゴペプチド - K L H 複合体でウサギを免疫する。生じた抗血清を、例えば該ペプチドをプラスチックに結合し、1% B S A で遮断して、ウサギ抗血清と反応させ、洗浄して、放射性ヨウ素化ヤギ抗ウサギ I g G と反応させることによって、抗ペプチド活性に関して試験する。

20

【 0 4 1 5 】

X I I . 特異的抗体を用いた天然に生じる H s C E N P - E の精製

天然に生じる又は組換え H s C E N P - E を、H s C E N P - E に特異的な抗体を使用した免疫アフィニティークロマトグラフィーによって実質的に精製する。C N B r - 活性化 S E P H A R O S E (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) などの活性化クロマトグラフィー樹脂に抗 H s C E N P - E 抗体を共有結合することによって免疫アフィニティを構築する。結合後、樹脂を遮断し、製造者の指示に従って洗浄する。

30

【 0 4 1 6 】

H s C E N P - E を含む媒質を免疫アフィニティークラムに通し、H s C E N P - E の選択的吸着を可能にする条件下で (例えば界面活性剤の存在下での高イオン強度緩衝液) カラムを洗浄する。抗体 / H s C E N P - E 結合を分断する条件下で (例えば p H 2 - p H 3 の緩衝液、あるいは尿素又はチオシアン酸イオンなどの高濃度のカオトロップ) カラムを溶出し、H s C E N P - E を収集する。

40

【 0 4 1 7 】

X I I I . H s C E N P - E と相互作用する物質の特定

H s C E N P - E 又はその生物活性フラグメントを ^{1 2 5} I ボルトン - ハンター試薬 (例えば、B o l t o n ら (1 9 7 3) B i o c h e m . J . 1 3 3 : 5 2 9 参照) で標識する。あらかじめマルチウエル平板のウエルに整列しておいた候補分子を標識 H s C E N P - E と共にインキュベートし、洗浄して、標識 H s C E N P - E 複合体を含むウエルを検定する。種々の濃度の H s C E N P - E を使用して得たデータを用いて、候補分子と H s C E N P - E の数、親和性及び結合に関する数値を算定する。

50

【0418】

本発明の範囲及び精神から逸脱することなく、上述した本発明の方法及びシステムの様々な変更及び変法が当業者には明白である。本発明を特定の好ましい実施形態に関して説明したが、特許請求される本発明がそのような特定実施形態に不当に限定されないことは了解されるべきである。実際に、分子生物学又は関連分野における当業者には明白な、本発明を実施するための上述した様式の様々な修正は、特許請求の範囲内であることが意図されている。

【0419】

(配列の要約)

配列番号1は、CENP-E465と称する、ヒトCENP-Eタンパク質の新規モータードメインをコードする1395塩基対のヌクレオチド配列を開示する。該配列の残りの部分(bp1396-1488)は、pTrcHis2C発現ベクターに由来するポリリンカーである。

10

【0420】

配列番号2は、配列番号1に示すヌクレオチド配列によってコードされるモータータンパク質のアミノ酸配列：1-465アミノ酸である。アミノ酸466-496はCENP-Eモータードメインに由来せず、pTrcHis2C発現ベクターによって提供されるリンカー領域プラスmycエピトープ及び6X His Tagであることに留意されたい。

【0421】

配列番号3は、CENP-E340とも称される、340アミノ酸のヒトCENP-Eタンパク質の新規モータードメインをコードする1020塩基対のヌクレオチド配列に相当する。該配列の残りの部分(bp1021-1065)は、pET23D発現ベクターに由来するポリリンカーである。この発現ベクターのさらなる詳細については実施例参照。

20

【0422】

配列番号4は、配列番号3に示すヌクレオチド配列によってコードされるモータータンパク質のアミノ酸配列：3-340アミノ酸である。アミノ酸341-355はCENP-Eモータードメインに由来せず、pET23D発現ベクターによって提供されるリンカー領域プラス6X His Tagであることに留意されたい。

30

【図面の簡単な説明】

【0423】

【図1】図1(配列番号1)は、CENP-E465と称する、ヒトCENP-Eタンパク質の新規モータードメインをコードする1395塩基対のヌクレオチド配列を開示する。

