

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 541776

(P2002 - 541776A)

(43)公表日 平成14年12月10日(2002.12.10)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ド* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/46			P 4 B 0 2 9
39/395		48/00	4 B 0 5 0
48/00		A 6 1 P 3/12	4 B 0 6 3
		19/08	4 B 0 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 80数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 601144(P2000 - 601144)

(86) (22)出願日 平成12年2月24日(2000.2.24)

(85) 翻訳文提出日 平成13年8月24日(2001.8.24)

(86) 国際出願番号 PCT/CA00/00201

(87) 国際公開番号 W000/50580

(87) 国際公開日 平成12年8月31日(2000.8.31)

(31) 優先権主張番号 2,262,056

(32) 優先日 平成11年2月24日(1999.2.24)

(33) 優先権主張国 カナダ(CA)

(71)出願人 ユニベルシテ ドゥ モントリオール
カナダ国,ケベック エイチ3ティ- 1ジェ
イ4,モントリオール,エドゥアール- モンブ
ティ 2900

(72)発明者 クリーヌ, フィリップ
カナダ国,ケベック エイチ2ブイ 2エック
ス1,ウートルモント,アベニュー クロード-
シャンパーニュ 28

(72)発明者 ボワロー, ギュイ
カナダ国,ケベック ジェイ4ワイ 1イ-6
,プロサール,マルエルブ 7645

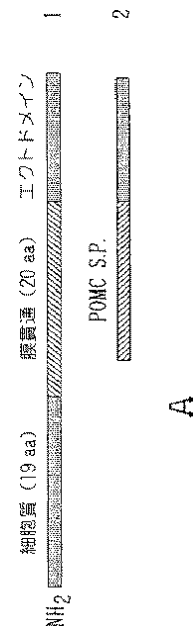
(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外 4 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト P H E X の可溶性形態の組成物、方法及び合成試薬

(57) 【要約】

本発明は、PHEXの可溶性形態に関する。PHEXはII型の内在性膜糖タンパク質である。この酵素は、X染色体上のエンドペプチダーゼに対する相同性を有する、リン酸塩調節遺伝子の遺伝子産物である。PHEXの可溶性形態を製造するために、トランスメンブランアンカードメインはシグナルペプチドコーディング配列をコードするように修飾された。したがって、可溶性PHEXは活性エクドメインを含んでなる。また、PHEXの不活性突然変異体は本発明の目的である。PHEXの可溶性および不活性の両方の突然変異は、PHEXに対するリガンドをスクリーニングするために使用することができる。これらのリガンドは、また、PHEXのインヒビターまたは基質として使用することができる。PHEXがリン酸塩尿性であるとき、そのインヒビターはリン酸塩尿症および/または低リン酸塩血症を治療するために使用されるであろう。反対に、PHEXの基質またはPHEXそれ自体は高リン酸塩血症を治療するために使用することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 精製された可溶性ヒトPHEX酵素およびその変異型。

【請求項2】 不活性であるが、PHEXに対するリガンド分子に対する結合能力を保持する、請求項1に記載の酵素の突然変異体。

【請求項3】 位置582にグルタミン酸残基が変異しているPHEX酵素から本質的に成る、請求項2に記載の突然変異体。

【請求項4】 位置582のグルタミン酸残基が疎水性アミノ酸残基で置換されているPHEX酵素から本質的に成る、請求項2に記載の突然変異体。

【請求項5】 位置582のグルタミン酸残基がバリン残基で置換されているPHEX酵素から本質的に成る、請求項2に記載の突然変異体。

【請求項6】 PHEX C末端のエクトドメインが活性または不活性であり、切断可能なシグナルペプチドを含むように修飾されたPHEX膜 - アンカードメインをコードする末端切除PHEX遺伝子配列を含んでなる核酸。

【請求項7】 前記切断可能なシグナルペプチドがプロ - オピオメラノコルチンシグナルペプチドである、請求項6に記載の核酸。

【請求項8】 請求項6または7に記載の核酸を含んでなる組換えベクター。

【請求項9】 発現ベクターである、請求項8に記載の組換えベクター。

【請求項10】 請求項8に記載の組換えベクターを含んでなる組換え宿主。

【請求項11】 請求項9に記載の組換えベクターを含んでなる組換え宿主。

【請求項12】 工程：

- 請求項11に記載の組換え宿主が核酸を発現するようにさせ、そして
- 前記組換え宿主の分泌産物として可溶性PHEX酵素またはその突然変異体を回収する、

を含んでなる、可溶性PHEX酵素またはその不活性突然変異体を産生する方法。

【請求項13】 請求項1～5のいずれか一項に記載の酵素を含んでなる、抗原性組成物。

【請求項14】 PHEXに結合することができる、請求項1～5のいずれか一項に記載の酵素に対して発生させた抗体またはそのフラグメント。

【請求項15】 前記フラグメントがPHEXのアミノ酸配列の残基121から残基294に延びる、請求項14に記載の抗体。

【請求項16】 モノクローナル抗体である、請求項14に記載の抗体。

【請求項17】 モノクローナル抗体である、請求項15に記載の抗体。

【請求項18】 PHEX中和性抗体である、請求項16に記載の抗体。

【請求項19】 請求項16～18のいずれか一項に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項20】 請求項1に記載の酵素または請求項6に記載の核酸と、薬学上許容される担体とを含んでなる組成物。

【請求項21】 請求項2～5のいずれか一項に記載の酵素と、薬学上許容される担体とを含んでなる組成物。

【請求項22】 請求項14～18のいずれか一項に記載の抗体と、薬学上許容される担体とを含んでなる組成物。

【請求項23】 請求項14～18のいずれか一項に記載の抗体を含んでなる、PHEXの存在または量を検出する診断試薬。

【請求項24】 請求項14～18のいずれか一項に記載の抗体を含んでなる、PHEXの存在または量を検出する診断キット。

【請求項25】 可溶性PHEX酵素をさらに含んでなる、請求項24に記載の診断キット。

【請求項26】 工程：

- 免疫複合体を形成できる条件下に、試料を請求項14～18のいずれか一項に記載の抗体と接触させ、そして
- 前記試料中のPHEXの存在または量の指示として免疫複合体を検出する、を含んでなる、試料中のPHEXの存在または量を検出する方法。

【請求項27】 請求項14～18のいずれか一項に記載の抗体を含んでなる、PHEXまたはその突然変異体を精製する装置。

【請求項28】 請求項1～5のいずれか一項に記載の可溶性PHEX酵素また

はその突然変異体を含んでなる、PHEXリガンドをスクリーニングする装置。

【請求項29】 前記抗体が固体支持体上に固定されている、請求項27に記載の装置。

【請求項30】 前記PHEX酵素または突然変異体が固体支持体上に固定されている、請求項28に記載の装置。

【請求項31】 それ自体前記固体支持体上に固定された抗PHEX抗体に対するその結合を通して、前記PHEX酵素または突然変異体が固体支持体上に固定されている、請求項30に記載の装置。

【請求項32】 前記固体支持体に対してPHEXをカップリングさせることができる残基または基で終わるC末端のアミノ酸エクステンションを通して、前記PHEX酵素または突然変異体が固体支持体上に固定されている、請求項30に記載の装置。

【請求項33】 工程：

- 1またはそれ以上の分子とPHEXとの結合が起こることができるような条件下に、前記1またはそれ以上の分子を含有する試料を請求項2～5のいずれか一項に記載のPHEX突然変異体酵素と接触させ、
 - 前記試料中のPHEXリガンドの存在の指示として前記結合を検出し、そして
 - 前記PHEXリガンドを選択する、
- を含んでなる、PHEXリガンドを得る方法。

【請求項34】 前記リガンドがPHEXインヒビターまたは基質である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】 試料をPTHrP107 - 139と実質的に無リン酸塩条件下に接触させ、そして試料中のPHEX活性の指示としてPTHrP107 - 139の切断産物の出現を観測する工程を含んでなる、試料中のPHEX活性を評価する方法。

【請求項36】 試料中の前記PHEX活性を陽性対照として請求項1に記載のPHEX酵素の活性と比較する工程をさらに含んでなる、請求項35に記載の方法。

【請求項37】 工程：

- 分子を請求項1に記載のPHEX酵素と実質的に無リン酸塩条件下に接触させ、そして

- 前記分子がPHEX基質である指示として前記分子の切断産物を観測する、
を含んでなる、PHEXの基質である能力について分子の活性を評価する方法。

【請求項38】 前記分子を陽性対照としてPTHrP107 - 139と比較する工程
をさらに含んでなる、請求項37に記載の方法。

【請求項39】 工程：

- 分子をPTHrP107 - 139および請求項1に記載のPHEX酵素と実質的に無リン酸
塩条件下に接触させ、そして

- 分子がPHEXインヒビターである指示としてPTHrP107 - 139の切断産物の形成
の阻害を観測する、
を含んでなる、PHEXのインヒビターである能力について分子の活性を評価する方
法。

【請求項40】 請求項35～39のいずれか一項に記載の方法を実行する
ためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

PHEX遺伝子（従来名PEX；X染色体上の候補の遺伝子としてエンドペプチダーゼに対する相同性を有するリン酸調節遺伝子）は、位置クローニングアプローチにより、X染色体性低リン酸塩血症（XLH）の候補の遺伝子として同定された（Francis他、1995）。成長遅延、くる病性および骨軟化性骨疾患、リン酸塩再吸収およびビタミンD代謝の腎欠陥により特徴づけられるリン酸塩ホメオスタシスのメンデル疾患である（RasmussenおよびTenenhouse、1995）。PHEX遺伝子の配列の公開により入手可能となった情報、および当業者にとって明らかな標準的技術を使用して、いくつかのグループはヒトおよびマウスPHEX / Phex cDNAをクローニングし、配列決定した（Du他、1996；Lipman他、1998；Grieff他、1997；Beck他、1997；GuoおよびQuarles、1997；Strom他、1997）（PHEX / Phexは、それぞれ、ヒトおよびマウスの遺伝子である）。

【0002】

アミノ酸配列を比較すると、候補の遺伝子の部分的配列において以前に観測されたように、PHEX / Phexタンパク質と中性エンドペプチダーゼファミリーのメンバーとの間の相同性が証明された（Francis他、1995）。中性エンドペプチダーゼファミリーのペプチダーゼは亜鉛を含有するII型内在性膜糖タンパク質であり、これらのタンパク質は比較的短い細胞質N末端領域、単一のトランスメンブランドメイン、および酵素の活性部位を含む、長い細胞質外ドメインを有する（Devault他、1987）。

【0003】

PHEX機能の喪失がXLHにおいて観察される骨および腎臓の異常を誘発するメカニズムは明らかではない。腎臓におけるPHEX / Phex mRNAの存在を示唆するデータは存在しない（Du他、1996；Beck他、1997；Grieff他、1997）。Hypマウスにおける腎臓のリン酸塩外分泌の増加は、リン酸塩輸送因子のダウンレギュレーションのためであり、これはネフロンからのリン酸塩の再吸収のために必要である（Tenenhouse 1998）。

【0004】

1,25(OH)₂D₃(カルシトリオール)の血清濃度は、Hypマウスにおいて、正常の同腹子と同一であることが見出された(Meyer 1980)。しかしながら、Hyp腎臓は、活性が減少した代謝物質である1,24,25(OH)₃D₃へのビタミンD代謝物質の加速された分解を示す(Tenenhouse 1988)。リン酸塩に富んだ食事の存在下に、Hypマウスは血清1,25(OH)₂D₃の増加およびC-24酸化産物の低下を経験するが、正常マウスはこのような変化を経験しない(Tenenhouse 1980)。要約すると、HypマウスにおけるビタミンD代謝における腎臓障害はリン酸塩障害に対して二次的ように見える。

【0005】

PHEX/Phex mRNAは、骨においてノザンプロットハイブリダイゼーションにより、他の成体および胎児の組織、例えば、肺、肝臓、筋肉、および卵においてRT-PCRおよびRNアーゼタンパク質アッセイにより検出された(Du他、1996; Beck他、1997)。胚および新生児のマウスの切片について実施されたin situハイブリダイゼーションは、骨芽細胞および象牙芽細胞におけるPhex mRNAの存在を示した(Ruchon他、1998)。Phex遺伝子の発現は胚発生の第15日に検出可能であった。これは骨における細胞内基質の沈着の開始と一致する。

【0006】

そのうえ、3日齢および成体のマウスの頭蓋冠および歯からの全RNAのノザン分析により、成体の骨および非成長歯においてPhex転写物の存在量は減少することが示された。ヒトPHEXに対して発生させたモノクローナル抗体を使用するウェスタンブロットティングにより、新生児および成体の骨におけるPhexタンパク質の存在を研究したとき、この結果は確証された。2月齢のマウスについての免疫組織学的研究は、骨における成熟骨芽細胞および骨細胞および歯における象牙芽細胞の独占的標識化を示した。これらの研究を総合すると、PHEX/Phexがこれらの組織における無機質化の発生および維持において重要な役割を演ずることを示唆する。

【0007】

腫瘍形成性骨軟化症(OOM)、すなわち、非常に類似する臨床的適用を有し腫

瘍関連散在性症状の症例についての実験的研究により、骨代謝におけるPHEXの役割のそれ以上の洞察が提供された。腫瘍産生体液性因子は腎臓の骨軟化症を生ずるリン酸塩再吸収およびビタミンD合成を阻害するという、強い証拠が存在する(Nelson他、1997)。HypおよびGyマウス、ヒトXLのネズミモデルについての実験的研究は、また、体液性因子の掛かり合いを示唆する。両方のマウスモデルにおいて、突然変異がPhex遺伝子において同定され、これはまた遺伝子産物の機能の喪失を生ずるように思われる(Strom他、1997; Beck他、1997)。

【0008】

PHEXタンパク質と酵素の金属ペプチダーゼファミリーの他のメンバーとの間の類似性を考慮すると、腎臓の管のリン酸塩再吸収をモジュレートするペプチドホルモンを代謝することが推測された。このような活動は、リン酸塩再吸収ホルモン前駆体のその活性形態へのプロセッシングまたは循環するリン酸塩尿性因子の不活性化を包含するであろう。Hypマウスからの骨芽細胞の固有の異常性の証拠が存在する(Ecarot他、1992)。

【0009】

また、欠陥のあるリン酸塩輸送がHypマウスからの骨芽細胞において観察された(Rifas他、1994)。こうして、腎臓のリン酸塩再吸収をコントロールすることによって腎臓のレベルにおいて間接的に、そして骨芽細胞または溶骨細胞または両方の機能をコントロールするトロフィックペプチド因子を不活性化することによって直接的に、PHEXは両方の方法で骨代謝をコントロールすることに関係することがある。

【0010】

機能化PHEX遺伝子の非存在は低リン酸塩血症に導くので、この酵素を阻害することによって高リン酸塩血症を包含するヒト疾患をコントロールすることができるであろう。こうして、PHEXの阻害は血液のリン酸塩濃度を減少させ、ヒトおよび動物における高リン酸塩血症に関係する障害の予防および減少を可能とするであろう。腎機能の障害によるリンの腎外分泌の減少は、高リン酸塩血症の最も普通の原因である。

【0011】

二次的上皮小体機能亢進症（腎性骨形成異常）の特別の症例において、適切なリン酸塩濃度は、また、内因性カルシトリオール産生の増加および/またはPTHレベルの低下に導くことによって、患者にとって有益である。したがって、PHEXの初期のかつ適切な阻害は腎性骨形成異常の重大な結果を緩和し、進行した腎性骨形成異常の疼痛および運動性の問題なしに、生命・生活の質を改善する。成人において、高リン酸塩血症は 1.67mmol/L (5mg/dL) 以上の血清リンの増加として定義される。高リン酸塩血症は多数の原因を有する普通の発見である (Harrison's 第14版 CD-ROM、McGraw Hill Health Professions、New York、N. Y.、chapter 356)。

【0012】

上皮小体機能亢進症または腎性骨形成異常は慢性腎不全の進行した特質から生ずる。慢性腎不全の主要な原因は、US Medicare患者（65歳を超えた患者）の間で、糖尿病（43%）、高血圧症（35%）および糸球体腎炎（14%）である。(Harrison's 第14版 CD-ROM、McGraw Hill Health Professions、New York、N. Y.、chapter 271、Figure 271.1)。

【0013】

転移性カルシウム沈着のために、高リン酸塩血症は潜在的に危険である。唯一の概算的指針であるが、70より大きいカルシウム・リンの積 [血清Ca (mg/dL) \times 血清 (mg/dL)] はカルシウム沈着の潜在的脅威である。この疾患を有する患者は、この疾患を有する患者は、骨および関節の疼痛、骨減少症、奇形、骨折、筋肉の弱体化および余分の骨格カルシウム沈着に悩まされる。

根元的原因に無関係に、この疾患は廃棄物を排除し、カルシトリオール ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) を産生し、そしてリン酸塩を外分泌する腎臓の能力の漸進的喪失により特徴づけられる。リン酸塩外分泌の増加はPTHの増加とともに達成される。

【0014】

PTHレベルに対するリン酸塩の直接的作用は十分に記載されている。増加する濃度のリン酸塩の存在下に、無傷の新鮮な副甲状腺はPTH分泌の増加を示す (Almaden、1996)。高いリン酸塩の食事はPTHを増加させるが、血清リン酸塩を正常に維持する；対照的に、同一食事を与えた副甲状腺摘出したラットはリン酸塩レ

ベルの増加を示した (Borie、1981およびDemeter、1991)。軽度～中程度の腎不全を有する患者における結果は、リン酸塩濃度がPTHと相関することを示した (Kate、1997)。

PHEXの不適切な発現を包含する障害の治療は本発明の主要な目標であるが、その逆は本発明の範囲内である。PHEXの欠乏症を包含する障害を治療するための、可溶性活性PHEXまたはそれ腸溶性コーティング核酸を含んでなる組成物は、本発明の目的である。

【0015】

亜鉛金属ペプチダーゼファミリー (また、Zincinsとして知られている ; Hooper FEBS Letters 354、1-6、1994参照) は、活性部位における亜鉛原子の存在により特徴づけられる。この大きいファミリーは、活性部位の構造により区別することができる、いくつかのサブクラスから成る。1つのこのようなサブファミリーはグルジンシンであり、これらはHEXXHモチーフおよび第3亜鉛リガンドとしてのグルタミン酸により特徴づけられる。このサブファミリーは、サーモリシン、ACE (アンギオテンシン変換酵素)、アミノペプチダーゼおよび中性エンドペプチダーゼまたはネプリシン (NEP) ファミリーの酵素を包含する。

