

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 528300

(P2003 - 528300A)

(43)公表日 平成15年9月24日(2003.9.24)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 2 G 0 5 4 M 4 B 0 6 3
A 6 1 K 38/00 39/395		A 6 1 K 39/395 48/00	D 4 C 0 8 4 N 4 C 0 8 5 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全130数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 562208(P2001 - 562208)

(86)(22)出願日 平成13年2月26日(2001.2.26)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月20日(2002.8.20)

(86)国際出願番号 PCT/IB01/00259

(87)国際公開番号 W001/063295

(87)国際公開日 平成13年8月30日(2001.8.30)

(31)優先権主張番号 0004412.3

(32)優先日 平成12年2月24日(2000.2.24)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(31)優先権主張番号 0004415.6

(32)優先日 平成12年2月24日(2000.2.24)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 オックスフォード グリコサイエンス (ユーケー) リミテッド

イギリス, オクソン オーエックス14 4アールワイ, アピンドン, ミルトン パーク 86, ザ フォーラム

(72)発明者 ヘラス, ヘラス, ムジヤンセラゲ, アスラ, チャンドラシリ

イギリス, アピンドン オーエックス14 1 ワイダブリュー, フォスター ロード 53

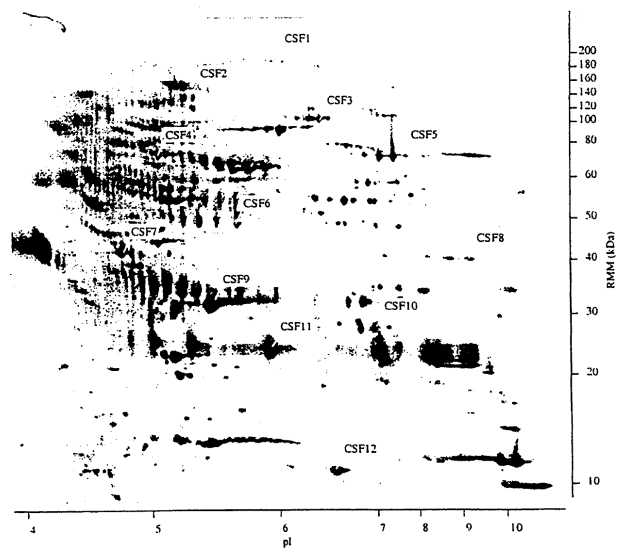
(74)代理人 弁理士 八田 幹雄 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経精神及び神経障害における D P I - 6、推定上の治療ターゲットおよびバイオマーカー

(57)【要約】

本発明は、B A D、精神分裂病及び脈管性痴呆等の神経精神または神経状態のスクリーニング、診断及び予測のための、上述の状態のすべての処置の有効性をモニターするための、ならびに薬剤の開発のための方法及び組成物を提供するものである。髄液、血清または血漿の2次元電気泳動によって検出可能である、B A D - 関連特徴 (D F) が記載される。本発明はさらに、髄液、血清または血漿中で検出可能なB A D - 関連タンパク質イソ型 (BAD-Associated Protein Is oform) (D P I)、単離されたD P Iを含む調製物、D P Iに対して免疫特異的な抗体、および前記を有するキットを提供するものである。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検者から得られる生体試料におけるポリペプチドの量を検出するおよび/または定量する段階を有し、該ポリペプチドは、

- a) 図1または3に示されるアミノ酸配列；
- b) 図1または3に示されるアミノ酸配列に関して一以上のアミノ酸の置換、欠失または挿入を有する誘導体；及び
- c) 少なくとも10アミノ酸長である、上記a)またはb)で規定されるポリペプチドの断片

から選択されるものである、被検者における神経精神および/または神経状態に関するスクリーニングおよび/またはこれの診断方法。

【請求項2】 該ポリペプチドは、融合ポリペプチドの一部として提供される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 該融合ポリペプチドは、緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein)及びDsRed蛍光タンパク質(DsRed Fluorescent Protein)からなる群より選択される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 治療上有効な量の請求項1～3のいずれか1項に記載の少なくとも一のポリペプチドを被検者に投与することを有する、被検者における神経精神および/または神経状態の予防および/または処置方法。

【請求項5】 被検者から得られる生体試料における核酸の量を検出するおよび/または定量する段階を有し、該核酸分子は、

- a) 図2に示されるRNA配列またはそのDNA等価物を含む；
- b) a)の配列と相同性を有する配列を有する；
- c) a)若しくはb)の配列と同じポリペプチドをコードする配列を有する；
- d) a)、b)及びc)のいずれかと実質的な一致性を示す配列を有する；または
- e) 図1に示されるアミノ酸分子の誘導体または断片をコードする配列、

被検者における神経精神および/または神経状態に関するスクリーニングおよび/またはこれの診断方法。

【請求項6】 治療上有効な量の請求項5に記載の少なくとも一の核酸を被

検者に投与することを有する、被検者における神経精神および/または神経状態の予防および/または処置方法。

【請求項7】 治療上有効な量の請求項1に記載の少なくとも一のポリペプチドに結合する抗体を被検者に投与することを有する、被検者における神経精神および/または神経状態の予防および/または処置方法。

【請求項8】 該抗体は、該ポリペプチドに特異的に結合する、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 該抗体は、治療部分と共役する、請求項7または8に記載の方法。

【請求項10】 該治療部分は、第二抗体またはこれの断片若しくは誘導体、細胞毒剤またはサイトカインである、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 請求項1に記載の少なくとも一のポリペプチド、請求項5に記載の少なくとも一の核酸または該ポリペプチドに結合する少なくとも一の抗体、および必要であれば一以上の製薬上許容できる賦形剤、担体または希釈剤を含む薬剤配合物。

【請求項12】 生体試料における、請求項1に記載の少なくとも一のポリペプチドまたは該ポリペプチドに結合する少なくとも一の抗体の存在若しくは不存在を決定するおよび/または定量する段階を有する、ポリペプチドの発現を調節する、即ち、アップレギュレートするまたはダウンレギュレートする化合物に関するスクリーニング方法。

【請求項13】 患者から得られた生体試料における、請求項1に記載の少なくとも一のポリペプチドまたは該ポリペプチドに結合する少なくとも一の抗体の存在若しくは不存在を決定するおよび/または定量する段階を有する、患者における乳癌処置のモニター/評価方法。

【請求項14】 該神経精神および/または神経状態は、双極性うつ病(bipolar affected depression) (BAD)、精神分裂病及び脈管性痴呆(vascular dementia)から選択される、請求項1、4~7または13のいずれかに記載の方法。

。

【発明の詳細な説明】**【0001】**発明の背景発明の分野

本発明は、双極性障害(Bipolar Affective Disorder)、精神分裂病及び脈管性痴呆(Vascular Dementia)等の神経精神及び神経状態の診断、予防及び処置に、ならびに特に、このような診断、予防及び処置における、D K K - 3に関連するタンパク質イソ型、このタンパク質に対して免疫特異的である抗体等の、タンパク質を含む組成物の使用に関するものである。より詳しくは、本発明は、少なくとも3種の神経精神及び神経障害、即ち、双極性障害(Bipolar Affective Disorder)、精神分裂病(Schizophrenia)及び脈管性痴呆(Vascular Dementia)で差別的に発現する、本明細書中ではD P I - 6と称される、タンパク質イソ型を開示する。上述の障害におけるこのイソ型に係る診断及び治療用途が開示される。

【0002】関連技術の説明

D i c k k o p f - 3 (D k k - 3) は、W n t シグナル伝達経路を拮抗する (antagonise) 分泌性糖タンパク質の群に属する。W n t は、f r i z z l e d 7 - トランスメンブラン - スパンレセプター (frizzled seven-transmembrane-span receptor) に結合する、システインリッチな、分泌性糖タンパク質の大きな群であり、細胞の死及び胚のパターニングを調節する (Eastmann and Grosschedl, Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals, Curr Opin Cell Biol 1999 Apr 11:2 233-40)。近年の研究から、シナプスの形成を促進する中枢神経系 (C N S) における W n t 調節遺伝子のさらなる機能、低投与量のリチウム処置によって模倣されうる効果が示唆される (Jennings C., A signal for synapse formation, Nature Neuroscience 2000 Apr 3:4, 308; Hall AC, Lucas FR, Salinas PC, Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling, Cell 2000 Mar 3 100:5 525-35)。

【0003】

細胞内では、Wntシグナル伝達(Wnt signalling)は、細胞質ゾルのβ-カテニン(beta-catenin)の安定化を引き起こす。Wntがない場合には、β-カテニンは、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3β(glycogen synthase kinase3beta) (GSK3beta)によってリン酸化され、これによりβ-TrCPによるβ-カテニンのユビキチン化及びプロテアソーム(proteasome)の分解が起こる。β-カテニンのリン酸化は、足場タンパク質(scaffolding protein)であるアキシン(axin)またはコンダクチン(conductin)によって構築されるマルチタンパク質複合体(multiprotein complex)で生じる。

【0004】

そのレセプターであるFrizzledへのWntの結合により、Dishevelledタンパク質の活性化が起こり(Klingensmith J, Nusse R, Perrimon N: The Drosophila segment polarity gene dishevelled encodes a novel protein required for response to the wingless signal. Genes Dev 1994, 8:118-130.; Krasnow RE, Wong LL, Adler PN, Dishevelled is a component of the frizzled signaling pathway in Drosophila, Development 1995 Dec 121:124095-102; Theisen H, Purcell J, Bennett M, Kansagara D, Syed A, Marsh JL, Dishevelled is required during wingless signaling to establish both cell polarity and cell identity, Development 1994 Feb 120:2347-60)、これによりグリコーゲンシンターゼキナーゼ(glycogen synthase kinase) (GSK)のリン酸化が促進する(Cook D, Fry MJ, Hughes K, Sumathipala R, Woodgett JR, Dale TC, Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C, EMBO J 1996 Sep 2 15:174526-36)。GSKのリン酸化は、β-カテニンのリン酸化能を遮断し、これにより安定性及び蓄積が増加する(Munemitsu S, Albert I, Rubinfeld B, Polakis P, Deletion of an amino-terminal sequence beta-catenin in vivo and promotes hyperphosphorylation of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein, Mol Cell Biol 1996 Aug 16:84088-94.; Pai LM, Orsulic S, Bejsovec A, Peifer M, Negative regulation of Armadillo, a Wingless effector in Drosophila, Development 1997 Jun 124:112255-66; Yost C

, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT, The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3, *Genes Dev* 1996 Jun 15 10:12 1443-54)。 - カテニンは、Wnt ターゲット遺伝子を調節する、核内のT細胞因子(TCF) / リンパ球様エンハンサー因子(lymphoid enhancer factor)(LCF)群のものと相互作用できる。(Wodarz A, Nusse R, Mechanisms of Wnt signaling in development, *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998 14: 59-88)。WIF-1、ケルベロス(cerberus)(cer)及びFrzB等の、様々な分泌因子は、Wntに結合して、frizzledタンパク質との相互作用を遮断する。

【0005】

Dkkタンパク質は、未知のメカニズムによりWntシグナル伝達の潜在的なアントゴニストである。ヒトのDkk遺伝子群は、Dkk-1、Dkk-2、Dkk-3、Dkk-4及びSoggy(Sgy)と称する唯一のDkk-3関連タンパク質から構成される(Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K, Chang B, Duong T, Goodearl AD, Gearing DP, Sokol SY, McCarthy SA, Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family, *Gene* 1999 Oct 1 238: 2301-13)。Dkk-3 mRNAは脳及び心臓で非常に発現し、脾臓、腎臓、肝臓、小腸、胎盤及び肺では低レベルが検出できる(Tsuji T, Miyazaki M, Sakauchi M, Inoue Y, Namba M, A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines, *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Feb 5 268:1 20-4)。マウスのDkk-3 mRNAは、皮質及び海馬のニューロンで発現する(Krupnik et al., supra)。

【0006】

特定の腫瘍では、アキシン(axin)、 - カテニンまたは腫瘍抑制剤 APCの変異によっても、 - カテニンの安定化が起こる。 - カテニンの分解は、カゼインキナーゼCK1によってならびにタンパク質ホスファターゼPP2A及びPP2Cによって調節される。安定化 - カテニンは細胞核に入り、TCF転

写因子と会合し、これによりWnt - ターゲット遺伝子の転写が起こる。Smad4、Tsh、XSox17及びヒストンアセチルトランスフェラーゼCBPは、ターゲット遺伝子の発現を調節する。 - カテニンが存在しない場合には、特定のTCFが、コレプレッサー(co-repressor)であるグロウチヨ(groucho)及びCtBPと相互作用することによって転写を抑制する。TAK1及びNLKを含むMAP - キナーゼ経路によるTCFのリン酸化はWntシグナル伝達を負に調節する。 - カテニンはまた、カドヘリン細胞接着分子に結合して、アクチン細胞骨格への連結が生じる。Wnt経路に関するデータが、様々な系及び生物から得られた。関連遺伝子及び別の名称は下記のとおりである：Wnt/Wingless；GBP/frat1；アキシン/コンダクチン(axin/conductin)；GSK3beta/Zeste-white3/Shaggy；betaTrCP/Slimb/FWD1；TCF/LEF；CBP/p300。

【0007】

DPI-6として知られるタンパク質が従来文献に開示されてきたが、その活性ならびに診断及び治療での有用性は従来記載され、明らかにされていなかった。ゆえに、例えば、1998年7月2日に公開された、国際公開WO 98/27932号には、タンパク質が同定されたが、これは心臓病に関連して発見され、遺伝子の単離に関する実施例または脳脊髄液での存在はない。同様に、国際公開WO 99/14328号及びWO 98/46755号、及びWO 00/18914号では、同様の材料が同定されるが、ここでも、本明細書中に記載される活性及び存在が同定されていない。最後に、国際公開WO 00/52047号は、ヒトDKK-3の発見に関するものであり、これに関連するタンパク質及び核酸分子双方を記載するが、以下に記載されるような、脳脊髄液でのこの存在またはより重要なことでは、神経及び神経精神状態の存在及び経過でのその関係に関しては全く開示されていない。

【0008】

本発明の要約

本発明は、少なくとも3種の神経精神及び神経障害、即ち、双極性障害(Bipolar Affective Disorder)、精神分裂病及び脈管性痴呆(Vascular Dementia)で差

別的に発現する、タンパク質イソ型、D P I - 6を開示するものである。

【0009】

D P I - 6は、2次元電気泳動によって単離され、質量分析によって特徴が明らかになった。データベース検索の結果、下記GenBankへのエントリーによって、質量分析によって同定されたトリプシンペプチドと一致することが分かった：A F 1 7 7 3 9 6、ホモサピエンスd i c k k o p f - 3 (D K K - 3) mRNA、完全c d s (complete cds)及び相当するタンパク質に関するA A F 0 2 6 7 6 . 1。D K K - 3の核酸及びタンパク質配列もまた、国際公開W O 0 0 / 5 2 0 4 7号に開示され、その完全な開示は参考により本明細書に引用され、その一部をなす。

【0010】

したがって、第一の態様においては、本発明は、被検者から得られる生体試料におけるポリペプチドの量を検出するおよび/または定量する段階を有し、該ポリペプチドは、

- a) 図1または3に示されるアミノ酸配列；
- b) 図1または3のいずれかに示されるアミノ酸配列に関して一以上のアミノ酸の置換、欠失または挿入を有する誘導体；または
- c) 少なくとも10アミノ酸長である、上記a)またはb)で規定されるポリペプチドの断片

から選択されるものである、被検者における神経精神及び神経障害に関するスクリーニングおよび/またはこれの診断方法を提供するものである。

【0011】

第二の態様においては、本発明は、治療上有効な量の本発明の第一の態様に規定される少なくとも一のポリペプチドを被検者に投与することを有する、被検者における神経精神および/または神経状態の予防および/または処置方法を提供するものである。

【0012】

第三の態様においては、本発明は、双極性障害(BAD)、精神分裂病及び脈管性痴呆等の障害の予防および/または処置に使用される薬剤の調製における本

発明の第一の態様に規定される少なくとも一のポリペプチドの使用を提供するものである。

【0013】

被検者は哺乳動物であってもよく、サル、類人猿、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ及びウサギが本発明の概念に含まれるものの、好ましくはヒトである。

【0014】

第二及び第三の態様において、ポリペプチドまたはその断片が単離または組換え形態で提供されてもよく、また、他の部分に融合してもよい。特に、緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein) (米国特許第5,625,048号、第5,777,079号、第6,054,321号及び第5,804,387号) または及びDsRed蛍光タンパク質(DsRed fluorescent protein)(Matz, et al (1999) Nature Biotech. 17:969-973)等の極在化 - レポータータンパク質(localisation-reporter protein)とのポリペプチドまたはその断片の融合が特に包含される。ポリペプチドまたはその断片は、実質的に純粋な形態で、即ち、他のタンパク質を、実質的な程度にまで、含まずに、提供されてもよい。ゆえに、ポリペプチドは、これが存在する優位な成分である(すなわち、溶剤または担体を除いた重量/重量基準で測定する際に; 少なくとも50%; 好ましくは少なくとも75%、少なくとも90%、または少なくとも95%のレベルで存在する)組成物中に提供されてもよい。

【0015】

本発明のさらなる態様においては、本発明のポリペプチド、その誘導体及び断片、これに対する抗体、ならびにこれのアゴニスト及びアンタゴニストは、すべてはより詳細に以下に記載、詳述されるように、双極性うつ病(bipolar affected depression)、精神分裂病及び脈管性痴呆の処置を目的とする診断または治療の可能性のある薬剤のいずれかとしての、例えば、患者のこのような病気の存在または例(instance)を同定するための、さらには同様の能力で機能するかもしれない他の薬剤を同定するための、スクリーニングアッセイを含む診断アッセイの一部として使用されてもよい。

【0016】

したがって、本発明を、下記図面を参照しながら詳細に記載することを考慮することにより、より良好に理解するであろう。

【0017】

図面の簡単な説明

図1は、NCBIデータベースに記載され、受託番号AAF02676によって同定される、ヒトDKK-3のアミノ酸配列を示すものである。

【0018】

図2は、受託番号AF177396でNCBIに提示される、ヒトDKK-3の相当するmRNA及び完全なCDSを示すものである。

【0019】

図3は、図1に記載されるDKK-3のアミノ酸配列からトリプシン消化ペプチドとの一致で比較することから決定されたDPI-6のトリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列を表わすものである。

【0020】

図4は、CSF1～CSF12で称される、12個のランドマーク特徴を同定できるように注釈された正常なCSFの2次元電気泳動から得られた画像である。

【0021】

図5は、12個のDPI-6イソ型を示す、図4のものと同様の2次元ゲル画像である。

【0022】

詳細な説明

本発明をより十分理解するために、上記a)～c)の概念に含まれるポリペプチドをここでより詳細に説明する。

【0023】

a)の概念に含まれるポリペプチド

a)の概念に含まれるポリペプチドは、図1に示されるアミノ酸配列由来であってもよくまたは図3に相当するアミノ酸配列から構成されてもよく、または図1及び3に示される配列に対してさらなるN末端および/またはさらなるC末端

アミノ酸配列を有するものであってもよい。

【0024】

さらなるN - 末端またはC - 末端配列は、様々な理由により提供されてもよい。このような配列の追加(additional sequences)を提供するための技術は、当該分野において既知である。

【0025】

配列の追加は、特定のポリペプチドの特性を変更するために提供されてもよい。これは、特定の発現系において発現を向上するのにまたは発現の調節に有用でありうる。例えば、配列の追加は、タンパク質分解酵素による切断(proteolytic cleavage)に対するある保護を提供するものであってもよい。これは、ホルモンであるソマトスタチンをそのN - 末端で - ガラクトシダーゼ酵素の一部に融合させることによってなされる(Itakwa et al., Science 198: 105-63 (1977))。

【0026】

配列の追加はまた、同定または精製を促進するようにポリペプチドの性質を変えるのに有用でありうる。例えば、ポリペプチドがアフィニティクロマトグラフィーによって単離されうる部分に連結される融合タンパク質が提供されてもよい。この部分は抗原またはエピトープであってもよく、アフィニティカラムは当該抗原またはエピトープに(望ましくは、高い特異性度合いで)結合する固定化抗体または固定化抗体断片を含むものであってもよい。融合タンパク質は、一般的に、適当な緩衝液の添加によってカラムから溶出されうる。

【0027】

しかしながら、N - 末端またはC - 末端配列の追加は、ポリペプチドを得るのに使用される特定の技術の結果として単に存在するのみであり、ポリペプチドに特定の好ましい特性を付与する必要はない。このようなポリペプチドは本発明の概念に含まれる。

【0028】

N - 末端またはC - 末端配列の追加が存在するかにかかわらず、得られたポリペプチドが図1または3のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫学的または生物学的活性を発揮することが好ましい。

【0029】

b) の概念に含まれるポリペプチド

ここで上記b)に規定されるポリペプチドに向けると、これらのポリペプチドは上記a)で記載されたポリペプチドの変異体であることは、当業者に理解されるであろう。このような変異体は、図1または3のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫学的または生物学的活性を発揮することが好ましい。

【0030】

タンパク質の機能に影響を与えないタンパク質のアミノ酸配列の変更を生じてもよい。これらとしては、アミノ酸の欠失、挿入及び置換が挙げられ、これは複数の翻訳開始部位及び終結部位の別のスプライシングおよび/または存在から生じうる。多形性は、翻訳プロセスの誤り(infidelity)の結果生じてもよい。ゆえに、タンパク質の生物学的または免疫学的機能に影響を与えないアミノ酸配列の変更は許容される。

【0031】

当業者は、しばしば、様々な変化を特定の活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列に行なって、当該活性の少なくとも一部を有する、及び好ましくは当該活性の実質的な部分を有する変異体(場合によっては、「突然変異タンパク質(mut ein)」として知られている)を製造できると考えるであろう。上記a)で記載されるポリペプチドのこのような変異体は、本発明の概念に含まれ、以下により詳細に説明する。これらとしては、対立遺伝子及び非対立遺伝子変異体がある。

【0032】

本発明の変異体の例としては、一以上のアミノ酸の一以上の他のアミノ酸による置換に加えて、上記a)で記載されるポリペプチドがある。当業者は、様々なアミノ酸が類似の性質を有することを知っている。ポリペプチドの一以上のこのようなアミノ酸は、しばしば、そのポリペプチドの所望の活性を失うことなく一以上の他のこのようなアミノ酸で置換されうる。