【図2】図2(配列番号2)は、配列番号1に示すヌクレオチド配列によってコードされるモータータンパク質-465アミノ酸のアミノ酸配列である。

【図3】図3(配列番号3)は、CENP-E340とも称する、340アミノ酸のヒトCENP-Eタンパク質の新規モータードメインをコードする1020塩基対のヌクレオチド配列に相当する。

40

【図4】図4(配列番号4)は、配列番号3に示すヌクレオチドによってコードされるモータータンパク質-340アミノ酸のアミノ酸配列である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Merck & Co., Inc.
Harvey, Diane Marie
Yang, Yi
Kohl, Nancy

<120> ISOLATED NUCLEIC ACID MOLECULE ENCODING
A NOVEL CENTROMERE-ASSOCIATED MOTOR PROTEIN, AND USES
THEREOF

<130> 21023-PCT

<150> 60/387,403

<151> 2002-06-10

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 1488
<212> DNA
<213> Human

```

<400> 1
atggcgagg aaggagccgt ggcgctctgc gtgcgagtgc ggccgctgaa cagcagagaa 60
gaatcacttg gagaaactgc ccaagtttac tggaaaactg acaataatgt catttatcaa 120
gttgatggaa gtaaatcctt caattttgat cgtgtctttc atggtaatga aactaccaa 180
aatgtgtatg aagaaatagc agcaccaatc atcgattctg ccatacaagg ctacaatggt 240
actataattg cctatggaca gactgcttca ggaaaaacat ataccatgat ggttcagaa 300
gatcatttgg gagttatacc cagggcaatt catgacattt tccaaaaaat taagaagttt 360
cctgataggg aatttctctt acgtgtatct tacatggaaa tatacaatga aaccattaca 420
gatttactct gtggcactca aaaaatgaaa cctttaatta ttcgagaaga tgtcaatagg 480
aatgtgtatg ttgctgatct cacagaagaa gttgtatata catcagaaat ggctttgaaa 540
tggattacaa agggagaaaa gagcaggcat tatggagaaa caaaaatgaa tcaaaagaagc 600
agtcgttctc ataccatctt taggatgatt ttggaaagca gagagaaggg tgaaccttct 660
aattgtgaag gatctggtta ggtatcccat ttgaatttgg ttgatcttgc aggcagttaa 720
agagctgctc aaacaggcgc tgcagggtgt cggctcaagg aaggctgtaa tataaatcga 780
agcttattta ttttgggaca agtgatcaag aaacttagtg atggacaagt tgggtggttc 840
ataaattatc gagatagcaa gttaacacga attctccaga attccttggg aggaaatgca 900
aagacacgta ttatctgcac aattactcca gtatcttttg atgaaacact tactgctctc 960
cagtttgcca gtactgctaa atatatgaag aatactcctt atgttaatga ggtatcaact 1020
gatgaagctc tctgaaaag gtatagaaaa gaaataatgg atcttaaaaa acaattagag 1080
gaggtttctt tagagacgcy ggctcaggca atggaaaaag accaattggc ccaacttttg 1140
gaagaaaaag atttgcttca gaaagtacag aatgagaaaa ttgaaaactt aacacggatg 1200
ctggtgacct ctctctccct cacgltgcaa caggaattaa aggctaaaag aaaacgaaga 1260
gttacttggg gccttggcaa aattaacaaa atgaagaact caaactatgc agatcaattt 1320
aatataccaa caaatataac aacaaaaaca cataagcttt ctataaattt attacgagaa 1380
attgatgaat ctgtcggtag catatgggaa ttcgaagctt acgtagaaca aaaactcatc 1440
tcagaagagg atctgaatag cgccgtcgcac catcatcatc atcatcat 1488

```

<210> 2
<211> 496
<212> PRT
<213> Human

```

<400> 2
Met Ala Glu Glu Gly Ala Val Ala Val Cys Val Arg Val Arg Pro Leu
1          5          10          15
Asn Ser Arg Glu Glu Ser Leu Gly Glu Thr Ala Gln Val Tyr Trp Lys