【0016】

NEPそれ自体は、ここでそのファミリーの酵素のプロトタイプとして考えられる。これらのペプチダーゼは、広範な配列および構造的類似性を共有する。NEPに加えて、パブリックドメインにおいて5つの他の酵素が存在する : エンドセリン変換酵素ECE - 1、ECE - 2、Kell、XCEおよびPHEX (外観については下記の文献を参照のこと : TurnerおよびTanzawa、1977b)。いくつかのファミリーメンバーは同一ペプチド基質を切断することができ、そして同一インヒビターは2以上のNEP様酵素を阻害することができる。

【0017】

事実、いくつかの化学的実在物はグルジンシンサブファミリーの2以上の酵素を阻害することができる (Roques B. P. Path Biol 1998、46、3、191-200)。したがって、既知のグルジンシンインヒビターをPHEX酵素アッセイによりアッセイし、PHEXインヒビターとして同定することができる。本発明の方法の1

つは「PHEXインヒビター」の投与である。ここにおいて言及するとき、用語「PH EXインヒビター」は、PHEXの酵素作用を阻害する化合物を包含する。

【0018】

発明の要約

この目的に向かって、我々はPHEXの組換え形態を産生しかつ細胞画分、使用済み培地および組織抽出物からの組換え酵素および天然酵素の両方を精製するように設計された種々の試薬およびツールを製造した。我々は全長のヒトPHEXをコードするcDNAを種々の発現ベクターの中にクローニングした。COS-1(サル腎臓)細胞、CHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞、およびLLC-PK1(ブタ腎臓)を包含する種々の細胞系統の中に、トランスフェクションにより、これらのPHEXコーディングベクターを導入した。永久的細胞系統を確立し、これらの細胞系統は細胞表面においてPHEXタンパク質を安定に発現することが示された。組換えPHEXタンパク質に富んだ膜画分を急速に調製する手法が確立された。

【0019】

PHEXは、N末端に付近に位置する疎水性20アミノ酸配列により定着された、固有の膜タンパク質である。固有の膜結合タンパク質を膜の脂質環境から遊離させるために、洗浄剤を使用することが必要である。これらの洗浄剤は酵素の触媒活性を妨害することができる。そのうえ、特に濃縮された溶液および/または大量、例えば、結晶化および高い処理量のスクリーニングアッセイに要求される量、のタンパク質を必要とする場合、洗浄剤を使用して精製されたタンパク質は、通常、安定性および溶解性の問題を提示する。完全に活性な酵素の高い収率で製造および精製することを促進するために、PHEXの可溶性形態を使用して作業することが好ましい。

【0020】

エクドメインの全体から成るが、細胞質ゾルおよび疎水性トランスメンブランダメインを欠如するNEP(Lemay他、1989)およびECE(Korth他、1997)の可溶性形態は構築され、天然の膜結合相同体の酵素活性に類似する活性を有することが示された。こうして、タンパク質のシグナルペプチド/トランスメンبران領域を修飾することによって、組換えPHEXの可溶性形態が構築された。可溶性PHEX

は、そのPHEXエクトドメインまたは触媒部分を含んでなる；PHEXのこの可溶性形態をsecPHEXと呼ぶ。secPHEXをコードする発現ベクターをLLC - PK1細胞の中にトランスフェクトし、そして安定な基準でキメラPHEXタンパク質を発現する永久的細胞系統が確立された。

【0021】

この細胞系統の使用済み培地をウェスタンブロットで分析すると、それはsecPHEXを高いレベルで含有ことが示された。イムノアフィニティーまたはイオン交換クロマトグラフィーにより、このsecPHEXを精製した。イオン交換クロマトグラフィーは、使用済み培地からsecPHEXを精製するために最も効率よいことが見出された。基質としてPTHrP107 - 139を使用する酵素アッセイにおいて、精製されたsecPHEXは活性であることが示された。そのうえ、このsecPHEXの入手可能性により、抗PHEX抗体を産生するための抗原としてsecPHEXを使用することができる。

【0022】

大腸菌 (*E. coli*) において産生されたPHEX由来組換え融合タンパク質でマウスを免疫化することによって、PHEXに対して特異的なモノクローナル抗体を発生させた。種々のイムノアフィニティー手順により組換えPHEXを精製するために、これらのモノクローナル抗体を使用した。また、免疫組織学的技術およびウェスタンブロットティングにより、骨におけるPHEXの発現を特性決定するために、PHEX特異的抗体は有効であることが証明された。

【0023】

本発明は、また、ヒトおよび動物におけるPHEX関係障害を治療する組成物に関する。特に、本発明は、その最も頻繁な発現を包含する、高リン酸塩血症、二次的上皮小体機能亢進症および腎性骨形成異常を治療するための組成物を提供する。組成物は抗PHEX分子を含んでなり、この分子は、PHEX活性を阻害することによって、リン酸塩外分泌の増加ならびに腸リン酸塩吸収の減少を誘発し、こうして高リン酸塩血症およびその最も頻繁な発現、二次的上皮小体機能亢進症および腎性骨形成異常を減少および/または好ましくは予防する。

【0024】

例えば、このような治療を使用して、PTH血清濃度を増加することと反対に、PHEX活性を犠牲にして、軽度の腎不全を有する患者において正常リン酸塩血が維持される。PHEX突然変異から生ずる表現型はPHEX阻害が毒性でありうることを示唆し、生理学の注意深い研究は他のことを示唆する。リン酸塩外分泌の優勢の特質は、所望の結果を達成するために、わずかに部分的阻害を必要とすることを示唆する。ヘテロ接合体の雌における観察は、50%より非常に少ない阻害が要求されることを示唆する。この低いレベルの阻害において、遺伝子投与依存的またはリン酸塩依存的であるXLHの他の特徴は十分でないことがある。

【0025】

したがって、本発明の目的は、PHEX酵素または突然変異体、または抗PHEXリガンドを含んでなる組成物を提供することである。これらの組成物は、ヒトおよび動物においてPHEX関係障害の治療に特に有効である。それ以上の目的は下記のものを提供することである：(1) 試料中のPHEXの存在または量を検出する診断キット；(2) 試料中のPHEXの存在または量を検出する方法；(3) PHEXまたはその突然変異体を精製する装置；(4) PHEXリガンドをスクリーニングする装置；(5) PHEXリガンドを得る方法；および(6) PHEXおよびPHEX基質を包含する酵素アッセイ。

【0026】

本発明の特定の態様の説明

この説明の中で使用する用語を明瞭にかつ終始一貫して理解できるように、下にいくつかの定義を提供する。特記しない限り、本明細書において使用する科学のおよび技術的用語および専門用語は、本発明が関係する当業者により普通に理解されるのと同じの意味を有する。

【0027】

本明細書において使用するとき、表示「変異型」は、核酸またはアミノ酸配列であるかどうかの配列の関係において、もとの配列の生物学的活性に実質的に類似する生物学的活性（機能的または構造的）を保持する分子を意味する。この変異型または同等物は天然の種内または種間の変異型であることができるか、あるいは合成的に製造することができる。このような変異型は、タンパク質の生物学

的活性が保存されるかぎり、1またはそれ以上のアミノ酸の置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を包含する。

【0028】

配列の生物学的活性が一般に維持されるかぎり、これは1またはそれ以上のヌクレオチドの置換、欠失または付加を有することができる、核酸配列の誘導体に適用される。タンパク質配列に關すると、置換するアミノ酸は置換されたアミノ酸のそれに類似する化学物理学的特性を一般に有する。同様な化学物理学的特性は、電荷、嵩、疎水性、ヒドロパシーおよびその他を包含する。用語「変異型」は、本発明の主題の「フラグメント」、「セグメント」、「機能的誘導体」、「アナログ」または「化学的誘導体」を包含することを意図する。

【0029】

用語「疎水性アミノ酸残基」は、下記の基から選択されるアミノ酸を意味することを意図する：アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンまたはそれらの変異型 (A. L. Lehninger, Principles of Biochemistry (Worth Publishers, Inc., 1982), p. 101)。本発明の關係において、脂肪族アミノ酸は好ましい。

表現「抗PHEX」分子は、「アンチセンス核酸分子」、「抗体」、「インヒビター」または「アンタゴニスト」(すなわち、PHEX活性を障害することができる分子)のような分子を意味することを意図する。

【0030】

本発明は、また、例えば、本発明の核酸配列またはタンパク質の発現を減少または阻害するために使用することができる、アンチセンス核酸分子を提供する。本発明によるアンチセンス核酸分子は、そのターゲット核酸配列(DNAまたはRNA)の一部分と安定な二重らせんまたはトリプレックスを形成することができる分子を意味する。アンチセンス核酸分子の使用およびこのような分子の設計および修飾はこの分野においてよく知られており、例えば、WO 96/32966、WO 96/11266、WO 94/15646、WO 93/08845および米国特許第5,593,974号に記載されている。

【0031】

本発明によるアンチセンス核酸分子は、よく知られている方法に従い核酸配列から誘導し、修飾することができる。例えば、いくつかのアンチセンス分子は、普通にこの分野において知られているように、分解に対していっそう耐性とし、それらのターゲット配列に対するそれらのアフィニティーを増加し、選択した細胞型または細胞区画へのそれらの輸送に影響を与え、および/またはヌクレオチドアナログの使用および/またはそれらの選択した化学的フラグメントの置換により、それらの脂質溶解度を増強するように、設計することができる。

【0032】

一般に、抗体（モノクローナル抗体およびハイブリドーマを包含する）を製造する技術および抗体を使用して抗原を検出する技術はこの分野においてよく知られている（Campbell、1984、Monoclonal Antibody Technology : Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology、Elsevier Science Publishers、オランダ国アムステルダム）、およびHarlow他、Antibody - A Laboratory Manual、CSH Laboratories）。本発明は、また、それらのそれぞれの相互作用ドメインおよび/またはそれらに対する特異性を阻害または中和する、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、またはそれらのヒト化バージョン、キメラ抗体およびその他を提供する。

【0033】

普通に知られているように、「突然変異」は、娘細胞に伝達することができる、遺伝物質における検出可能な変化である。よく知られているように、突然変異は、例えば、1またはそれ以上のデオキシリボヌクレオチドの検出可能な変化であることができる。例えば、ヌクレオチドを付加し、欠失し、置換し、逆方向に、または新しい位置に輸送することができる。自発的突然変異および実験的に誘導された突然変異が存在する。核酸分子の突然変異の結果は突然変異体核酸分子である。突然変異体ポリペプチドをこの突然変異体核酸分子からコードすることができる。突然変異は影響を受けない突然変異体、陰性または陽性に部分的に影響を受けた突然変異体、または不活性突然変異体を生ずることができる。本発明の態様において、PHEXに結合する特定の能力を有するが、不活性触媒部位を有する突然変異体が得られた。

【0034】

本明細書において使用するとき、用語「精製された」は、細胞成分から分離された分子を意味する。こうして、例えば、「精製されたタンパク質」を自然において見出されないレベルに精製することができる。「実質的に純粋な」分子は、大部分の他の細胞成分を欠如する分子である。

【0035】

本明細書において使用するとき、用語「分子」または「リガンド」は、天然、合成または半合成の分子または化合物を意味するために互換的にかつ広い意味で使用される。したがって、用語「分子」は、例えば、化学物質、高分子、微小分子、細胞または組織の抽出物（植物または動物からの）およびその他を意味する。分子の非限定的例は、核酸分子、ペプチド、抗体、炭水化物または薬剤を包含する。これらの因子は、ランダムスクリーニング、合理的選択を包含する種々の手段により、そして、例えば、タンパク質またはリガンドのモデル化法、例えば、コンピューターモデル化法を使用する合理的設計により、選択し、スクリーニングすることができる。

【0036】

用語「合理的的に選択する」または「合理的に設計する」は、本発明の相互作用するドメインの立体配置に基づいて選択された化合物を定めことを意味する。当業者は理解するように、天然に存在しない修飾を有する高分子は、また、用語「分子」の範囲内に入る。「高分子」と「微小分子」との間の区別は大きさに基づいてなされる。

【0037】

例えば、それぞれ、約100以下のヌクレオチドまたはアミノ酸のオリゴヌクレオチドおよびペプチドは微小分子と考えられるが、遺伝子、完全なcDNAおよびタンパク質は、それらのサイズが大きいために、一般に高分子と分類されるであろう。本発明の技術に従い同定された分子は、細胞および/または組織の生理学または恒常性がPHEX遺伝子産物の特質またはレベルにおける欠陥により危うくされる疾患または症状において、療法上の価値を有する。それらは、また、同一の疾患または症状において診断上の価値を有することができる。

【0038】

方法

モノクローナル抗体の製造

PHEXアミノ酸配列のアミノ酸121~294(第2図において下線が引かれているセグメント)に対応するcDNAを使用して、大腸菌(E. coli)中でGST-融合タンパク質を構築した。グルタチオン-セファローズカラム上のアフィニティークロマトグラフィーにより、この融合タンパク質を大腸菌(E. coli)抽出物から精製した。トロンピン切断後、GST融合タンパク質のPHEX部分をポリアクリルアミドゲルからの電気溶離によりさらに精製した。この物質を使用して4匹のマウスを免疫化した(約50 µgのPHEX₁₂₁₋₂₉₄の5回の注射)。免疫化スケジュール後、血液を各マウスから収集し、大腸菌(E. coli)抽出物で被覆したマイクロタイタープレートを使用するELISAにより、マウス血清中の抗体の存在を評価した。

【0039】

また、PHEX発現ベクターでトランスフェクトしたLLC-PK1細胞の抽出物をウェスタンブロッティングすることによって、マウス血清をまたPHEXの存在について試験した。4匹のマウスのうちで、3匹はELISAおよびウェスタンブロットの両方においてすぐれた結果を示した。PHEX特異的抗体の高い力価について選択した1匹のマウス(ELISAにより測定して)を殺し、その脾細胞を収集し、骨髓腫細胞(系統)との融合により永久分裂能化した。HAT選択培地中で増殖する能力について、ハイブリドーマ細胞を選択し、数ラウンドの限界希釈によりクローニングした。

【0040】

トランスフェクトした細胞におけるヒトPHEXの発現

以前に記載されているように(Beck他、1997)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、全長のヒトPHEXをコードするcDNAを得た。このcDNAをpCR2.1(Invitrogen)の中にクローニングすることによって、プラスミドpCR2.1-PHEX-FLBを発生させた。全PHEXコーディング配列を含有する制限フラグメント(SpeI-EcoRV)を消化し、平滑末端とし、哺乳動物の発現ベクター(pCDNA3/RSV)の中にサブクローニングした。生ずるプラスミド(pCDNA3/RSV-PHEX-FLB)は、ラウス

肉腫ウイルス (RSV) プロモーターの制御下に全PHEX cDNAを含有した。

【0041】

次いでこの組換えベクターをトランスフェクションによりCOS-1細胞中で一時的に発現させた。5%CO₂雰囲気下に5%のCOSMIC (Hyclone)、100U/mlのペニシリン、および100µg/mlのストレプトマイシンを含有するダルベッコ変性イーグル培地 (DMEM) 中でCOS-1細胞を37℃において成長させた。リン酸カルシウム-DNA共沈手順を使用して、COS-1細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションの次の日に、血清を含有する培地を、2.5µg/mlのインスリン、17.5µg/mlのトランスフェリン、2µg/mlのエタノールアミン、100µg/mlの大豆トリプシンインヒビターおよび10µg/mlのアプロチニンを補充したDMEMから成る合成培地と交換した。最後に、酪酸ナトリウムを合成培地に10mMの濃度に添加して、RSVプロモーターを担持するプラスミドの発現を増強した。48時間後、細胞を収集し、膜をKorth他 (1977) の手順に従い調製した。

【0042】

プラスミドpCDNA3/RSV-PHEX-FLBを、また、LLC-PK1細胞中でCaPO₄沈降法によりトランスフェクトした。400µg/mlのG-418を培地に添加することによって、トランスフェクトされた細胞を選択した。アール塩 (Eale's salts)、2mMのL-グルタミン、Hepesおよび5%の胎仔ウシ血清 (FBS)、50単位/mlのペニシリン、および50µg/mlのストレプトマイシンを補充した重炭酸塩緩衝液を含む20mlの培地199を含有する150mmの皿中でG-418耐性細胞を成長させた。細胞をほぼ1週間コンフルエンスまで成長させ、ゴムのポリスマンでこすりことによって収集した。

【0043】

組換えPHEXの可溶性形態の構築および発現

組換えヒトPHEXの可溶性形態を得るために、分泌したタンパク質 (プロオピオメラノコルチンまたはPOMC) のシグナル配列をコードするcDNAをヒトPHEXのエクストドメインのcDNA配列にインフレームで融合することを我々は最初に試みた (第1図、パネルA)。この戦略は、このペプチダーゼファミリーの他のメンバー、すなわち、NEPおよびECEについて首尾よく使用され (Lemay他、1989; Korth他、19

97) は、トランスフェクトされた細胞の粗い内質の中に捕捉されたままである、ミスフォールドPHEXタンパク質を産生した。結局、PHEXのN末端の疎水性膜アンカー中の選択したアミノ酸を置換して、それを切断可能なシグナル配列に変換させることから成る別の戦略を開発した。

【0044】

切断可能なシグナル配列への膜アンカーのトランスフォーメーションはpCDNA3 / RSV / PHEX - FLBプラスミド上で実施した。センスプライマーとしてオリゴヌクレオチド # 5136、5'CTGACAGTGATCGCTCAACAAACAACCAGTCAAGGTCTCTTAAGTCTCCAAG3' およびアンチセンスプライマーとしてオリゴヌクレオチド # 5134、5'GGTTGTTTGTGAGCGATCACTGTCAGGACAAACACGACCAGGGCAATTTCG3' を使用するポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により、部位特異的突然変異 (9コドン) および欠失 (4コドン) を導入した (第1図、パネルB)。生ずるプラスミド (pCDNA3 / RSV / PHEX - MutEと表示する) はPHEXの分泌された形態 (secPHEX) をコードした。

【0045】

次いで、前述したトランスフェクションにより、組換えベクターをCOS - 1細胞中で発現させた。16時間インキュベートした後、培地を回収し、セントリプレブ (Centriprep) カートリッジ (Amicon) を使用する限外濾過 (分子量カットオフ = 30kDa) により濃縮した。LLC - PK₁細胞においてsecPHEXの安定な発現を誘導するために、CaPO₄沈降法によりプラスミドpCDNA3 / RSV / PHEX - MutEをLLC - PK₁細胞中でトランスフェクトした。400 µg / mlのG - 418を培地に添加することによって、トランスフェクトした細胞を選択した。アール塩、2mMのL - グルタミン、Hepesおよび5%の胎仔ウシ血清 (FBS)、100 µg / mlのG - 418、50単位 / mlのペニシリン、および50 µg / mlのストレプトマイシンを補充した重炭酸塩緩衝液を含む20mlの培地199を含有する150mmの皿中でG - 418耐性細胞を成長させた。細胞をほぼ1週間コンフルエンスまで成長させた。