【0033】

ゆえに、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンのアミノ酸

は、しばしば、相互に置換されうる（脂肪族側鎖を有するアミノ酸）。これらの可能な置換のうちでは、（比較的短い側鎖を有するため）グリシン及びアラニンを用いて相互に置換されること、また、（疎水性であるより大きな脂肪族側鎖を有するため）バリン、ロイシン及びイソロイシンを用いて相互に置換されることが好ましい。

【0034】

しばしば相互に置換されうる他のアミノ酸としては下記が挙げられる：

- フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン（芳香族側鎖を有するアミノ酸）；
- リジン、アルギニン及びヒスチジン（塩基性側鎖を有するアミノ酸）；
- アスパラギン酸塩及びグルタミン酸塩（酸性側鎖を有するアミノ酸）；
- アスパラギン及びグルタミン（アミド側鎖を有するアミノ酸）；ならびに
- システイン及びメチオニン（硫黄含有側鎖を有するアミノ酸）。

【0035】

このような置換は、しばしば、「同類」または「半同類」アミノ酸置換と称される。

【0036】

アミノ酸の欠失または挿入もまた、上記a)で記載されるアミノ酸配列に対してなされてもよい。ゆえに、例えば、ポリペプチドの生物学的および/または免疫学的活性に実質的な効果をもたない、または少なくともこのような活性を失わせないアミノ酸は欠失されてもよい。ポリペプチドの全長及び分子量が活性は依然として保持したまま減少できるので、このような欠失は好ましい。これにより、特定の目的のために必要なポリペプチドの量を減少することが可能である - 例えば、投与レベルを減らすことができる。

【0037】

上記a)で記載される配列に対するアミノ酸の挿入もまたなされうる。これは、本発明で使用されるポリペプチドの性質を変えるため（例えば、融合タンパク質について上記で説明したように、同定、精製または発現を促進するため）になされてもよい。

【0038】

上記a)で記載される配列に対するアミノ酸の変更は、適当な技術を用いて、例えば、特定部位の突然変異誘発(Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551)を用いることによってなされる。

【0039】

本発明の概念に含まれるアミノ酸の置換または挿入は天然に生じるまたは非天然に生じるアミノ酸を用いてなされうると、考えられるべきである。天然または合成のアミノ酸を使用するか否かにかかわらず、L-アミノ酸のみが存在することが好ましい。

【0040】

(置換、挿入または変更によるにかかわらず)アミノ酸の変更がなされるか否かにかかわらず、本発明の好ましいポリペプチドは、上記a)で規定されるポリペプチドと少なくとも50%の配列の一致率を有し、より好ましくは配列の一致率の度合いは少なくとも75%である。少なくとも90%または少なくとも95%の配列の一致率が最も好ましい。

【0041】

2個のアミノ酸配列のまたは2個の核酸配列の一致率(%)は、最適な比較を目的として配列を並列し(例えば、ギャップを配列との最良のアラインメントを目的として第1の配列中に導入できる)、相当する位置でのアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較することによって決定される。「最良のアラインメント(best alignment)」は、最も高い一致率(%)を生じる2個の配列のアラインメントである。一致率(%)は、比較される配列における一致するアミノ酸残基またはヌクレオチドの数によって決定される(即ち、一致率(%) = 一致する位置の数 / 位置の全数 × 100)。

【0042】

2個の配列間の一致率(%)の決定は、当業者に既知の数値アルゴリズムを用いて達成できる。2つの配列を比較するための数学的アルゴリズムの例としては、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877と同様にして修正された、Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. US

A 87:2264-2268がある。Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラムは、このようなアルゴリズムを組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索 (BLAST nucleotide searches) は、該NBLASTプログラムをスコア = 100、ワードレングス (wordlength) = 12 で用いて実施することにより、本発明の核酸分子に相同性を有するヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラムをスコア = 50、ワードレングス = 3 で用いて実施することにより、本発明のタンパク質分子に相同性を有するアミノ酸配列を得ることができる。比較目的でギャップドアライメントを得るために、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402で記載されるようにして、ギャップドBLAST (Gapped BLAST) が利用できる。または、PSI-Blastを用いて、分子間の距離関係 (Id) を検出する反復検索を実施することができる。BLAST、ギャップドBLASTおよびPSI-Blastプログラムを用いる際に、それぞれのプログラム (例えば、XBLASTおよびNBLAST) のデフォルトのパラメータが用いられ得る。http://www.ncbi.nlm.nih.gov.を参照すること。

【0043】

配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの他の例として、Myers & Miller, CABIOS (1989)のアルゴリズムがある。CGC配列アライメントソフトウェアパッケージの一部である、ALIGNプログラム(version 2.0)は、このようなアルゴリズムを組み込んでいる。当該分野において既知の配列分析のための他のアルゴリズムとしては、Torellis and Robotti (1994) Comput. Appl. Biosci., 10 :3-5で記載されているADVANCEおよびADAM; ならびにPearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8で記載されているFASTAがある。FASTAでは、k t u pは検索の感度と速度を設定するコントロールオプションである。

【0044】

高度の配列の一致率が存在する際には、アミノ酸配列中にはほとんど相違はないであろう。ゆえに、例えば、20未満、10未満、または5未満の相違がある

かもしれない。

【0045】

c) の概念に含まれるポリペプチド

上述したように、得られた長さの減ったポリペプチドが依然として所望の活性を有するまたは有用な抗体を生じることができる際には、ポリペプチドの長さを減少することが好ましい場合が多い。したがって、本発明の態様c)は、上記a)またはb)のポリペプチドの断片をカバーするものである。

【0046】

当業者は、上記した技術を用いて特定の断片が活性を有するか否かを決定できる。好ましい断片は少なくとも10アミノ酸長である。これらは、少なくとも20、少なくとも50または少なくとも100アミノ酸長であってもよい。

【0047】

以下に記載されるように、本発明で使用されるポリペプチドは、上記状態への免疫治療アプローチに用途を見出すであろう。当業者は、一以上のこのようなポリペプチドの調製を目的として、好ましいアプローチは組換えDNA技術に基づくものでありと考えるであろう。加えて、上記ポリペプチドまたはその断片をコード化する核酸分子は、それ自体使用されてもよい。ゆえに、第四の態様においては、本発明は、被検者から得られる生体試料における核酸の量を検出するおよび/または定量する段階を有し、該核酸分子は、

a) 図2に示されるRNA配列またはそのDNA等価物を少なくとも一部含む若しくはこれと一致する；

b) a)の配列と相同性を有する配列を有する；

c) a)若しくはb)の配列と同じポリペプチドをコードする配列を有する；

d) a)、b)及びc)のいずれかと実質的な一致性を示す配列を有する；または

e) 図1若しくは3のいずれかに示されるアミノ酸分子の誘導体または断片をコードする配列、

被検者における神経精神または神経状態に関するスクリーニングおよび/またはこのような状態の診断方法を提供するものである。

【0048】

第五の態様においては、本発明は、治療上有効な量の本発明の第四の態様に規定される少なくとも一の核酸を被検者に投与することを有する、被検者における神経精神及び神経状態の予防および/または処置方法を提供するものである。

【0049】

第六の態様においては、本発明は、神経精神または神経状態の予防および/または処置に使用される薬剤の調製における本発明の第四の態様に規定される少なくとも一の核酸の使用を提供するものである。

【0050】

ここで、これらの核酸分子について、より詳細に説明する。

【0051】

上記a)、b)及びc)のいずれかと実質的な一致率を示す配列が、例えば、少なくとも50%、少なくとも75%または少なくとも90%若しくは95%の配列の一致率を有することが好ましい。

【0052】

本発明で使用されるポリペプチドは、遺伝コードの既知の縮重を考慮して、非常に様々な核酸分子をコードしてもよい。これらの分子すべては本発明の概念に含まれる。これらは、ベクター中に挿入され、クローニングされることによって、さらなる研究のためのDNAまたはRNAを多量に提供することができる。適当なベクターを宿主細胞に導入して、当業者に既知の技術を用いて本発明で使用されるポリペプチドの発現を可能にしてもよい。

【0053】

上記で使用される際の「RNA等価物」ということばは、RNAでは、「U」が遺伝コードにおける「T」に代わるという事実を見越して、所定のRNA分子が所定のDNAの配列と相補的である配列を有することを示す。核酸分子は、単離された、組換えのまたは化学合成の形態であってもよい。

【0054】

タンパク質及びポリペプチドをクローニングし、発現させ、及び精製するための技術は、当業者には既知である。DNA構築物は、当該分野において既知の方

法を用いて容易に形成できる。これらの技術は、例えば、J. Sambrook et al, Molecular Cloning 2nd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989); in Old & Primrose Principles of Gene Manipulation 5th Edition, Blackwell Scientific Publications (1994); 及び in Stryer, Biochemistry 4th Edition, W H Freeman and Company (1995)に開示される。次に、プロモーター、エンハンサー、シグナル配列、リーダー配列、翻訳開始及び終結シグナルならびにDNA安定性制御領域の付加、または融合パートナーの付加などの、DNA構築物及び発現させたタンパク質の修飾が容易になされてもよい。

【0055】

一般的に、DNA構築物は、ファージまたはプラスミド由来のベクター中に挿入されるであろう。タンパク質の発現は、真核生物または原核生物由来である宿主細胞中へのベクターの形質転換またはトランスフェクションによって達成される。このようなベクター及び適当な宿主細胞は、本発明のさらなる態様を形成する。

【0056】

核酸構造物の知見が、抗体を生じるのに及び遺伝子治療に使用されてもよい。これに関する技術は、以下により詳細に説明されるように、当業者には既知である。

【0057】

適当な発現システムを使用することによって、本発明のポリペプチドを、グリコシル化または非グリコシル化形態で発現してもよい。非グリコシル化形態は、大腸菌(*E. coli*)等の、原核細胞での発現によって製造されうる。

【0058】

N-末端メチオニンを含むポリペプチドを特定の発現系を用いて製造してもよく、その一方で、成熟したポリペプチドはこの残基を欠失しているであろう。

【0059】

本発明で使用されるポリペプチドをクローニングする、発現させる及び精製するための好ましい技術を以下に要約する。

【0060】

ポリペプチドは、天然にまたは変性条件下で調製された後、再生されてもよい。バキュロウィルスによる発現ベクターとしては、検出を助け、その後のタンパク質の精製を可能にするために同じフレームに(in frame)クローニングされたエピトープタグ配列(例えば、myc、V5またはHis)を有してもよい、分泌プラスミド(secretory plasmid)(Pharmingen製のpACGP67など)がある。哺乳動物の発現ベクターとしては、pCDNA3及びpSecTag(双方ともInvitrogen製)、ならびにpREP9及びpCEP4(invitrogen製)が挙げられる。大腸菌(E. coli)システムとしては、pBadシリーズ(His標識(His tagged) - Invitrogen製)またはpGexシリーズ(Pharmacia製)が挙げられる。

【0061】

本明細書で「コーディング」核酸分子と称される、本発明で使用されるポリペプチドをコードする核酸分子に加えて、本発明はまた、これに相補的な核酸分子を包含するものである。ゆえに、例えば、2本鎖核酸分子の双方のストランドが、(相互に結合するか否かにかかわらず)本発明の概念に含まれる。mRNA分子及び相補的DNA分子(例えば、cDNA分子)もまた包含される。

【0062】

上記した核酸分子のいずれかとハイブリッド形成できる核酸分子もまた本発明によってカバーされる。このような核酸分子は、本明細書において、「ハイブリッド形成」核酸分子と称される。ハイブリッド形成核酸分子は、例えば、プローブまたはプライマーとして有用である。

【0063】

望ましくは、このようなハイブリッド形成分子は、少なくとも10ヌクレオチド長であり、好ましくは少なくとも25または少なくとも50ヌクレオチド長である。ハイブリッド形成核酸分子は、好ましくは、上記で詳述された(a)、(b)、(c)、(d)または(e)の概念に含まれる核酸とハイブリッド形成する。

【0064】

望ましくは、ハイブリッド形成分子は、ストリンジェントなハイブリダイゼー

ション条件下でこのような分子とハイブリッド形成するであろう。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の一例としては、試みられたハイブリダイゼーションが約0.9モル濃度である塩溶液を用いて約35～約65の温度で行なわれることがある。しかしながら、当業者は、プローブ長、塩基組成、存在するイオンのタイプなどを考慮するために、適切にこのような条件を変更できるであろう。

【0065】

タンパク質をコード化するDNAの操作は、タンパク質を修飾すること及び精製を目的として多量のタンパク質を得ること双方を目的として特に強力な技術である。これは、所望の核酸配列を増幅するPCR技術の使用を含むものであってもよい。ゆえに、本明細書中で提供される配列データは、所望の配列を標的とした後、高度に増幅できるようにPCRで使用されるプライマーを設計するのに使用できる。

【0066】

具体的には、プライマーは、少なくとも5ヌクレオチド長であろうし、通常、少なくとも10ヌクレオチド長（例えば、15～25ヌクレオチド長）であろう。場合によっては、少なくとも30または少なくとも35ヌクレオチド長のプライマーが使用されてもよい。

【0067】

さらなる代わりとして、化学合成が使用されてもよい。これは、自動化されてもよい。比較的短い配列を化学的に合成して、一緒に連結することにより、より長い配列を得てもよい。

【0068】

プライマーおよび/またはプローブとして使用されるのに加えて、本発明のハイブリッド形成核酸分子は、相補的な核酸分子に結合することによって本発明の物質の発現を変更するためにアンチセンス分子として使用できる。この技術は、アンチセンス治療に使用できる。

【0069】

本発明のハイブリッド形成核酸分子は、上記(a)～(e)の概念に含まれる

核酸分子とその長さに沿って高い配列の一致性（例えば、少なくとも50%、少なくとも75%または少なくとも90%若しくは95%の配列の一致性）を有する。当業者には理解されるように、所定の1本鎖の核酸分子が他の核酸分子と有する配列の一致性が高くなるほど、適当な条件下で他の核酸分子に相補的である核酸分子がハイブリッド形成する可能性が大きくなる。

【0070】

前記した説明を考慮すると、当業者は、大多数の核酸が本発明の概念に含まれることを理解するであろう。特記しない限り、本発明の核酸分子は、下記特性の一以上を有してもよい：

- 1) 核酸分子は、DNAまたはRNAであってもよい；
- 2) 核酸分子は、1本または2本鎖であってもよい；
- 3) 核酸分子は、組換え形態で提供されてもよく、例えば、5' および / または 3' フランキング配列に共有結合することにより、天然では生じない分子が提供されてもよい；
- 4) 核酸分子は、一般的に天然で生じる5' および / または 3' フランキング配列を持たずに提供されてもよい；
- 5) 核酸分子は、実質的に純粋な形態で提供されてもよい。ゆえに、核酸分子は、混入タンパク質をおよび / または他の核酸を実質的に含まない形態で提供されてもよい；ならびに
- 6) 核酸分子は、イントロンを持つようにまたはイントロンを持たずに（例えば、cDNAとして）提供されてもよい。

【0071】

本発明で使用されるポリペプチドを検出 / 定量するための簡便な手段としては、抗体の使用がある。ゆえに、本発明で使用されるポリペプチドはまた、抗体を生じるという用途が見出せる。

【0072】

第七の態様においては、本発明は、被検者における神経精神および / または神経状態に関するスクリーニングおよび / またはこのような状態の診断を目的とした本発明の第一の態様で規定される少なくとも一のポリペプチドに結合する抗体

の使用を提供するものである。好ましくは、抗体は、被検者から得られた生体試料中の本発明の第一の態様で規定されるポリペプチドの量を検出するおよび/または定量するのに使用される。

【0073】

第八の態様においては、本発明は、治療上有効な量の本発明の第一の態様で規定される少なくとも一のポリペプチドに結合する抗体を被検者に投与することを有する、被検者における神経精神および/または神経状態の予防および/または処置方法を提供するものである。

【0074】

第九の態様においては、本発明は、神経精神および/または神経状態の予防および/または処置に使用される薬剤の調製における本発明の第一の態様で規定される少なくとも一のポリペプチドに結合する抗体の使用を提供するものである。

【0075】

好ましい抗体は、このようなポリペプチドを精製するのにおよび/またはこれの活性を阻害するのに使用できるように、本発明のポリペプチドに特異的に結合する。本抗体は、モノクローナルであってもまたはポリクローナルであってもよい。

【0076】

ゆえに、本発明で使用されるポリペプチド、その断片若しくは他の誘導體、またはこれの類似体は、免疫原に免疫特異的に結合する抗体を生じるのための免疫原として使用されてもよい。本発明の抗体としては、以下に制限されないが、ポリクローナル、モノクローナル、二重特異性、ヒト化またはキメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片及びF(ab')断片、Fab発現ライブラリーによって製造される断片、抗イディオタイプ(抗-Id)抗体、ならびに上記いずれかのエピトープ結合断片が挙げられる。本明細書中で使用される「抗体」ということばは、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性のある部分、即ち、抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を意味する。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子のいずれのクラス(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD及びIgA)またはサブクラスであってもよい。

【0077】

抗体の製造において、所望の抗体のスクリーニングは、当該分野における既知の技術、例えば、ELISA（酵素結合免疫吸着検査法）によって達成できる。例えば、本発明で使用されるポリペプチドの特定のドメインを認識する抗体を選択するために、このようなドメインを含むポリペプチド断片に結合する生成物について生成したハイブリドーマをアッセイしてもよい。第一のポリペプチド同族体には特異的に結合するが第二のポリペプチド同族体には特異的に結合しない（またはあまり貪欲に結合しない）抗体を選択するために、第一のポリペプチド同族体にはポジティブに結合しかつ第二のポリペプチド同族体には結合しない（または結合が抑制される）ことを基準に選択することができる。

【0078】

本発明で使用されるポリペプチドに対するモノクローナル抗体（mAb）の調製に関しては、培養物における連続細胞系による抗体分子の生産を提供する技術が使用される。例えば、元々Kohler and Milstein(1975, Nature 256:495-497)によって開発されたハイブリドーマ技術、さらにはトリオーマ技術(trioma technique)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72)、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)がある。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD等のいずれかの免疫グロブリンクラスおよびこれらのいずれかのサブクラスであってもよい。本発明で使用されるmAbを産生するハイブリドーマは、インビトロまたはインビボで培養されてもよい。本発明のさらなる実施態様においては、モノクローナル抗体は、既知の技術（PCT/US90/02545号）を用いて無菌動物で生産されてもよい。

【0079】

モノクローナル抗体としては、以下に制限されないが、ヒトのモノクローナル抗体及びキメラモノクローナル抗体（例えば、ヒト-マウスキメラ）が挙げられる。キメラ抗体は、ヒトの免疫グロブリンの定常領域及びマウスのmAb由来の変換領域を有するもの等の、異なる部分が異なる動物種由来である分子である。

(例えば、米国特許第4,816,567号;及び米国特許第4,816,397号を参照)。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の一以上の相補的決定領域(complementarily determining region)(CDR)及びヒトの免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する非ヒト種由来の抗体分子である(例えば、米国特許第5,585,089号を参照)。

【0080】

キメラ及びヒト化モノクローナル抗体は、例えば、WO 87/02671; EP-A-184,187; EP-A-171,496; EP-A-173,494; WO 86/01533; 米国特許第4,816,567号; EP-A-125,023; Better et al., 1988, Science 240:1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Canc. Res. 47:999-1005; Wood et al., 1985, Nature 314:446-449; Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi et al., 1986, Bio/Techniques 4:214; U.S. Patent 5,225,539; Jones et al., 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534; 及びBeidler et al., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060に記載される方法を用いて、当該分野において既知の組換えDNA技術によって生産されうる。

【0081】

完全ヒト抗体が、ヒト患者の治療のための処置では特に望ましい。このような抗体は、内因性の免疫グロブリンの重及び軽鎖遺伝子を発現できないが、ヒトの重及び軽鎖遺伝子を発現できる形質転換マウスを用いて生産できる。形質転換マウスを、所定の抗原、例えば、本発明で使用されるポリペプチドのすべてまたは一部で一般的な方法で免疫処置する。この抗原に対するモノクローナル抗体は、公知のハイブリドーマ技術を用いて得られる。形質転換マウスによってもたれるヒト免疫グロブリントランスジーンは、B細胞分化中に再編成し(rearrange)、その後、クラススイッチ及び体細胞変異を受ける。ゆえに、このような技術を用いることによって、治療上有用なIgG、IgA、IgM及びIgE抗体を製造

することが可能である。ヒト抗体を製造するためのこの技術のあらましとして、Lonberg and Huszar (1995), Int. Rev. Immunol. 13:65-93を参照。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体を製造するためのこの技術ならびにこのような抗体を製造するためのプロトコルの詳細な討論については、例えば、米国特許第5,625,126号；米国特許第5,633,425号；米国特許第5,569,825号；米国特許第5,661,016号；及び米国特許第5,545,806号を参照。加えて、Abgenix, Inc. (Freemont, CA)及びGenpharm (San Jose, CA)等の会社が、上記したと同様の技術を用いて所定の抗原に対するヒト抗体を提供するのに従事できる。

【0082】

所定のエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「誘導選択(guided selection)」と称される技術を用いて得られる。このアプローチでは、所定の非ヒトモノクローナル抗体、例えば、マウス抗体を用いて、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を誘導する(Jespers et al. (1994) Bio/technology 12:899-903)。

【0083】

本発明で使用される抗体はまた、当該分野において既知の様々なファージディスプレイ方法(phage display method)を用いて得られる。ファージディスプレイ方法では、機能抗体ドメインを、これらをコード化するポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面で表示させる(display)。特に、このようなファージは、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒトまたはマウス）から発現する抗原結合ドメインをディスプレイするのに利用できる。関心のある抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて、例えば、標識抗原または固体表面若しくはビーズに結合する若しくは捕捉される抗原を用いて、選択または同定されうる。これらの方法で使用されるファージとしては、具体的には、ファージ遺伝子IIIまたは遺伝子VIIITANPAK質のいずれかに組換えにより融合されるFab、Fvまたはジスルフィド安定化Fv抗体ドメインを有するファージから発現されるfd及びM13結合ドメインを含む線状ファージがある。本発明で使用される抗体を作製するのに使用できる