```

10

20

30

			20					25					30			
Thr	Asp	Asn	Asn	Val	Ile	Tyr	Gln	Val	Asp	Gly	Ser	Lys	Ser	Phe	Asn	
		35					40					45				
Phe	Asp	Arg	Val	Phe	His	Gly	Asn	Glu	Thr	Thr	Lys	Asn	Val	Tyr	Glu	
		50				55					60					
Glu	Ile	Ala	Ala	Pro	Ile	Ile	Asp	Ser	Ala	Ile	Gln	Gly	Tyr	Asn	Gly	
		65			70					75					80	
Thr	Ile	Phe	Ala	Tyr	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser	Gly	Lys	Thr	Tyr	Thr	Met	
				85					90					95		
Met	Gly	Ser	Glu	Asp	His	Leu	Gly	Val	Ile	Pro	Arg	Ala	Ile	His	Asp	
			100					105					110			
Ile	Phe	Gln	Lys	Ile	Lys	Lys	Phe	Pro	Asp	Arg	Glu	Phe	Leu	Leu	Arg	
		115					120					125				
Val	Ser	Tyr	Met	Glu	Ile	Tyr	Asn	Glu	Thr	Ile	Thr	Asp	Leu	Leu	Cys	
		130				135					140					
Gly	Thr	Gln	Lys	Met	Lys	Pro	Leu	Ile	Ile	Arg	Glu	Asp	Val	Asn	Arg	
		145			150					155					160	
Asn	Val	Tyr	Val	Ala	Asp	Leu	Thr	Glu	Glu	Val	Val	Tyr	Thr	Ser	Glu	
				165					170					175		
Met	Ala	Leu	Lys	Trp	Ile	Thr	Lys	Gly	Glu	Lys	Ser	Arg	His	Tyr	Gly	
			180					185					190			
Glu	Thr	Lys	Met	Asn	Gln	Arg	Ser	Ser	Arg	Ser	His	Thr	Ile	Phe	Arg	
		195					200					205				
Met	Ile	Leu	Glu	Ser	Arg	Glu	Lys	Gly	Glu	Pro	Ser	Asn	Cys	Glu	Gly	
		210				215					220					
Ser	Val	Lys	Val	Ser	His	Leu	Asn	Leu	Val	Asp	Leu	Ala	Gly	Ser	Glu	
		225			230					235					240	
Arg	Ala	Ala	Gln	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Val	Arg	Leu	Lys	Glu	Gly	Cys	
				245					250					255		
Asn	Ile	Asn	Arg	Ser	Leu	Phe	Ile	Leu	Gly	Gln	Val	Ile	Lys	Lys	Leu	
			260					265					270			
Ser	Asp	Gly	Gln	Val	Gly	Gly	Phe	Ile	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ser	Lys	Leu	
		275					280					285				
Thr	Arg	Ile	Leu	Gln	Asn	Ser	Leu	Gly	Gly	Asn	Ala	Lys	Thr	Arg	Ile	
		290			295						300					
Ile	Cys	Thr	Ile	Thr	Pro	Val	Ser	Phe	Asp	Glu	Thr	Leu	Thr	Ala	Leu	
		305			310					315					320	
Gln	Phe	Ala	Ser	Thr	Ala	Lys	Tyr	Met	Lys	Asn	Thr	Pro	Tyr	Val	Asn	
				325					330					335		
Glu	Val	Ser	Thr	Asp	Glu	Ala	Leu	Leu	Lys	Arg	Tyr	Arg	Lys	Glu	Ile	
			340						345				350			
Met	Asp	Leu	Lys	Lys	Gln	Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Leu	Glu	Thr	Arg	Ala	
		355					360					365				
Gln	Ala	Met	Glu	Lys	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Glu	Glu	Lys	Asp	
		370				375						380				
Leu	Leu	Gln	Lys	Val	Gln	Asn	Glu	Lys	Ile	Glu	Asn	Leu	Thr	Arg	Met	
		385			390					395					400	
Leu	Val	Thr	Ser	Ser	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Lys	
			405						410					415		
Arg	Lys	Arg	Arg	Val	Thr	Trp	Cys	Leu	Gly	Lys	Ile	Asn	Lys	Met	Lys	
			420					425					430			
Asn	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asp	Gln	Phe	Asn	Ile	Pro	Thr	Asn	Ile	Thr	Thr	
		435					440					445				
Lys	Thr	His	Lys	Leu	Ser	Ile	Asn	Leu	Leu	Arg	Glu	Ile	Asp	Glu	Ser	
		450				455					460					
Val	Gly	Thr	Ile	Trp	Glu	Phe	Glu	Ala	Tyr	Val	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	
		465			470					475					480	
Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Ser	Ala	Val	Asp	His	His	His	His	His	His	
				485					490						495	