【0046】

secPHEXを産生するために、2.5 µg / mlのインスリン、17.5 µg / mlのトランスフェリン、2 µg / mlのエタノールアミン、100 µg / mlの大豆トリプシンインヒビターおよび10 µg / mlのアプロチニンを補充した199培地から成る合成培地中で、

コンフルエント細胞を4日間インキュベートした。最後に、酪酸ナトリウムを合成培地に10mMの濃度に添加して、RSVプロモーターの制御下にある、secPHEX遺伝子の発現を増強した。4日後、培地を回収し、遠心し、サトコン・マイクロ・ユニット (Sartocon Micro Unit) (Sartorius) を使用する交差流濾過 (分子量カットオフ = 30kDa) により濃縮した。典型的には、secPHEXトランスフェクテッド LLC - PK1細胞からの600mlの粗製使用済み培地を30mlに濃縮した後、精製のためにイオン交換カラム上に負荷した。

【0047】

イムノブロットングによりsecPHEXを特性決定した。簡単に述べると、濃縮した培地からのタンパク質を7.5%のSDS - PAGE上で分割し、0.45 μ mのニトロセルロース膜上に移した。5% (w/v) のインスタント脱脂粉乳 (Carnation) を補充したTTBS (0.05%のTween - 20を含有するTris緩衝化生理食塩水) 中で、膜を1時間インキュベートした。膜をTTBSで急速に洗浄し、1% (w/v) のBSAを補充したTTBS中の抗 (ヒトPHEX) モノクローナル抗体 (13B12) の1:200希釈物とインキュベートした。膜を洗浄し、化学発光試薬 (NEN) を使用してプロセッシングした。

他のシグナルペプチドコーディング配列は細胞外空間におけるPHEXの分泌を適切に支配する限りにおいて、それらを使用することができる (使用する宿主細胞、組織または生物に依存して培地または分泌流体)。

【0048】

免疫沈降アッセイ

まずプロテインA - セファローズビーズ (Pharmacia) をウサギ抗マウスIgGで飽和し、次いでハイブリドーマ上清からのマウス免疫グロブリンで飽和することによって、免疫沈降アッセイを実行した。PBS中の洗浄した後、免疫沈降 (IPP) 緩衝液 (20mMのTris - HCl、pH7.4、100mMのNaCl、2%のトリトンX - 100、0.2%のSDS、および0.2%のBSA) 中で希釈したsecPHEX (40 μ gの全タンパク質) を産生する LLC - PK1細胞の使用済み培地のアリコート中で、これらのビーズをインキュベートした。ビーズを遠心によりペレット化し、IPP中で2回洗浄し、PBS中で1回洗浄し、イムノプロット分析前に、電気泳動試料中でプロテインA - セファロ

ーズに結合したタンパク質を非共有結合方式で沸騰させることによって、イムノアフィニティー支持体に結合したsecPHEXの存在をアッセイした。

【0049】

可溶性形態のPHEXの精製

1) イオン交換クロマトグラフィーによるsecPHEXの精製

50mMのNaClを含有する50mMのリン酸ナトリウムpH6.6と前以て平衡化したSP - セファローズカチオン交換カラム (Pharmacia) 上に、濃縮した培地を負荷した。カラムを10カラム体積の同一緩衝液で洗浄し、secPHEXを50mM ~ 1MのNaClの勾配で溶離した。前述したように、画分をSDS - PAGEおよびイムノプロットングにより分析し、secPHEXを含有する画分を銀染色により可視化した。

【0050】

2) イムノアフィニティークロマトグラフィーによるsecPHEXの精製

抗体4C5aをアフィゲル (Affigel) (BioRad) に結合することによって、イムノアフィニティークラムを構築した。免疫グロブリンを4C5腹水からプロテインGカラム (Amersham - Pharmacia) 上で精製し、供給業者 (BioRad) が推奨するようにアフィゲルマトリックスにカップリングさせた。2mgのIgGを4mlのカラム中のマトリックスに結合させた。カラムを供給業者が推奨するように洗浄し、20mMのTris - HCl、pH8.0中で平衡化させた。15mlの濃縮したLLC - PK1培地のアリコートのカラム上に一夜循環させた。カラムを5体積の平衡化緩衝液で洗浄した。タンパク質を0.1MのトリエチルアミンpH11.5で溶離し、直ちに0.2体積の1Mのリン酸塩緩衝液pH6.5の添加により中和した。画分中のタンパク質をSDS - PAGEおよびイムノプロットングにより分析した。

【0051】

PHEXを含有する刷子縁膜の調製

LLC - PK1細胞系統は培養において極性化単層を形成する。以前に記載されたように (Blais他、1987)、刷子縁 (頂端) 膜BBMをLLC - PK1細胞ホモジネートから精製した。簡単に述べると、細胞膜を超音波処理により崩壊させた。4 において一定速度で攪拌しながらCaCl₂を13mMの最終濃度に添加することによって、非頂端膜を沈降させた。950 × gにおいて10分間、次いで35,000 × gにおいて30分間

順次に遠心することによって、BBMを分画した。BBMを含有する最後ペレットを50 mMのTris - HCl、pH7.5で2回洗浄し、同一緩衝液の中に再懸濁させた。BBM中のsecPHEXの存在をイムノブロットングにより確認した。

【0052】

PHEXの活性についてのアッセイ

150mMのNaClおよび基質として10 μ gのPTHrP107 - 139を含有する、200 μ lの体積の50mMのMES (2 - (N - モルホリノエタンスルホン酸、pH6.5) 中で、2 μ gのタンパク質を含有する精製したPHEXのアリコート³⁷ において15分間インキュベートした。インキュベーション期間後、トリフルオロ酢酸を0.1%の最終濃度に添加することによって、加水分解を停止した。214nmにセットしたUV検出器を使用してC18 μ ボンダパック (Bondapak) 分析カラム (Waters) 上の逆相高性能液体クロマトグラフィー (RP - HPLC) により、ペプチド産物を実行した。0.4ml / 分の流速で5%B ~ 85%Bの線形勾配により45分でペプチドを分割した [移動相A = 0.1%のトリフルオロ酢酸 ; 移動相B = 80%のアセトニトリル (CH₃CN) 、0.1%のトリフルオロ酢酸] 。

【0053】

結果

モノクローナル抗体の産生

限界希釈法により、ELISAアッセイにおいてPHEX₁₂₁₋₂₉₄ に結合し、ウェスタンブロットアッセイ (第3A図) において組換え全長PHEXを認識し、そしてsecPHEXを免疫沈降させる (第3B図) 能力について、ハイブリドーマを試験した。抗体15D7は免疫沈降、イムノブロットングおよびまた免疫蛍光実験 (結果は示されていない) においてすぐれた結果を示した。この抗体をトランスフェクトした細胞中のPHEXまたはsecPHEXの発現、または組織中のPHEXの発現をモニターするために選択した。PHEX特異的抗体を探求するかぎりにおいて、PHEXの他のセグメントがPHEXに対して特異的である場合、これらのセグメントを抗原として使用することができる。

【0054】

COS - 1細胞中の膜結合組換えPHEXの発現

RSVプロモーターから下流に挿入されたPHEXの全コーディング配列を含有する発現ベクターで、COS-1細胞をトランスフェクトした。このベクターをpCDNA3/RSV-PHEX-FLBと呼ぶ(方法参照)。細胞をトランスフェクション後16時間培養し、膜画分を方法において説明したように調製した。ウェスタンブロットにおいてモノクローナル抗体15D7を使用して、PHEXの発現をモニターした。第4図において見られるように、pCDNA3/RSV-PHEX-FLBベクターでトランスフェクトした細胞の膜画分(レーン2)において、見掛けの分子量105,000に対応する移動性で移動するバンドが観測された。このバンドは対照細胞の抽出物の中に存在しない(レーン1)。

【0055】

組換えPHEXの可溶性形態の産生

次に、トランスフェクトした真核細胞からのPHEXの可溶性形態および活性形態の分泌を促進するために、遺伝子工学技術を使用することができるかどうかを我々は決定しようとした。明らかのように、この種の酵素は、洗浄剤を使用しないで培養した細胞のインキュベーション培地から容易に精製することができ、それ以上の構造の研究およびインヒビターのスクリーニングのための非常に有効である。また、それは注射可能な治療剤としてまたは骨の鉱物化または骨の治癒の速度を増加するために局所的用途において究極的に使用できるであろう。

【0056】

PHEXはクラスIIの内在性膜タンパク質である。クラスIIの膜タンパク質は、それらのアミノ末端付近に、粗面内質細網の膜を通してタンパク質を転位させるシグナルペプチドとして、そして細胞原形質膜の中にタンパク質を定着させるトランスメンブランドメインとして作用する、ユニークな疎水性ペプチドを有する。切断可能なシグナルペプチドを有しかつ追加の膜スパニング疎水性配列(また、膜透過停止配列と呼ばれる)により膜の中に定着されるクラスI膜タンパク質と異なり、クラスII膜タンパク質は疎水性トランスメンブランドメインを欠失させることによって可溶性形態に容易に変換することができない。

【0057】

クラスII膜タンパク質において、定着セグメントはまたシグナルペプチドを除

去し、これによりPER中のタンパク質の転位および細胞表面へのその輸送を妨害する。理論的には、膜結合クラスIIタンパク質を可溶性形態に変換する2つの異なるアプローチが存在する：1) タンパク質の細胞外ドメインを異種切断可能なシグナルペプチドに融合することができる；および2) トランスメンブランダドメインの変化を導入して、シグナル/アンカーの組合わせを切断可能なシグナルペプチドに変換することができる。両方の戦略はNEPの可溶性形態の産生に首尾よく使用された (Lemay他、1989 ; Lemire他、1997)。

【0058】

この研究において、ヒト酵素の完全なエクトドメインをコードする配列をPOMCシグナルペプチドとインフレームで融合することによってまずPHEX分泌ベクターを構築し (第1A図)、これらの配列はRSVプロモーターの制御下にある。PHEX免疫反応性物質をトランスフェクトした細胞の細胞抽出物において検出できたという事実にかかわらず、発現レベルは低く、酵素は分泌培地の中に見出すことができなかった (結果は示されていない)。細胞関連PHEX免疫反応性物質をエンドグルコシダーゼで消化し、ウェスタンブロットにより分析したとき、それはエンドH感受性ことが見出され、PERにおいて組換えタンパク質が保持されることが示された (結果は示されていない)。

【0059】

ライン2上に示す下線が引かれている配列によりトランスメンブラン領域の一部 (第1B図中の下線が引かれている配列：配列1) を置換すると、トランスフェクトしたCOS-1細胞から可溶性形態のPHEXが分泌された (結果は示されていない)。トランスメンブランとエクトドメインとの間の連結部における配列LFLVを欠失させることによって、収率はさらに増加した (パネルB：配列3)。第4図 (レーン4) は、トランスフェクトしたCOS-1細胞によりインキュベーション培地中で分泌された組換えタンパク質の量を補充した。同一ベクターを方法において記載するようにLLC-PK1細胞においてトランスフェクトされ、そして安定なトランスフェクタントをそれらのG-418耐性について選択した。

【0060】

G-418耐性細胞のプールは、ウェスタンブロットングにより見られるように

、実質的な量のsecPHEX (600 µg/L) を分泌することが見出された (結果は示されていない)。secPHEXはエンドHに対して耐性であり、多分それがゴルジ装置を通して移行する間に、それが末端糖を獲得したことが示された (結果は示されていない)。次いでLLC - PK1細胞の培養物により分泌された酵素をイムノアフィニティーまたはイオン交換クロマトグラフィーにより精製することができるであろう。

【0061】

イオン交換クロマトグラフィーによりsecPHEXの好ましい精製法

secPHEXトランスフェクテッドLLC - PK1細胞から濃縮した培地をSP - セファローズカラム上に負荷し、そして方法に記載されているように、タンパク質を溶離した。溶出液を280nmにおいてモニターすると、1つの主要なタンパク質ピークが明らかにされ (結果は示されていない)、これはイムノプロットングによりsecPHEXを含有することが示された (第5図)。塩化ナトリウムを含有する画分を7.5% SDS - PAGE上で分析し、銀染色によりゲル中のタンパク質を検出すると、secPHEXは画分の中に存在するタンパク質の90%より多くを表すことが示された。典型的には、1.25mgの純粋なsecPHEXが600mlの非濃縮培地から得られた。

【0062】

secPHEXが使用済み培地から回収されたが、現今、それらの器官がミルク中の分泌産物としてPHEXを産生するように操作されている、反芻動物のような宿主を得ることが可能である。組織中で発現可能な組換えベクターは、使用済み培地中の塩化ナトリウムの産生に導くものに類似する構築物をインサートとして含み得る。この構築物に対する修飾は当業者によく知られている (プロモーター、シグナルペプチド、およびその他)。PHEXを産生するための組成物および方法の中に、その組換えベクターを含める。

反対に、PHEXをサイレンスとすることが必要である場合、本発明の組成物および方法の中に抗PHEX分子を含め、それらの投与によりPHEX活性を阻害する。

【0063】

イムノアフィニティーによるsecPHEXの精製

カラムから得られた画分のイムノプロット分析により、secPHEXは保持される

ことが示された。しかしながら、クーマッシーブルー染色により、他のタンパク質もまた画分の中に存在することが示された。165mlの非濃縮LLC - PK1培地から得られるsecPHEXの量は3 μ gのタンパク質として評価された。

【0064】

secPHEXの活性

方法に記載する条件下にsecPHEXで消化したPTHrP107 - 139をHPLCで分析すると、secPHEXはこのペプチドを分解することが明らかになった。クロマトグラム上のPTHrP107 - 139のピークは、わずかに15分のインキュベーションにより、そのもとの表面の15%に減少した(第6図)。代謝物に対応するピークはクロマトグラム上に出現した。この酵素活性は、0.001MのEDTAおよび0.001Mの0 - フェナントロイン、すなわち、金属ペプチダーゼの2つの一般的インヒビター、により完全に阻害された。活性はまたアセテート、HEPESおよび4.0~8.5のpH範囲をカバーするTris緩衝液において観測された。リン酸塩緩衝液は酵素活性を阻害した(第6図)。

【0065】

実施例

実施例1: 骨中の組換えsecPHEXの天然基質を同定するためのその使用

PHEXを骨芽細胞中で発現させ、そしてその発現は培養した骨芽細胞中で(Beck他、1997a; Du他、1996a; GuoおよびQuarles、1997a)そして発生の間に(Ruchon他、2000)細胞外マトリックスの鉱物化に関係づけられる。これらの観察が示唆するように、骨は関係するPHEX発現部位であり、そしてPHEXの突然変異と異常な骨芽細胞仲介鉱物化との間に潜在的関係が存在する。

【0066】

こうして、骨芽細胞仲介鉱物化のプロセスを調節する内因的または外因的因子を鉱物化するように、PHEXは骨芽細胞において機能することができる。この仮説の支持において、Hypマウスの培養した骨芽細胞におけるPHEX機能の喪失は、in vitroにおいて細胞外マトリックスの鉱物化を阻害する1またはそれ以上の因子の蓄積に関連することを最近の報告は示唆している(Xiao他、1998)。組換え可溶性PHEXの入手可能性は、1系列の実験、例えば、後述する実験におけるPHEXの1

またはそれ以上の生理学的骨基質の同定を促進する。

【0067】

Hypマウスの骨を解剖し、結合組織を分離し、筋肉を液体窒素中で凍結し、凍結乾燥する。次いで骨を破碎して粉末にし、トリフルオロ酢酸(TFA)、ギ酸および1MのNaClを含有する強く酸性の溶液で抽出する。この溶液の組成は、例えば、すべてのプロテアーゼ活性を不活性化し、大きい分子量のタンパク質の可溶化を回避するように選択する。次いで酸性抽出物を凍結乾燥し、生理的緩衝液pH約7.0の中に再懸濁したほぼ100 µgの全ペプチドを含有するアリコートをし、前述したように、イオン交換クロマトグラフィーまたはイムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製した1~10 µgのPHEXで消化する。インキュベーション前に酸性または熱処理により酵素調製物を不活性化し、対照実験を平行して実施する。

【0068】

次いで試料の中に含有されるペプチドをC18 µ Bondapakカラム上の逆相HPLCにより分離し、0.1%のTFAおよび可変濃度のアセトニトリル(すなわち、0~約80%)を含有する緩衝液を使用する。活性または不活性化PHEXで消化したペプチドのクロマトグラムを比較する。Hypマウスから採り、不活性化PHEX調製物とインキュベートした骨ペプチドの混合物は、PHEX基質を含有するであろう。しかしながら、同一混合物を活性PHEXとインキュベートすると、PHEX基質をペプチド代謝物質に切断することができる。クロマトグラムを比較すると、PHEX基質およびその代謝物質に対応するピークを同定することができる。次いで、このピークを収集し、質量分析および/または自動化エドマン配列分解により同定する。

また、Hypマウス骨芽細胞の培養物から採ったコンディショニングした培地を使用する同様な戦略により、PHEX基質の同定を実施することができる。

【0069】

あるいは、組織(例えば、骨)または血清の粗製抽出物からPHEX基質を精製するためのアフィニティー試薬として、クロマトグラフィーの支持体上に固定化したPHEXの不活性化可溶性形態を使用することができる。C末端のエクステンションの付加により、酵素活性を妨害されないで、ネプリシンファミリーからの細胞

表面金属ペプチダーゼを修飾することができる (Howell他、1995 ; Yang他、1995)。NEPについて以前に説明されたように (Howell他、1995)、インフレームで合成オリゴヌクレオチドを融合することによって、ほぼ20~25アミノ酸残基の追加のC末端のペプチドにより延長された、PHEXの可溶性形態 (ここでsecPHEX - EC) を構築する。

【0070】

追加の配列をシステイン残基により終止させて、例えば、活性化チオール - セファローズ4B [アガロース - 2 - ピリジルジサルファイド] (Pharmacia、Fine Chemical AB、Uppsala、Sweden) に対する効率よいカップリングを可能とする。例えば、secPHEXの産生に使用するLLC - PK1細胞系を使用して、secPHEX - ECを産生する。secPHEXの精製について記載した条件に類似する条件を使用して、イオン交換クロマトグラフィーまたはイムノアフィニティークロマトグラフィーにより、組換えペプチドを精製する。画分をSDS - PAGEにより分析し、クーマッシーブルー染色により純度を確認する。