ファージディスプレイ方法としては、Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182: 41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); PCT/GB91/01134号; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 及び米国特許第5,698,426号;第5,223,409号;第5,403,484号;第5,580,717号;第5,427,908号;第5,750,753号;第5,821,047号;第5,571,698号;第5,427,908号;第5,516,637号;第5,780,225号;第5,658,727号;第5,733,743号及び第5,969,108号に開示されるものが挙げられる。

【0084】

上記引例で記載されるように、ファージ選択後は、ファージ由来の抗体コーディング領域を単離して、用いることにより、ヒト抗体を含む、全抗体、または他の所望の抗原結合断片が得られ、これを、例えば、以下に詳細に説明するようにして、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、及び細菌等の、所望の宿主中で発現できる。例えば、Fab、Fab'及びF(ab')₂断片を組換えにより産生する技術はまた、WO 92/22324;Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); 及び Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); 及び Better et al., Science 240:1041-1043 (1988)に開示されるものなどの当該分野において既知の方法を用いて使用できる。

【0085】

単鎖Fv及び抗体を産生するのに使用できる技術の例としては、米国特許第4,946,778号及び第5,258,498号;Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993); 及び Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988)に記載されるものが挙げられる。

【0086】

本発明はさらに、当該分野において既知の方法によって作製できる、二重特異性抗体の使用を提供するものである。全長の二重特異性抗体の従来の生産は、2つの鎖が異なる特異性を有する、2つの免疫グロブリンの重鎖 - 軽鎖対の同時発現(coexpression)によるものである(Milstein et al., 1983, Nature 305:537-539)。免疫グロブリンの重及び軽鎖のランダムな組み合わせにより、これらのハイブリドーマ(クオドロマ(quadromas))は、うち一つのみが正しい二重特異性構造を有する、10個の異なる抗体分子の潜在的な混合物を生産する。一般的に、アフィニティクロマトグラフィー段階によって行なわれる、正しい分子の精製は、むしろ扱いにくく、生成物の収率が低い。同様の方法が、WO 93/08829に、およびTraunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659に開示される。

【0087】

異なるかつより好ましいアプローチによると、所望の結合特異性(抗体 - 抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを、免疫グロブリンの定常ドメイン配列に融合させる。この融合物は、好ましくは、ヒンジの少なくとも一部、CH2及びCH3領域を含む、免疫グロブリンの重鎖定常ドメインを有する。融合物は、融合物の少なくとも一中に存在する、軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)を有することが好ましい。免疫グロブリンの重鎖融合物、及び必要であれば、免疫グロブリンの軽鎖をコード化するDNAは、別の発現ベクターに挿入され、適当な宿主生物体中に一緒にトランスフェクションされる(co-transfected)。これにより、構築に使用される3個のポリペプチド鎖の不等な割合が最適な収率を生じる際の実施態様における3個のポリペプチド断片の相互の割合を非常に柔軟性をもって調節できる。しかしながら、等しい割合の少なくとも2個のポリペプチド鎖の発現により高い収率が得られる場合にはまたはその割合に特に有意性がない場合には一の発現ベクター中に2または3個すべてのポリペプチド鎖に関するコーディング配列を挿入することが可能である。

【0088】

このアプローチの好ましい実施態様においては、二重特異性抗体は、一方のア

ームに第一の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、および他方のアームに(第二の結合特異性を提供する)ハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対から構成される。二重特異性分子の半分のみにおける免疫グロブリン軽鎖の存在により容易な分離がなされるため、この非対称な構造は望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせからの所望の二重特異性化合物の分離を容易にすることが見出された。このアプローチは、WO 94/04690に開示されている。二重特異性抗体を得るためのさらなる詳細については、例えば、Suresh et al., Methods in Enzymology, 1986, 121:210を参照。

【0089】

本発明は、抗ポリペプチド免疫グロブリン分子の機能的に活性のある断片、誘導体または類似体を提供するものである。「機能的に活性のある」とは、その断片、誘導体または類似体が、断片、誘導体または類似体がこれ由来である抗体によって認識される同じ抗原を認識する抗-抗-イデオタイプ抗体(即ち、3次抗体(tertiary antibody))を誘発できることを意味する。詳細には、好ましい実施態様においては、免疫グロブリン分子のイデオタイプの抗原性は、抗原を特異的に認識するCDR配列に対してC末端であるフレームワーク及びCDR配列の欠失によって促進される。どのCDR配列が抗原に結合するかを決定するために、CDR配列を含む合成ペプチドが、当該分野において既知の結合アッセイ方法によって抗原を用いる結合アッセイに使用できる。

【0090】

本発明は、以下に制限されないが、F(ab')₂断片及びFab断片等の抗体断片を提供するものである。特定のエピトープを認識する抗体断片は、既知の技術によって得られる。F(ab')₂断片は、可変領域、軽鎖定常領域及び重鎖のCH1ドメインから構成され、抗体分子のペプシン消化によって得られる。Fab断片は、F(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することによって得られる。本発明はまた、本発明の抗体の重鎖及び軽鎖二量体、またはFv若しくは単鎖抗体(SCA)等のこの最小断片(例えば、米国特許第4,946,778号; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; 及び Ward et al., 1989, Nature 334:544-54

に記載されるような)、または本発明の抗体と同じ特異性を有する他の分子を提供するものである。単鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してFv領域の重及び軽鎖断片を連結することにより、単鎖ポリペプチドを得ることによって形成される。大腸菌(*E. coli*)における機能的なFv断片のアセンブリに関する技術を使用してもよい(Skerra et al., 1988, Science 242:1038-1041)。

【0091】

他の実施態様においては、本発明は、例えば、免疫グロブリンが、免疫グロブリンではない他のタンパク質(またはこの一部、好ましくはタンパク質の少なくとも10、20または50アミノ酸部分)のアミノ酸配列のN-末端若しくはC-末端のいずれかで、共有結合(例えば、ペプチド結合)を介して融合する、本発明の免疫グロブリンの融合タンパク質(またはこれの機能的に活性のある断片)を提供するものである。好ましくは、免疫グロブリン、またはこの断片は、定常ドメインのN-末端で他のタンパク質に共有結合する。上述したように、このような融合タンパク質は、精製が容易であり、インビボでの半減期を増加し、免疫系への上皮バリアを介した抗原のデリバリーを促進する。

【0092】

本発明で使用される免疫グロブリンは、即ち、このような共有結合が免疫特異的な結合を損なわない限りいずれかのタイプの分子の共有結合によって、修飾される類似体及び誘導体を包含する。例えば、以下に制限されないが、免疫グロブリンの誘導体及び類似体としては、グリコシル化、アセチル化、ペギレーション(pegylation)、リン酸化、アミド化、既知の保護/ブロック基による誘導化(derivatization)、蛋白分解による切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質への結合などによって、さらに修飾されたものが挙げられる。数多くの化学的修飾のいずれかは、以下に制限されないが、特異的な化学切断、アセチル化、ホルミル化等の、既知の技術によって行なわれてもよい。さらに、類似体または誘導体は、一以上の非古典的なアミノ酸(non-classical amino acid)を含んでもよい。

【0093】

前記抗体は、診断方法などにおいて、例えば、これらのタンパク質をイメージ化または放射線によるイメージ化(radioimaging)、適当な生体サンプルにおける

このレベルを測定することを目的として、及び放射線治療のために、本発明で使用されるポリペプチドの位置及び活性に関する当該分野における既知の方法に使用できる。

【0094】

本発明の抗体は、抗体の合成に関する当該分野における既知の方法によって、特に、化学合成によってまたは組換え発現によって製造でき、好ましくは、組換え発現技術によって製造される。

【0095】

抗体、またはこれの断片、誘導体若しくは類似体の組換え発現は、抗体をコード化する核酸の構築を必要とする。抗体のヌクレオチド配列が知られている際には、抗体をコード化する核酸は、簡単にいうと、抗体をコード化する配列の部分を含ま重複オリゴヌクレオチドの合成、これらのオリゴヌクレオチドのアニーリング及び連結、ならびに次のPCRによる連結されたオリゴヌクレオチドの増幅を含む、(例えば、Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242に記載されるような) 化学的に合成されたオリゴヌクレオチドからアセンブリされてもよい。

【0096】

または、抗体をコード化する核酸は、抗体をクローニングすることによって得てもよい。特定の抗体をコード化する核酸を含むクローンは利用できないが、抗体分子の配列が分かっている際には、抗体をコード化する核酸は、配列の3'及び5'末端にハイブリダイズ可能である合成プライマーを用いたPCR増幅によってまたは特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いたクローニングによって、適当な源(例えば、抗体cDNAライブラリー、または抗体を発現する組織若しくは細胞から得られるcDNAライブラリー)から得られてもよい。

【0097】

特定の抗原を特異的に認識する抗体分子が利用できない(またはこのよう抗体をコード化する核酸をクローニングするためのcDNAライブラリーの源)際には、特定の抗原に特異的な抗体は、当該分野において既知の方法によって、例え

ば、ウサギ等の動物を免疫処置して、ポリクローナル抗体を得ることによって、または、より好ましくはモノクローナル抗体を得ることによって、得てもよい。または、抗体の少なくともF a b部分をコード化するクローンを、特定の抗原に結合するF a b断片のクローンについて（例えば、Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281に記載されるようにして）F a b発現ライブラリーをスクリーニングすることによってまたは抗体ライブラリーをスクリーニングする（例えば、Clackson et al., 1991, Nature 352:624; Hane et al., 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937を参照）ことによって得てもよい。

【0098】

抗体分子の少なくとも可変ドメインをコード化する核酸が得られたら、これを抗体分子の定常領域をコード化するヌクレオチド配列を含むベクター中に導入してもよい（例えば、WO 86/05807；WO 89/01036；及び米国特許第5,122,464号を参照）。完全抗体分子を発現させる核酸と同時に発現させるための完全な軽または重鎖を含むベクターを使用してもよい。次に、抗体をコード化する核酸を用いて、スルフヒドリル基を含まないアミノ酸残基との鎖内のジスルフィド結合に関係する一以上の可変領域システイン残基を置換する（または欠失する）のに必要なヌクレオチドの置換または欠失を導入してもよい。このような修飾は、例えば、以下に制限されないが、化学的突然変異誘発、インビトロの特定部位の突然変異誘発(Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551)、PCRを基礎とする方法などの、ヌクレオチド配列における特異的な変異または欠失の導入に関する当該分野において既知の方法によって行なわれる。

【0099】

加えて、適当な生物学的活性を有するヒト抗体分子由来の遺伝子により一緒に適当な抗原特異性を有するマウス抗体分子由来の遺伝子をスプライシングすることによる「キメラ抗体」の製造を目的として開発された技術(Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454)が使用できる。上記したように、キメラ抗体は、マウスm A b由来の可変領域及びヒト抗体定常領域

を有するもの、異なる部分が異なる動物種由来である分子であり、例えば、ヒト化抗体がある。

【0100】

抗体分子をコード化する核酸が得られたら、抗体分子の製造用のベクターが当該分野において既知の技術を用いて組換えDNA技術によって製造される。ゆえに、抗体分子配列を含む核酸を発現することによる本発明で使用されるポリペプチドの調製方法が本明細書において説明される。当業者に既知の方法が、抗体分子のコーディング配列ならびに適当な転写及び翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築するのに使用できる。これらの方法としては、例えば、インビトロの組換えDNA技術、合成技術、及びインビボの遺伝子組換えが挙げられる。例えば、Sambrook et al. (1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)及びAusubel et al. (eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY)に記載される技術を参照。

【0101】

発現ベクターは公知の技術によって宿主細胞にトランスフェクションされた後、トランスフェクションされた細胞は公知の技術によって培養されて本発明の抗体を生産する。

【0102】

本発明の組換え抗体を発現するのに使用される宿主細胞は、特に全組換え抗体分子の発現用の、大腸菌(*Escherichia coli*)等の細菌細胞、または好ましくは、真核細胞であってもよい。特に、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子プロモーター要素(major intermediate early gene promoter element)などのベクターと組み合わせられた、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)等の哺乳動物細胞が抗体の有効な発現系である(Foecking et al., 198, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2)。

【0103】

様々な宿主 - 発現ベクター系が本発明の抗体分子を発現させるのに使用される。このような宿主 - 発現ベクター系は、これにより関心のあるコーディング配列

が製造された後精製されるベヒクルを表わす(represent)が、また、適当なヌクレオチドコーディング配列で形質転換またはトランスフェクションされると、本発明の抗体分子を*in situ*で発現する細胞を表わす。これらとしては、以下に制限されないが、抗体のコーディング配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA若しくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌(例えば、大腸菌(*E. coli*)、枯草菌(*B. subtilis*))等の微生物;抗体のコーディング配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、サッカロミセス属(*Saccharomyces*)、ピチア属(*Pichia*));抗体のコーディング配列を含む組換えウィルス発現ベクター(例えば、バキュロウィルス)で感染させた昆虫細胞系;組換えウィルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウィルス、CaMV;タバコモザイクウィルス、TMV)で感染させた若しくは抗体のコーディング配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系;または哺乳動物細胞のゲノム由来の(例えば、メタロチオネインプロモーター)若しくは哺乳動物ウィルス由来の(例えば、アデノウィルスのレイトプロモーター(*adenovirus late promoter*);ワクシニアウィルス7.5Kプロモーター)プロモーターを含む組換え発現構築物を有する哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3細胞)が挙げられる。

【0104】

細菌系では、数多くの発現ベクターが、発現される抗体分子に意図される用途によって好ましく選択される。例えば、抗体分子を含む薬剤組成物の製造を目的として、大量のこのようなタンパク質を製造しようとする際には、高レベルの容易に精製される融合タンパク質産物を発現させるベクターが望ましい。このようなベクターとしては、以下に制限されないが、抗体のコーディング配列が融合タンパク質が製造されるようにlacZコーディング領域と同フレームで(*in frame with*)ベクター中に個々に連結される、大腸菌発現ベクターpUR278(Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791); pINベクター(Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509)などが挙げられる。また、pGEXベクターをグルタチオン

S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現するのに使用してもよい。通常、このような融合タンパク質は、可溶性であり、マトリックスグルタチオン-アガロースビーズへの吸着及び結合後に遊離グルタチオンの存在下での溶出することによって溶解細胞から容易に精製できる。pGEXベクターは、クローニングされたターゲット遺伝子産物がGST部分から放出できるように、トロンビンまたは第Xa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

【0105】

昆虫系では、オートグラフィアカリフォルニカ核多角体病ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)(AcNPV)が外来遺伝子を発現するベクターとして使用される。このウイルスは、スポドプテラフルギペルダ(Spodoptera frugiperda)細胞中で成長する。抗体のコーディング配列を、個々に、ウイルスの非必須領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子(polyhedrin gene))中にクローニングし、AcNPVプロモーター(例えば、ポリヘドリンプロモーター(polyhedrin promoter))の制御下におく。哺乳動物宿主細胞では、数多くのウイルスによる発現系(例えば、アデノウイルス発現系)が使用される。

【0106】

上述したように、挿入された配列の発現を調節する、または所望の特定の様式で遺伝子産物を修飾、プロセッシングする、宿主細胞株が選択される。タンパク質産物のこのような修飾(例えば、グリコシル化)及びプロセッシング(例えば、切断)は、タンパク質の機能にとって重要である。

【0107】

組換え抗体を長期間、高収率で製造するためには、安定した発現が好ましい。例えば、関心のある抗体を安定して発現する細胞系は、抗体のヌクレオチド配列及び選択可能なヌクレオチド配列(例えば、ネオマイシンまたはハイグロマイシン)を含む発現ベクターで細胞をトランスフェクションし、選択マーカーの発現で選択することによって、製造できる。このように操作された細胞系は、抗体分子と直接的にまたは間接的に相互作用する化合物のスクリーニング及び評価に特に有用である。

【0108】

抗体分子の発現レベルは、ベクターの増幅によって増加されうる（レビューとして、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)を参照）。抗体を発現するベクター系でのマーカが増幅可能である場合には、宿主細胞の培養物中に存在する阻害剤のレベルの増加によりマーカ遺伝子のコピー数が増加するであろう。増幅された領域は抗体遺伝子と関連するので、抗体の生産もまた増加するであろう (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257)。

【0109】

宿主細胞は、本発明の2個の発現ベクターで同時にトランスフェクションされてもよく、この際、第一のベクターは重鎖由来のポリペプチドをコード化し、第二のベクターは軽鎖由来のポリペプチドをコード化する。これらの2個のベクターは、重及び軽鎖ポリペプチドの同等の発現を可能にする同じ選択マーカを含んでいてもよい。または、重及び軽鎖ポリペプチド双方をコード化する単一のベクターを使用してもよい。このような状況では、軽鎖は、過剰な毒性のある遊離重鎖を防止するために重鎖の前に置かれるべきである (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197)。重及び軽鎖のコーディング配列はcDNAまたはゲノムDNAを含んでもよい。

【0110】

本発明で使用される抗体分子が組換えにより発現されたら、これは、抗体分子の精製に関して当該分野において既知の方法によって、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAまたは特異的な抗原による等のアフィニティークロマトグラフィー、及びサイジングカラムクロマトグラフィー (sizing column chromatography)）、遠心分離、吸収率較差溶解度 (differential solubility) によって、またはタンパク質の精製に関する他の標準的な技術によって、精製されてもよい。

【0111】

または、融合タンパク質は、発現される融合タンパク質に特異的な抗体を用い

ることによって容易に精製される。例えば、Janknecht et al.によって記載されるシステムによって、ヒト細胞系で発現する非変性融合タンパク質が容易に精製できる(Janknecht et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897)。

このシステムでは、関心のある遺伝子は、遺伝子のオープンリーディングフレームが6個のヒスチジン残基から構成されるアミノ末端タグに翻訳により融合される(translationally fused)ように、ワクシニア組換えプラスミド中にサブクローニングされる。このタグは、融合タンパク質のマトリックス結合ドメインとして作用する。組換えワクシニアウィルスで感染させた細胞の抽出物を、Ni²⁺ニトロ酢酸(nitriloacetic acid) - アガロースカラムにのせ、ヒスチジン標識タンパク質をイミダゾール含有バッファーで選択的に溶出する。

【0112】

好ましい実施態様においては、本発明の抗体またはこの断片を、診断または治療部分に共役する(conjugate)。抗体は、診断にまたは所定の処置レジメの有効性を決定するのに使用できる。検出は、検出可能な物質に抗体をカップリングすることによって容易に行なわれる。検出可能な物質の例としては、様々な酵素、補欠分子団、蛍光材料、発光材料、バイオルミネセンス材料(bioluminescent materials)、放射性核種、陽電子放出金属(ポジトロンエミッショントモグラフィに使用される)、及び非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。一般的に、本発明に従って診断剤として使用される抗体に共役できる金属イオンに関しては、米国特許第4,741,900号を参照。適当な酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適当な補欠分子団としては、ストレプトアビジン、アビジン及びビオチンが挙げられ；適当な蛍光材料としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン(dichlorotriazinylamine fluorescein)、ダンシルクロリド及びフィコエリトリンが挙げられ；適当な発光材料としては、ルミノールが挙げられ；適当なバイオルミネセンス材料(bioluminescent materials)としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが挙げられ；さらに適当な放射性核種としては、¹²⁵I、¹³¹I、¹¹¹In及び⁹⁹Tcが挙げら

れる。

【0113】

本発明で使用される抗体またはこれらの断片は、所定の生体応答を修飾するために治療剤または薬剤部分に共役されてもよい。治療剤または薬剤部分は、典型的な化学治療剤に限定されるものではないと解される。例えば、薬剤部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質としては、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス属のエキソトキシン、またはジフテリア毒素等の毒素；腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲン活性化因子、血栓剤または抗脈管形成剤(anti-angiogenic agent)、例えば、アンギオスタチン(angiostatin)またはエンドスタチン(endostatin)等のタンパク質；またはリンホカイン、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-6(IL-6)、顆粒球マクロファージコロニー形成刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor)(GM-CSF)、顆粒球コロニー形成刺激因子(granulocyte colony stimulating factor)(G-CSF)、神経成長因子(NGF)または他の成長因子等の生体応答修飾剤が挙げられる。

【0114】

抗体にこのような治療部分を共役する技術は既知であり、例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications; Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabelled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp

. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)を参照。

【0115】

または、米国特許第4,676,980号に記載されるように、抗体を第二抗体に共役して、抗体異種共役体(heteroconjugate)を形成してもよい。

【0116】

治療部分が抗体に共役したまたは共役しない抗体は、単独でまたは細胞毒性因子および/またはサイトカインと組み合わせて投与される治療剤として使用できる。

【0117】

本明細書に記載されるように、特定のポリペプチド、核酸分子及び抗体は、神経精神または神経状態の処置または予防に用途を見出す。ゆえに、第十の態様においては、本発明は、本発明の概念に含まれ、ゆえに本発明の少なくとも一のポリペプチド若しくはその断片、核酸分子または抗体を含む少なくとも一の活性剤、および必要であれば一以上の製薬上許容できる賦形剤、担体または希釈剤を含む薬剤配合物を提供するものである。好ましくは、薬剤配合物は、ワクチンとして使用され、このため、さらなる成分がワクチン用途用に許容できるであろう。加えて、当業者は、一以上の適当なアジュバントをこのようなワクチン調製物に添加されてもよいと考えるであろう。

【0118】

薬剤は、一般的に、通常、製薬上許容できる担体を含む滅菌されている薬剤組成物の一部として供給されるであろう。この薬剤組成物は、(患者への所望の投与方法によって)適当な形態を有するものであってもよい。

【0119】

薬剤組成物は、単位服用量形態(unit dosage form)で提供されてもよく、通常、密閉容器中で提供されるだろうし、また、キットの一部として提供されてもよい。このようなキットは、一般的に(必ずしもそうである必要はないが)、使用に関する使用説明書を含むであろう。また、複数の単位服用量形態を含むもので

あってもよい。

【0120】

薬剤組成物は、いずれかの適当な経路によって、例えば、経口（口腔内または舌下を含む）、直腸内、経鼻、局所（口腔内、舌下または経皮を含む）、経膈または非経口（皮下、筋肉内、静脈内または皮内を含む）経路による投与を目的として適用されてもよい。このような組成物は、薬学の分野において既知のいずれかの方法によって、例えば、滅菌条件下で活性成分を担体または賦形剤と混合することによって調製されてもよい。