10

20

30

<210> 3

<211> 1065
<212> DNA
<213> Human

```

<400> 3
atggcggagg aaggagccgt ggccgtctgc gtgcgagtgc ggccgctgaa cagcagagaa 60
gaatcacttg gagaaactgc ccaagtttac tggaaaactg acaataatgt catttatcaa 120
gttgatggaa gtaaatacctt caattttgat cgtgtctttc atggtaatga aactaccaa 180
aatgtgtatg aagaaatagc agcaccaatc atcgattctg ccatacaagg ctacaatggt 240
actatatttg cctatggaca gactgcttca ggaaaaacat ataccatgat gggttcagaa 300
gatcatttgg gagttatacc cagggcaatt catgacattt tccaaaaaat taagaagttt 360
cctgataggg aatttctctt acgtgtatct tacatggaaa tatacaatga aaccattaca 420
gatttactct gtggcactca aaaaatgaaa cctttaatta ttcgagaaga tgtcaatagg 480
aatgtgtatg ttgctgatct cacagaagaa gttgtatata catcagaat ggctttgaaa 540
tggattacaa agggagaaaa gagcaggcat tatggagaaa caaaaatgaa tcaagaagc 600
agtcgttctc ataccatctt taggatgatt ttggaagca gagagaagg tgaaccttct 660
aattgtgaag gatctgttaa ggtatcccat ttgaatttgg ttgatcttgc aggcagttaa 720
agagctgctc aaacaggcgc tgcaggtgtg cggctcaagg aaggctgtaa tataaatcga 780
agcttattta ttttgggaca agtgatcaag aaacttagtg atggacaagt tgggtgttct 840
ataaattatc gagatagcaa gttaacacga attctcaga attccttggg aggaatgca 900
aagacacgta ttactctgac aattactcca gtatcttttg atgaaacct tactgtctct 960
cagtttgcca gtactgctaa atatatgaag aatactcctt atgttaatga ggtatcaact 1020
gtcgacaagc ttgcccgcgc actcagcac caccaccacc accac 1065

```

10

<210> 4
<211> 355
<212> PRT
<213> Human

```

<400> 4
Met Ala Glu Glu Gly Ala Val Ala Val Cys Val Arg Val Arg Pro Leu
1 5 10 15
Asn Ser Arg Glu Glu Ser Leu Gly Glu Thr Ala Gln Val Tyr Trp Lys
20 25 30
Thr Asp Asn Asn Val Ile Tyr Gln Val Asp Gly Ser Lys Ser Phe Asn
35 40 45
Phe Asp Arg Val Phe His Gly Asn Glu Thr Thr Lys Asn Val Tyr Glu
50 55 60
Glu Ile Ala Ala Pro Ile Ile Asp Ser Ala Ile Gln Gly Tyr Asn Gly
65 70 75 80
Thr Ile Phe Ala Tyr Gly Gln Thr Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Thr Met
85 90 95
Met Gly Ser Glu Asp His Leu Gly Val Ile Pro Arg Ala Ile His Asp
100 105 110
Ile Phe Gln Lys Ile Lys Lys Phe Pro Asp Arg Glu Phe Leu Leu Arg
115 120 125
Val Ser Tyr Met Glu Ile Tyr Asn Glu Thr Ile Thr Asp Leu Leu Cys
130 135 140
Gly Thr Gln Lys Met Lys Pro Leu Ile Ile Arg Glu Asp Val Asn Arg
145 150 155 160
Asn Val Tyr Val Ala Asp Leu Thr Glu Glu Val Val Tyr Thr Ser Glu
165 170 175
Met Ala Leu Lys Trp Ile Thr Lys Gly Glu Lys Ser Arg His Tyr Gly
180 185 190
Glu Thr Lys Met Asn Gln Arg Ser Ser Arg Ser His Thr Ile Phe Arg
195 200 205
Met Ile Leu Glu Ser Arg Glu Lys Gly Glu Pro Ser Asn Cys Glu Gly
210 215 220
Ser Val Lys Val Ser His Leu Asn Leu Val Asp Leu Ala Gly Ser Glu
225 230 235 240
Arg Ala Ala Gln Thr Gly Ala Ala Gly Val Arg Leu Lys Glu Gly Cys
245 250 255