【0071】

精製された組換えタンパク質を固相に結合させるために、チオール - セファローズ樹脂を再水和してほぼ1mlのゲル体積を得る。このゲルを緩衝液A (0.1MのBis - Tris、0.5MのNaCl、pH7.0) と平衡化し、一定速度で攪拌しながら4 においてほぼ3mgのsecPHEX - ECと緩衝液A (2~4ml) 中で一夜インキュベートした。次いでスラリーをまずほぼ1mlの緩衝液B (0.1MのBis - Tris、5mMのDTT、pH7.0) で洗浄し、次いで緩衝液Aでよく洗浄した。少量のゲル上のブラッドフォード (Bradford) アッセイ (BioRad) により、支持体に結合したタンパク質の量を測定する。

【0072】

PHEXインヒビターをスクリーニングするための固相試薬として、固定化secPHEX - ECを使用する。位置582に触媒のグルタミン酸残基上にそれをバリンに変化する突然変異を担持する形態のsecPHEX - ECを結合することによって、この物質の酵素的に不活性な変異型をまた調製する。NEPのコーディング配列中の同様な突然変異は、それにもかかわらず、インヒビターおよび基質に対する完全な結合活

性を保持する、触媒的に不活性な酵素を生ずることが示された (Devault他、1988)。粗製組織抽出物中のPHEXペプチド基質を結合し、精製するために、このようなアフィニティー試薬を使用する。同一アプローチを使用して、存在する場合、レセプターを見出すことができる。また、インヒビター化合物のスクリーニングを実行することができるが、活性PHEXは好ましいことがある。

【0073】

前述したように調製した組織抽出物を緩衝液、例えば、0.1MのBis-Tris、pH7.5中で一定速度で攪拌しながら1mlのアフィニティー樹脂と4 においてインキュベートする。同一結合緩衝液中で洗浄した後、緩衝液のpHを上昇または低下させおよび/またはイオン強度を増加することによって、結合したペプチドをゲルから溶離することができる。多数の他の突然変異をもくろむことができ、その目的はグルジシンに対して特異的であるグルタミン酸残基の置換または排除を維持することである。例えば、バリンが首尾よく置換アミノ酸として試験されたが、他のアミノ酸、例えば、疎水性、好ましくは脂肪族、アミノ酸を同等に使用することができる。

【0074】

実施例II： 酵素アッセイ

例えば、PTHrP107-139の切断部位をスパンする10アミノ酸残基から成るペプチドを固相ペプチド合成法により合成し、PHEX基質として使用する。LC-MS器具で見出されるような、液体試料入口を装備し、分離をインラインまたはオフラインで達成する、質量分析器を使用して、酵素産物をアッセイすることによって、切断部位を決定する。デカペプチド(10 μ g)を精製したPHEX(1~10gの全タンパク質)の存在下にMES pH6.5中で37 において60分間インキュベートする。TFAを0.1%の最終濃度で添加して反応を停止させる。C18 μ Bondapakカラム(Waters)を使用して、代謝物質を分析する。例えば、0.1%のトリフルオロ酢酸中の0~40%のアセトニトリルの45分の線形勾配で1.0ml/分の速度で、代謝物質を分割することができる。

【0075】

214および254nmにおける吸収をモニターすることによって、溶離したペプチド

を検出する。デカペプチドは異なる保持時間で溶離される2つの短いペプチドに切断される。これらの2つのペプチドに対応するピーク画分を収集し、それらの分子量を質量分析により測定して切断部位の位置を同定する。いったんPHEX基質として確認されると、前述の合成ペプチドは、例えば、蛍光基、色素形成基または放射性原子を担持するアミノ酸誘導体を組込むように、修飾することができる。次いで、実施例IIIに記載されているように、組織抽出物中のPHEXをさらに定量しかつ特性決定するために、これらのペプチドを使用して、高速、感受性、耐久力の大きい酵素アッセイを構築する。

【0076】

実施例III：クエンチドフルオレセント基質についてのスクリーニング

実施例IIにおいて同定されたペプチドを使用して、PHEXの内部的にクエンチされたフルオレセントペプチド基質を設計し、合成する。小さいペプチドライブラリーを一方の極端に蛍光体および他方にクエンチャーを有する、小さいペプチドライブラリーを調製する(Meldal、1998)。記載された戦略を使用して基質を同定することができる(Apletalina他、1998)。各ヘキサペプチドライブラリーについて、1つの位置に1つの残基の同一性は一定に止まるが、残部はランダム化されている(合計 $6 \times 20 = 120$ の個々のライブラリーについて)。各ライブラリーは 3.2×10^6 の異なる膜から構成されており、そしてヘキサペプチドに沿った一定残基の位置およびその同一性の両方により同定される。

【0077】

PHEX酵素の精製された調製物を各ライブラリーに添加し、蛍光を記録する。データを体制化して、ヘキサペプチドに沿った各位置について最も蛍光を産生するライブラリーを同定する。この配置は、ヘキサペプチドに沿った各位置において重要な残基の同定を示唆する。最良の示唆を表すヘキサペプチドを調製し、同様な方式で試験する。この設定から、最良の蛍光を有するヘキサペプチドを選択する。化合物の組合わせライブラリー中のインヒビターを同定する、高い処理量のスクリーニングを構成するために、このアッセイは有用であることがある。

【0078】

実施例IV：治療的用途における組換えPHEXタンパク質の使用

ネズミHypモデルは、ヒトX染色体性低リン酸塩血症(XLH)、腎性リン酸塩(Pi)喪失を引き起こす遺伝性疾患、重度のくる病および軟骨化症の特徴を再現する。PHEX遺伝子中の突然変異による腎性リン酸塩消耗の存在は、ホスファトニンと呼ぶ、まだ同定されていないリン酸塩尿性ホルモンをこのエンドペプチダーゼは分解すること示唆する(Kumar, 1997)。この仮説を直接試験するために、近位管状細胞の正常の特徴を表す、一次マウス近位管状細胞培養物(MPTC)を調製する。

【0079】

MPTC培養の最後の48時間の間におけるHAMF12/DMEM培地(1mMのPi)中の10%のHypマウス血清の存在は、投与量および時間に依存する方法で、正常マウス血清と比較したとき、45.7+/-3.9%だけPi吸収を減少させることが以前に見出された(Lajeunesse他、1996)。循環に到達しかつ腎性リン酸塩再吸収を阻害する因子の解放および/または変更は、Hypマウス骨芽細胞におけるPHEX遺伝子の欠陥が関係する場合、PHEXの精製した調製物で血清を前処理することによって、Pi吸収に対するHypマウス血清の作用を壊滅することができる。次いで、MPTC細胞によるリン酸塩の吸収を測定することによって、Hypマウス血清に対するPHEX(1~10µgの精製された組換えsecPHEX)の作用をモニターする。

【0080】

対照実験は、同様に条件下であるが、熱または酸不活性化PHEXと血清試料をインキュベートすることを包含する。PHEX処理は正常リン酸塩吸収を回復することが見出された場合、こうしてまず動物モデル(例えば、Hypマウス)において、次いでX染色体性低リン酸塩血症くる病で特徴づけられる病理学的状態を有する患者において、正常リン酸塩レベルを回復するための治療剤として組換え可溶性PHEXを使用することができる。

稀な障害である腫瘍形成性低リン酸塩血症軟骨化症を患う患者は、X染色体性低リン酸塩血症くる病の患者で見出されるものに類似する異常を表す。したがって、可溶性PHEX酵素の投与により、これらの患者における正常リン酸塩血を再確立することができる。

【0081】

実施例V： PHEX抗体の産生および使用

本研究において示されるように、PHEX cDNA配列の知識を使用して特異的抗体を発生させることができる。例えば、ペプチダーゼ間の相同性が低い領域（アミノ酸残基121～294）を使用して、cDNAの翻訳から推定された配列を有するペプチドを合成することができる。あるいは、例えば、GSTに融合したcDNAの細菌的に発現されたフラグメントを精製し、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を産生するためにウサギまたはマウスに注射することができる。これらの抗体または誘導された「診断試薬」は、通常標識化抗体を含んでなり、下記の目的で使用することができる：

【0082】

- ペプチダーゼが機能しているペプチド作用性経路を免疫組織化学的に同定する；
- 生物学的流体またはバイオプシーの試料についてイムノブロットニングまたは免疫組織化学によりPHEXの生理病理学を研究する；
- PHEXインヒビターを同定する高い処理量のスクリーニングアッセイを構成する。これは、例えば、PHEXを固体支持体に結合する抗体を使用することによって、実施することができる；

【0083】

- 1つの組の条件においてPHEXに選択的に結合することができる抗体を同定し、そして典型的にはPHEXを変性しないで大きいpHまたは塩濃度の変化を包含する、他の条件においてそれを解放することによって、免疫沈降またはアフィニティークロマトグラフィーにより前記抗体でPHEXを精製する；
- PHEX活性をブロックする抗体を同定し、それらの抗体を治療剤として使用する。実施例IIに記載されているようにin vitro酵素アッセイに抗血清または腹水を添加し、PHEX活性の阻害について検査することによって、ブロッキング抗体を同定することができる。次いでブロッキング抗体を正常および疾患のモデル動物に注射して、in vivo作用について試験することができる。

【0084】

実施例VI： 組換え可溶性PHEX酵素を産生する別法

上に示したように、組換え活性secPHEX - ECは哺乳動物細胞におけるPHEX cDNAの発現により得ることができる。このファミリーの他のメンバー、ネプリシンを使用する過去の実験から (Devault他、1992 ; Fossiez他、1992 ; Ellefsen、1999)、適当な発現ベクター中のPHEX cDNAのクローニング後、また、他の発現系において発現を実行することができる。これらの発現系はバキュロウイルス / 昆虫細胞または幼虫系およびピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) をベースとする酵母系を包含する。

【0085】

組換えPHEX酵素の産生は、タンパク質の天然に存在する膜結合または可溶性形態、またはこの酵素の遺伝子操作された可溶性形態を包含する。後者は、以前に実施されたように (Lemay他、1989a)、細胞質ゾルまたはトランスメンブランドメインを切断可能なシグナルペプチド、例えば、プロオピオメラノコルチンのそれと置換するか、あるいは以前に実施されたように (Lemire他、1997b)、遺伝学的操作により非切断可能シグナルペプチド膜アンカードメインを切断可能なシグナルペプチドに変換するか、あるいは他の研究において実施されたように、天然に存在する可溶性NEP様酵素、例えば、NL - 1のアミノ末端ドメイン (イニシエーターメチオニンからアミノ酸残基300まで) にPHEX酵素のエクトドメインを融合することによって得ることができる。

【0086】

実施例VII: インヒビターの同定

合成ライブラリー、ビオタ抽出物、現在の文献、から、そしてX線結晶学および置換基の活性の関係を使用して、合理的に設計されたインヒビターから、インヒビターを同定することができる。前述の酵素試験を使用して、各分子または抽出画分を阻害活性について試験する。既知の手順に従い、最大の阻害に関係する分子をさらに試験してその薬理的および毒物学的特性を決定する。いくつかのこの分野において認識されている *in vitro*法を使用して、酵素的PHEX分解の *in vitro*阻害をスクリーニングすることができる。

【0087】

これらの方法において、ペプチド (「基質」) をPHEX酵素に暴露する。基質は

骨に関係するペプチド、任意の他のファミリーメンバーにより切断されることが知られているペプチドまたはPHEX酵素による分解に対して感受性であるペプチドの基質であることができる。ペプチドを分解すると、特異的代謝物質の遊離する。遊離した代謝物質（または維持されたペプチド）の量をモニターして、酵素により基質の分解度を決定することができる。すなわち、PHEX酵素インヒビターを試験して、特定の酵素による特定の基質の分解により遊離する代謝物質の量を減少させる、それらの性向を決定することができる。

【0088】

一般に、これらのin vitroモデルは、試験試料（PHEX酵素インヒビターまたはペプチド基質）および対照試料（PHEXインヒビターを含まない基質を含有する）から成る。各試料を特定のインヒビターに暴露し、次いで試料を比較して、試験試料よりも有意に多い代謝物質（またはすくない基質）が対照試料の中に存在するかどうかを決定する。試験試料よりも有意に多い代謝物質（またはすくない基質）が対照試料の中に存在する場合、被検化合物は1またはそれ以上の実施例のインヒビターである。1つのこのような方法は前述された。

【0089】

ネプリシン（NEP）のインヒビターとしてZn金属ペプチダーゼについて網羅的な文献が入手可能である（Roques、1982a；Roques、1982b；Ondetti、1984；Roques、1985；Roques、1986；Chipkin、1986；Thorsett、1987；Rich、1990；Vallée、1990）。Zn⁺⁺カチオンを配位することができる多数の既知の官能基の中で、チオール、カルボキシル、ヒドロキシアミルおよびホスホリル基のすべては首尾よくACEおよびNEPインヒビターの開発において使用されてきている。PHEX酵素（PHEXインヒビター）の阻害活性を表示する、すべてのこのような分子は、本発明に包含される。

【0090】

上に示したように、PHEXは同様な特性、例えば、同一インヒビターに対する感受性および同一基質をプロセスする能力を共有する酵素ファミリーのメンバーである。PHEX酵素インヒビターおよびそれらの製造方法は文献に記載されており、そして本発明の方法において有用である。このようなインヒビターは下記の文献

に記載されており、これらすべては引用することによって本明細書の一部とされる：

【0091】

米国特許第4,380,350号 (Sarantakis、1983年4月19日発行)；米国特許第4,432,242号 (Wilkinson他、1983年12月27日発行)；米国特許第4,474,795号 (Greenberg他、1984年10月2日発行)；米国特許第4,504,492号 (Wilkinson他、1985年3月12日発行)；米国特許第4,513,009号 (Roques他、1985年4月23日発行)；米国特許第4,514,391号 (Gordon他、1985年4月30日発行)；米国特許第4,528,296号 (Vecchiotti他、1985年7月9日発行)；米国特許第4,552,866号 (Delaney他、1985年11月12日発行)；米国特許第4,567,198号 (Delevallee他、1986年1月28日発行)；米国特許第4,610,816号 (Berger他、1986年9月9日発行)；米国特許第4,611,002号 (Ondett他、1986年9月9日発行)；米国特許第4,618,708号 (Roques他、1986年10月21日発行)；

【0092】

米国特許第4,636,522号 (Gordon他、1987年1月13日発行)；米国特許第4,670,541号 (Delaney他、1987年6月2日発行)；米国特許第4,681,960号 (Kakimoto他、1987年7月21日発行)；米国特許第4,721,726号 (Berger他、1988年1月26日発行)；米国特許第4,722,810号 (Delaney他、1988年2月2日発行)；米国特許第4,939,261号 (Ksander他、1990年7月3日発行)；米国特許第5,096,925号 (Ksander他、1992年3月17日発行)；米国特許第5,098,934号 (Veverth他、1992年3月24日発行)；米国法定発明登録第11642号 (Floyd他、1989年6月6日発行)；英国特許公開第8111322号 (Wilkinson他、1981年11月4日発行)；英国特許公開、Wilkinson他、1983年11月21日発行)；

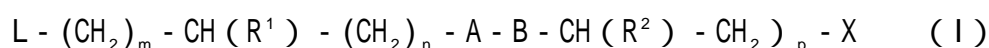
【0093】

欧州特許公開第161,769号 (Delaney他、1985年11月21日発行)；欧州特許公開第341,081号 (Kwamura他、1989年11月8日発行)；欧州特許公開第474,533号 (Shibhara他、1992年3月11日発行)；PCT特許公開第92/03410号 (Neustadt他、1992年3月5日発行)；Fournie - Zaluski他、Differential Recognition of 'Enkephalinase' and angiotensin - Converting Enzyme by New Carboxyla

lkyI Inhibitors、31 Life & L 2947-2954 (1982); Mimura他、A Novel Class of Enkephalinase Inhibitors Containing a C-Terminal Sulfo Group、35. J. Med. Chem. 602-608 (1992)。

【0094】

本発明の方法において有用な好ましいPHEX酵素インヒビターは式(1)の一般構造を有する化合物およびそれらの薬学上許容される塩である：



式中、

(1) Lは-S-R³または-C(=O)-R⁴であり、ここでR³は水素または-C(=O)-R⁵であり、ここでR⁵は低級アルキルであり、そしてR⁴はヒドロキシまたは-NHOHである；

(2) R¹は水素、低級アルキル、アリール、アリールアルキルである；

(3) AはC(=O)-、-NH-C(=O)-、または-N(R⁶)であり、ここでR⁶は水素または低級アルキルである；

【0095】

(4) Bは-NH-、-O-、-S-、または-C(=O)-である；

(5) R²は水素、低級アルキル、アリール、アリールアルキル(好ましくはフェニルメチル)である；

(6) Xは-C(=O)-NH-R⁷または-C(=O)-O-R⁷であり、ここでR⁷は水素、低級アルキル、フェニル、またはアリールアルキルである；

(7) mは0~約2である；

(8) nは0または1(好ましくは0)である；そして

(9) pは0~約4(好ましくは0または1)である。

【0096】

他の好ましいPHEX酵素インヒビターは式(II)の一般構造を有する化合物およびそれらの薬学上許容される塩である：



式中、

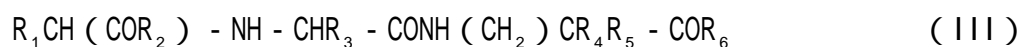
(1) L、R¹、A、m、およびnは式(1)に記載した通りである；

(2) Zは -NH-、-O-、-S-、-C(=O)-、またはゼロである；

(3) R⁷は炭素環式環または複素環式環、好ましくはベンゼンスルホン酸、ピリジル、またはモルホリニルである。

【0097】

他の好ましいPHEX酵素インヒビターは、米国特許第4,721,726号 (Berger、1988年1月26日発行、に記載されており、式(III)の一般構造を有する化合物およびそれらのラセミ体、鏡像異性体およびジアステレオマーおよびそれらの薬学上許容される塩である：



式中、

【0098】

R₁は1~6個の炭素原子を有するアルキル、アダマンチルメチル、4~8個の炭素原子を有するシクロアルキルメチル、またはA-X_m-C_nH_{2n}-であり、ここでXは酸素または硫黄であり、Aは基Y置換されていてもよいフェニルであり、ここでYはハロゲン、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、1~6個の炭素原子を有するアルコキシ、1~6個の炭素原子を有するアルキル、2-および3-フラニル、2-および3-チエニル、またはフェニル(これはハロゲン、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、1~6個の炭素原子を有するアルコキシまたは1~6個の炭素原子を有するアルキルで置換されていてもよい)、ベンジル(そのフェニル環はここにおいて定義した基Yで置換されていてもよい)、1-および2-ナフチル、2-および3-フラニルまたは2-および3-チエニルである；mは0または1である、そしてnは0、1、2、3、または4である；