【0121】

経口投与に使用される薬剤組成物は、カプセルまたは錠剤等の別個の単位として；粉末または顆粒として；溶液、シロップまたは懸濁液として（水性若しくは非水性液体における；または食用の発泡物若しくはホイップとして；またはエマルジョンとして）提示されてもよい。

【0122】

錠剤または硬質ゼラチンカプセルに適当な賦形剤としては、ラクトース、トウモロコシデンプンまたはこれの誘導體、ステアリン酸またはこれの塩が挙げられる。

【0123】

軟質ゼラチンカプセルに使用されるのに適当な賦形剤としては、例えば、植物油、ワックス、脂肪、半固体、または液状ポリオールなどが挙げられる。

【0124】

溶液及びシロップの調製を目的として、使用される賦形剤としては、例えば、水、ポリオール及び糖が挙げられる。懸濁液の調製を目的としては、油（例えば、植物油）を用いて、水中油形または油中水形懸濁液を得てもよい。

【0125】

経皮投与に使用される薬剤組成物は、長期間、レシipientの表皮とよく接触し続けるように意図された別個のパッチとして提示されてもよい。例えば、活性成分を、通常、Pharmaceutical Research, 3(6):318 (1986)に記載されるのと同様にして、イオン導入によってパッチからデリバリーしてもよい。

【0126】

局所投与に使用される薬剤組成物は、軟膏、クリーム、懸濁液、ローション、粉末、溶液、ペースト、ゲル、スプレー、エアロゾルまたはオイルとして配合されてもよい。眼または他の外部組織、例えば、口及び皮膚の感染(infection)には、組成物は、好ましくは、局所軟膏またはクリームとして適用される。軟膏に配合される場合には、活性成分をパラフィン系または水混和性の軟膏基剤のいずれかと使用してもよい。または、活性成分を水中油形クリーム基剤または油中水形基剤とクリーム中で配合してもよい。眼への局所投与に使用される薬剤組成物としては、活性成分が適当な担体、特に水性溶剤に溶解または懸濁される点眼剤がある。口内への局所投与に使用される薬剤組成物としては、ロゼンジ、香錠及び口内洗剤が挙げられる。

【0127】

直腸内投与に使用される薬剤組成物は、坐剤または浣腸剤として提示されてもよい。

【0128】

担体が固体である経鼻投与に使用される薬剤組成物としては、吸入剤を摂取するように、即ち、鼻にまで接近して保持される粉末の容器から鼻腔を通じて迅速に吸入することによって投与される、例えば、20～500ミクロンの粒度を有する粗い粉末がある。鼻噴霧剤としてまたは点鼻剤として投与される、担体が液体である適当な組成物としては、活性成分の水性または油性溶液が挙げられる。

【0129】

吸入による投与に使用される薬剤組成物としては、様々なタイプの一定量が投与される加圧式のエアロゾル(metered dose pressurised aerosol)、ネブライザーまたは注入器によって生じる微粒子ダストまたはミストが挙げられる。

【0130】

経腔投与に使用される薬剤組成物は、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォームまたはスプレー配合物として提示されてもよい。

【0131】

非経口投与に使用される薬剤組成物としては、抗酸化剤、緩衝液、静菌薬及び

配合物を意図されるレシピエントの血液と実質的に等張にする溶質を含む水性及び非水性滅菌注射溶液；ならびに懸濁化剤及び増粘剤を含んでもよい水性及び非水性滅菌懸濁液が挙げられる。注射溶液に使用される賦形剤としては、例えば、水、アルコール、ポリオール、グリセリン及び植物油が挙げられる。本組成物は、1回投与用の(unit-dose)または複数回投与用の(multi-dose)の容器、例えば、密閉アンプル及びバイアル瓶に提示されてもよく、また、使用される直前に、保持される滅菌液体、例えば、注射用の水の添加のみが必要であるフリーズドライ(freeze-dried) (凍結乾燥(lyophilised)) 条件で貯蔵されてもよい。即時注射(extemporaneous injection)溶液及び懸濁液を、滅菌粉末、顆粒及び錠剤から調製してもよい。

【0132】

薬剤組成物は、防腐剤、可溶化剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、甘味剤、着色剤、着臭剤、塩（本発明の物質はそれ自体製薬上許容できる塩の形態で提供されてもよい）、緩衝剤、コーティング剤または抗酸化剤を含んでもよい。また、薬剤組成物は、本発明の物質に加えて治療上活性のある物質を含んでもよい。

【0133】

本発明で使用されるポリペプチド、核酸または抗体の投与量は、処置される病気または障害、処置される人の年齢及び状態などによって、広範な範囲で変化でき、医師が最終的に使用される適切な投与量を決定するであろう。この投与量は適切である限りしばしば繰り返されてもよい。副作用が現れる場合には、投与の量および/または頻度を、一般的な臨床慣習に従って、減少してもよい。

【0134】

神経及び神経精神におけるDPI-6の関係の点で、下記が本発明のさらなる態様を形成する：

i) 生体試料における本発明の少なくとも一のポリペプチドまたは抗体の存在若しくは不存在を決定するおよび/またはこれを定量する段階を有する、本発明で使用されるポリペプチドの発現を調節する、即ち、アップレギュレートする(upregulate)またはダウンレギュレートする(downregulate)化合物に関するスクリーニング方法；

i i) 患者から得られた生体試料における本発明で使用される少なくとも一のポリペプチドの存在若しくは不存在を決定するおよび/またはこれを定量する段階を有する、患者におけるこのような状態の処置のモニター/評価方法。

【0135】

本発明において、生体試料は、血清サンプルまたは組織サンプル、例えば、CSFなどの、いずれの源から得られてもよい。転移の証拠を探す場合には、リンパ節、肝臓、肺および/または骨等の乳癌転移の主要部位を見ればよい。

【0136】

本発明は、処置の有効性をモニターするための、及びこのような状態の処置を目的とする薬剤の開発のための、神経精神または神経状態のスクリーニング、診断、予測及び治療方法およびこれらを目的とする組成物を提供するものである。

【0137】

特定の態様において、本発明は下記を提供するものである：

(i) 1次元電気泳動によって胸部組織のサンプルを分析して、本明細書で規定されるポリペプチドを検出することを有するこのような状態の診断方法。これらの方法はまた、治療の結果をスクリーニング、予測、モニターするのに、薬剤の開発に及び薬剤の処置の新たなターゲットの発見にも適する；

(i i) (a) このような状態の発症または発達を防止する；(b) このような状態の進行を防止する；または(c) このような状態の症状を改善するために、このような状態を有する患者に本明細書で規定されるポリペプチドの発現若しくは生物学的活性(または双方)を調節する(例えば、アップレギュレートする(upregulate)またはダウンレギュレートする(downregulate))またはこれを補足する化合物を治療上有効な量患者に投与することを有する、このような状態の処置方法；

(i i i) 本明細書で規定されるポリペプチドの発現または生物学的活性を調節する(例えば、アップレギュレートするまたはダウンレギュレートする)化合物に関するスクリーニング方法；

(i v) ヒト被検者から得られた生体試料における、本明細書で規定されるポリペプチドの存在または不存在を同定する段階を有する、ヒト被検者におけるこ

のような状態に関するスクリーニングおよび/またはこれの診断方法。

【0138】

(v) ヒト被検者から得られた生体試料における、本明細書で規定されるポリペプチドの存在または不存在を同定する段階を有する、ヒト被検者におけるこのような状態の処置のモニターおよび/または評価方法。

【0139】

(vi) 本明細書で規定されるポリペプチドが患者から得られた生体試料中で増加する/減少するかを決定する段階を有する、ヒト被検者における処置のモニターおよび/または評価方法。

【0140】

下記に詳細に記載される本発明は、被検者における状態のスクリーニング、診断及び予測のための、治療の結果をモニターするための、および薬剤の開発のための方法及び組成物を包含するものである。本発明はまた、状態を処置または予防するための哺乳動物の被検者への治療組成物の投与をも包含するものである。好ましくは、哺乳動物の被検者は、ヒトであり、より好ましくはヒトの成人である。開示を明確にするために、以下に制限されるものではないが、本発明を、胸部組織サンプルの分析に関して説明する。しかしながら、当業者は理解するように、以下に記載されるアッセイ及び技術は、体液（例えば、血液、血清、血漿または唾液）、上記状態を有する危険性のある患者からの組織サンプル（例えば、胸部の生検材料等の生検材料）またはこれらのホモジネートなどの、他のタイプの患者サンプルに適用できる。本発明の方法及び組成物は、生きた被検者のスクリーニング、診断及び予測に特に適するが、被検者における死後の診断に、例えば、同じ病気を発達する危険性のある家族のメンバーを同定するために、使用されてもよい。

【0141】

本明細書で使用される、胸部組織は、胸部自体、さらには胸部の下にある層(stratum)付近のおよび/またはその中の組織を意味する。

【0142】

本発明の一態様においては、1次元電気泳動が、状態のスクリーニング若しく

は診断のために本明細書中で規定されるポリペプチドの発現を測定するために、患者の予後を決定するために、乳癌治療の有効性をモニターするために、または薬剤の開発を目的として、被検者、好ましくは生きた被検者からの胸部組織を分析するのに使用される。本明細書で使用される、「1次元電気泳動(1D-電気泳動)」とは、電気泳動の変性を含む技術を意味する；これによって、複数の別個のタンパク質を含む1次元ゲル(1D-ゲル)が得られる。好ましくは、電気泳動を変性する段階は、ドデシル硫酸ナトリウム存在下でのポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)を用いる。19~29頁の好ましいプロトコルを特に参照して参考により完全に本明細書に引用される、WO 98/23950に記載される高精度かつ自動操作可能な方法および装置(「好ましい技術」)が特に好ましい。簡単にいうと、好ましい技術は、生体試料中の生体分子を同定し、選択し、特徴付けるための、効率的なコンピュータ補助方法および装置を提供するものである。1次元アレイは、その電気泳動の移動度に従って1次元ゲルで生体分子を分離することによって得られる。1次元アレイ中で検出される複数の生体分子の同一性、見かけの分子量を表わす、アレイのコンピュータによるデジタルプロフィールが得られ、これによって、複数の生体試料のプロフィールのコンピュータ介在比較(computer-mediated comparison)、さらには関心のある分離タンパク質のコンピュータで補助される切り出し(computer aided excision)が可能になる。

【0143】

蛍光標識されたタンパク質を検出するための好ましいスキャナーは、WO 96/36882号におよび"Development of a High-throughput Fluorescence Scanner Employing Internal Reflection Optics and Phase-sensitive Detection (Total Internal Reflection, Electrophoresis)", University of Washington (1997), Volume 58/12-B of Dissertation Abstracts International, page 6686のタイトルの、David A. Basijiの博士論文に記載されており、いずれの内容も参考により本明細書に引用される。これらの文献は、高速で自動化され統合された操作に関して特別に設計されたイメージスキャナーを説明している。該スキャナーは、蛍光染料または銀染料で染色されたゲル、さらには貯蔵リン蛍光スク

リーン(storage phosphor screen)を映像化することができる。Basijiの学位論文は、レーザーの散乱または均質な蛍光(homogeneous fluorescence)によるベースラインノイズからの調節された蛍光を区別するためのフェーズ感受性検出システム(phase-sensitive detection system)を提供するものであるが、スキャナーは非フェーズ感受性モード(non-phase-sensitive mode)で操作されてもよい。このフェーズ感受性検出能は、従来の蛍光イメージングシステムに比べて装置の感度を1オーダー以上増加する。増強されたイメージの品質が工程の下流のイメージ分析を簡単にすると共に、高められた感度は装置の上流のサンプル調製物の負荷を少なくする。

【0144】

さらにより好ましいスキャナーは、アポロ3スキャナー(Apollo 3 scanner)(Oxford Glycosciences, Oxford, UK)であり、これは、上述のスキャナーの改良バージョンである。該アポロ3スキャナーでは、ゲルを精密なリード-スクリュードライブシステム(precision lead-screw drive system)でスキャナーを介して移す。ゲルをイメージング光学機器(imaging optics)に精密に移送する再現性のある手段が提供されるので、Basijiの学位論文に説明されているベルト駆動システム上にガラスプレートを設置することが好ましい。

【0145】

アポロ3スキャナーにおいて、ゲルは、既知の位置でガラスプレートを固定する3つのアライメントストップ(alignment stop)に対して固定される。上述の精密なトランスポートシステムとともにこれを行なうことによって、ゲルの絶対位置を予想し記録することができる。これにより、ゲル上の各特徴の座標がより正確に決定され、所望であれば、その特徴の切り出しのためのカッティングロボットに連結することが確実にできる。アポロ3スキャナーにおいて、ゲルを保持するキャリアーは、イメージ形状寸法を修正するのに用いられる4つの不可欠な蛍光マーカー(integral fluorescent markers)を有する。これらのマーカーは、スキャニングが正確に行なわれたことを確認する品質コントロール特徴(quality control feature)である。

【0146】

Basijiの学位論文で記載されたスキャナーに比べて、アポロ3スキャナーの光学部品は逆に配置される。アポロ3スキャナーにおいて、レーザー、ミラー、導波管および他の光学部品は、スキャンされるガラスプレートの上にある。Basijiの学位論文に記載されたスキャナーは、その下にこれらの部品を有する。アポロ3スキャナーでは、ガラスプレートは、光路がガラスプレートを通って残るように、スキャナーゲル側の下方向に配置される。このようにすることによって、ガラスプレートから離脱するゲルの粒子は、光学機器中にはなくむしろ装置のベース上に落ちるであろう。これは、システムの機能に影響を与えないが、その信頼性を高める。さらに及び最後に、アポロ3スキャナーでは、シグナルの出力がピーク飽和なくまたはシグナルの平方根コード化なく全16ビットデータにデジタル化される。補正アルゴリズム(compensation algorithm)もまた、スキャンングビームの経路に沿った検出感度の変動を修正するために適用された。この変動は、光学における異常および導波管での収集効率の相違によるものである。キャリアレーションは、終始同じ蛍光を有するパースペックプレートを用いて行なわれる。このプレートのスキャンから得られたデータは、シグナルを各画素レベルからターゲットレベルまで増加させるのに必要な増倍係数を決定するのに用いられる。さらに、これらの係数は、次のゲルのスキャンで用いられ、内部の光学的変化(internal optical variations)を除去する。

【0147】

本明細書に規定されるポリペプチドは、好ましい技術の方法及び装置により実験室で培養されたヒト乳腺細胞系(mammary cell line)の膜タンパク質抽出物で同定された(通常、実験室で培養されたヒト乳腺細胞系(mammary cell line)の膜タンパク質抽出物の1Dゲル電気泳動及びトリプシン消化)。ペプチド配列を、現在あるcDNAデータベースと比較して、相当する遺伝子を同定した。本明細書に規定されるポリペプチドは、上記状態に関連する、乳腺細胞のマーカーとしての用途を見出す。

【0148】

一実施形態において、特徴の発現のレベルは、(a)エリア中で問題となっている特定の特征と等価である；および(b)識別し得るタンパク質特徴を含まな

いイメージの隣接領域から得られたシグナルのレベルとして規定される、バックグラウンド値と比較して測定される。

【0149】

本明細書に規定されるポリペプチドは、状態の検出、予測、診断、若しくはモニターに、または薬剤の開発に使用できる。本発明の一実施態様において、被検者（例えば、状態を有することが疑われる被検者）からの胸部組織を、本明細書に規定されるポリペプチドの検出を目的として1D電気泳動によって分析する。状態のない被検者若しくは複数の被検者からの胸部組織（例えば、コントロールサンプル）または予め決定された参考範囲に対する被検者からの胸部組織での当該ポリペプチドの存在比の増加は状態の存在を示す。

【0150】

一実施態様において、被検者からの胸部組織を、本明細書に規定されるポリペプチドの定量的な検出を目的として分析し、この際、状態のない被検者若しくは複数の被検者からの胸部組織（例えば、コントロールサンプルまたは予め決定された参考範囲）に対する被検者からの胸部組織でのポリペプチドの存在比の変化は状態の存在を示す。

【0151】

本明細書で用いられる際には、ポリペプチドは、混入タンパク質を実質的に含まない製剤中に、すなわち、存在する全タンパク質の10%未満（好ましくは5%未満、より好ましくは1%未満）が混入タンパク質である製剤中に存在する際に、「単離される」。混入タンパク質は、質量スペクトル分析で測定される際に、単離されたポリペプチドのものとは有意に異なるアミノ酸配列を有するタンパク質である。本明細書で用いられる、「異なる」配列とは、参考プロトコル(Reference Protocol)に従って行なわれる、質量スペクトル分析によって混入タンパク質がポリペプチドから分離(resolve)できるようなものである。

【0152】

本明細書で規定されるポリペプチドは、当業者に既知の方法によってアッセイでき、これらとしては、以下に制限されないが、本明細書に記載される好ましい技術、キナーゼアッセイ、イムノアッセイ、およびウェスタンブロッティングが

挙げられる。一実施態様において、ポリペプチドは、そのMWにより1-Dゲル上で分離され、ゲルを染色することによって可視化される。一実施態様において、ポリペプチドは、蛍光染料で染色され、蛍光スキャナーでイメージ化される。S y p r o R e d (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon)がこの目的に適した染料である。好ましい蛍光染料は、1999年10月5日付で出願された、米国特許第09/412,168号に記載され、これは参考により完全に本明細書に引用される。

【0153】

または、本明細書で規定されるポリペプチドはイムノアッセイで検出できる。一実施態様において、イムノアッセイは、ポリペプチドが存在する場合には免疫特異的結合が起こるような条件下で試験される被検者からのサンプルを抗ポリペプチド抗体と接触させ、抗体による免疫特異的結合の量を検出または測定することによってなされる。抗ポリペプチド抗体は、本明細書で示唆される方法および技術によって生産することができる。

【0154】

一実施態様において、組織切片における抗体の結合は、異常なポリペプチドの位置(localization)またはポリペプチドの異常なレベルを検出するのに用いられる。特定の実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドに対する抗体を用いて、ポリペプチドの異常なレベルが状態の一を示すようなポリペプチドのレベルに関して患者組織をアッセイできる。本明細書で用いられる、「異常なレベル(aberrant level)」とは、状態のない被検者におけるレベルまたは参照レベルに比べて増加または減少するレベルを意味する。所望であれば、状態に冒されていない身体の部分から採取された、同じ被検者からの整合サンプル(matched sample)との比較を行なってもよい。

【0155】

適当なイムノアッセイとしては、以下に制限されないが、ウェスタン法、ラジオイムノアッセイ、E L I S A (酵素様免疫吸着法)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈殿反応、ゲル拡散沈降反応(gel diffusion precipitation reaction)、免疫拡散アッセイ(immunodiffusion assay)、凝集アッセイ

(agglutination assay)、補体固定化アッセイ (complement-fixation assay)、免疫放射定量測定法 (immunoradiometric assay)、蛍光イムノアッセイ (fluorescent immunoassay) およびプロテイン A イムノアッセイ (protein A immunoassays) 等の技術を用いた競合及び非競合アッセイ系が挙げられる。

【0156】

所望であれば、本明細書で規定されるポリペプチドは、2段階サンドイッチアッセイによって検出することができる。第1の段階では、捕捉試薬 (capture reagent) (例えば、抗ポリペプチド抗体) がポリペプチドを捕捉するために用いられる。捕捉試薬は、必要であれば固相に固定化されてもよい。第2の段階では、直接的または間接的に標識された検出試薬が捕捉されたポリペプチドを検出するために用いられる。一実施態様において、検出試薬は、レクチンである。ポリペプチドと同じコアタンパク質を有する他のイソ型にまたは抗体によって認識される抗原決定基を共有する他のタンパク質によりむしろポリペプチドに優先的に結合するレクチンが、この目的のために使用できる。好ましい実施態様においては、選ばれたレクチンは、ポリペプチドと同じコアタンパク質を有する他のイソ型にまたは抗体によって認識される抗原決定基を共有する他のタンパク質により、少なくとも2倍大きな親和性、より好ましくは少なくとも5倍大きな親和性、さらにより好ましくは少なくとも10倍大きな親和性で、ポリペプチドに結合する。所定のポリペプチドを検出するのに適するレクチンは、当該分野において既知の方法によって容易に同定することができ、例えば、Sumar et al., Lectins as Indicators of Disease-Associated Glycoforms, In: Gabius H-J & Gabius S (eds.), 1993, Lectins and Glycobiology, at pp. 158-174 (その全体を参照することによって本明細書に引用する) の158~159頁の表Iに列挙された一以上のレクチンを試験することである。別の実施態様においては、検出試薬は、抗体、例えば、リン酸化アミノ酸に免疫特異的に結合する抗体等の、他の翻訳後修飾を免疫特異的に検出する抗体である。このような抗体の例としては、以下に制限されないが、ホスホチロシン (phosphotyrosine) に結合するもの (BD Transduction Laboratories, catalog nos.: P11230-050/P11230-150; P11120; P38820; P39020)、ホスホセリン (phosphoserine) に結合するもの (Zymed Laboratories

Inc., South San Francisco, CA, catalog no. 61-8100)およびホスホスレオニン(phosphothreonine)に結合するもの(Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, catalog nos. 71-8200, 13-9200)が挙げられる。

【0157】

所望であれば、相補的配列を含む、本明細書で規定されるポリペプチド、関連遺伝子、または関連核酸配列若しくはサブ配列(subsequences)をコード化する遺伝子を、ハイブリダイゼーションアッセイに用いてもよい。本明細書で規定されるポリペプチドをコード化するヌクレオチド、または少なくとも8ヌクレオチドを有するそのサブ配列がハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。ハイブリダイゼーションアッセイは、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子の異常な発現に関連する、状態、障害または病気の状態の検出、予想、診断若しくはモニターに、または目的の状態を示唆する徴候または症状を有する被検者の特異の診断に使用できる。特に、このようなハイブリダイゼーションアッセイは、ハイブリダイゼーションが起こり得るような条件下で、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化するDNAまたはRNAにハイブリダイズすることのできる核酸プローブと核酸を含む被検者のサンプルを接触させ、得られたハイブリッド形成を検出または測定することを含む方法によって、行なわれる。ヌクレオチドは、以下に記載するように、状態の一を有する被検者の治療に使用できる。