```

20

30

Asn	Ile	Asn	Arg	Ser	Leu	Phe	Ile	Leu	Gly	Gln	Val	Ile	Lys	Lys	Leu
			260					265					270		
Ser	Asp	Gly	Gln	Val	Gly	Gly	Phe	Ile	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ser	Lys	Leu
			275				280					285			
Thr	Arg	Ile	Leu	Gln	Asn	Ser	Leu	Gly	Gly	Asn	Ala	Lys	Thr	Arg	Ile
			290			295					300				
Ile	Cys	Thr	Ile	Thr	Pro	Val	Ser	Phe	Asp	Glu	Thr	Leu	Thr	Ala	Leu
					310					315					320
Gln	Phe	Ala	Ser	Thr	Ala	Lys	Tyr	Met	Lys	Asn	Thr	Pro	Tyr	Val	Asn
					325				330					335	
Glu	Val	Ser	Thr	Val	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	His	His
					340			345					350		
His	His	His													
			355												

【 図 1 】

```

atggcggagg aaggagccgt ggccgtctgc gtgcgagtc ggccgctgaa cagcagagaa
gaatcacttg gagaactgc ccaagtttac tggaaaactg acaataatgt catttatcaa
gttgatgaaa gtaaatcctt caattttgat cgtgtctttc atggtaatga aactaccaaa
aatgtgatg aagaaatagc agcaccaatc atcgattctg ccatacaagg ctacaatggt
actatatttg cctatggaca gactgcttca ggaaaaacat ataccatgat gggttcagaa
gatcatttgg gaggatatac cagggcaatt catgacattt tccaaaaaat taagaagttt
cctgataggg aatttctctt acgtgatctc tacatggaaa tatacaatga aaccattaca
gatttactct gtggcactca aaaaatgaaa ccttaatta ttcgagaaga tgcattatgg
aatgtgatg ttgctgatct cacagaagaa gtgtatata catcagaatg gcctttgaaa
tggattacaa agggagaaaa gaggcagcat tatggagaaa caaaaatgaa tcaaagaagc
agtcgttctc ataccatctt taggatgatt ttgaaaagca gagagaaggg tgaaccttct
aattgtgaag gatctgttaa ggtatcccat ttgaatttgg ttgatcttgc aggcagtgaa
agagctgctc aaacaggcgc tgcaggtgtg cggctcaagg aaggctgtaa tataaatcga
agcttattta ttttgggaca agtgatcaag aaacttagtg atggacaagt tgggtggttc
ataaattatc gagatagcaa gttaacacga attctccaga attccttggg aggaaatgca
aagacacgta ttatctgcac aattactcca gtatcttttg atgaaacact tactgctctc
cagtttgcca gtactgctaa atatatgaag aatactcctt atgtaaatga ggtatcaact
gatgaagctc tctgaaaagg gtatagaaaa gaataaatgg atcttaaaaa acaattagag
gaggtttctt tagagacgcg ggctcaggca atggaaaaag accaattggc ccaacttttg
gaagaaaaag atttgcttca gaaagtacag aatgagaaaa ttgaaaactt aacacggatg
ctggtgacct ctcttccct cagcttgcaa caggaaatga aggctaaaag aaaaagaa
gttacttggg gccttggcaa aattaacaaa atgaagaact caaactatgc agatcaattt
aataatacaa caaataaac acaaaaaaca cataagcttt ctataaattt attacgagaa
attgatgaat ctgct ggtaccatattggaattcgaagcttacgtagaacaaaaactcatctc
agaagaggatctgaatagcggcctcgaccatcatcatcatcatcat