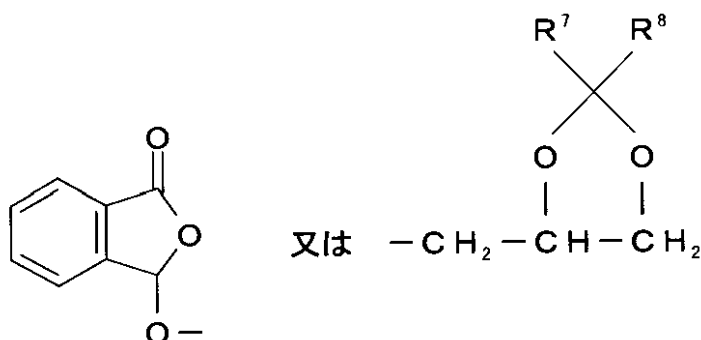
【0099】

R₂およびR₆は同一であるか、または異なり、そしてヒドロキシ、1~8個の炭素原子を有するアルコキシ、B-X_m-C_nH_{2n}-O-であり、ここでBはフェニル(これはここにおいて定義した基Yで置換されていてもよい)、1-および2-ナフチルであり、X、m、およびnはここにおいて定義した通りであり、ただしn=0、m=0であるとき、R²およびR⁶は3~8個の炭素原子を有する-OCH₂OCO-アルキル、-OCH₂CO-フェニル(そのフェニル環はここにおいて定義した基Yで置換されていてもよい)

もよい)、1-グリセリル、

【0100】

【化1】



【0101】

であり、ここでR₇は水素、1~6個の炭素原子を有するアルキル、またはフェニル（これはここにおいて定義した基Yで置換されていてもよい）であり、そしてR₈は水素または1~6個の炭素原子を有するアルキルである；

R₂はまた -NR₇R₈であることができ、ここでR₇およびR₈はここにおいて定義した通りである；

【0102】

R₃は1~6個の炭素原子を有するアルキル、4~8個の炭素原子を有するシクロアルキルメチル、2-および3-チエニルメチル、2-および3-フラニルメチル、1-および2-ナフチルメチル、またはベンジル（そのフェニル環はここにおいて定義した基Yで置換されていてもよい）である；

R₄はD-C_nH_{2n}O_m-であり、ここでDは水素、1~4個の炭素原子を有するアルキルまたはフェニル（これは基Z置換されていてもよく、ここでZはハロゲン、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、1~6個の炭素原子を有するアルコキシまたは1~6個の炭素原子を有するアルキル）である；ここでmおよびnはここにおいて定義した通りである；

【0103】

R₄はまた -NR₅COR₇（ここでR₅およびR₇はここにおいて定義した通りである）

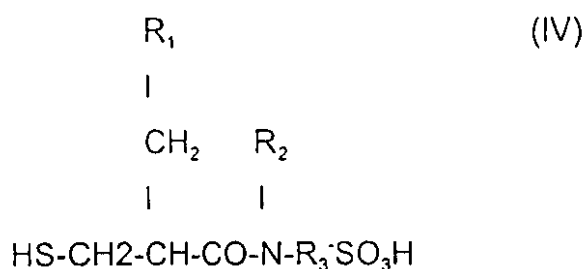
、および $\text{NR}_5\text{CO}_2\text{R}_9$ (ここで R_5 はここにおいて定義した通りであり、そして R_9 は1~6個の炭素原子を有するアルキルまたはフェニル(これはここにおいて定義した基Yで置換されていてもよい)であり、ただしpは1または2である；

R_5 は水素または1~6個の炭素原子を有するアルキルである；そしてpは0、1または2である。

【0104】

他の好ましいPHEX酵素インヒビターは、Mimura他、A Novel Class of Enkephalinase Inhibitors Containing a C-Terminal Sulfo Group、351、Med. Chem. 602 - 608に記載されており、一般構造(IV)を有する：

【化2】



【0105】

式中、

R_1 はフェニル、p-メチルフェニル、p-メトキシフェニル、p-フルオロフェニル、p-トリフルオロメチルフェニル、p-ニトロフェニル、p-ジメチルアミノフェニル、p-フェニルフェニル、フェニルエチル、1-ナフチル、3-ピリジル、1,2-ベンゾイソキサゾリル-3-イル、または1-メチルエチルから選択される；

R_2 は水素またはシクロプロピルから選択される；そして

R_3 は CR_2 、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)$ 、o-フェニル、m-フェニル、p-フェニル、p-フェニルメチル、および1,4-ナフタレンから選択される。

【0106】

本発明の方法において有用な特に好ましいPHEX酵素インヒビターは下記のものを含む：
 (DL-3-メルカプト-2-ベンジルプロパノイル)-グリシン；
 1-(DL-3-メルカプト-2-メチルプロパノイル)-L-プロリン；
 2-ベンジル-3-(N-ヒドロキシカルボキシアミド)-プロパノイル-L-アラニン；
 2-ベンジル-3-(N-ヒドロキシカルボキシアミド)-プロパノイル-L-フェニルアラニン；
 (±)-N-(2-アセチルチオ)メチル-1-オキソ-3-フェニルプロピルグリシンベンジルエステル；
 N-モルホリニル-2-フェニルメチル-3-メルカプトプロパンアミド；
 アルファ-(メルカプトメチル)-N-(4-ピリジル)ベンゼンプロパンアミド；
 N-[2-ベンジル-3-(N-ヒドロキシカルボキシアミド)-プロパノイル]-3-アミノ-4-フェニル酪酸；
 N-[(R,S)-2-ベンジル-3-[(S)(2-アミノ-4-メチルチオ)ブチルジチオ]-1-オキソプロピル]-L-Phe-ベンジルエステル；
 N-(2-ベンジル-3-(メルカプトプロパノイル)メタニル酸；
 およびN-[(R,S)-2-カルボキシ-3-フェニル-プロパノイル]-L-Leu。

【0107】

最良の分布、薬理学的作用と低い毒性との組合わせを有するインヒビターは、薬剤を製造するために選択されるであろう。インヒビターまたはその許容される塩の薬学上許容される処方物は、既知賦形剤と混合して錠剤、カプセル剤または注射可能な溶液を形成することによって製造することができる。1~500mgの薬剤は患者に投与される。

【0108】

実施例VIII：療法上の使用

本発明は、また、その最も頻繁な発現、二次的上皮小体機能亢進症および腎性骨形成異常を含む、低リン酸塩血症を治療する方法を提供する。この方法は、循環するリン酸塩の減少、こうして、低リン酸塩血症およびその最も頻繁な結果を減少させるか、あるいは好ましくは防止するPHEXインヒビターを投与することを含んでなる。

【0109】

上に示したように、PHEXは、上に示したように、同一インヒビターに対するそ

これらの感受性および同一基質をプロセッシングするそれらの能力を包含する、同様な特性を共有する金属プロテアーゼファミリーのメンバーである。多数のNEP様酵素インヒビター、およびそれらの製造方法は文献に記載されており、そして本発明の方法において有用である。

【0110】

阻害活性を有するPHEXインヒビターは、体重約250gのラットに1mg/kgの投与量で投与される。対照グループは、PHEXインヒビターを使用しないで同一ベヒクルを投与するラットの他のグループから成る。血清および尿は標準的方法を使用して試験動物から得られる。次いで血清および尿中のリン酸塩濃度は標準的方法により測定される。リン酸塩濃度の変化を誘導することができるPHEXインヒビターは、低リン酸塩血症であるといわれる。このような化合物は、高リン酸塩血症の患者を治療する目的に好ましい「低リン酸塩血症PHEXインヒビター」である。

【0111】

「最少の有効投与量」は、血清リン酸塩またはPTH濃度の有意な減少を誘導するために必要な最小投与量である。好ましくは、治療はこのような投与量で開始されるであろう。好ましくは、治療はリン酸塩またはPTH血液濃度または両方（ここにおいておよび以後において血液パラメーター）の減少を達成するために十分な期間の間、「低リン酸塩血症PHEXインヒビター」を投与することを包含する。好ましくは、正味の減少は患者の値と正常個体群の値との間の差の約25%、より好ましくは患者の値と正常個体群の値との間の差の少なくとも約50%である。

【0112】

被検体の血液パラメーターのこの減少を達成するために十分な特定の期間は種々の因子に依存するであろう。このような因子は、例えば、使用する特定の低リン酸塩血症インヒビター、投与量、被検体の年齢およびジェンダー、治療すべき特定の障害、使用する付随的治療（使用する場合）、被検体の一般的身体的健康（他の障害の存在を包含する）、個体における疾患の重症度、および個体の栄養的習慣を包含する。

【0113】

本発明の方法によれば、「投与」は、健全な医学的实施において、本発明にお

いて使用する低リン酸塩血性インヒビターを、血液パラメーターの減少の達成において有効である方法において、治療すべき被検体に送達する方法を意味する。低リン酸塩血性PHEX酵素インヒビターは、下記の種々の既知の方法で投与することができる：例えば、経口的、皮膚粘膜的（例えば、皮膚、舌下、鼻内、および経直腸）、非経口的（例えば、皮下注射、筋肉内注射、関節内注射、静脈内注射）、および吸入。こうして、特定の投与モードは、例えば、下記のを包含する：経口、経皮、粘膜、舌下、筋肉内、静脈内、腹腔内、皮下の投与、および局所的適用。低リン酸塩血性PHEX酵素インヒビターを送達する好ましいモードは、医学的に必要な長さおよび頻度における、経口的投与である。期間および頻度は、血清リン酸塩、PTHおよびビタミンD代謝物質の規則的測定後に調節される。

【0114】

こうして、本発明の好ましい方法は、下記の工程を含んでなる：その最も頻繁な発現、二次的上皮小体機能亢進症および腎性骨形成異常を包含する、低リン酸塩血症を検出するためにヒト被検体について診断を実行し、前記診断から陽性結果が得られたとき、本発明の方法に従い低リン酸塩血性PHEX酵素インヒビターを投与する。その最も頻繁な発現、二次的上皮小体機能亢進症および腎性骨形成異常を包含する、低リン酸塩血症を検出するために適当な方法は、この分野においてよく知られている。このような方法は、血液、血清、血漿または尿のリン酸塩の測定または血液、血清または血漿のPTHの測定を包含する。

【0115】

実施例IX：投与形態

本明細書に記載する低リン酸塩血性PHEX酵素インヒビターは、種々の薬学上許容される組成物の形態で投与することができる。したがって、例えば、低リン酸塩血性PHEX酵素インヒビターを投与するための組成物は、下記の成分を含んでなる：

- (a) 約1.0mg～約10000mgの低リン酸塩血性PHEX酵素インヒビター；および
- (b) 薬学上許容される担体。

【0116】

薬学上許容される担体は、ヒトまたは下等動物への投与に適当な、固体または

液体の充填希釈剤またはカプセル化物質、およびそれらの混合物を包含する。用語「適合性」は、本明細書において使用するとき、通常の使用状況下に医薬組成物の薬学的効能を実質的に減少する、相互作用が存在しないような方法で、薬学上の組成物の成分を低リン酸塩血性PHEX酵素インヒビター、および互いに混合できることを意味する。薬学上許容される担体は、もちろん、治療するヒトまたは下等動物への投与に相当とするために十分に高い純度および十分に低い毒性をもたなくてはならない。

【0117】

薬学上の担体として働くことができる物質のいくつかの例は次の通りである：糖、例えば、ラクトース、グルコースおよびスクロース；澱粉、例えば、コーンスターチおよびジャガイモ澱粉；セルロースおよびその誘導体、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、酢酸セルロース；粉末状トラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；ステアリン酸；ステアリン酸マグネシウム；植物油、例えば、落花生油、綿実油、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油およびカカオバター；ポリオール、例えば、プロピレングリコール、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール；寒天；アルギン酸；発熱物質を含まない水；等張生理食塩水；リン酸塩緩衝液；湿潤剤および滑剤、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム；着色剤；香味剤；および保存剤。他の適合性薬学上の添加剤および低リン酸塩血性PHEX酵素インヒビターは、本発明の組成物において使用するための薬学上許容される担体の中に含めることができる。

【0118】

活性物質と組合わせて使用すべき薬学上許容される担体の選択は、活性物質を投与する方法により決定される。活性物質を注射すべき場合、好ましい薬学上許容される担体は無菌の水、生理食塩水、またはそれらの混合物である。このような非経口的組成物のpHは好ましくは約7.4に調節される。局所的適用のために薬学上許容される担体は、クリーム、ゲル、テープ、パッチ、および同様な局所的デリバリー手段において使用するためにこの分野において知られている担体を包含する。

【0119】

低リン酸塩血性PHEX酵素インヒビターと組合わせて使用する薬学上許容される担体は、投与関係に対して実際のサイズを提供するために十分な濃縮で使用される。薬学上許容される担体は、合計、本発明の医薬組成物の約0.1重量%～約99.9重量%、好ましくは約5重量%～約80重量%、最も好ましくは約10重量%～約50重量%を構成することができる。

示したように、低リン酸塩血性PHEX酵素インヒビターを投与する好ましい方法は、投与すべき活性成分のクラスに依存する。低リン酸塩血性PHEXインヒビターのために、好ましい投与方法は、経口的に、単位投与形態（すなわち、健全な医学的实施に従い、1回の単一投与量で投与するために適当な活性成分の量を含む投与形態）である。

【0120】

好ましい単位投与形態は、安全なかつ有効な量の活性成分を含んでなる、錠剤、カプセル剤、懸濁液、および溶液を包含する。経口投与のための単位投与形態の製造に適当な薬学上許容される担体は、この分野においてよく知られている。それらの選択は、本発明の目的について決定的ではない、味覚、コスト、貯蔵安定性のような二次的考察に依存し、そして当業者により困難なく行うことができる。好ましくは、低リン酸塩血性PHEX酵素インヒビターの経口的単位投与形態は、約1.0mg～約1000mgのインヒビターを含んでなる。

【0121】

本発明は下記のをさらにを包含する：（1）試料中のPHEXの存在または量を検出する診断キット；（2）試料中のPHEXの存在または量を検出する方法；（3）PHEXまたはその突然変異体を精製する装置；（4）PHEXリガンドをスクリーニングする装置；および（5）PHEXリガンドを得る方法。さらに詳しくは、診断キットは抗体および/または可溶性PHEX酵素を含んでなる。PHEXに対する抗体PHEXを精製する装置において使用することができ、そしてPHEXまたはその突然変異体はPHEXリガンドをスクリーニングする装置において使用することができる。本明細書に記載しないが、診断キットおよび本発明に含まれる装置の操作可能性に関する、より一般的面はこの分野において知られており、そして容易に入手可能で

ある。

【0122】

PHEXの存在または量を検出する方法は、下記の工程を含んでなる：

- 免疫複合体を形成できる条件下に、PHEXを含有する試料を抗体と接触させ、
そして

- 試料中のPHEXの存在または量の指示として免疫複合体を検出する。

PHEXリガンドを得る方法は下記の工程を含んでなる：

- 1またはそれ以上の分子とPHEXとの結合が起こることができるような条件下に、前記1またはそれ以上の分子を含有する試料をPHEX突然変異体酵素と接触させ、

- 試料中のPHEXリガンドの存在の指示として前記分子とPHEXとの結合を検出し、
そして

- PHEXリガンドを選択する。

【0123】

詳細に説明したが、前述の方法を実施するための実験条件に関する特定事項は当業者の技量の範囲内であり、当業者により容易に適用可能である。

本発明をその特定の態様に関して記載したが、理解されるように、それ以上の変更が可能であり、この出願は、一般に本発明の原理に従いかつ本発明が関係する既知の普通の実施の範囲内に入るこの開示からの逸脱を包含し、前述の本質的特徴に適用することができ、かつ添付された特許請求の範囲の範囲に入る、本発明の任意の変動、使用、または適応を包含することを意図する。

【0124】

参考文献

Almaden Y., Canalejo A., Hernandez A., Ballesteros E., Garcia - Navarro S., Torres A., およびRodriguez M. (1996)。in vitroにおける全ラット副甲状腺からのPTH分泌に対するリンの直接的作用。J. Bone Miner. Res. Jul. 11: 970 - 6。

Apletalina E., Appel J., Lamango N. S., Houghten R. A., およびLibberg I. (1998)。ペプチド組合わせライブラリーを使用するプロホルモンコ

ンバーターゼ1および2のインヒビターの同定。J. Biol. Chem. 273:26589 - 26595。

【0125】

Beck L., Soumounou Y., Martel J., Krishnamurty G., Gauthier C., Godyer C. G., および Tenenhouse H. S. (1997)。Pex/PEX組織分布およびX染色体性低リン酸塩血症およびマウスにおけるPex遺伝子の3'領域における欠失についての証拠。J. Clin. Invest. 99:1200 - 1209。

Blais A., Bissonnette P., および Berteloot A. (1987)。Caco-2細胞およびヒト胎児結腸におけるNa⁺依存性糖輸送についての共通の特徴。J. Membr. Biol. 99:113 - 125。

Borle A. B., および Clark I. (1981)。in vivoにおけるラット腎臓カルシウムに対するリン酸塩誘導上皮小体機能亢進症および上皮小体切除の作用。Am. J. Physiol. Aug. 241:2E136 - 41。

【0126】

Chipkin R. E., Inhibitors of enkephalinase: the next generation of analgesics. Drugs Future 11:593 - 606, 1986。

Crine P., Dion N., および Boileau G. (1997)。Endopeptidase - 24.11. In Cell-Surface Peptidases in Health and Disease. A. J. および C. M. Boustead編。(Oxford: BIOS Scientific Publishers), pp. 79 - 98。

Demeter J. G., De Jong S. A., Oslapas R., Ernst K., Hessel P., Jarosz H., Smith M., Nayyar R., Lawrence A. M., および Paloyan E. (1991)。High phosphate diet-induced primary hyperparathyroidism: an animal model. Surgery Dec. 110:61053 - 60。

【0127】

Devault A., Lazure C., Nault C., Le Moual H., Seidah N. G., Chretien M., Kahn P., Powell J., Mallet J., Beaumont A., Roques B. P., および Boileau G. (1987)。相補性DNAから推定されたウサギ腎臓中性エンドペプチダーゼ24.11 (エンケファリナーゼ) のアミノ酸配列。EMBO J. 6:13

17 - 1322。

Devault A., Nault C., Zollinger M., Fournie-Zaluski M.-C., Crine P., およびBoileau G. (1988)。異種COS-1細胞における中性エンドペプチダーゼ(エンケファリナーゼ)の発現。組換え酵素の特性決定および活性部位におけるグルタミン酸残基についての証拠。J. Biol. Chem. 263:4033-4040。
Du L., Desbarats M., Viel J., Glorieux F. H., Cawthorn C., およびEcarot B. (1996)。X染色体性低リン酸塩血症に関係づけられるネズミPex遺伝子のcDNAクローニングおよび骨における発現についての証拠。Genomics 36:22-28。

【0128】

Ecarot B., Glorieux F. H., Desbarats M., Travers R., およびLabellie L. (1992)。正常マウスおよびX染色体性低リン酸塩血症のマウスからの移植された細胞による骨形成に対するレシピエントマウスの食事のリン酸塩誘導化および補充の作用。J. Bone Miner. Res. 7:523-530。

Ellefsen (1999)。Immobilization d'une ferme chimerique soluble de l'endopeptidase neutre-24.11 sur un support chromatographique et mise au point d'un test de liaison. Memoire de maitrise Universite de Montreal.