【0158】

本発明はまた、本明細書で規定されるポリペプチドに対する抗体を含む診断キットを提供するものである。加えて、このようなキットは、必要であれば、一以上の下記を含んでもよい；(1)診断、予想、治療のためのモニターまたはこれら用途の組み合わせのために抗ポリペプチド抗体を用いるための説明書；(2)抗体に対する標識結合パートナー(labeled binding partner)；(3)抗ポリペプチド抗体が固定化される固相(試薬ストリップなど)；および(4)診断、予想若しくは治療用途またはこれらの組み合わせに関する規定承認を示すラベルまたはインサート。抗体に対する標識結合パートナーを提供しない場合には、抗ポリペプチド抗体それ自身が検出可能なマーカー、例えば化学発光、酵素、蛍光

、または放射性成分などで標識されてもよい。

【0159】

本発明はまた、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化するRNAにハイブリッド形成できる核酸プローブを含むキットを提供するものである。特定の実施態様においては、キットは、一以上の容器中に、適切な反応条件下で、ポリメラーゼ連鎖反応（例えば、Innis et al., 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CAを参照）、リガーゼ連鎖反応（EP 320,308号を参照）、Qレプリカーゼの使用、サイクリックプローブリアクション（cyclic probe reaction）または当該分野において既知の他の方法などによって、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する核酸の少なくとも一部分を増幅し得る一対のプライマー（例えば、それぞれが6～30ヌクレオチド、より好ましくは10～30ヌクレオチド、およびさらにより好ましくは10～20ヌクレオチドの範囲の大きさのもの）を含む。

【0160】

本発明の診断方法及び組成物は、例えば、状態の治療のための薬剤を評価するのに、臨床研究をモニターするのに補助できる。一実施態様において、候補分子について、正常値にまたはその付近にレベルを保持するために、処置患者（例えば、タキソールまたはドキソルビシンによる処置後）において、状態のない被検者で見出されるレベルへの状態を有する患者における本明細書で規定されるポリペプチドのレベルの回復能について試験する。

【0161】

他の実施態様においては、本発明の方法及び組成物は、状態を有する個人を同定するために臨床研究のための候補をスクリーニングするのに使用される；次に、このような個人は、研究から排除できるまたは処置若しくは分析のために別のコホートに配置されうる。所望であれば、候補を状態を有する個人を同定するために同時にスクリーニングしてもよい；これらのスクリーニングの方法は当該分野において既知である。

【0162】

特定の態様においては、本発明は、抗原決定基を含む（即ち、抗原によって認

識されうる)または機能的に活性のある本明細書で規定される単離されたポリペプチド、ならびにその断片及び誘導体を、さらには前記をコード化する核酸配列を提供するものである。本明細書において用いられる「機能的に活性のある(functionally active)」とは、全長の(野生型の)ポリペプチドと関連する1以上の機能的な活性、例えば、ポリペプチド基質またはポリペプチド結合パートナーへの結合性、抗原性(抗ポリペプチド抗体への結合性)、免疫原性、酵素活性などを示す物質をいう。

【0163】

本明細書で規定されるポリペプチドは、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー、およびサイズカラムクロマトグラフィー)、遠心、較差溶解度(differential solubility)を含む標準的な方法によって、またはタンパク質の精製のための他の標準的な技術によって、単離および精製されうる。または、ポリペプチドをコード化する組換え核酸が同定されたので、タンパク質を当該分野において既知の標準的な化学的方法によって合成してもよい(例えば、Hunkapiller et al., 1984, Nature 310:105-111を参照)。

【0164】

他の別の実施形態においては、天然のポリペプチドを、上記したような標準的な方法(例えば、イムノアフィニティー精製)によって、天然源から精製してもよい。

【0165】

本明細書で規定されるポリペプチド(またはその断片、同族体若しくは類似体)をコード化する配列を有する、DNAおよびRNA等の、本発明のヌクレオチド配列は、公知の化学的アプローチまたはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅などの、当該分野において既知の方法を用いて合成される。また、本発明のヌクレオチド配列により、例えば、cDNAライブラリー、ゲノムライブラリーまたは発現ライブラリーをスクリーニングすることによって、いずれかの種由来のBCMPをコード化する遺伝子が同定およびクローニングできる。

【0166】

例えば、PCR技術によって本明細書で規定されるポリペプチドをコード化す

る遺伝子をクローニングするために、固定化された(anchored)変性オリゴヌクレオチド(または一連の最も可能性のある(most likely)オリゴヌクレオチド)が、同一タンパク質の部分として同定される全てのポリペプチドペプチド断片のために設計されうる。種々の条件下でのPCR反応は、1以上の種由来の関連するcDNAおよびゲノムDNA(例えば、脳組織由来のまたは免疫系の細胞由来の)を用いて実施され得る。また、ベクトル(vectorette)反応が、上述のようにオリゴヌクレオチド(好ましくはネスト状である(nested))を用いた入手可能なcDNAおよびゲノムDNAで実施されうる。ベクトルPCRは、ただ一つのプライマーの配列が知られているような状況で特定のDNA断片の増幅を可能にする方法である。従って、それは、配列情報が一の末端においてのみ入手可能であるDNAの伸長にPCRの適用を拡張する。(Arnold C, 1991, PCR Methods Appl. 1(1):39-42; Dyer KD, Biotechniques, 1995, 19(4):550-2)。ベクトルPCRは、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリープールをテンプレートとして用いて、ペプチド断片に関してコードする固定化された変性オリゴヌクレオチド(または最も可能性のあるオリゴヌクレオチド)であるプローブを用いて実施されてもよい。

【0167】

固定化された変性および最も可能性のあるオリゴヌクレオチドは、全てのペプチド断片について設計されうる。これらのオリゴヌクレオチドは、標識されて、cDNAおよびゲノムDNAライブラリーを含むフィルターにハイブリダイズされてもよい。同一のタンパク質由来の異なるペプチドに対するオリゴヌクレオチドによって、ライブラリーの同じものがしばしば同定されるであろう。cDNAおよびゲノムDNAライブラリーは、多数の哺乳動物種から、好ましくはヒトから得てもよい。

【0168】

本明細書で規定されるポリペプチドまたはこの断片をコード化するヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列は、他のタンパク質をコード化する遺伝子の相補的な伸長に選択的にハイブリダイズできるので有用である。用途によって、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化するヌクレオチドの配列に対して、少

なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または100%同一であるヌクレオチド配列を得るために、種々のハイブリダイズ条件が用いられる。

【0169】

高度な選択性のためには、低塩または高温条件のような、比較的ストリンジェントな条件がデュプレックスを形成するために用いられる。本明細書において用いられる「非常にストリンジェントな条件」とは、65℃で0.5M NaHPO₄、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1mM EDTA中でフィルターに結合したDNAにハイブリダイズさせ、68℃で0.1×SSC/0.1% SDSで洗浄することを意味する(Ausubel F.M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York, at p. 2.10.3; 全体が本明細書に参照として組み込まれる)。用途によっては、デュプレックスの形成のためによりストリンジェントでない条件が必要とされる。本明細書において用いられる「適度にストリンジェントな条件」とは、42℃で0.2×SSC/0.1% SDSで洗浄することを意味する(Ausubel et al., 1989, 上記記載)。ハイブリダイズ条件は、ハイブリットデュプレックスを不安定化させるために、ホルムアミドの量を増加させて添加することによっても、よりストリンジェントにされる。このように、特定のハイブリダイズ条件は容易に操作でき、一般的には所望する結果に応じて選択されるであろう。通常、50%ホルムアミドの存在下での簡便なハイブリダイズ温度は、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子の断片に95~100%同一であるプローブのためには42℃、90~95%の同一性のためには37℃、70~90%の同一性のためには32℃である。ゲノムライブラリーの調製において、DNA断片が生成され、それらの幾つかは、本明細書で規定されるポリペプチドの一部または全部をコード化しているであろう。DNAは、種々の制限酵素を用いて特定部位で切断されてもよい。または、マンガンの存在下でDNaseを用いてDNAをフラグメント化してもよく、またはDNAを、例えば、超音波処理によって、物理的に剪断してもよい。次に、DNA断片を、以下に制限されるものではないが、アガロースおよびポリア

クリルアミドゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィーおよびショ糖勾配遠心分離などの、標準的な技術によって、サイズに従って分離できる。さらに、DNA断片は、以下に制限されるものではないが、プラスミド、コスミド、バクテリオファージラムダまたは T_4 等の適当なベクター、および酵母人工染色体(YAC)に挿入されうる(例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D.M. (ed.), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II; Ausubel F.M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., 及び John Wiley & sons, Inc., New Yorkを参照)。ゲノムライブラリーは、標識プローブへの核酸のハイブリッド形成によって、スクリーニングされてもよい(Benton and Davis, 1977, Science 196:180; Grunstein and Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3961)。

【0170】

ゲノムライブラリーは、当該分野において既知の最適なアプローチを用いて本明細書で規定されるポリペプチドのペプチドのアミノ酸配列に相当する標識変性オリゴヌクレオチドによりスクリーニングされてもよい。使用されるプローブは、好ましくは、10ヌクレオチドまたはそれより長く、より好ましくは15ヌクレオチドまたはそれより長い。

【0171】

ライブラリーがスクリーニングされる際に、ポリペプチドまたはその断片をコード化する挿入DNAを有するクローンは、相当する変性オリゴヌクレオチドプローブ(またはその補体)の群の1種またはそれ以上にハイブリッド形成するであろう。このようなオリゴヌクレオチドプローブのゲノムライブラリーへのハイブリッド形成は、当該分野において既知の方法を用いて実行される。例えば、上述の変性オリゴヌクレオチド群、もしくはそれらの補体(またはそのような群のいずれか、もしくはその補体)とのハイブリッド形成は、上記で規定された非常にストリンジентな条件もしくは適度にストリンジентな条件下で行なわれる、または $2 \times \text{SSC}$ 、 $1.0\% \text{SDS}$ 中で、 50°C で行なわれ、同じ条件で洗

浄される。

【0172】

本発明のさらなるの態様においては、本明細書で規定されるポリペプチド全体若しくはこれの一部、または誘導ポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列を含むクローンはまた、発現ライブラリーをスクリーニングすることによって得てもよい。例えば、関連する源由来のDNAを単離し、ランダムな断片を調製して、ベクター中に挿入された配列がベクターが次に導入される宿主細胞によって発現されうるように発現ベクター（例えば、バクテリオファージ、プラスミド、ファージミドまたはコスミド）中に連結(ligate)する。続いて、種々のスクリーニングアッセイが、発現ポリペプチドを選択するために用いられうる。一実施形態において、種々の抗ポリペプチド抗体が、当該分野において既知の方法を用いて所望のクローンを同定するために用いられうる。例えば、Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Appendix IVを参照。ライブラリー由来のコロニーまたはプラークを抗体と接触させて、抗体に結合したこれらのクローンを同定する。

【0173】

一実施形態において、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化するDNAを含むコロニーまたはプラークは、参照として本明細書に引用される、Olsvick et al., 29th ICAAC, Houston, Tex. 1989に従って、DYNAビーズを用いて検出されうる。抗ポリペプチド抗体は、トシル化されたDYNAビーズM280に架橋された後、これらの抗体含有ビーズは組換えポリペプチドを発現するコロニーまたはプラークと接触させる。ターゲットポリペプチドを発現するコロニーまたはプラークは、ビーズに結合しているものとして同定される。

【0174】

または、抗ポリペプチド抗体は、シリカまたはセライト(Celite)（登録商標）樹脂等の、適当な支持体に非特異的に固定化されうる。次に、この材料を用いて、本明細書で規定されるポリペプチドを発現する細菌コロニーに吸着させる。

【0175】

他の態様においては、本明細書で規定されるポリペプチド全体またはその一部をコード化する実質的に純粋なDNA（即ち、混入核酸を実質的に含まないDNA）をゲノムDNAから単離するのにPCR増幅が用いられてもよい。好ましくは、このようなDNAは、少なくとも95%純粋であり、より好ましくは99%純粋である。既知の配列に対応するオリゴヌクレオチド配列、変性体(degenerate)などが、プライマーとして使用できる。

【0176】

PCRは、例えば、Perkin-Elmer Cetusサーマルサイクラー(Perkin-Elmer Cetus thermal cycler)及びTaqポリメラーゼ(Gene Amp（登録商標）またはAmpli Taq DNAポリメラーゼ)を用いることによって行なわれる。PCR反応に使用される、数種の異なる変性プライマーを合成することを選択してもよい。変性プライマーとDNA中の対応する配列とのヌクレオチド配列の相似性をより大きくまたはより小さくするために、PCR反応を開始するのに用いられるハイブリッド形成条件のストリンジェンシーを変化させることも可能である。本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する配列のセグメントの増幅が成功した後、そのセグメントを分子的にクローニングし、配列を決定し、完全なゲノムクローンを単離するためのプローブとして利用してもよい。これにより、さらに、以下に記載されるように、遺伝子の完全なヌクレオチド配列の決定、その発現の分析、および機能分析のためのそのタンパク質産物の生産が可能になるであろう。

【0177】

本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子はまた、核酸のハイブリッド形成によるmRNAの選択さらにはインビトロ翻訳によって同定されてもよい。この方法において、断片はハイブリッド形成によって相補的mRNAを単離するために用いられる。このようなDNA断片は、他の種（例えば、マウス、ヒト）のポリペプチドをコード化する、入手可能で精製されたDNAを表してもよい。単離されたmRNAの単離産物のインビトロの翻訳産物の免疫沈降分析または機能アッセイ（例えば、インビトロでの凝集能；レセプターへの結合性）によって、mRNA、およびこれにより所望の配列を含む相補的DNA断片が同

定される。加えて、特定のmRNAが、BCMPを特異的に認識する固定化抗体への細胞から単離されたポリソームの吸着によって、選択されてもよい。本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する放射性標識されたcDNAは、選択されたmRNA（吸着ポリソーム由来の）をテンプレートとして用いて合成される。次に、放射性標識されたmRNAまたはcDNAは、他のゲノムDNA断片の中から本明細書で規定されるポリペプチドをコード化するDNA断片を同定するためのプローブとして用いられてもよい。

【0178】

本明細書で規定されるポリペプチドをコード化するゲノムDNAを単離することの別の方法としては、これらに限定されるものではないが、既知の配列から遺伝子配列そのものを化学的に合成することまたはポリペプチドをコード化するmRNAに対してcDNAを作製することが挙げられる。例えば、遺伝子のcDNAクローニングのためのRNAは、ポリペプチドを発現する細胞から単離される。他の方法を使用してもよく、またこれは本発明の概念に含まれる。

【0179】

真核細胞が、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子の分子クローニングのための核酸源として使用できる。ポリペプチドをコード化する核酸配列は、脊椎動物、哺乳動物、霊長類、ヒト、ブタ、ウシ、ネコ、ニワトリ、ウマ、イヌまたはマウス源から単離される。DNAは、クローニングされたDNA（例えば、DNA「ライブラリー」）から当該分野において既知の標準的な方法によって、化学合成によって、cDNAクローニングによって、または所望する細胞から精製されたゲノムDNA、若しくはその断片のクローニングによって、得ることができる（例えば、Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D.M. (ed.), 1985, *DNA Cloning: A Practical Approach*, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II.を参照）。ゲノムDNAから誘導されるクローンは、コーディング領域に加えて調節およびイントロンDNA領域を含んでいてもよい；cDNAから誘導されるクローンはエキソン配列のみを含んでいるであろう。

【0180】

さらに、同定され、単離された遺伝子またはcDNAは、適当なクローニングベクター内に挿入されうる。当該分野において既知の数多くのベクター-宿主系が用いられうる。選択されるベクター系が使用される宿主細胞と適合することが唯一の制限事項である。このようなベクターとしては、以下に限定されるものではないが、ラムダ誘導体等のバクテリオファージ、pBR322やpUCプラスミド誘導体若しくはBluescriptベクター(Stratagene)等のプラスミドまたはアデノウイルス、アデノ-関連ウイルス(adeno-associated virus)若しくはレトロウイルス等の修飾ウイルスが挙げられる。クローニングベクターへの挿入は、例えば、相補的な付着端を有するクローニングベクターにDNA断片を連結することによって、達成されうる。しかしながら、DNAを断片化するために用いられる相補的な制限部位がクローニングベクター中に存在しない場合には、DNA分子の末端を酵素的に修飾してもよい。または、DNA末端にヌクレオチド配列(リンカー)を連結することによって、所望する部位を作製してもよい;これらの連結されるリンカーは、制限エンドヌクレアーゼの認識配列をコード化する特定の化学的に合成されたオリゴヌクレオチドを含んでいてもよい。代替の方法としては、開裂されたベクターおよび本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子が、ホモポリマーテーリング(homopolymeric tailing)によって修飾されてもよい。組換え分子は、遺伝子配列の多くのコピーが生成されるように、形質転換、トランスフェクション、感染、エレクトロポレーションなどを介して宿主細胞中に導入することができる。

【0181】

特定の実施形態においては、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する単離された遺伝子、cDNA、または合成DNA配列を取り込んでいる組換えDNA分子で宿主細胞を形質転換することによって、遺伝子の多重コピーの生成ができる。このようにして、遺伝子は、形質転換体を成長させ、形質転換体から組換えDNA分子を単離し、必要であれば単離された組換えDNAから挿入された遺伝子を回収することによって、大量に得られる。

【0182】

本発明のヌクレオチド配列としては、天然のポリペプチドと実質的に同じアミノ酸配列を有するアミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列、及び機能的に同等のアミノ酸を有するアミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列、さらには他のターゲット誘導体または類似体をコード化するものが挙げられる。

【0183】

本明細書で規定されるポリペプチドまたはこれの機能的に活性のある類似体若しくは断片若しくは他の誘導体をコードするヌクレオチド配列は、適当な発現ベクター、即ち、挿入されたタンパク質のコーディング配列の転写及び翻訳に必要な要素(element)含むベクター中に挿入されうる。必要な転写及び翻訳シグナルはまた、天然遺伝子またはその隣接領域によって供給されうる。様々な宿主-ベクター系が、タンパク質のコーディング配列を発現するのに利用される。これらとしては、以下に制限されないが、ウィルス(例えば、ワクチニアウィルス、アデノウィルス等)に感染させた哺乳動物細胞系；ウィルス(例えば、バキュロウィルス)に感染させた昆虫細胞系；酵母ベクターを含む酵母等の微生物；またはバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、若しくはコスミドDNAで形質転換された細菌が挙げられる。ベクターの発現要素はその強さや特異性を変える。使用される宿主-ベクター系によって、数多くの適当な転写及び翻訳要素のうちの一が使用されてもよい。特定の実施態様においては、ヒト遺伝子をコード化するヌクレオチド配列(または本明細書で規定されるヒトポリペプチドの機能的に活性のある部分をコード化するヌクレオチド配列)が発現される。さらなる他の実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドのドメインを有するポリペプチドの断片が発現される。

【0184】

ベクターへのDNA断片の挿入について従来記載されるいずれかの方法が、適当な転写及び翻訳コントロールシグナルならびにタンパク質のコーディング配列から構成されるキメラ遺伝子を含む発現ベクターを構築するのに使用される。これらの方法としては、インビトロの組換えDNA及び合成技術ならびにインビボの組換え体(遺伝子組換え)が挙げられる。本明細書で規定されるポリペプチドまたはこの断片をコード化する核酸配列の発現は、ポリペプチドまたはこの断片

が組換えDNA分子で形質転換された宿主で発現するように第2の核酸配列によって調節されてもよい。例えば、本明細書で規定されるポリペプチドの発現は、当該分野において既知のプロモーターまたはエンハンサー要素によって制御されてもよい。本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子の発現を制御するのに使用されるプロモーターとしては、以下に制限されないが、SV40初期プロモーター(early promoter)領域(Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310)、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含まれるプロモーター(Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42)、テトラサイクリン(Tet)プロモーター(Gossen et al., 1995, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:55475551); -ラクタマーゼプロモーター(-lactamase promoter)(Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731)、またはtacプロモーター(DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25; また、"Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242:74-94をも参照)等の原核生物の発現ベクター; ノパリンシンセターゼプロモーター領域(Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213)またはカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター(Gardner, et al., 1981, Nucl. Acids Res. 9:2871)、及び光合成酵素リブローズ2リン酸カルボキシラーゼのプロモーター(Herrera-Estrella et al., 1984, Nature 310:115-120)を有する植物の発現ベクター; Gal4プロモーター、ADC(アルコールデヒドロゲナーゼ)プロモーター、PGK(ホスホグリセロールキナーゼ)プロモーター、アルカリホスファターゼプロモーター等の酵母または他の真菌由来のプロモーター要素、ならびに組織特異性を発揮しかつ形質転換動物で利用されてきた、以下の動物の転写制御領域: 膵腺房細胞中で活性を有するエラスターゼI遺伝子制御領域(Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); 膵臓ベータ細胞中で活性を有するインスリン遺伝子制御領域(Hanahan, 1985, Nature 315:115-122)、リンパ

系細胞中で活性を有する免疫グロブリン遺伝子制御領域(Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444)、精巣、乳腺、リンパ系及び肥満細胞中で活性を有するマウス乳腺癌ウイルスの制御領域(Leder et al., 1986, Cell 45:485-495)、肝臓中で活性を有するアルブミン遺伝子制御領域(Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276)、肝臓中で活性を有する α -フェトプロテイン遺伝子制御領域(Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58); 肝臓中で活性を有する α -1-アンチトリプシン遺伝子制御領域(Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171)、骨髄細胞中で活性を有する β -グロビン遺伝子制御領域(Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); 脳の乏突起膠細胞中で活性を有するミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域(Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); 骨格筋中で活性を有するミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域(Sani, 1985, Nature 314:283-286); ニューロン細胞(neuronal cell)中で活性を有するニューロン特異的エノラーゼ(neuronal-specific enolase) (NSE) (Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80:571-83); ニューロン細胞中で活性を有する脳誘導神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor) (BDNF) 遺伝子制御領域(Tabuchi et al., 1998, Biochem. Biophys. Res. Com. 253:818-823); 星状細胞中で活性を有する神経膠線維酸性タンパク質(GFAP)プロモーター(Gomes et al., 1999, Braz J Med Biol Res 32(5):619-631; Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80:571-83)及び視床下部中で活性を有する性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域(Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378)、ニューロン細胞中で活性を有する脳誘導神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor) (BDNF) 遺伝子制御領域(Tabuchi et al., 1998, Biochem. Biophys. Res. Com. 253:818-823); 星状細胞中で活性を有する神経膠線維酸性タンパク質(GFAP)プロモーター(Gomes et al., 1999, Braz J Med Biol Res 32(5):619-631; Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80:571-83)及び視床下部中で活性を有する性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域(Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378)、ニューロンのニコチン性受