```

FIG.1

【 図 2 】

```

1 MAEEGAVAVC VRRVPLNSRE ESLGETAQVY WKTDNNVIYQ VDGSKSFNFD RVFHGNETTK
61 NYVEEIAAPI IDSAIQGYNG TIFAYGQTAS GKTYTMMGSE DHLGVIPRAI HDIFQKIKKF
121 PDREFLLRVS YMEIYNETIT DLLCGTQKMK PLIIREVDNR NRVYADLTEE VVYTSSEMALK
181 WITKGEKSRH YGETKMNQRS SRSHIFRMI LESREKGEPS NCEGSVKVSH LNLVDLAGSE
241 RAAQTGAAGV RLKEGCNINR SLFILGQVIK KLSDGQVGGF INYRDSKLTR ILQNSLGGNA
301 KTRIICTITP VSFDETLTAL QFASTAKYMK NTPYVNEVST DEALLKRYRK EIMDLKQLE
361 EVSLETRAQA MEKDLAQLL EEKDLLQKVQ NEKIENLTR LVTSSSLTLQ QELKAKRRR
421 VTWCLGKINK MKNSYADQF NIPTNITTK HKLSINLLRE IDESVGTIWE FEAYVEQKLI
481 SEEDLNSAVD HHHHHH

```

FIG.2

【 図 3 】

```

atggcggagg aaggagccgt ggccgtctgc gtgcgagtc ggccgctgaa cagcagagaa
gaatcacttg gagaactgc ccaagtttac tggaaaactg acaataatgt catttatcaa
gttgatgaaa gtaaatcctt caattttgat cgtgtctttc atggtaatga aactaccaaa
aatgtgatg aagaaatagc agcaccaatc atcgattctg ccatacaagg ctacaatggt
actatatttg cctatggaca gactgcttca ggaaaaacat ataccatgat gggttcagaa
gatcatttgg gaggatatac cagggcaatt catgacattt tccaaaaaat taagaagttt
cctgataggg aatttctctt acgtgatctc tacatggaaa tatacaatga aaccattaca
gatttactct gtggcactca aaaaatgaaa ccttaatta ttcgagaaga tgcattatgg
aatgtgatg ttgctgatct cacagaagaa gtgtatata catcagaatg gcctttgaaa
tggattacaa agggagaaaa gaggcagcat tatggagaaa caaaaatgaa tcaaagaagc
agtcgttctc ataccatctt taggatgatt ttgaaaagca gagagaaggg tgaaccttct
aattgtgaag gatctgttaa ggtatcccat ttgaatttgg ttgatcttgc aggcagtgaa
agagctgctc aaacaggcgc tgcaggtgtg cggctcaagg aaggctgtaa tataaatcga
agcttattta ttttgggaca agtgatcaag aaacttagtg atggacaagt tgggtggttc
ataaattatc gagatagcaa gttaacacga attctccaga attccttggg aggaaatgca
aagacacgta ttatctgcac aattactcca gtatcttttg atgaaacact tactgctctc
cagtttgcca gtactgctaa atatatgaag aatactcctt atgtaaatga ggtatcaact
gtcgaagcttgcggccgactcgagaccaccaccaccacc

```

FIG.3

【 図 4 】

```

1 MAEEGAVAVC VRRVPLNSRE ESLGETAQVY WKTDNNVIYQ VDGSKSFNFD RVFHGNETTK
61 NYVEEIAAPI IDSAIQGYNG TIFAYGQTAS GKTYTMMGSE DHLGVIPRAI HDIFQKIKKF
121 PDREFLLRVS YMEIYNETIT DLLCGTQKMK PLIIREVDNR NRVYADLTEE VVYTSSEMALK
181 WITKGEKSRH YGETKMNQRS SRSHIFRMI LESREKGEPS NCEGSVKVSH LNLVDLAGSE
241 RAAQTGAAGV RLKEGCNINR SLFILGQVIK KLSDGQVGGF INYRDSKLTR ILQNSLGGNA
301 KTRIICTITP VSFDETLTAL QFASTAKYMK NTPYVNEVST DEALLKRYRK EIMDLKQLE
361 EVSLETRAQA MEKDLAQLL EEKDLLQKVQ NEKIENLTR LVTSSSLTLQ QELKAKRRR
421 VTWCLGKINK MKNSYADQF NIPTNITTK HKLSINLLRE IDESVGTIWE FEAYVEQKLI
481 SEEDLNSAVD HHHHHH