Fossiez F., Lemay G., Labonte N., Parmentier-Lesage F., Boileau G., およびCrine P. (1992)。バキュロウイルス感染昆虫細胞系統からの中性エンドペプチダーゼ-24.11の機能的可溶性形態の分泌。Biochem. J. 284:53-59。

【0129】

Francis F., Hennig S., Korn B., Reinhardt R., De Jong P., Poustka A., Lehrach H., Rowe P. S. N., Goulding J. N., Summerfield T., Mountford R., Read A. P., Popowska E., Pronicka E., Davies K. E., O'Riordan J. L. H., Econs M. J., Nesbitt T., Drezner M. K., Oudet C., Pannetier S., Hanauer A., Strom T. M., およびMeindl A. (1995)。エンドペプチダーゼに対する相同性を有する遺伝子(PEX)はX染色体性

低リン酸塩血症くる病の患者において突然変異される。Nature Genet. 11:130-136. Grieff M., Mumm S., Waeltz P., Mazzarella R., Whyte M. P., Thakker R. V., およびSchlessinger D. (1997)。ヒトX染色体性低リン酸塩血症の遺伝子cDNAの発現およびクローニング。Biochemical & Biophysical Research Communications 231:635-639。

【0130】

Guo R. およびQuarles L. D. (1997)。骨cDNAライブラリーからのヒトPEXのクローニングおよび配列決定：骨芽細胞におけるその発生段階特異的調節についての証拠。J. Bone Miner. Res. 12:1009-1017。

Howell S., Lanctet C., Cailler F., およびCrine P. (1995)。中性エンドペプチダーゼの可溶性形態へのグリコシルホスファチジルイノシトールアンカーの添加は、LLC-PKI細胞における頂端ターゲティングを再確立する。The Biochemical Society Meeting 657:41-41. (Abstract)。

Kates D. M., Sherrard D. J. およびAndress D. L. (1997)。Am. J. Kidney Dis. Dec. 30:6809-13。

Korth P., Egidy G., Parnot C., LeMoulliec J. M., Corvol P., およびPinet F. (1997)。ヒトエンドセリン変換酵素の構築、発現および特性決定。FEBS Lett. 417:365-370。

【0131】

Kumar R. (1997)。ホスファトニン - - 新しいリン酸塩尿性ホルモン？(腫瘍誘導軟骨化およびX染色体性低リン酸塩血症からのレッスン) [論説]。Nephrol. Dial. Transplant. 12:11-13。

Lajeunesse D., Meyer R. A. J., およびHamel L. (1996)。Hypマウスにおける腎性リン酸塩の輸送の体液仲介阻害の直接的証明。Kidney Int. 50:1531-1538。

Lemay G., Waksman G., Roques B. P., Crine P., およびBoileau G. (1989)。中性エンドペプチダーゼ (EC 3.4.24.11) のエクトドメインに対する切断可能なシグナルペプチドの融合は、COS-1細胞において活性酵素の分泌を生ずる。J. Biol. Chem. 264:1562-15623。

【0132】

Lemire I., Lazure C., Crine P., およびBoileau G. (1997)。トランスメンブランセグメントの突然変異により誘導されたII型一体的膜タンパク質の分泌。Biochem. J. 322: 335 - 342。

Lipman M. L., Panda D., Bennett H. P., Henderson J. E., Shane E., Shen Y. N., Goltzmann D., およびKaraplis A. C. (1998)。ヒトPEX cDNA発現のクローニング、細胞レベル以下の局在化、およびエンドペプチダーゼ活性。J. Biol. Chem. 273: 13729 - 13737。

Meldal M. (1998)。分子内蛍光クエンチド基質ライブラリー。Methods Mol. Biol. 87: 65 - 74。

Nelson A. E., Mason R. S., およびRobinson B. G. (1997)。PEX遺伝子：X染色体性低リン酸塩血症くる病および腫瘍形成性軟骨化に対する簡単な答えではない。Mol. Cell. Endocrinol. 132: 1 - 5。

【0133】

Meyer R. A. Jr., Gray R. W., およびMeyer M. H. 1980。X染色体性低リン酸塩血症のマウスにおける異常なビタミンDの代謝。Endocrinology 107: 1577 - 1581。

Ondetti M. A., およびCushman D. W.。アンギオテンシン変換酵素のインヒビター：生化学的特性および生物学的作用。Crit. Rev. Biochem. 16: 381 - 411, 1984。

Rasmussen H., およびTenenhouse H. S. (1995)。Mendelian hypophosphatemia. In The metabolic and Molecular Basis of Inherited disease. C. L. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, およびD. Valle編、(New York: McGraw Hill)、pp. 3717 - 3745。

【0134】

Rich D. H.: Peptidase inhibitors. In comprehensive Medicinal Chemistry. The Rational Design, Mechanistic Study and Therapeutic Application of Chemical Compounds、編者、P. G. SammesおよびJ. B. Taylor、Vol. 2、p. 391、Pergamon Press、New York、1990。

Rifas L., Dawson L. L., Halstead L. R., Roberts M., および Avioli L. V. (1994)。正常マウスおよびX染色体性低リン酸塩血症のマウスからの骨芽細胞におけるリン酸塩の輸送。Calif. Tissue Int. 54:505-510。

Roques B. P., Fournie-Zaluski M. C., Florentin D., Waksman G., Sassi A., Chaillet P., Collado H., および Constantin J., 「エンケファリナーゼ」およびアンギオテンシン変換酵素の活性部位を区別するプローブとしての新しいエンケファリナーゼインヒビター。Life Sci. 31:1749-1752, 1982a。

【0135】

Roques B. P., Fournie-Zaluski M. C., Gacel G., Lucas-Soroca E., David M., Schwartz J. C., Malfroy B., Llorens C., Swert J. P., Lecomte, J. M., Meunier J. C., Moisand C., Morgat J. L., および Maigret B., Synthèse et études physicochimiques et biologiques de ligands spécifiques des récepteurs encephalneriques mu delta et d'inhibiteurs du système de dégradation des enkephalines endogènes. Acta Chim. Ther. 9:211-240, 1982b。

Roques B. P., および Fournie-Zaluski M. C., エンケファリン分解酵素インヒビターの合理的設計による抗痛覚化合物に対する新しい方法。Proceedings of the International Symposium on Medical Chemistry, R. Dalhbo および J. L. G. Nilsson 編, pp. 134-146, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, Sweden, 1985。

【0136】

Roques B. P., および Fournie-Zaluski M. C., エンケファリン分解酵素インヒビター：新しい鎮痛剤および精神活性剤に対する生理学的方法。Natl. Inst. Drug Abuse Res. Monogr. Ser. 70:128-154, 1986。

Ruchon A. F., Marcinkiewicz M., Siegfried G., Tenenhouse H. S., DesGroseillers L., Crine P., および Boileau G. (1988)。Pex mRNA は発生するマウス骨芽細胞および象牙芽細胞において局在化される。J. Histochem. Cytochem. 46:459-468。

Strom T. M., Francis F., Lorenz B., Boddrich A., Econs M. J., L ehrach H., およびMeitinger T. (1997)。 GyおよびHypマウスにおけるPex 遺伝子の欠失はX染色体性低リン酸塩血症のマウスモデルを提供する。Hum. Mol . Genet. 6 : 165 - 171。

【 0 1 3 7 】

Tenenhouse H. S., Yip A., およびJones G., 1988、ネズミX染色体性低リン酸塩血症くる病における1,25 - ジヒドロキシビタミンD3の腎性異化作用の増加。J. Clin. Invest. 81 : 461 - 465。

Tenenhouse H. S., およびJones G., 1990、ネズミX染色体性低リン酸塩血症くる病における食事リン酸塩による腎性ビタミンD異化作用の異常な調節。J. Clin. Invest. 85 : 1450 - 1455。

Tenenhouse H. S.他、Am. J. Physiol. 1998、Oct. 275 : 4Pt2F527 - 34。 Thorsett E. D., およびWyvratt M. J., ニューロペプチドを加水分解する亜鉛ペプチダーゼの阻害。Neuropeptides and their Peptidases, A. J . Turner編、pp. 229 - 292、Harwood、Chichester、UK、1987。

Turner A. J. (1997)。エンドセリン変換酵素。Cell - Surface peptidase s in health and disease. A. J. Kenney and C. M. Boustead編、(Oxford、UK : BIOS Scientific Publishers Ltd.)、pp. 137 - 153。

【 0 1 3 8 】

Turner A. J., およびTanzawa K. (1997b)。Mammalian metallopeptidas es : NEP , ECE , KELL , and PEX. FASEB J. 11 : 355 - 364。

Vallee B. L., およびAuld D. S., 亜鉛酵素および他のタンパク質の亜鉛共同的機能および構造。Biochemistry 29 : 5647 - 5659、1990。

Xiao Z. S., Crenshaw M., Guo R., Nesbitt T., Drezner M. K., およびQuarles L. D. (1998)。Hypマウス骨芽細胞中の固有の鉱物化の欠陥。Am . J. Physiol. Endocrinol. Metab. 275 : E700 - E708。

Yang X. F., Crine P., およびBoileau G. (1995)。トポジェニック配列の特質は中性エンドペプチダーゼ - 24.11.のトポロジ-突然変異体の輸送競合を決定する。Biochem. J. 312 : 99 - 105。

【図面の簡単な説明】

【図1】

第1図： PHEXの可溶性形態の構築物。第1A図（構築物1）は、酵素の自然膜結合形態、およびPOMCシグナルペプチドが自然酵素（構築物2）のエクトドメインとインフレームで融合されている構築物の概略的構造を表す。第1B図は、構築物1中の疎水性トランスメンブランドメインの配列の一部分（下線が引かれている）が構築物2中のより親水性ドメインにより置換されている、構築物を表す。構築物3において、疎水性配列の一部分は、構築物2におけるように親水性配列の挿入に加えて、欠失されている。

【図2】

第2図： ヒトPHEXのアミノ酸配列。ボックスの配列は疎水性シグナルペプチド/トランスメンブランドメインを表す。下線が引かれている配列は、モノクローナル抗体を産生するための大腸菌（*E. coli*）GST-融合タンパク質をつくるために使用した配列を表す。

【図3】

第3図： PHEXモノクローナル抗体のスクリーニング。まず、ELISAアッセイにおけるハイブリドーマ培養の使用済み培地を使用することによって試験したとき、大腸菌（*E. coli*）中で産生されたPHEX₁₂₁₋₂₉₄フラグメントに結合する能力について、モノクローナル抗体を選択した。次に、PHEX発現ベクターでトランスフェクトされたLLC-PK1細胞からの膜結合PHEXに結合する能力について、陽性培養物からの免疫グロブリンを試験した。第3A図は、種々のハイブリドーマ上清で染色したLLC-PK1抽出物のウェスタンブロット分析である。トラック12は、ウサギにおいて調製したPHEXポリクローナル抗体を使用して得られた染色パターンである。第3B図： PHEXの可溶性形態（secPHEX）の免疫沈降。まず、材料および方法の節において説明するように、PHEXの可溶性形態をコードするベクターでLLC-PK1細胞をトランスフェクトした。次いで、免疫沈降実験のためのsecPHEX源として、トランスフェクトされたLLC-PK1細胞の使用済み培地を使用した。まず、プロテインA-セファローズビーズ（Pharmacia）をウサギ抗マウスIgG画分で飽和し、次いで第3A図に示すように選択したハイブリドーマ上清からのマウス免疫

グロブリンで飽和することによって、免疫沈降を実行した。洗浄後、secPHEXを産生するLLC - PK1細胞の使用済み培地のアリコート（40 μ gの全タンパク質）中で、これらのビーズをインキュベートした。ビーズを遠心によりペレット化し、洗浄し、電気泳動試料の緩衝液中のプロテインA - セファローズに結合したタンパク質を沸騰させ、次いでPHEXポリクローナル抗体を使用するウェスタンブロット分析により、secPHEXの存在を評価した。トラック10は、ウサギPHEXポリクローナル抗血清と同一条件下に実施した免疫沈降の結果を示す。トラック10および11は、モックトランスフェクトした細胞から調製した対照実験を示す。

【図4】

第4図： COS - 1細胞中の組換えPHEXの膜結合形態および可溶性形態の発現。PHEXの全コーディング配列（左のパネル）を含有する発現ベクターまたはPHEXの分泌を促進することができる構築物（方法参照）（右のパネル）を含有する発現ベクターで、COS - 1細胞をトランスフェクトした。トランスフェクション後、細胞を16時間培養し、方法において説明するように、膜画分（左のパネル）または使用済み培地（右のパネル）を調製した。モノクローナル抗体15D7を使用するウェスタンブロットにおいて、PHEXの発現をモニターした。左のパネルにおいて見られるように、pCDNA3 / RSV - PHEX - FLBベクターでトランスフェクトした細胞の膜画分の中に、105,000の見掛けのMrに対応する移動度で移動するバンドが存在した（レーン2）。このバンドは対照細胞の抽出物には存在しなかった（レーン1）。右のパネルは、PHEXの分泌された可溶性形態がトランスフェクトした細胞の使用済み培地の中に存在するが、対照のモックトランスフェクトした細胞の中に存在しないことを示す。

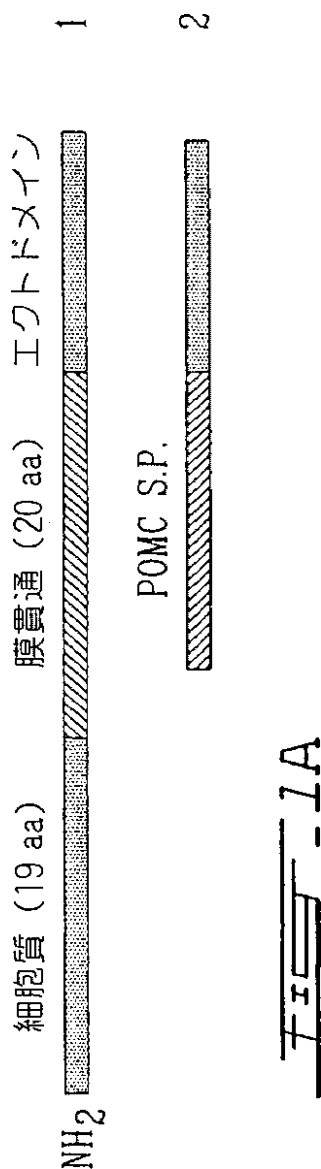
【図5】

第5図： secPHEXのイオン交換クロマトグラフィー精製。LLC - PK1細胞を発現するsecPHEXからの濃縮された使用済み培地をSP - セファローズカラム上に負荷し、タンパク質を線形NaCl勾配で溶離した。画分を7.5%SDSポリアクリルアミドゲル上で分析し、イムノプロットング（第5A図）または銀染色（第5B図）により検出した。

【図6】

第6図： secPHEXについて酵素アッセイ。精製されたsecPHEX (2 μg) を10 μg のPTHrP107 - 139の存在下にインキュベートし、反応混合物をRP - HPLCにより分析した。第6A図は、secPHEXの非存在下にPTHrP107 - 139をインキュベートしたとき得られたクロマトグラムを示す。第6B図は、secPHEXによるPTHrP107 - 139の消化を示す。反応混合物に0.001MのEDTAを添加することによって、この消化は完全に阻害された (第6C図)。secPHEXによるPTHrP107 - 139の切断はリン酸塩濃度に対して感受性である (第6D図 ~ 第6H図：それぞれ、1、5、10、25、50mMのリン酸塩)。