容体アルファ5サブユニット遺伝子(neuronal nicotinic receptor alpha5 subunit gene)(Campos-Caro et al. 1999 J Biol Chem. 274, 4693-701); BDNF 遺伝子プロモーターI (Tabuchi et al. 1998 Biochem Biophys Res Commun 253, 818-23)、ニューロンのニコチン性アセチルコリン受容体アルファ4サブユニット遺伝子(neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha4 gene)(Watanabe et al. 1998 Eur J Neurosci. 10, 2244-53)、ニューロンのニコチン性受容体アルファ7サブユニット遺伝子(Carrasco-Serrano et al. 1998 J Biol Chem. 273, 20021-8)、GABA(A)受容体デルタサブユニット遺伝子プロモーター/上流領域(GABA(A) receptor delta subunit gene promoter/upstream region)(Luscher et al. 1997 Brain Res Mol Brain Res. 51, 197-211)、ラットのチロシンヒドロキシラーゼプロモーター(Robert et al. 1997 J Neurochem. 68, 2152-60)、ラットの芳香族L-アミノ酸デカルボキシラーゼ遺伝子(Aguanno et al. 1995 J Neurochem. 65, 1944-54)、 α -インターネキシンプロモーター(alpha-interneixin promoter)(Ching et al. 1991 J Biol Chem. 266, 19459-68)、ニューロンのニコチン性アセチルコリン受容体アルファ2サブユニット遺伝子(Milton et al. 1995 J Biol Chem. 270, 15143-7)、D1Aドーパミン受容体遺伝子プロモーター(D1A dopamine receptor gene promoter)(Severynse et al. 1995 Brain Res Mol Brain Res. 30, 336-46)が挙げられる。

【0185】

特定の実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する核酸に操作により連結される(operably linked)プロモーター、一以上の複製のオリジン、及び必要であれば、一以上の選択マーカー(例えば、抗生物質耐性遺伝子)を含むベクターが使用される。

【0186】

特定の実施態様においては、発現構築物は、本明細書で規定されるポリペプチドのコーディング配列を3つのpGEXベクター(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ発現ベクター; Smith and Johnson, 1988, Gene 7:31-40)のそれぞれのEcoRI制限部位にサブクローニングすることによって作製される。これによって、正確なリーディングフレームでサブクローンから産物が発現できる

。

【0187】

哺乳動物宿主細胞では、数多くのウィルスを基礎とした発現系が利用される。アデノウィルスが発現ベクターとして使用される場合には、本明細書で規定されるポリペプチドのコーディング配列は、アデノウィルスの転写/翻訳制御複合体、例えば、レイトプロモーター(late promoter)及び3部分リーダー配列(tripartite leader sequence)に連結されてもよい。次に、このキメラ遺伝子は、インビトロまたはインビボ組換えによってアデノウィルスのゲノムに挿入されてもよい。ウィルスゲノムの非必須領域(例えば、領域E1またはE3)への挿入によって、生育可能でかつ感染宿主中で抗体分子を発現できる組換えウィルスが得られるであろう(例えば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359を参照)。特定の開始シグナルはまた、挿入された抗体のコーディング配列の効率的な翻訳に必要であるかもしれない。これらのシグナルとしては、ATG開始コドン及び隣接配列が挙げられる。さらに、開始コドンは、完全な挿入物の翻訳を確かに行なうために所望のコーディング配列と同じリーディングフレームにいなければならない。これらの外因性の翻訳制御シグナル及び開始コドンは様々なオリジン由来であってもよく、天然及び合成双方であってもよい。発現の有効性は、適当な転写エンハンサー要素、転写ターミネーターなどを含ませることによって促進されてもよい(Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544を参照)。

【0188】

本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子の挿入物を含む発現ベクターは、3種の一般的なアプローチによって同定できる:(a)核酸のハイブリダイゼーション、(b)「マーカー」遺伝子機能の存在または不存在、及び(c)挿入配列の発現。第一のアプローチでは、発現ベクター中に挿入される本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子の存在が、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する挿入遺伝子と相同性を有する配列を有するプローブを用いた核酸のハイブリダイゼーションによって検出できる。第二のアプローチでは、組換えベクター/宿主系が、ベクターへの本明細書で規定される

ポリペプチドをコード化する遺伝子の挿入によって生じる特定の「マーカー」遺伝子機能（例えば、チミジンキナーゼ活性、抗生物質に対する耐性、形質転換の表現型、バキュロウィルスにおける封入体(occlusion body)の形成など）の存在または不存在に基づいて同定及び選択できる。例えば、遺伝子がベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入されると、遺伝子挿入物を含む組換え体は、マーカー遺伝子機能の不存在によって同定できる。第三のアプローチでは、組換え発現ベクターは、組換え体によって発現される遺伝子産物をアッセイすることによって同定できる。このようなアッセイは、例えば、抗体との結合などの、インビトロのアッセイ系における本明細書で規定されるポリペプチドの物理的なまたは機能的な特性を基礎とするものでありうる。

【0189】

加えて、挿入された配列の発現を調節する、または所望の特定の様式で遺伝子産物を修飾、処理する宿主細胞株が選択されてもよい。特定のプロモーターからの発現は特定のインデューサーの存在下で上昇できる；このため、遺伝子操作されたポリペプチドの発現を制御してもよい。さらに、異なる宿主細胞は、翻訳及び翻訳後プロセッシング及び修飾（例えば、グリコシル化、タンパク質のリン酸化）に関する特徴的な及び特異的な機構を有する。適当な細胞系または宿主系が、発現される外来タンパク質の所望の修飾及びプロセッシングを確かに行なうために選択されうる。例えば、細菌系での発現はグリコシル化されない産物を生産するであろうし、酵母における発現はグリコシル化された産物を生産するであろう。一次転写産物の適当なプロセッシング、グリコシル化、及び遺伝子産物のリン酸化に関する細胞機構(cellular machinery)を有する真核宿主細胞を使用してもよい。このような哺乳動物宿主細胞としては、以下に制限されないが、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、WI38、および特に、例えば、SK-N-AS、SK-N-FI、SK-N-DZのヒト神経芽細胞腫(Sugimoto et al., 1984, J. Natl. Cancer Inst. 73: 51-57)、SK-N-SHのヒト神経芽細胞腫(Biochim. Biophys. Acta, 1982, 704: 450-460)、ダオイのヒト小脳髄芽細胞腫(Daoy human cerebellar medulloblastoma)(He et al., 1992, Cancer Res. 52: 1144-1148)、DBTRG-05MGグリア芽細胞

腫細胞(Kruse et al., 1992, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28A: 609-614)、I M R - 3 2 のヒト神経芽細胞腫(*Cancer Res.*, 1970, 30: 2110-2118)、1 3 2 1 N 1 のヒト星状細胞腫(*Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1977, 74: 4816)、M O G - G - C C M のヒト星状細胞腫(*Br. J. Cancer*, 1984, 49: 269)、U 8 7 M G のヒトグリア芽細胞腫 - 星状細胞腫(*Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1968, 74: 465-486)、A 1 7 2 のヒトグリア芽細胞腫(Olopade et al., 1992, *Cancer Res.* 52: 2523-2529)、C 6 のラット神経膠腫細胞(Benda et al., 1968, *Science* 161: 370-371)、N e u r o - 2 a のマウス神経芽細胞腫(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, 65: 129-136)、N B 4 1 A 3 のマウス神経芽細胞腫(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1962, 48: 1184-1190)、S C P のヒツジ脈絡叢(Bolin et al., 1994, *J. Virol. Methods* 48: 211-221)、G 3 5 5 - 5、P G - 4 のネコ正常星状細胞(Haapala et al., 1985, *J. Virol.* 53: 827-833)、M p f のフェレット脳(Trowbridge et al., 1982, *In Vitro* 18: 952-960)等のニューロン細胞系、ならびに例えば、C T X T N A 2 のラットの正常な脳皮質(Radany et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6467-6471)等の正常な細胞系が挙げられる。さらに、異なるベクター/宿主発現系が異なる程度のプロセッシング反応を行なってもよい。組換えタンパク質の長期間で高収率の生産のために、安定した発現が好ましい。例えば、異なって発現するまたは経路の異なる遺伝子タンパク質を安定して発現する細胞系を操作してもよい。ウィルスの複製オリジンを含む発現ベクターを用いるよりむしろ、宿主細胞に、適当な発現制御要素(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)によって制御されるDNA及び選択マーカーを形質転換してもよい。外来DNAを導入後、操作された細胞を栄養強化培地で1~2日間生育させた後、選択培地に切り換えてもよい。組換えプラスミド中の選択マーカーは選択に対する耐性を付与し、これにより細胞はそのクロモソーム中にプラスミドを安定して組み込み、生育して細胞増殖巣を形成することができ、さらに、これをクローニングして細胞系に拡張できる。この方法は、異なって発現するまたは経路の異なる遺伝子タンパク質を発現する細胞系を操作するのに好ましく使用される。このような操作された細胞系は、異なって発現するまたは経路の異なる遺伝子タンパク質

の内因性の活性に影響を与える化合物のスクリーニング及び評価に特に有用である。

【0190】

多くの選択系が使用され、これらとしては、以下に制限されないが、単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ(Wigler, et al., 1977, Cell 11:223)、ヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026)、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy, et al., 1980, Cell 22:817)遺伝子が、それぞれ、 $t k^{-}$ 、 $h g p r t^{-}$ または $a p r t^{-}$ 細胞で使用できる。また、代謝拮抗剤耐性が、メトトレキセートに対する耐性を付与する、 $d h f r$ (Wigler, et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare, et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527) ; ミコフェノール酸(mycophenolic acid)に対する耐性を付与する、 $g p t$ (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072) ; アミノグリコシド G - 418 に対する耐性を付与する、 $n e o$ (Colberre-Garapin, et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1) ; 及びハイグロマイシンに対する耐性を付与する、 $h y g r o$ (Santerre, et al., 1984, Gene 30:147) 遺伝子に関する選択の基礎として使用できる。

【0191】

他の特定の実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチド、断片、類似体、または誘導体を、(異種タンパク質配列にペプチド結合を介して結合されたタンパク質、断片、類似体、または誘導体を含む) 融合物、またはキメラタンパク質産物として発現してもよい。例えば、本発明のポリペプチドを、免疫グロブリン(IgA、IgE、IgG、IgM)の定常ドメイン、またはその一部(CH1、CH2、CH3、またはその組み合わせ及びその一部)と融合して、キメラポリペプチドを得てもよい。このような融合タンパク質は、精製を容易にし、インビボでの半減期を増加し、さらに免疫系への上皮バリアを介した抗原のデリバリーを促進する。インビボでの半減期の増加及び精製の容易さは、ヒトCD4ポリペプチドの始めの2つのドメイン及び哺乳動物の免疫グロブリンの重または軽鎖の定常領域の様々なドメインから構成されるキメラタンパク質について

示された。例えば、EP 394,827; Traunecker et al., Nature, 331:84-86 (1988)を参照。免疫系への上皮バリアを介した抗原の促進されたデリバリーは、IgGまたはFc断片等のFcRn結合パートナーに共役された抗原(例えば、インスリン)について示された(例えば、PCT公開公報 WO 96/22024及びWO 99/04813を参照)。

【0192】

本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する核酸は、発現ポリペプチドの検出及び精製を助けるためにエピトープタグ(例えば、ヘマグルチニン(「HA」)タグまたはフラグタグ(flag tag))に融合されてもよい。例えば、Janknecht et al.によって記載されたシステムによって、ヒト細胞系で発現した非変性融合タンパク質を容易に精製できる(Janknecht et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897)。

【0193】

融合タンパク質は、適当なコーディングフレーム中に、当該分野において既知の方法によって所望のアミノ酸配列をコード化する適当な核酸配列を相互に連結し、当該分野において一般的に既知の方法によってキメラ産物を発現することによって作製できる。または、融合タンパク質は、例えば、ペプチド合成器の使用によって、タンパク質合成技術によって作製してもよい。

【0194】

cDNA及びゲノム配列双方がクローニング及び発現されうる。

【0195】

本発明によると、神経精神または神経状態を有すると疑われているまたはこれを有することが知られている被検者から得られた組織または髄液(cerebrospinal fluid)(CSF)のテストサンプルが、診断若しくはモニターに使用される。一実施態様においては、コントロールサンプル(乳癌に冒されていない被検者または複数の被検者からの)または予め決定された参考範囲に比してテストサンプルにおける本明細書で規定されるポリペプチドの存在比の変化が、乳癌の存在を示す。他の実施態様においては、コントロールサンプルまたは予め決定された参考範囲に比したテストサンプルにおける本明細書で規定されるポリペプチドの

相対的な存在比が特定の状態を示唆してもよい。さらなる実施態様においては、コントロールサンプルまたは予め決定された参考範囲に比したテストサンプルにおける本明細書で規定されるポリペプチドの相対的な存在比が、状態の程度または重篤度を示す。前記方法のいずれかにおいて、本明細書で規定されるポリペプチドの検出は、必要であれば、目的とする状態に関する一以上のさらなるバイオマーカーの検出と組み合わせられてもよい。当該分野における多くの方法の標準物質を、本明細書で規定されるポリペプチドのレベルを測定するのに使用でき、これらとしては、本明細書に記載される好ましい技術に制限されるものではないが、キナーゼアッセイ、ポリペプチドを検出および/または視覚化するイムノアッセイ（例えば、ウェスタン法、免疫沈降、その後にドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動、免疫細胞化学など）が挙げられる。さらなる実施態様においては、コントロールサンプルまたは予め決定された参考範囲に比したテストサンプルにおける本明細書で規定されるポリペプチドを含むmRNAの存在比の変化が、目的とする状態の存在を示す。ハイブリダイゼーションアッセイは、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化するmRNAを検出するおよび/または視覚化すること（例えば、ノーザンアッセイ、ドットプロット、in situハイブリダイゼーションなど）によって、本明細書で規定されるポリペプチドの発現を検出するのに使用できる。

【0196】

本発明の他の実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドに特異的に結合する、標識抗体、これらの誘導體及び類似体を、神経精神または神経状態を検出、診断、またはモニターする診断目的に使用してもよい。好ましくは、このような状態は、哺乳動物で及び最も好ましくはヒトで検出される。

【0197】

本発明は、本明細書で規定されるポリペプチドに結合するまたは本明細書で規定されるポリペプチドの発現若しくは活性に刺激若しくは阻害効果を有する物質、候補化合物またはテスト化合物を同定する方法を提供するものである。物質、候補化合物またはテスト化合物の例としては、以下に制限されるものではないが、核酸（例えば、DNA及びRNA）、炭水化物、脂質、タンパク質、ペプチド

、ペプチドミメティックス(peptidomimetics)、小分子及び他の薬剤が挙げられる。物質は、生物学的なライブラリー(biological library)；空間的にアドレス可能な平行固相(spatially addressable parallel solid phase)または液相ライブラリー；逆重畳積分を必要とする合成ライブラリー方法；「one-bead one-compound」ライブラリー方法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を用いた合成ライブラリー方法などの、当該分野において既知のコンビナトリアルライブラリー(combinatorial library)方法において数多くのアプローチのいずれかを用いて行なわれる。生物学的なライブラリーのアプローチはペプチドライブラリーに制限されるが、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または小分子ライブラリーに適用できる(Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12:145；米国特許第5,738,996号；及び米国特許第5,807,683号、これらはそれぞれ参考により完全に本明細書に引用される)。

【0198】

分子ライブラリーの合成方法の例は当該分野において見出され、例えば、DeWitt et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6909; Erb et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422; Zuckermann et al., 1994, J. Med. Chem. 37:2678; Cho et al., 1993, Science 261:1303; Carrell et al., 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carell et al., 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; および Gallop et al., 1994, J. Med. Chem. 37:1233に見出され、これらはそれぞれ参考により完全に本明細書に引用される。

【0199】

化合物のライブラリーは、溶液(例えば、Houghten, 1992, Bio/Techniques 13:412-421)中に、またはビーズ(Lam, 1991, Nature 354:82-84)、チップ(Fodor, 1993, Nature 364:555-556)、細菌(米国特許第5,223,409号)、孢子(特許第5,571,698号；第5,403,484号；及び第5,223,409号)、プラスミド(Cull et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869)またはファージ(Scott and Smith, 1990, Science 249:386-390; Devlin, 1990, Science 249:404-406; Cwirla et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382; および Felici, 1991, J. Mol. Biol. 222:301-310)

上に提示されてもよい。これらはそれぞれ参考により完全に本明細書に引用される。

【0200】

一実施態様において、本明細書で規定されるポリペプチドまたはこの生物学的に活性のある部分と相互作用する（即ち、これらに結合する）物質は、細胞を基礎とするアッセイシステムで同定される。この実施態様によると、本明細書で規定されるポリペプチド、または当該ポリペプチドの他の天然のイソ型若しくはポリペプチドのもの若しくはこのようなタンパク質の関連同族体若しくはこの生物学的に活性のある部分を発現する細胞を、このような細胞または組換え発現システムに取り入れて、化合物の大きなライブラリーに対する一次スクリーニングでアッセイしてもよい。様々な形態の上記ポリペプチドを、候補化合物またはコントロール化合物と接触させて、候補化合物のポリペプチドとの相互作用能、さらにはポリペプチドの生物学的活性を阻害または促進する化合物を測定する。次に、このような一次スクリーンから出現した化合物を、関心のあるポリペプチドを取り込んだ細胞または組換え発現タンパク質システムに対して再アッセイしてもよい。候補化合物のこのような二次アッセイにおける本明細書で規定されるポリペプチドとの直接または間接的な相互作用能は、当業者に既知な方法によって測定できる。例えば、候補化合物及び本明細書で規定されるポリペプチド間の相互作用は、フローサイトメトリー、シンチレーションアッセイ、免疫沈降またはウェスタンブロット分析によって測定できる。

【0201】

他の実施態様において、本明細書で規定されるポリペプチドまたはこの生物学的に活性のある部分と相互作用する（即ち、これらに結合する）物質は、細胞を基礎とするアッセイシステムで同定される。この実施態様によると、本明細書で規定されるポリペプチドを発現する細胞を、候補化合物またはコントロール化合物と接触させて、候補化合物のポリペプチドとの相互作用能を測定する。細胞は、例えば、原核生物（例えば、大腸菌(E. coli)）由来であってもまたは真核生物（例えば、酵母または哺乳動物）由来であってもよい。さらに、細胞は、ポリペプチドを内因的に発現してもまたはポリペプチドを発現するように遺伝子操作

されてもよい。場合によっては、本明細書で規定されるポリペプチドまたは候補化合物は、ポリペプチド及び候補化合物間の相互作用を検出できるように、放射性標識（例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 及び ^{125}I ）または蛍光標識（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン(allophycocyanin)、*o*-フタルアルデヒド及びフルオレスカミン)で標識される。候補化合物の本明細書で規定されるポリペプチドとの直接または間接的な相互作用能は、当業者に既知な方法によって測定できる。例えば、相互作用は、フローサイトメトリー、シンチレーションアッセイ、免疫沈降またはウェスタンブロット分析によって測定できる。

【0202】

他の実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドまたはこの生物学的に活性のある部分と相互作用する（即ち、これらに結合する）物質は、細胞を含まないアッセイシステムで同定される。この実施態様によると、天然の若しくは組換えポリペプチドまたはこの生物学的に活性のある部分を、候補化合物と接触させて、候補化合物のポリペプチドとの相互作用能を測定する。好ましくは、ポリペプチドまたはこの生物学的に活性のある部分を、まず、例えば、ポリペプチドをこのポリペプチドを特異的に認識、結合する固定化抗体と接触させることによって、またはポリペプチドの精製された調製物をタンパク質に結合するように設計された表面と接触させることによって、固定化する。ポリペプチドまたはこの生物学的に活性のある部分は、一部が若しくは完全に精製されてもよく（例えば、部分的にまたは完全に他のポリペプチドを含まない）または細胞溶解産物の一部であってもよい。さらに、ポリペプチドは、ポリペプチド若しくはこれの生物学的に活性のある部分およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ等のドメインを含む融合タンパク質であってもよい。または、ポリペプチドは、当業者に既知の技術（例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals; Rockford, IL）を用いてビオチン化されてもよい。候補化合物の本明細書で規定されるポリペプチドとの相互作用能は、当業者に既知の方法によって測定できる。

【0203】

他の実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドまたはこれの生

物学的に活性のある部分と優先的に相互作用する（即ち、これらに結合する）物質は、競合結合アッセイで同定される。この実施態様によると、ポリペプチドを発現する細胞を、候補化合物及びポリペプチドと相互作用することが知られている化合物と接触させ、候補化合物のポリペプチドとの優先的な相互作用能を測定する。または、本明細書で規定されるポリペプチドまたはこれの生物学的に活性のある部分と優先的に相互作用する（即ち、これらに結合する）物質は、ポリペプチドまたはこれの生物学的に活性のある部分を候補化合物及びポリペプチドと相互作用することが知られている化合物と接触させることによって、細胞を含まないアッセイシステムで同定される。上述したように、候補化合物の本明細書で規定されるポリペプチドとの相互作用能は、当業者に既知の方法によって測定できる。

【0204】

他の実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドの発現または活性を調節する（即ち、アップレギュレートする(upregulate)またはダウンレギュレートする(downregulate)）物質は、ポリペプチドを発現する細胞（例えば、原核生物由来または真核生物由来の細胞）を、候補化合物またはコントロール化合物（例えば、リン酸緩衝生理食塩水（PBS））と接触させて、ポリペプチドまたはこれをコード化するmRNAの発現を測定することによって同定される。候補化合物の存在下での選択されたポリペプチドまたはmRNAの発現のレベルを、候補化合物の不存在下での（例えば、コントロール化合物の存在下での）ポリペプチドまたはmRNAの発現のレベルと比較する。次に、候補化合物が、この比較に基づいてポリペプチドの発現の調節剤として同定できる。例えば、ポリペプチドまたはmRNAの発現が不存在下に比べて候補化合物の存在下の方が有意に大きい場合には、その候補化合物はポリペプチドまたはmRNAの発現の刺激剤として同定される。または、ポリペプチドまたはmRNAの発現が不存在下に比べて候補化合物の存在下の方が有意に小さい場合には、その候補化合物はポリペプチドまたはmRNAの発現の阻害剤として同定される。本明細書で規定されるポリペプチドまたはこれをコード化するmRNAの発現のレベルは、当業者に既知の方法によって測定できる。例えば、mRNAの発現は、ノーザンプロ