```

FIG.4

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/18203
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C07H 21/04; C12N 15/00, 1/20, 5/00 US CL : 536/23.1, 23.2; 435/6, 15, 320.1, 325, 252.3 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. : 536/23.1, 23.2; 435/6, 15, 320.1, 325, 252.3		
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) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,544,766 B1 (BERAUD et al) 08 April 2003 (08.04.2003), entire document.	1-3, 5-10, 12-17
X	WO 02/02055 A2 (ANADYS PHARMACEUTICALS, INC.) 10 January 2002 (10.01.2002), entire document.	1-3, 5-10, 12-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"
"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"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
		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
		document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
		document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 March 2004 (19.03.2004)		Date of mailing of the international search report 31 MAR 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 Padmavathi v Baskar <i>P.D.R. for</i> Telephone No. (703)308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/18203

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
MEDLINE, STN, A -GENSEQ, N-GENSEQ, EST, DERWENT, SWISS-PROT, PIR, USPTOWEST, SWISSPTREMEL,
GENEMBEL, PUBLISHED APPLICATIONS AND ISSUED PATENTS
SEQ.ID.NO: 2 has been searched on all commercial databases.

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 0 7 K 14/47	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/574	A 6 1 K 37/02	

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ハーベイ, ダイアン・マリー

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

(72)発明者 ヤン, イー

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

(72)発明者 コール, ナンシー・イー

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FA11 FB01 FB12 GC15
 4B024 AA01 AA11 AA12 BA80 CA04 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04
 GA11 HA14
 4B063 QA01 QA18 QQ42 QR56 QR62 QS25 QS34 QX02
 4B064 AG01 AG31 CA10 CA19 CC24 CE12 CE13 DA01 DA05 DA13
 DA14
 4B065 AA26X AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 BD14 CA24 CA44
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA22 BA23 CA53 NA14 ZA01 ZB21 ZB26
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 DA86 EA20
 EA50 FA74 GA20 GA26

专利名称(译)	编码新型着丝粒相关运动蛋白的分离的核酸分子及其用途		
公开(公告)号	JP2005528913A	公开(公告)日	2005-09-29
申请号	JP2004511486	申请日	2003-06-09
申请(专利权)人(译)	默克结束Kamupani公司		
[标]发明人	ハーベイダイアンマリー ヤンイー コールナンシーイー		
发明人	ハーベイ,ダイアン・マリー ヤン,イー コール,ナンシー・イー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P43/00 C07H21/04 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/00 C12N9/14 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/00 C12N9/14		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61P25/00 A61P35/00 A61P43/00.105 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/574.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/CE13 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZB21 4C084/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA20 4H045/GA26		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	60/387403 2002-06-10 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了分离的核酸，其编码新的着丝粒相关的运动蛋白HsCENP-E。还提供了由核酸序列编码的纯化的多肽，以及对该多肽具有免疫学特异性的抗体。这些生物分子可用作细胞增殖的标志物，特别是用于鉴定细胞周期G2和M期的细胞。提供了用于使用核酸，蛋白质和抗体来评估生物流体和组织样品中的细胞增殖以及用于检测针对蛋白质的自身抗体的存在的方法。

(5) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 25/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00 I O 5	4 B 0 6 4
A 6 1 P 43/00	C O 7 K 14/47	4 B 0 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 78 頁) 最終頁に	

(2) 出願番号	特願2004-511486 (P2004-511486)	(7) 出願人	390023526
(8) (22) 出願日	平成15年6月9日 (2003.6.9)		メルク エンド カムパニー インコー レーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月3日 (2005.2.3)		MERCK & COMPANY IN CORPORATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/018203		アメリカ合衆国、ニュージャージー、 ウエイ、イースト リンカーン アヴ ニュー 1 2 6
(87) 国際公開番号	W02003/104426		
(87) 国際公開日	平成15年12月18日 (2003.12.18)		
(31) 優先権主張番号	60/387, 403	(74) 代理人	100062007
(32) 優先日	平成14年6月10日 (2002.6.10)		弁理士 川口 義雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114188
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR , CA, JP, US		弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真