【図1A】



【図1B】



VGGTLVLGTILFLVSQGLLS 1

VLTVIAQQTTFLFLVSQGLLS 2


VLTVIAQQTT SQGLLS 3

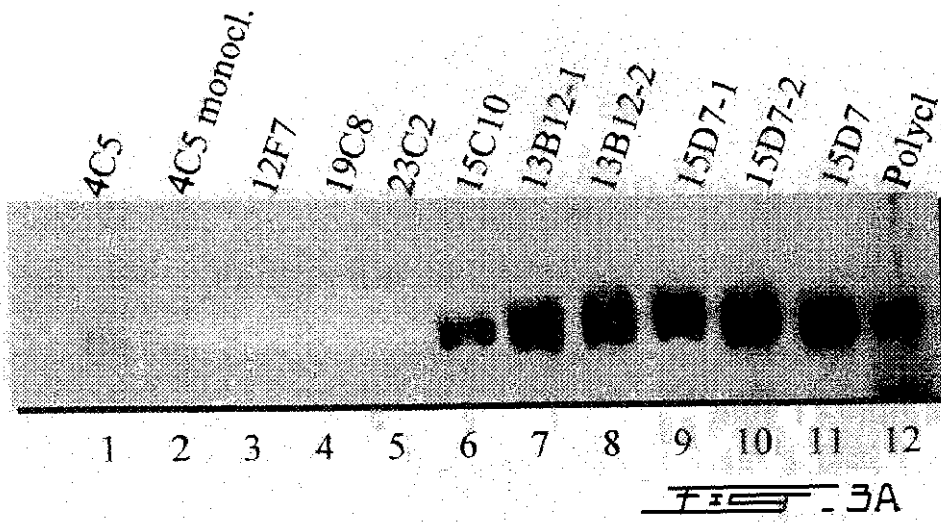



FIG. 1B

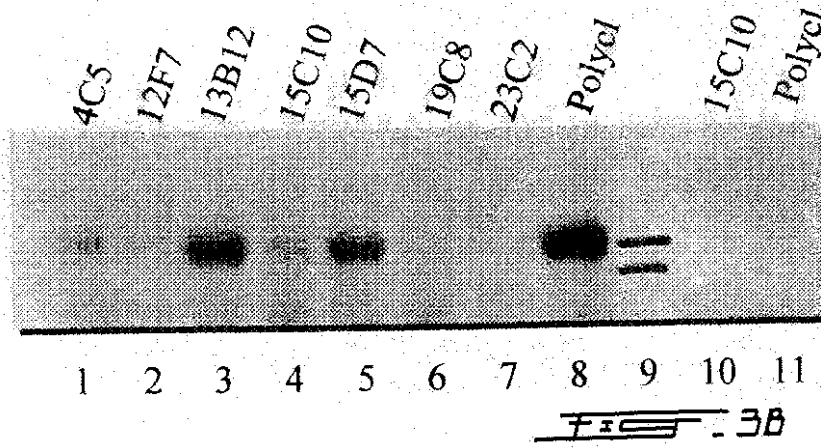
1 MEAETGSSVE TGKKANRGTR IALVFEVGGT LVLGTILFLV SQGLLSLOAK QEYCLKPECI
 61 EAAAAIILSKV NLSVDPCDNF FRFACDGWIS NNPIPEDMPS YGVYPWLRHN VDLKLLKELLE
 121 KSISRRRDTE AIQKAKILYS SCMNEKAIEK ADAKPLLLHIL RHSPFRWPVL ESNIGPEGVW
 181 SERKFSLLQT LATERGQYSN SVFIRLYVSP DDKASNEHIL KLDQATLSLA VREDYLDNST
 241 EAKSYRDALY KFMVDTAVLL GANSSRAEHD MKSVLRLEIK IAEIMIPHEN RTSEAMYNKM
 301 NISELSAMIP QFDWLGYIKK VIDTRLYPHL KDISPSENVV VRVPQYFKDL FRILGSERKK
 361 TIANYLVWRM VYSRIPNLSR RFQYRWLEFS RVIQGTTLTLL PQWDKCVNFI ESALFYVVVGK
 421 MFVDVYFQED KKEMMEELVE GVRWAFIDML EKENEWMDAG TKRKAKAKAR AVLAKVGYPE
 481 FIMNDTHVNE DLKAIKFSEA DYFGNVLQTR KYLAQSDFFW LRKAVPKTEW FTNETTVNAF
 541 YSASTNQIRE PAGELQKPEF WGTEYPRSL S YGAIQVIVGH EFTHGFDNNG RKYDKNGNLD
 601 PWWSTESEEK FKEKTKCMIN QYSNYWYKKA GLNVKGRRTL GENIADNGGL REAFRAYRKK
 661 INDRRQGLEE PLLPGITFTN NQLFFLSYAH VRCNSYRPEA AREQVQIGAH SPPQFRVNGA
 721 ISNSEEFQKA FNCPPNSTMN RGMDSCLRW