ット分析またはRT-PCRによって評価でき、また、タンパク質のレベルは、ウェスタンブロット分析によって評価できる。

【0205】

他の実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドまたはこれの生物学的に活性のある部分の活性を調節する物質は、ポリペプチド若しくはこれの生物学的に活性のある部分を含む調製物またはポリペプチド若しくはこれの生物学的に活性のある部分を発現する細胞（例えば、原核または真核細胞）を、テスト化合物またはコントロール化合物と接触させて、テスト化合物の、ポリペプチドまたはこれの生物学的に活性のある部分の活性の調節（例えば、刺激または阻害）能を測定することによって同定される。本明細書で規定されるポリペプチドの活性は、ポリペプチドの細胞の2次メッセンジャーの誘導（例えば、細胞内 Ca^{2+} 、ジアシルグリセロール、IP3など）を検出する、適当な基質でのターゲットの触媒若しくは酵素活性を検出する、レポーター遺伝子（例えば、ポリペプチドに応答でき、検出マーカー、例えば、ルシフェラーゼをコード化する核酸に操作により連結される調節要素）の誘導を検出する、または細胞の応答、例えば、細胞の分化、若しくは細胞の増殖を検出することによって、評価できる。当業者に既知の技術がこれらの活性を測定するのに使用できる（例えば、米国特許第5,401,639号を参照、これは参考により完全に本明細書に引用される）。次に、候補化合物は、候補化合物の効果をコントロール化合物と比較することによって本明細書で規定されるポリペプチドの活性の調節剤として同定される。適当なコントロール化合物としては、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）及び一般的な生理食塩水（NS）が挙げられる。

【0206】

他の実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドまたはこれの生物学的に活性のある部分の発現、活性または発現及び活性の双方を調節する（即ち、アップレギュレートする(upregulate)またはダウンレギュレートする(downregulate)）物質は、動物モデルで同定される。適当な動物の例としては、以下に制限されないが、マウス、ラット、ウサギ、サル、モルモット、イヌ及びネコが挙げられる。好ましくは、使用される動物は、乳癌のモデル（例えば、フェンシ

クリジンで処置された齧歯動物(Sams-Dodd Rev Neurosci 1999 10, 59-90)、感覚運動通門(sensorimotor gating)が欠如した動物モデル(Swerdlow and Geyer Schizophr Bull 1998 24:2 285-301)、海馬領域への新生児の障害(neonatal insult to the hippocampal region)(Beauregard and Bachevalier Can J Psychiatry 1996 Sep 41:7 446-56)、新生児の毒性促進性の海馬障害に基づくモデル(models based on neonatal excitotoxic hippocampal damage)(Lillrank et al, Clin Neurosci 1995 3:2 98-104)、注意欠陥モデル(Feldon et al. J Psychiatr Res 4, 345-66)及びNMDA欠如齧歯動物モデル(Mohn et al. Cell 1999, 98, 427-436)を表わす。この実施態様によると、テスト化合物またはコントロール化合物は、適当な動物に(例えば、経口で、直腸にまたは腹腔内若しくは静脈内に等の非経口で)投与され、ポリペプチドの発現、活性または発現及び活性の双方に関する効果を測定する。ポリペプチドの発現の変化は、上記で概説した方法によって評価できる。

【0207】

さらなる他の実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドまたはこれの生物学的に活性のある部分は、ポリペプチドまたはこれの生物学的に活性のある部分に結合するまたはこれと相互作用する他のタンパク質を同定するための2-ハイブリッドアッセイ(two-hybrid assay)または3ハイブリッドアッセイ(three hybrid assay)における「バイトタンパク質(bait protein)」として使用される(例えば、米国特許第5,283,317号; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartell et al. (1993) Bio/Techniques 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696; 及びPCT公開公報第WO 94/10300号を参照)。このような結合タンパク質はまた、例えば、ポリペプチドを含むシグナル経路の上流または下流要素としてポリペプチドによるシグナルの伝達にかかわりがあると考えられる。

【0208】

本発明はさらに、上記スクリーニングアッセイによって同定される新規な物質および本明細書中に記載されるような処置へのこれらの使用を提供するものであ

る。加えて、本発明はまた、目的とする状態の処置を目的とする薬剤の製造における本明細書で規定されるポリペプチドと相互作用する、またはこれの活性を調節する物質の使用を提供するものである。

【0209】

本発明は、治療化合物の投与による様々な病気及び障害の処置及び予防を提供するものである。このような化合物としては、以下に制限されるものではないが、本明細書で規定されるポリペプチドならびにこれの類似体及び誘導体（断片を含む）；前記に対する抗体；本明細書で規定されるポリペプチド、類似体、または誘導体をコード化する核酸；本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子に対するアンチセンス核酸；ならびに本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子のアゴニスト及びアンタゴニストまたは本明細書で規定されるポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストが挙げられる。本発明の重要な特徴は、目的とする状態に係わりのある本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子の同定である。

【0210】

好ましくは、抗体等の生物学的な産物は、投与される被検者に対して同種異系である。

【0211】

したがって、本発明の治療方法は、本明細書で規定されるポリペプチドのレベル若しくは活性（即ち、機能）を調節する（即ち、増加するまたは減少する）化合物を、神経精神若しくは神経状態を有すると疑われているまたはこのような状態を有することが知られているまたは神経精神若しくは神経状態が発達する危険性のある被検者に投与することを有する。一実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドのレベルまたは活性（即ち、機能）をアップレギュレートする（即ち、増加する）化合物を投与する。このような化合物の例としては、以下に制限されないが、本明細書で規定されるポリペプチド、（例えば、上記したようなインビトロアッセイにおいてまたは動物モデルにおいて）機能的に活性のあるこの誘導体または断片、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する核酸またはこれの機能的に活性のある誘導体若しくは断片（例えば、遺伝子治療

に使用される)が挙げられる。使用できる他の化合物、例えば、アゴニストが、インビトロアッセイを用いて同定できる。

【0212】

このような状態はまた、本明細書で規定されるポリペプチドのレベル若しくは活性をダウンレギュレートする(downregulate)化合物を、このような状態を有すると疑われているまたはこのような状態を有することが知られているまたはこのような状態が発達する危険性のある被検者に投与することによっても、処置または予防されうる。このような化合物の例としては、以下に制限されないが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、または本明細書で規定されるポリペプチドに対する抗体が挙げられる。使用できる他の化合物、例えば、アンタゴニスト及び小分子アンタゴニストが、インビトロアッセイを用いて同定できる。

【0213】

好ましい実施態様においては、治療およびまたは予防は、個々の被検者の必要性に合わせられる。特定の実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドのレベル若しくは機能を減少する化合物が、上記状態を有すると疑われているまたはこのような状態を有することが知られている被検者に治療のためにまたは予防のために投与される。

【0214】

このような化合物の投与による、本明細書で規定されるポリペプチドの機能またはレベルの変化は、例えば、胸部組織または体液サンプル(例えば、CSF由来)を得、当該ポリペプチドのレベル、または当該ポリペプチドをコード化するmRNAのレベル、または前記いずれかの組み合わせをインビトロでアッセイすることによって、容易に検出されうる。このようなアッセイは、本明細書に記載されるような化合物の投与の前後に行なわれる。

【0215】

本発明の化合物としては、いずれの化合物に制限されるものではないが、例えば、このような化合物または処置が、以下に制限されないが、タキソール、シクロフォスファミド、タモキシフェン、及びドキシソルビシンを含む場合には、プロフィールを正常に回復する、小有機分子、タンパク質、ペプチド、抗体、核酸な

どが挙げられる。

【0216】

本明細書で規定されるポリペプチドは、抗原性材料として有用であってもよく、上記状態の処置または予防のためのワクチンの製造に使用されてもよい。このような材料は、「抗原性」および/または「免疫原性」であってもよい。通常、「抗原性」は、タンパク質が抗体を生じるのに使用することができるまたは被検者における抗体応答を誘導することができることを意味するものとする。「免疫原性」は、タンパク質が被検者における保護免疫応答を誘発することができることを意味するものとする。ゆえに、後者の場合には、タンパク質は、抗体応答のみでなく、これに加えて、非抗体を基礎とする(non-antibody based)免疫応答をも生じることができてよい。

【0217】

抗原性タンパク質またはポリペプチドをスクリーニングすることにより、エピトープ領域、即ち、タンパク質またはポリペプチドの抗原性または免疫原性に応答できる領域を同定することが可能であることは知られている。当業者に既知の方法を用いて、抗原性に関して断片および/または同族体および/または誘導体を試験できる。ゆえに、本発明の断片は、一以上のこのようなエピトープを含むまたはこれらの抗原性/免疫原性を保持するのに十分このような領域と類似するべきである。ゆえに、本発明による断片では、一致性は、本明細書に記載されるようなタンパク質またはポリペプチド、同族体または誘導体の特定の部分と100%一致であってもよいため、恐らく無関係である。再度繰り返すが、断片がこれ由来であるタンパク質の抗原性/免疫原性を保持することが、重要である。

【0218】

同族体、誘導体及び断片で重要なことは、これらがこれ由来であるタンパク質またはポリペプチドの抗原性/免疫原性の少なくともある程度を有することである。

【0219】

本明細書で規定されるポリペプチド、またはこれの抗原性断片は、精製されたまたは単離された調製物として、単独で提供されてもよい。これは、本発明の一

以上の他のタンパク質の特徴、またはこの抗原性断片との混合物の一部として提供されてもよい。したがって、さらなる態様においては、本発明は、本明細書で規定されるポリペプチドおよび/または一以上のこれの抗原性断片を含む抗原組成物を提供するものである。このような組成物は、神経精神または神経状態の検出および/または診断に使用できる。

【0220】

第六の態様においては、本発明は、本明細書で規定される抗原性ポリペプチド、またはこの抗原性断片、または本発明の抗原組成物を、試験されるサンプルと接触させて；および神経精神または神経状態に対する抗体の存在を検出することを有する、神経精神または神経状態の検出および/または診断方法を提供するものである。

【0221】

特に、本発明のタンパク質、この抗原性断片または抗原組成物は、IgA、IgMまたはIgG抗体を検出するのに使用できる。好ましくは、試験されるサンプルは、生物学的サンプル、例えば、血液または唾液のサンプルであろう。

【0222】

さらなる態様において、本発明は、上記状態の検出および/または診断における本明細書で規定される抗原性ポリペプチド、これの抗原性断片または本発明の抗原組成物の使用を提供するものである。好ましくは、検出および/または診断は、インビトロで行なわれる。

【0223】

本発明の抗原性ポリペプチド、これの抗原性断片または抗原性組成物は、神経精神または神経状態のインビトロでの検出および/または診断に使用されるキットとして提供されうる。ゆえに、さらなる別の態様においては、本発明は、本発明の抗原性ポリペプチド、これの抗原性断片または抗原性組成物を含む、神経精神または神経状態のインビトロの検出および/または診断に使用されるキットを提供するものである。

【0224】

加えて、本発明の抗原性ポリペプチド、これの抗原性断片または抗原組成物は、上述の状態に対する免疫応答を誘導するのに使用できる。ゆえに、別のさらなる態様においては、薬剤における本発明の抗原性ポリペプチド、これの抗原性断片または抗原組成物の使用を提供するものである。

【0225】

さらなる態様においては、本発明は、本発明のポリペプチド、これの抗原性断片または抗原組成物を含む、被検者における免疫応答を誘発できる組成物を提供するものである。好ましくは、組成物は、必要であれば一以上のアジュバントを含む、ワクチン組成物であろう。このようなワクチン組成物は、予防のためのあるいは治療のためのワクチン組成物のいずれであってもよい。

【0226】

特定の実施態様において、本明細書で規定されるポリペプチドまたはその機能的な誘導体をコード化する配列を有する核酸は、遺伝子治療によってポリペプチドの機能を促進するために投与される。遺伝子治療とは、発現するまたは発現可能な核酸の被検者への投与を意味する。この実施態様において、核酸は、ポリペプチドの機能を促進することによって治療効果を仲介するそのコード化されたポリペプチドを生産する。

【0227】

当該分野において利用できるいずれの遺伝子治療方法も本発明に従って使用できる。具体的な方法を以下に説明する。

【0228】

遺伝子治療法の一般的なレビューに関しては、Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932; and Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215)を参照。使用できる組換えDNA技術の分野において一般的に既知の方法は、Ausubel et al. (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; 及び Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press

, NYに記載される。

【0229】

好ましい態様において、化合物は、本明細書で規定されるポリペプチドまたはこれの断片若しくはキメラタンパク質をコード化する核酸等の、本明細書で規定される核酸を含み、当該核酸は、適当な宿主中で本明細書で規定されるポリペプチドまたはこれの断片若しくはキメラタンパク質を発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸は、ポリペプチドのコーディング領域に操作により連結されたプロモーターを有し、当該プロモーターは誘導性(inducible)または構成性(constitutive) (および、必要であれば、組織特異的) である。他の特定の実施態様においては、コーディング配列及びいずれかの他の所望の配列がゲノムの所望の部位での相同組換えを促進する領域に隣接し(flank)、これにより核酸の染色体内の発現を提供する核酸分子が使用される(Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438)。

【0230】

患者への核酸のデリバリーは直接的であってもよく、この場合には、患者は核酸または核酸を運搬する(carrying)ベクターに直接暴露される；このアプローチはインビボ遺伝子治療として知られている。または、患者への核酸のデリバリーは間接的であってもよく、この場合には、細胞にまずインビトロで核酸を形質転換した後、患者に移植する；このアプローチはex vivo遺伝子治療として知られている。

【0231】

特定の実施態様において、核酸は直接インビボで投与され、この際、核酸は発現してコード化産物を生産する。これは、当該分野において既知の数多くの方法によって、例えば、適当な核酸の発現ベクターの一部としてこれを構築し、細胞内になるように投与することによって、例えば、欠損若しくは弱毒化レトロウイルスまたは他のウィルスベクターを用いた感染によって(米国特許第4,980,286号を参照)；裸のDNAを直接注入することによって；微粒子の衝撃(microparticle bombardment) (例えば、遺伝子ガン；Biolistic, Dupont)の使用

によって；脂質、細胞表面レセプターまたはトランスフェクション剤(transfecting agent)で被覆することによって；リポソーム、微粒子またはマイクロカプセルへの封入によって；核に入ることが知られるペプチドに連結された核酸を投与することによって；またはレセプターを特異的に発現する細胞タイプを標的にするのに使用できる、レセプターが介するエンドサイトーシス（例えば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照）を受けるリガンドに連結された核酸を投与することによって達成できる。他の実施態様においては、リガンドが、核酸がリソソーム分解されるのを防止できる、エンドソームを破壊する融合誘導ウィルスペプチドを有する、核酸-リガンド複合体を形成してもよい。さらなる他の実施態様においては、核酸は、特定のレセプターを標的にすることによって、細胞に特異的な取り込み及び発現についてインビボで標的にされうる（例えば、1992年4月16日付のPCT公開公報WO 92/06180号(Wu et al.)；1992年12月23日付のWO 92/22635号(Wilson et al.)；1992年11月26日付のWO 92/20316号(Findeis et al.)；1993年7月22日付のWO 93/14188号(Clarke et al.)、1993年10月14日付のWO 93/20221号(Young)を参照)。または、核酸は、相同組換えによって、細胞内に導入され、発現用の宿主細胞DNA内に取り込まれてもよい(Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438)。

【0232】

特定に実施態様において、本明細書で規定される核酸を含むウィルスベクターが使用される。例えば、レトロウィルスベクターが使用できる(Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599を参照)。これらのレトロウィルスベクターは、ウィルスゲノムのパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組み込みに必要でないレトロウィルスの配列を削除するように予め修飾された。核酸をベクター中にクローニングして、これにより、被検者への遺伝子のデリバリーが容易になる。レトロウィルスベクターに関するより詳細は、Boesen et al., 1994, Biotherapy 6:291-302に見出され、これには幹細胞を化学療法に対してより耐性にするために造血幹細胞にmdr1遺伝子をデリバリーするのにレトロウィルスベ

クターを使用することが記載される。遺伝子治療におけるレトロウィルスベクターの使用を説明する他の引用文献は、Clowes et al., 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Kiem et al., 1994, Blood 83:1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141; および Grossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114がある。

【0233】

アデノウィルスは、遺伝子治療に使用できる他のウィルスベクターである。アデノウィルスは、遺伝子を気道上皮にデリバリーするための特に魅力的なベヒクルである。アデノウィルスは、自然には、気道上皮に感染して軽い病気を引き起こす。アデノウィルスを基礎とするデリバリーシステムに関する他のターゲットとしては、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、及び筋肉がある。アデノウィルスは、非分裂細胞に感染できるという利点を有する。Kozarsky and Wilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503には、アデノウィルスを基礎とする遺伝子治療のレビューが示される。Bout et al., 1994, Human Gene Therapy 5:3-10には、アカゲザルの気道上皮に遺伝子を伝達するのにアデノウィルスベクターを使用することが示される。遺伝子治療におけるアデノウィルスの使用の他の例は、Rosenfeld et al., 1991, Science 252:431-434; Rosenfeld et al., 1992, Cell 68:143-155; Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; PCT公開公報 WO 94/12649号;及び Wang, et al., 1995, Gene Therapy 2:775-783に見出される。

【0234】

遺伝子治療に使用されるアデノ - 関連ウィルス(Adeno-associated virus) (AAV) がまた報告されている(Walsh et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300; 米国特許第5,436,146号)。

【0235】

他の遺伝子治療法は、エレクトロポレーション、リポフェクション(lipofection)、リン酸カルシウムによるトランスフェクション(calcium phosphate mediated transfection)、またはウィルスの感染等の方法によって組織培養の細胞に遺伝子を伝達することに係る。一般的に、伝達方法としては、細胞への選択マーカ

一の伝達がある。次に、細胞を選択下におき、予め取り込まれて、伝達された遺伝子を発現している細胞を単離する。さらに、これらの細胞を被検者にデリバリーする。

【0236】

この実施態様において、核酸は、得られる組換細胞のインビボでの投与前に細胞中に導入される。このような導入は、以下に制限されないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含むウィルスまたはバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、クロモソームによる遺伝子の伝達(chromosome-mediated gene transfer)、マイクロセルによる遺伝子の伝達(microcell-mediated gene transfer)、スフェロプラスト融合などの、当該分野においていずれかの既知の方法によって行なわれる。外来遺伝子の細胞への導入に関して数多くの技術が当該分野において既知であり(例えば、Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; Cline, 1985, Pharmac. Ther. 29:69-92を参照)、受容細胞の必要な発達上の及び生理学的な機能が破壊しない際には、本発明に従って使用してもよい。核酸が細胞で発現可能であり、好ましくはその細胞子孫に受け継がれかつ発現可能であるように、細胞に核酸を安定して伝達するための技術が提供されるべきである。

【0237】

得られた組換細胞は、当該分野において既知の様々な方法によって被検者にデリバリーされうる。好ましい実施態様においては、上皮細胞を、例えば、皮下に注射する。他の実施態様においては、組換皮膚細胞を被検者に皮膚移植片として適用してもよい。組換血球(例えば、造血幹または前駆細胞)は静脈内に投与されることが好ましい。使用されることが予想される細胞の量は、所望の効果、被検者の状態などに依存し、当業者に決定できる。

【0238】

核酸を遺伝子治療を目的として導入できる細胞は、望ましい、使用される細胞いずれのタイプを包含し、以下に制限されないが、ニューロン細胞(neuronal cells)、グリア細胞(例えば、オリゴデンドロサイト(oligodendrocytes)または星

状細胞)、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞; Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球等の血球; 様々な幹または前駆細胞、特に例えば、骨髄、臍帯血、抹消血または胎児肝から得られるような、造血幹または前駆細胞が挙げられる。

【0239】

好ましい実施態様においては、遺伝子治療に使用される細胞は、患者にとって自己由来である。

【0240】

組換細胞を遺伝子治療に使用する実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する核酸を、核酸が細胞またはその子孫に発現可能であるように細胞中に導入した後、組換細胞を治療効果を目的としてインビボで投与する。特定の実施態様においては、幹または前駆細胞が使用される。インビトロで単離、維持されうる幹または前駆細胞が本発明のこの実施態様に従って使用できる(例えば、1994年4月28日付の、PCT公開公報WO 94/08598号; Stemple and Anderson, 1992, Cell 71:973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229; 及び Pittelkow and Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771を参照)。

【0241】

特定の実施態様においては、遺伝子治療を目的として導入される核酸は、核酸の発現が適当な転写の誘導物質の存在または不存在を制御することによって制御可能であるように、コーディング領域に操作により連結される誘導プロモーターを含む。

【0242】

本明細書で規定されるポリペプチドをコードするDNAの直接的な注入はまた、例えば、米国特許第5,589,466号に記載された技術に従って行なわれてもよい。これらの技術は、「裸のDNA (naked DNA)」、即ち、適当な担体に加えてリポソーム、細胞、または他の材料の不存在下での単離されたDNAの注入を包含する。タンパク質をコード化し、適当なプロモーターに操作により連結されたDNAの注入によって、注入部位付近の細胞中でタンパク質が生産され、

注入されたDNAによってコード化されたタンパク質に対する被検者の免疫反応が誘発される。好ましい実施態様において、(a)本明細書で規定されるポリペプチドをコード化するDNA及び(b)プロモーターを含む裸のDNAは、被検者に注射されて、ポリペプチドに対する免疫反応を誘発する。

【0243】

本発明の一実施態様において、神経精神または神経状態は、本明細書で規定されるポリペプチドのレベルおよび/または機能を調節する化合物の投与によって処置または予防される。

【0244】

他の実施態様においては、神経精神または神経状態は、本明細書で規定されるポリペプチドに作用する酵素のレベルおよび/または機能を調節する化合物の投与によって処置または予防される。