TABLE - 2

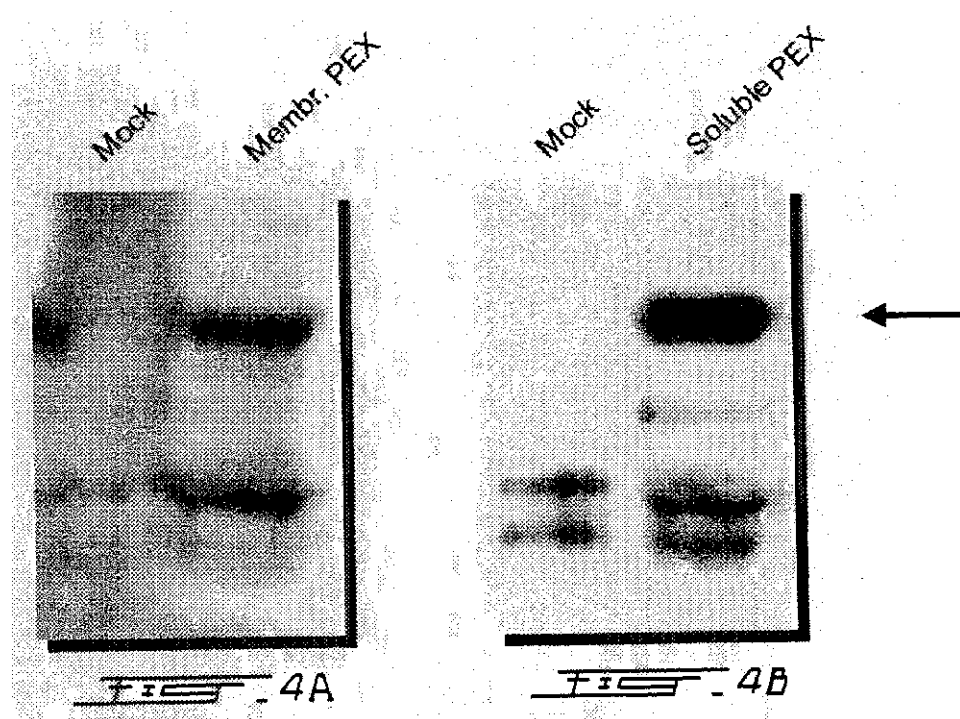
【 3 A】




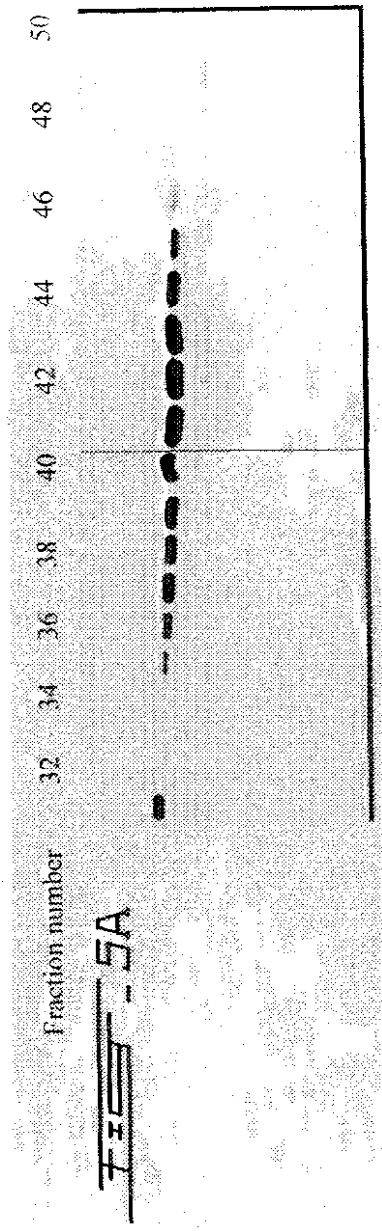
【 3 B】



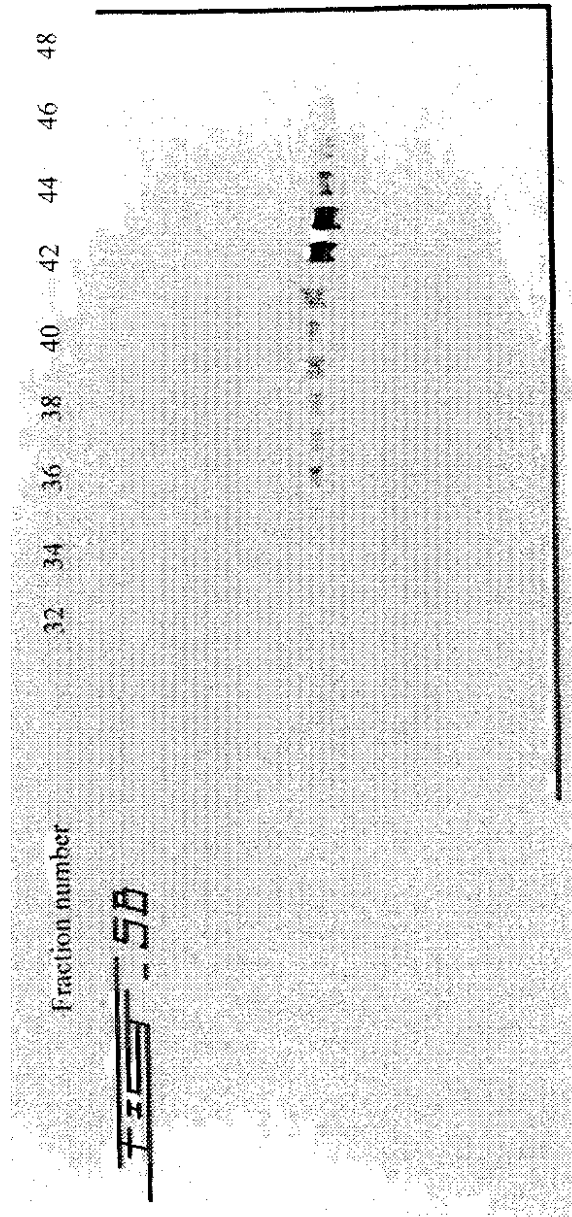
【図4】




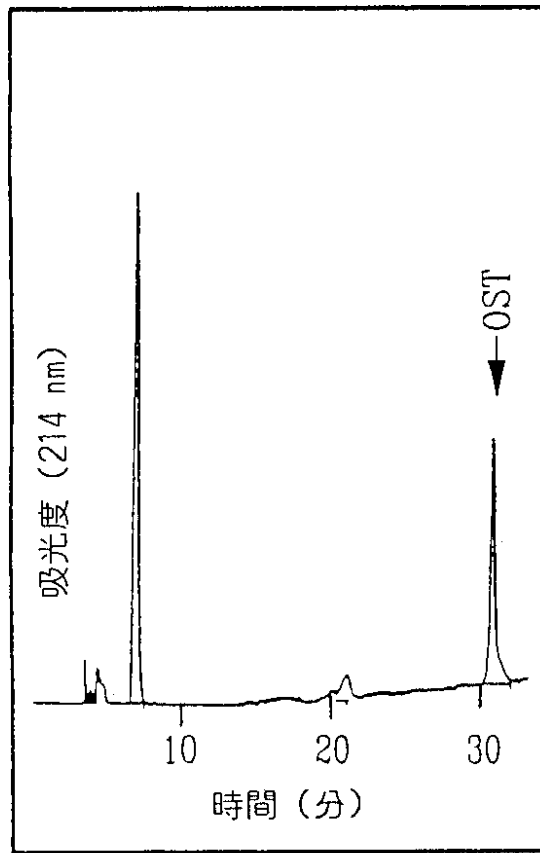
【 5 A】




【図5B】

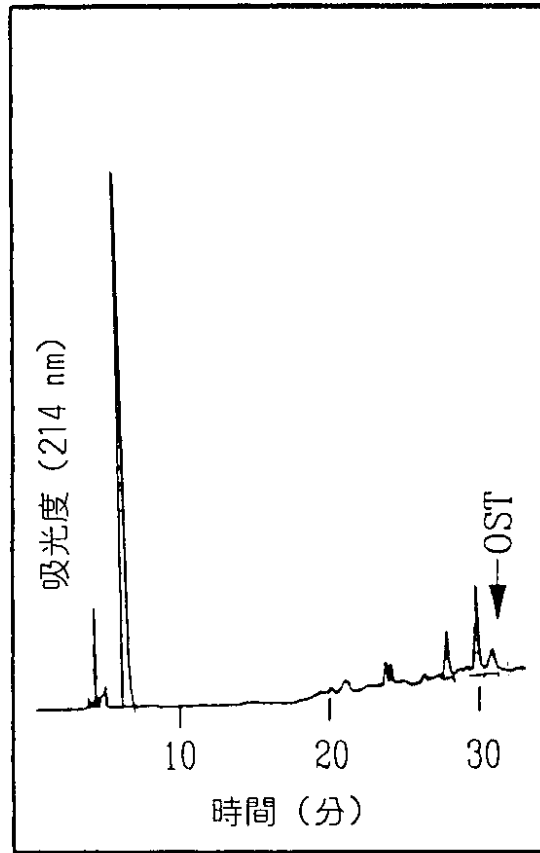


【 6 A】




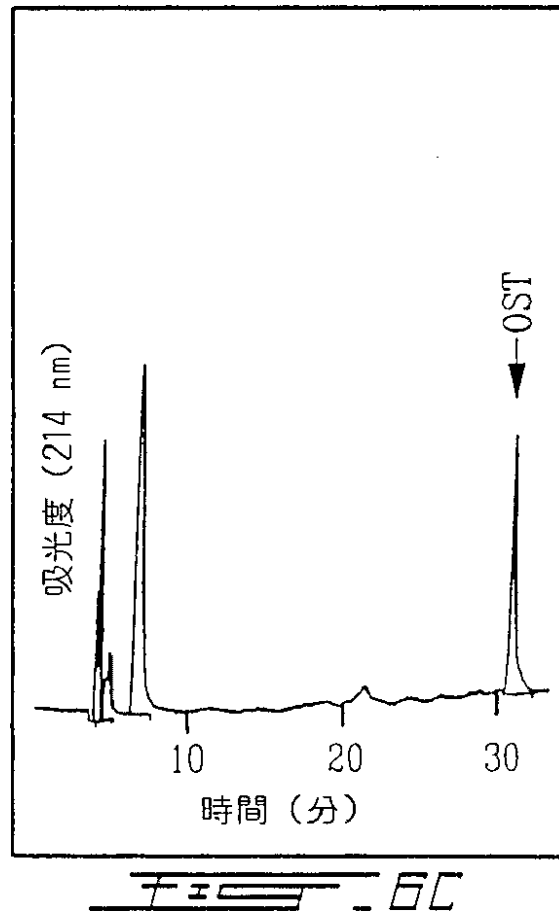
FEES-6A


【 6 B】

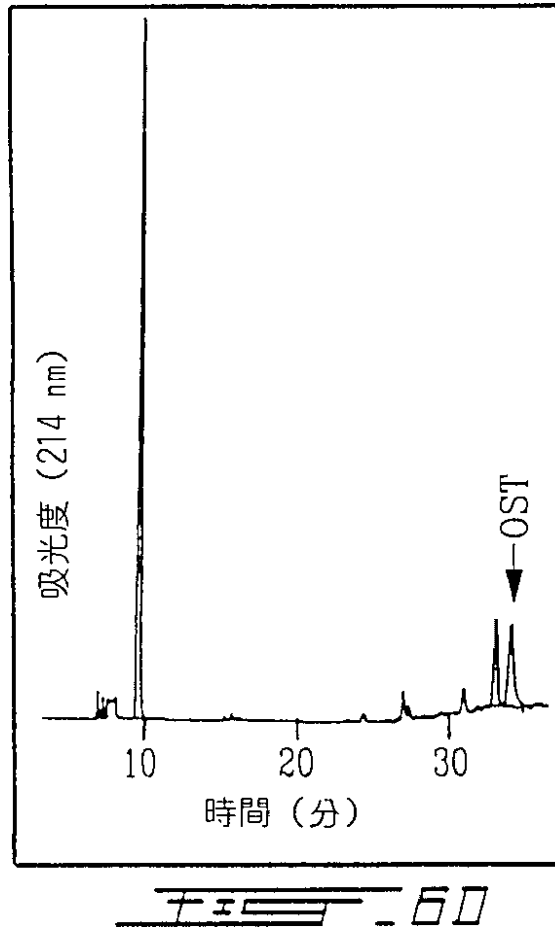



155-66

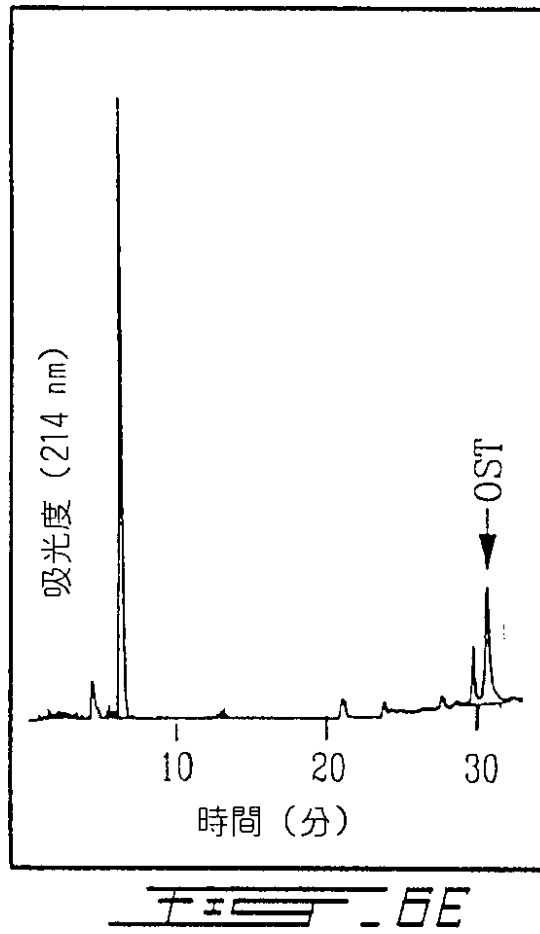
【 6 C】




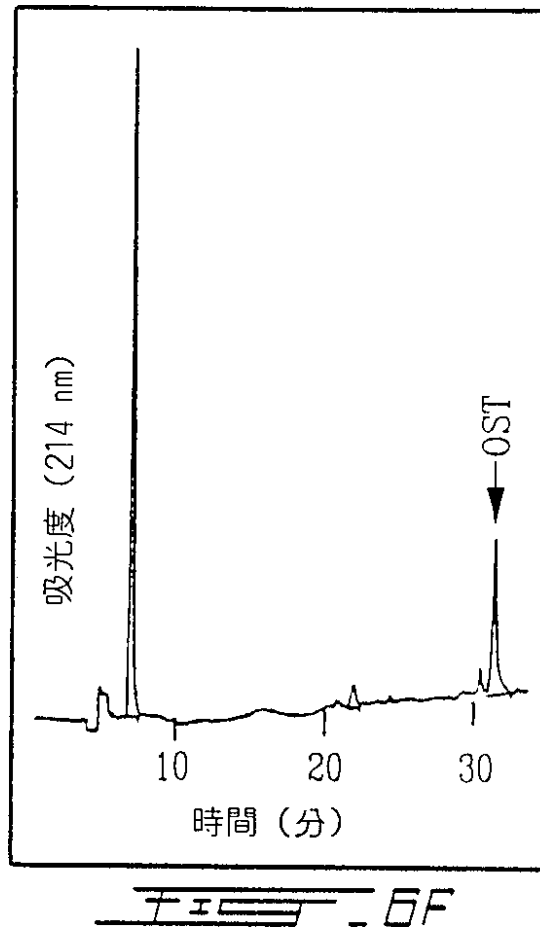
【 6 D】




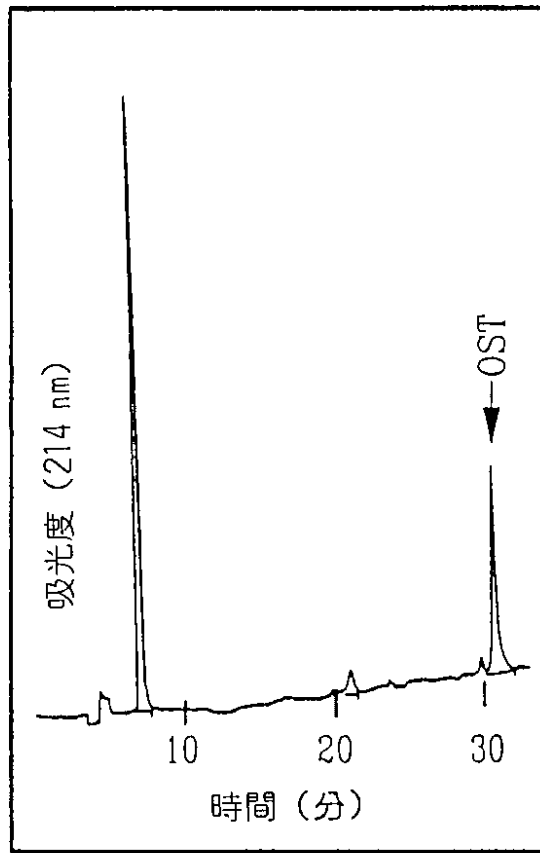
【 6 E】




【 6 F】

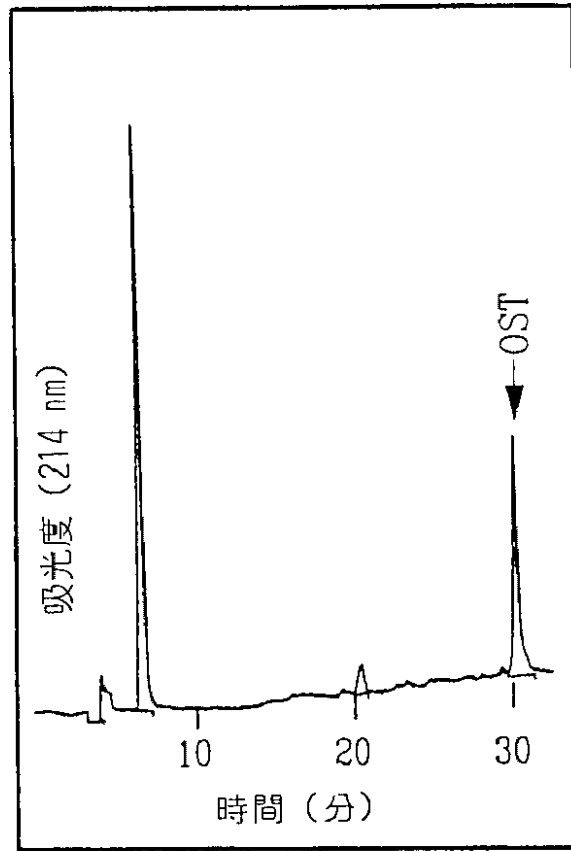


【 6 G】



758-66

【 6H】



TEST-0H

【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年6月4日(2001.6.4)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【請求項1】 PHEXエクトドメインまたはその触媒部分を含んでなる、精製された可溶性PHEX酵素(secPHEX)およびその変異型。

【請求項2】 PHEXエクトドメインまたはその触媒部分と、ヒト以外の真核宿主において発現されるとき、可溶性をPHEX酵素に付与するように修飾されたPHEXシグナルペプチド/トランスメンブラン領域とを含んでなる、精製された可溶性PHEX酵素(secPHEX)およびその変異型。

【請求項3】 不活性であるが、PHEXに対するリガンド分子に対する結合能力を保持する、請求項1または2に記載の酵素の突然変異体。

【請求項4】 位置581のグルタミン酸残基が変異しているPHEX酵素から成る、請求項3に記載の突然変異体。

【請求項5】 位置581のグルタミン酸残基が疎水性アミノ酸残基で置換されているPHEX酵素から成る、請求項3に記載の突然変異体。

【請求項6】 位置581のグルタミン酸残基がバリン残基で置換されているPHEX酵素から成る、請求項3に記載の突然変異体。

【請求項7】 PHEX C末端のエクトドメインが活性または不活性であり、そして切断可能なシグナルペプチドを含むように修飾されたPHEX膜-アンカードメインをコードするトランケートテッドPHEX遺伝子配列を含んでなる核酸。

【請求項8】 請求項7に記載の核酸を含んでなる組換えベクター。

【請求項9】 発現ベクターである、請求項8に記載の組換えベクター。

【請求項10】 請求項8に記載の組換えベクターを含んでなるヒト以外の真核宿主。

【請求項11】 請求項9に記載の組換えベクターを含んでなるヒト以外の真核宿主。

【請求項12】 - 請求項10または11に記載の真核宿主に核酸を発現せしめ、そして

- 前記宿主の分泌産物として可溶性PHEX酵素またはその突然変異体を回収する、ことを含んでなる、可溶性PHEX酵素またはその不活性突然変異体を産生する方法。

【請求項13】 請求項1～6のいずれか一項に記載の酵素を含んでなる、抗原性組成物。

【請求項14】 PHEXに結合することができかつ請求項1～6のいずれか一項に記載の酵素に対して発生させた抗体またはそのフラグメント。

【請求項15】 前記フラグメントがPHEXのアミノ酸配列の残基121から残基294に延びる、請求項14に記載の抗体。

【請求項16】 モノクローナル抗体である、請求項14に記載の抗体。

【請求項17】 モノクローナル抗体である、請求項15に記載の抗体。

【請求項18】 PHEX中和性抗体である、請求項16に記載の抗体。

【請求項19】 請求項16～18のいずれか一項に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項20】 請求項1または2に記載の酵素または請求項7に記載の核酸と、薬学上許容される担体とを含んでなる組成物。

【請求項21】 請求項3～6のいずれか一項に記載の酵素と、薬学上許容される担体とを含んでなる組成物。

【請求項22】 請求項14～18のいずれか一項に記載の抗体と、薬学上許容される担体とを含んでなる組成物。

【請求項23】 請求項14～18のいずれか一項に記載の抗体を含んでなる、PHEXの存在または量を検出する診断試薬。

【請求項24】 請求項14～18のいずれか一項に記載の抗体を含んでなる、PHEXの存在または量を検出する診断キット。

【請求項25】 可溶性PHEX酵素をさらに含んでなる、請求項24に記載の

診断キット。

【請求項26】 - 免疫複合体を形成できる条件下に、試料を、請求項14～18のいずれか一項に記載の抗体と接触させ、そして

- 前記試料中のPHEXの存在または量の指示として免疫複合体を検出する、ことを含んでなる、試料中のPHEXの存在または量を検出する方法。

【請求項27】 請求項14～18のいずれか一項に記載の抗体を含んでなる、PHEXまたはその突然変異体を精製する装置。

【請求項28】 請求項1～6のいずれか一項に記載の可溶性PHEX酵素またはその突然変異体を含んでなる、PHEXリガンドをスクリーニングする装置。

【請求項29】 前記抗体が固体支持体上に固定されている、請求項27に記載の装置。

【請求項30】 前記PHEX酵素または突然変異体が固体支持体上に固定されている、請求項28に記載の装置。

【請求項31】 それ自体前記固体支持体上に固定された抗PHEX抗体に対するその結合を通して、前記PHEX酵素または突然変異体が固体支持体上に固定されている、請求項30に記載の装置。

【請求項32】 前記固体支持体に対してPHEXをカップリングさせることができる残基または基で終わるC末端のアミノ酸伸長部を通して、前記PHEX酵素または突然変異体が固体支持体上に固定されている、請求項30に記載の装置。

【請求項33】 - 1または複数の分子とPHEXとの結合が起こることができるような条件下に、前記1または複数の分子を含有する試料を請求項2～5のいずれか一項に記載のPHEX突然変異体酵素と接触させ、

- 前記試料中のPHEXリガンドの存在の指示として前記結合を検出し、そして

- 前記PHEXリガンドを選択する、

ことを含んでなる、PHEXリガンドを得る方法。

【請求項34】 前記リガンドがPHEXインヒビターまたは基質である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】 - 分子を、請求項1に記載のPHEX酵素と実質的に無リン酸条件下に接触させ、そして

- 前記分子がPHEXの基質であることの指示として、前記分子の切断産物を観測する、

ことを含んでなる、PHEXの基質である能力について分子の活性を評価する方法。

【請求項36】 前記分子を陽性対照としてPTHrP107 - 139と接触させる工程をさらに含んでなる、請求項35に記載の方法。

【請求項37】 実質的に無リン酸条件下に、試料を請求項35または36に記載の基質と接触させるか、あるいは好ましくはPTHrP107 - 139と接触させ、そして試料中のPHEX活性の指示として、前記基質またはPTHrP107 - 139の切断産物の出現を観測する工程を含んでなる、試料中のPHEX活性を評価する方法。

【請求項38】 試料中の前記PHEX活性を陽性対照として請求項1に記載のPHEX酵素の活性と比較する工程をさらに含んでなる、請求項37に記載の方法。

【請求項39】 - 実質的に無リン酸条件下に、分子を、請求項35または36に記載の基質と接触させるか、あるいは好ましくはPTHrP107 - 139、および請求項1に記載のPHEX酵素と接触させ、そして

- 前記分子がPHEX基質であることの指示として、切断産物の形成の阻害を観測する、

ことを含んでなる、PHEXのインヒビターである能力について分子の活性を評価する方法。

【請求項40】 請求項35～39のいずれか一項に記載の方法を実行するためのキット。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/CA 00/00201
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N9/64 C12N15/57 C12N5/10 C07K16/40 A61K38/48 A61K48/00 A61K39/395 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, MEDLINE, SCISEARCH, BIOTECHNOLOGY ABS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 10078 A (HENDERSON JANET E ;KARAPLIS ANDREW C (CA); LIPMAN MARK L (CA); SHE) 12 March 1998 (1998-03-12) the whole document ----- -----	1-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. '&' document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 5 February 2001		Date of mailing of the international search report 20. 2. 01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040. Tx: 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer ALCONADA RODRIG., A

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In: International Application No
PCT/CA 00/00201

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LIPMAN MARK L ET AL: "Cloning of human PEX cDNA: Expression, subcellular localization, and endopeptidase activity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, vol. 273, no. 22, 29 May 1998 (1998-05-29), pages 13729-13737, XP002134628 ISSN: 0021-9258 page 13731, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 4 page 13734, left-hand column, paragraph 3 -page 13735, right-hand column, paragraph 2 figures 2,7,8 ---	1-13,20, 21,35-40
Y	DEVAULT A ET AL: "EXPRESSION OF NEUTRAL ENDOPEPTIDASE ENKEPHALINASE IN HETEROLOGOUS COS-1 CELLS CHARACTERIZATION OF THE RECOMBINANT ENZYME AND EVIDENCE FOR A GLUTAMIC ACID RESIDUE AT THE ACTIVE SITE" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 263, no. 8, 1988, pages 4033-4040, XP000930009 ISSN: 0021-9258 figures 6,7 page 4036, right-hand column, paragraph 2 -page 4039, right-hand column, paragraph 1 ---	2-5, 13-19, 21-34, 37,40
Y	LEMAY G ET AL: "FUSION OF A CLEAVABLE SIGNAL PEPTIDE TO THE ECTODOMAIN OF NEUTRAL ENDOPEPTIDASE EC 3.4.24.11 RESULTS IN THE SECRETION OF AN ACTIVE ENZYME IN COS-1 CELLS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 26, 1989, pages 15620-15623, XP000929927 ISSN: 0021-9258 cited in the application page 15621, right-hand column, paragraph 2 -page 15622, left-hand column, paragraph 1 --- -/--	1,6-34, 37,40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/CA 00/00201

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KORTH PETRA ET AL: "Construction, expression and characterization of a soluble form of human endothelin-converting enzyme-1." FEBS LETTERS, vol. 417, no. 3, 17 November 1997 (1997-11-17), pages 365-370, XP002147123 ISSN: 0014-5793 cited in the application figures 1,4 page 367, left-hand column, paragraph 1 -page 369, left-hand column, paragraph 1 -----	1,6-34, 37,40
Y	HELENE A ET AL: "EFFECTS OF MONOCLONAL ANTIBODIES RAISED AGAINST THE COMMON ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA ANTIGEN ON ENDOPEPTIDASE-24.11 ACTIVITY" BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 43, no. 4, 1992, pages 809-814, XP000925844 ISSN: 0006-2952 tables 1-3 page 810, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, last paragraph -----	14-19, 22-27,29
Y	FENTON A J ET AL: "Long-term culture of disaggregated rat osteoclasts: Inhibition of bone resorption and reduction of osteoclast-like cell number by calcitonin and PThrp(107-139)." JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, vol. 155, no. 1, 1993, pages 1-7, XP000979777 ISSN: 0021-9541 figures 2,5 -----	35,36, 38-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA 00/00201**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-34, 37 (complete) and 40 (partially)

A soluble form of human PHEX; an inactive form of soluble PHEX which still binds ligands consisting on a mutant having glutamic residue at position 582 mutated to valine; a nucleic acid encoding a soluble PHEX in which the transmembrane anchor has been modified to include a cleavable signal peptide, preferably from pro-opiomelanocortin; recombinant vector and host; a method for producing a recombinant soluble PHEX, an antigenic composition, monoclonal or polyclonal antibodies raised against the soluble PHEX, pharmaceutical compositions containing the nucleic acid, the soluble enzyme and the antibody of the invention; diagnostic reagents and kits comprising the anti-PHEX antibody; a method for detecting the presence of PHEX in a sample using the anti-PHEX antibody; a device to purify PHEX using anti-PHEX antibody in which the antibody is fixed to a solid support; a device to screen PHEX ligands using the soluble PHEX or a mutant thereof in which the PHEX molecule is fixed to a solid support; a method to obtain a PHEX ligand; a method for evaluating the activity of a molecule for its capacity of being a substrate of PHEX and a kit to carry out said method.

2. Claims: 35, 36, 38, 39 (complete) and 40 (partially)

A method for evaluating PHEX activity in a sample comprising contacting said sample with PTHrp107-139 and observing the appearance of the cleavage product; said method further comprising comparing said PHEX activity with the activity of the soluble PHEX; a method for evaluating the activity of a molecule for its capacity of being a substrate of PHEX comprising contacting said molecule with soluble PHEX and observing a cleavage product of said molecule as an indication that the molecule is a substrate of PHEX, said method further comprising the step of comparing said molecule with PTHrp107-139 as a positive control; a method for evaluating the activity of a molecule for its capacity of being an inhibitor of PHEX comprising contacting said molecule with PTHrp107-139 and soluble PHEX and observing an inhibition of the formation of a cleavage product of PTHrp107-139; a kit for executing any of the previous methods.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/CA 00/00201

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9810078 A	12-03-1998	AU 4107397 A	26-03-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 P	3/12	C 0 7 K	16/40	4 B 0 6 5
	19/08	C 1 2 M	1/00	A 4 C 0 8 4
C 0 7 K	16/40	C 1 2 N	1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 M	1/00		1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19		9/48	
	1/21	C 1 2 Q	1/37	
	5/10	G 0 1 N	33/53	D
	9/48		33/577	B
	15/02	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 Q	1/37	C 1 2 N	15/00	Z N A A
G 0 1 N	33/53		5/00	A
	33/577			B
// C 1 2 P	21/08		15/00	C
		A 6 1 K	37/54	

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

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA19 BA14 CA04
 DA02 EA04 FA18 GA11
 4B029 AA27 BB16 BB17 CC03
 4B050 CC04 DD11 FF11E FF14E
 LL01
 4B063 QA01 QA05 QQ03 QQ20 QQ36
 QQ79 QQ95 QR16 QR48 QR57
 4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CA20
 CC24 DA13
 4B065 AA90X AA92X AA93Y AB01
 AB05 AC14 BA02 BA08 CA25
 CA33 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA22
 DC02 ZA962 ZC192 ZC202
 ZC212
 4C085 AA13 AA14 BB22 CC02 DD63
 DD88
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 AA40
 BA10 CA40 DA75 DA76 DA89
 EA20 EA50 FA72 FA74 GA23
 GA26

【要約の続き】

<u>VG</u> GTLVLGTILFLVSQGLLS	1
<u>VLT</u> VIAQQTLEFLVSQGLLS	2
<u>VLT</u> VIAQQT SQGLLS	3

B



专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2002541776A5	公开(公告)日	2007-03-15
申请号	JP2000601144	申请日	2000-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	蒙特利尔大学		
申请(专利权)人(译)	Yuniberushite蒙特利尔		
当前申请(专利权)人(译)	Yuniberushite蒙特利尔		
[标]发明人	クリーヌフィリップ ボワローギユイ		
发明人	クリーヌ,フィリップ ボワロー,ギユイ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61K48/00 A61P3/12 A61P19/08 C07K16/40 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/48 C12Q1/37 G01N33/53 G01N33/577 C12N5/10 C12N15/02 A61K38/46 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 C12Y304/24011 A61K48/00 C12N9/6494 A61P19/08		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.P A61K48/00 A61P3/12 A61P19/08 C07K16/40 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/48 C12Q1/37 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N5/00.A C12N5/00.B C12N15/00.C A61K37/54 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA18 4B024/GA11 4B029/AA27 4B029/BB16 4B029/BB17 4B029/CC03 4B050/CC04 4B050/DD11 4B050/FF11E 4B050/FF14E 4B050/LL01 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ03 4B063/QQ20 4B063/QQ36 4B063/QQ79 4B063/QQ95 4B063/QR16 4B063/QR48 4B063/QR57 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA92X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA33 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/DC02 4C084/ZA962 4C084/ZC192 4C084/ZC202 4C084/ZC212 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB22 4C085/CC02 4C085/DD63 4C085/DD88 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/AA40 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA23 4H045/GA26		
优先权	2262056 1999-02-24 CA		
其他公开文献	JP2002541776A		

摘要(译)

本发明涉及PHEX的可溶形式。PHEX是II型整合膜糖蛋白。该酶是与X染色体上的内肽酶具有同源性的磷酸调节基因的基因产物。修饰跨膜锚结构域以编码信号肽编码序列以产生可溶形式的PHEX。因此，可溶性PHEX包含活性胞外域。PHEX的无活性突变体也是本发明的目的。PHEX的可溶性和非活性突变体均可用于筛选PHEX的配体。这些配体也可以用作PHEX的抑制剂或底物。当PHEX为磷尿时，其抑制剂将用于治疗磷尿和/或低磷血症。相反，PHEX底物或PHEX本身可用于治疗高磷血症。