【0245】

これを目的として有用である化合物としては、以下に制限されないが、抗ポリペプチド抗体(及びその結合領域を含む断片や誘導體)、本明細書で規定されるポリペプチドアンチセンスまたはリボザイム核酸、ならびに相同組換えによって内因性のポリペプチド機能を「ノックアウトする(knockout)」のに使用される本明細書で規定される機能障害性ポリペプチドをコード化する核酸が挙げられる(例えば、Capecchi, 1989, Science 244:1288 - 1292を参照)。本明細書で規定されるポリペプチドの機能を調節する、または本明細書で規定されるポリペプチドに作用する酵素のレベルおよび/または機能を調節する他の化合物は、既知のインビトロアッセイ、例えば、テスト化合物の、ポリペプチドの他のタンパク質若しくは結合パートナーとの結合の調節能、または既知のポリペプチド機能の調節能に関するアッセイを使用することによって同定できる。好ましくは、このような調節は、インビトロまたは細胞培養中でアッセイされるが、遺伝的なアッセイを使用してもよい。好ましい技術を使用して、化合物の投与前後でポリペプチドのレベルを検出してもよい。好ましくは、適当なインビトロまたはインビボアッセイを用いて、下記により詳述するように、特定の化合物の効果及びその投与が病変組織の処置について兆候を示すかどうかを決定する。

【0246】

特定の実施態様において、本明細書で規定されるポリペプチドの機能を調節する化合物は、ポリペプチドのレベルまたは機能活性の増加（例えば、正常なレベルまたは所望のレベルより大きい）が上述した状態のない被検者の組織若しくはCSFまたは所定の参考範囲に比較して検出される被検者に治療のためにまたは予防のために投与される。当該分野における標準的な方法を用いて、上記で概説したように、レベルまたは機能の増加を測定できる。好ましい阻害組成物としては、小分子、即ち、1000ダルトン以下の分子がある。このような小分子は本明細書に記載されるスクリーニング方法によって同定されうる。

【0247】

特定の実施態様において、本明細書で規定されるポリペプチドの発現は、アンチセンス核酸の使用によって阻害される。本発明は、本明細書で規定されるポリペプチドまたはその一部をコード化する遺伝子またはcDNAに対してアンチセンスである少なくとも6ヌクレオチドを含む核酸の治療を目的とするまたは予防を目的とする使用を提供するものである。本明細書で使用される、「アンチセンス」核酸は、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化するRNA（好ましくはmRNA）の一部に対する配列の相補性によってハイブリッド形成できる核酸を意味する。アンチセンス核酸は、このようなポリペプチドをコード化するmRNAのコーディングおよび/または非コーディング領域に相補的であってもよい。このようなアンチセンス核酸は、発現を阻害する化合物として有用であり、このような状態の処置または予防に使用できる。

【0248】

本発明のアンチセンス核酸は、2本鎖または1本鎖のオリゴヌクレオチド、RNA若しくはDNAまたはこれらの修飾若しくは誘導体であり、細胞に直接投与されてもまたは外因性の導入された配列の転写によって細胞内で生産されてもよい。

【0249】

本発明はさらに、以下に記載されるように、製薬上許容できる担体における有効量の本発明のアンチセンス核酸を含む薬剤組成物を提供するものである。

【0250】

他の実施態様においては、本発明は、本発明のアンチセンス核酸を含む有効量の組成物を用いて細胞を提供することを有する原核または真核細胞における本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する核酸配列の発現の阻害方法を提供するものである。

【0251】

アンチセンス核酸及びその使用を以下に詳細に説明する。

【0252】

本発明のアンチセンス核酸は、少なくとも6個のヌクレオチドを有し、6～約50オリゴヌクレオチドの範囲のオリゴヌクレオチドであることが好ましい。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、または少なくとも200ヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、DNA若しくはRNAまたはこれらのキメラ混合物若しくは誘導體若しくは修飾体であってもよく、また、1本鎖であってもまたは2本鎖であってもよい。オリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸主鎖で修飾されてもよい。オリゴヌクレオチドは、ペプチド等の他の付加基(appended group)；細胞膜(例えば、Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; 1998年12月15日に公開された、PCT公開公報WO 88/09810号を参照)若しくは血液脳関門(例えば、1988年4月25日に公開された、PCT公開公報WO 89/10134号を参照)での輸送を容易にする物質；ハイブリダイゼーションの引き金になる切断物質(hybridization-triggered cleavage agent)(例えば、Krol et al., 1988, BioTechniques 6:958-976を参照)または挿入剤(例えば、Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549を参照)を含んでもよい。

【0253】

本発明の好ましい態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは1本鎖DNAで提供される。オリゴヌクレオチドは、当該分野において通常既知の置換基によりその構造物の

いずれかの位置で修飾されてもよい。

【0254】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、下記修飾された塩基部分：5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β -D - ガラクトシルクエオシン(beta-D-galactosylqueosine)、イノシン、N6 - イソペンチルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2,2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、 β -D - マンノシルクエオシン(beta-D-mannosylqueosine)、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸(v)(uracil-5-oxyacetic acid (v))、ワイブトキシソシン(wybutoxosine)、シュードウラシル、クエオシン(queosine)、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸(v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、2,6 - ジアミノプリン、及び他の塩基類似体の少なくとも一を有していてもよい。

【0255】

他の実施態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも一の修飾糖部分、例えば、下記糖部分：アラビノース、2 - フルオロアラビノース、キシルロース、及びヘキソースの一を有する。

【0256】

さらなる他の実施態様においては、オリゴヌクレオチドは、少なくとも一の下記修飾リン酸主鎖(modified phosphate backbone)：ホスホロチオエート(phosphorothioate)、ホスホロジチオエート、ホスホロアミドチオエート、ホスホルアミ

デート(phosphoramidate)、ホスホルジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、ホルムアセタール(formacetal)、またはホルムアセタールの類似体を有する。

【0257】

さらなる他の実施態様においては、オリゴヌクレオチドは、
- アノマーオリゴヌクレオチドである。
- アノマーオリゴヌクレオチドは、一般的な
- ユニットとは反対に、ストランドが相互に平行に走っている相補的なRNAとの特異的な2本鎖ハイブリッドを形成する(Gautier et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625-6641)。

【0258】

オリゴヌクレオチドは、他の分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーションの引き金になる架橋剤(hybridization triggered cross-linking agent)、輸送剤、またはハイブリダイゼーションの引き金になる切断物質(hybridization-triggered cleavage agent)に共役されてもよい。

【0259】

本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば、(Biosearch, Applied Biosystems等から市販されているような)自動型のDNA合成器を使用することによって、当該分野において既知の標準的な方法によって合成されてもよい。例としては、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドをSteinらの方法(1988, Nucl. Acids Res. 16:3209)によって合成してもよく、また、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドを制御された多孔質ガラスポリマー支持体の使用によって調製してもよい(Sarin et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7448-7451)。

【0260】

特定の実施態様においては、本発明のアンチセンス核酸は、外因性の配列からの転写によって細胞内で製造される。例えば、ベクターを細胞によって取り込まれるようにインビボで導入して、この細胞内でベクターまたはこの一部を転写して、本発明のアンチセンス核酸(RNA)を製造する。このようなベクターは、アンチセンス核酸をコード化する配列を含むであろう。このようなベクターは、所望のアンチセンスRNAを製造するように転写できるものである限り、エピソ

ームのままであってもまたはクロモソームに組み込まれてもよい。このようなベクターは、当該分野における組換えDNA技術標準によって構築できる。ベクターは、哺乳動物細胞での複製及び発現に使用される、プラスミド、ウィルス、または当該分野において既知の他のものであってもよい。アンチセンスRNAをコード化する配列の発現は、哺乳動物、好ましくはヒト、細胞中で作用することが当該分野において既知のプロモーターによることができる。このようなプロモーターは、誘導性(inducible)であってもまたは構成性(constitutive)であってもよい。このようなプロモーターの例は上記で概説する。

【0261】

本発明のアンチセンス核酸は、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子、好ましくはヒト遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部に相補的である配列を有する。しかしながら、好ましいものの、完全な相補性は必要ではない。本明細書中で称される「RNAの少なくとも一部に相補的な」配列とは、ストリンジントな条件(例えば、65 での7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1mM EDTAにおけるハイブリダイゼーション及び68 での0.1×SSC/0.1%SDSによる洗浄を含む非常にストリンジントな条件、または42 での0.2×SSC/0.1%SDSによる洗浄を含む適度にストリンジントな条件)下でRNAとハイブリッド形成して、安定したデュプレックスを形成できるのに十分な相補性を有する配列を意味する；ゆえに、2本鎖のDPI-6アンチセンス核酸の場合には、デュプレックスDNAの1本鎖を試験されてもよく、またはトリプレックスの形成をアッセイしてもよい。ハイブリッド形成能は、相補性の度合い及びアンチセンス核酸の長さの双方に依存するであろう。通常、ハイブリッド形成する核酸が長くなるほど、核酸が含む本明細書で規定されるポリペプチドをコード化するRNAとの塩基のミスマッチが増加するが、依然として安定なデュプレックス(または、場合によってはトリプレックス)を形成する。当業者は標準的な方法の使用によりミスマッチの許容できる程度を確認して、ハイブリッド形成複合体の融点を測定できる。

【0262】

アンチセンス核酸は、本明細書で目的とされる状態を処置または予防するのに

使用できる。好ましい実施態様においては、1本鎖DNAアンチセンスオリゴヌクレオチドが使用される。

【0263】

本明細書で規定されるポリペプチドをコード化するRNAを発現するまたは過剰に発現する細胞型は、当該分野において既知の様々な方法によって同定できる。このような細胞型としては、以下に制限されないが、白血球（例えば、好中球、マクロファージ、単球）及び定住細胞（例えば、星状細胞、グリア細胞、ニューロン細胞、及び上皮細胞）が挙げられる。このような方法としては、以下に制限されないが、本明細書で規定されるポリペプチドに特異的な核酸とのハイブリダイゼーション（例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、ドットプロットハイブリダイゼーション、in situハイブリダイゼーションなど）、その細胞型由来のRNAが本明細書で規定されるポリペプチドにインビトロで翻訳されることができるとを観察すること、イムノアッセイなどが挙げられる。好ましい態様においては、患者からの1次組織を、例えば、免疫細胞化学またはin situハイブリダイゼーションによって、処置前にポリペプチドの発現についてアッセイしてもよい。

【0264】

製薬上許容できる担体における有効量のアンチセンス核酸を含む、本発明の薬剤組成物は、乳癌を有する患者に投与できる。

【0265】

乳癌の処置に有効であろうアンチセンス核酸の量は、標準的な臨床技術によって決定できる。

【0266】

特定の実施態様においては、一以上のアンチセンス核酸を含む薬剤組成物は、リポソーム、微粒子、またはマイクロカプセルを介して投与される。本発明の様々な実施態様においては、このような組成物はアンチセンス核酸の一様の放出を達成するように使用されてもよい。特定の実施態様において、特定の同定可能な抗原に対する抗体を介して標的にされたりポソームを使用することが好ましい(Leonetti et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2448-2451; Renneisen

et al., 1990, J. Biol. Chem. 265:16337-16342)。

【0267】

他の実施態様において、状態の症状は、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子配列を、既知の遺伝子「ノックアウト」、リボザイムまたは3重らせん方法と組み合わせて使用して、ポリペプチドの遺伝子発現を減少することによって、本明細書で規定されるポリペプチドのレベルまたは活性を減少することにより緩和されてもよい。このアプローチでは、リボザイムまたは3重らせん分子は、遺伝子の活性、発現または合成を調節し、これにより乳癌の症状を緩和するのに使用される。このような分子は、突然変異型または非突然変異型のターゲット遺伝子の発現を抑制するまたは阻害するように設計されてもよい。このような分子の製造及び使用技術は当業者にはよく知られている。

【0268】

本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子mRNA転写物を触媒で切断するように設計されるリボザイム分子は、ターゲット遺伝子mRNAの翻訳、従って遺伝子産物の発現を防止するのに使用できる。(例えば、1990年10月4日に公開された、PCT国際公報WO 90/11364号; Sarver et al., 1990, Science 247:1222-1225を参照)。

【0269】

リボザイムは、RNAの特異的な切断を触媒することができる酵素RNA分子である。(レビューとして、Rossi, 1994, Current Biology 4, 469-471を参照)。リボザイムの作用メカニズムは、相補的なターゲットRNAへのリボザイム分子の配列特異的なハイブリッド形成、さらにはエンドヌクレアーゼによる切断(endonucleolytic cleavage event)を含む。リボザイム分子の組成物は、ターゲット遺伝子mRNAに相補的な一以上の配列を含まなければならず、また、mRNAの切断に応答できる既知の触媒配列を含まなければならない。この配列については、例えば、米国特許第5,093,246号を参照し、これは参考により完全に本明細書に引用される。

【0270】

部位特異的な認識配列でmRNAを切断するリボザイムが本明細書で規定され

るポリペプチドをコード化するmRNAを破壊するのに使用できるが、シュモクザメのリボザイムの使用が好ましい。シュモクザメのリボザイムはターゲットmRNAと相補的な塩基対を形成するフランキング領域によって要求される位置でmRNAを切断する。ターゲットmRNAが下記2塩基配列：5' - UG - 3'を有することが唯一の必要条件である。シュモクザメのリボザイムの構築及び製造は当該分野においてよく知られており、Myers, 1995, Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, New York, (see especially Figure 4, page 833)におよびHaseloff and Gerlach, 1988, Nature, 334, 585-591により十分に記載されており、これらはそれぞれ参考により完全に本明細書に引用される。

【0271】

好ましくは、リボザイムは、切断認識部位が本明細書で規定されるポリペプチドをコード化するmRNAの5'末端付近に位置するように、すなわち、有効性を上げかつ非機能性mRNA転写物の細胞内の蓄積を最小限にするように、操作される。

【0272】

本発明のリボザイムはまた、テトラヒメナ サーモフィラ(Tetrahymena thermophila)に自然に発生する(IVS、またはL-19 IVS RNAとして知られる)、およびThomas Cech and collaborators (Zaug, et al., 1984, Science, 224, 574-578; Zaug and Cech, 1986, Science, 231, 470-475; Zaug, et al., 1986, Nature, 324, 429-433; University Patents Inc.による国際公開公報WO 88/04300号; Been and Cech, 1986, Cell, 47, 207-216)によって広範に記載されるものなどのRNAエンドヌクレアーゼ(以降、「Cech型リボザイム(Cech-type ribozyme)」)をも含む。Cech型リボザイムは、ターゲットRNA配列とハイブリッド形成した後ターゲットRNAの切断が起こる8塩基対の活性部位を有する。本発明は、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子中に存在する8塩基対の活性部位配列を標的とする上記Cech型リボザイムを包含する。

【0273】

アンチセンスアプローチにおけるのと同様、リボザイムは、修飾オリゴヌクレオチド（例えば、安定性、ターゲティングなどを改善するため）からなってもよく、インビボで本明細書で規定されるポリペプチドを発現する細胞にデリバリーされなければならない。好ましいデリバリー方法は、トランスフェクションされた細胞がポリペプチドをコード化する内因性のmRNAを破壊し、翻訳を阻害するのに十分な量のリボザイムを製造するように、強力な構成性pol IIIまたはpol IIプロモーターの制御を受けてリボザイムを「コード化する」DNA構築物を用いるものである。リボザイムは、アンチセンス分子とは異なり、触媒性であるため、より低い細胞内濃度が有効のために必要である。

【0274】

内因性ポリペプチド発現はまた、ターゲット相同組換(targeted homologous recombination)を用いて、ポリペプチドをコード化する遺伝子、またはこのような遺伝子のプロモーターを不活性化するまたは「ロックアウトする」ことによって抑制されてもよい（例えば、Smithies, et al., 1985, Nature 317:230-234; Thomas and Capecchi, 1987, Cell 51:503-512; Thompson et al., 1989, Cell 5:313-321; 及び Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438を参照。これらはそれぞれ参考により完全に本明細書に引用される）。例えば、内因性遺伝子（ポリペプチドをコード化する遺伝子のコーディング領域または調節領域）に相同性のあるDNAに隣接する非機能性ポリペプチド（または完全に関連のないDNA配列）をコード化する突然変異遺伝子が、インビボでターゲット遺伝子が発現する細胞にトランスフェクションするのに、選択マーカーおよび/またはネガティブな選択マーカーと共にまたはこのようなマーカーなしで、使用できる。ターゲット相同組換による、DNA構築物の挿入によって、ターゲット遺伝子の不活性化が起こる。このようなアプローチは、ES（胚幹）細胞の修飾が不活性化ターゲット遺伝子を有する動物の子孫を得るのに使用できる農業分野で特に適する（例えば、Thomas and Capecchi, 1987 and Thompson, 1989, supraを参照）。しかしながら、このアプローチは、組換DNA構築物が適当なウイルスベクターを用いてインビボで必要な部位に直接投与されるまたは標的とされる場合には、ヒトでの使用に適合させてもよい。

【0275】

または、本明細書で規定されるポリペプチドをコード化する遺伝子の内因性の発現は、遺伝子の調節領域（即ち、遺伝子のプロモーターおよび/またはエンハンサー）に相補的であるデオキシリボヌクレオチド配列を標的として体内の標的細胞での遺伝子の転写を防止する3重らせん構造を形成することによって抑制できる。（一般的に、Helene, 1991, *Anticancer Drug Des.*, 6(6), 569-584; Helene, et al., 1992, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660, 27-36; 及び Maher, 1992, *Bioassays* 14(12), 807-815を参照）。

【0276】

転写の阻害を目的とした3重らせんの形成に使用される核酸分子は、1本鎖で、デオキシヌクレオチドから構成されなければならない。これらのオリゴヌクレオチドの塩基組成は、通常デュプレックスの一方のストランドに存在するプリンまたはピリミジンの相当の大きさのストレッチを必要とする、フーグスティーン型塩基対ルールにより3重らせんの形成を促進するように設計されなければならない。ヌクレオチド配列はピリミジンを基礎とし、これにより得られる3重らせんの3本の会合ストランドにTAT及びCGC⁺が生じる。このピリミジンリッチな分子は、そのストランドに平行な方向でデュプレックスの1本鎖のプリンリッチな領域との塩基の相補性を提供する。加えて、プリンリッチである、例えば、G残基のストレッチを含む核酸分子が選択されてもよい。これらの分子はCG対がリッチであるDNAデュプレックスと3重らせんを形成するであろう。この際、大部分のプリン残基は標的となるデュプレックスの1本鎖上に位置し、これによりトリプレックスの3本のストランドにGGCTリプレットが生じる。

【0277】

または、3重らせんの形成について標的とされうる潜在的な配列は、いわゆる「スイッチバック」核酸分子を作製することによって増加する。スイッチバック分子は、まずデュプレックスの一方のストランドと、次に他方と塩基対を形成するように、5'-3'、3'-5'を交互に合成され、デュプレックスの一方のストランドに存在するプリンまたはピリミジンを相当の大きさのストレッチにする必要性を排除する。

【0278】

本発明のアンチセンスRNA及びDNA、リボザイム、ならびに3重らせん分子は、上記したように、DNA及びRNA分子の合成に関する当該分野において既知のいずれかの方法によって調製される。これらとしては、例えば、固相ホルミアミダイト化学合成等の当該分野においてよく知られているオリゴデオキシリボヌクレオチド及びオリゴリボヌクレオチドを化学的に合成する技術がある。または、RNA分子を、アンチセンスRNA分子をコード化するDNA配列のインピトロ及びインピボの転写によって形成してもよい。このようなDNA配列は、T7またはSP6ポリメラーゼプロモーターなどの適当なRNAポリメラーゼプロモーターを含む広範なベクター中に取り込まれてもよい。または、使用されるプロモーターによって、RNAを構成によりまたは誘導により合成するアンチセンスcDNA構築物を細胞系に安定して導入してもよい。

【0279】

本発明はまた、目的とする状態の処置または予防を目的とする化合物の効能を同定または確認するために薬剤の発見に使用されるアッセイを提供するものである。テスト化合物は、これらの状態の一を有する被検者における本明細書で規定されるポリペプチドのレベルの調節能についてアッセイできる。このような一の状態若しくは複数の状態を有する被検者における本明細書で規定されるポリペプチドのレベルを、このような一の状態若しくは複数の状態を持たない被検者で見出されるレベルにまで調節するまたはこのような一の状態若しくは複数の状態の実験動物モデルで同様の変化をもたらすことができる化合物は、さらなる薬剤の発見のための先導化合物(lead compound)として使用できる、または治療のために使用できる。本明細書で規定されるポリペプチドの発現は、好ましい技術、免疫アッセイ、ゲル電気泳動、さらに視覚化、活性の検出、または本明細書で示唆される若しくは当業者に既知の他の方法によってアッセイされうる。このようなアッセイは、候補薬剤をスクリーニングするのに、臨床上のモニターにまたは薬剤の開発に使用でき、本明細書で規定されるポリペプチドの存在比が臨床的病気の代理マーカー(surrogate marker)として機能できる。

【0280】

様々な特定の実施態様においては、インビトロアッセイが患者の障害に関わる細胞型を代表する細胞を用いて行なわれ、化合物がこのような細胞型に所望の効果を有するかどうかを決定できる。

【0281】

治療に使用される化合物は、ヒトで試験される前に適当な動物モデル系で試験されてもよく、これらとしては、以下に制限されないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなどが挙げられる。インビボ試験では、ヒトに投与される前に、当該分野において既知のいずれかの動物モデル系が使用されてもよい。乳癌の動物モデルの例としては、以下に制限されないが、エストロゲンが枯渇した重篤な合併免疫不全(estrogen-deprived Severe Combined Immunodeficient) (SCID) マウスにおけるMDA - MB - 345 (Eccles et al., 1994 Cell Biophysics 24/25, 279)等のヒト乳癌細胞系の異種移植片が挙げられる。これらは、これらのモデルで示される病理が目的とする状態のものと同様であるため、本明細書で規定されるポリペプチドレベルを調節するテスト化合物を試験するのに利用できる。

【0282】

一実施態様において、本明細書で規定されるポリペプチドの発現を調節するテスト化合物は、BCMPを発現する、非ヒト動物(例えば、マウス、ラット、サル、ウサギ、及びモルモット)、好ましくは非ヒト動物モデルで同定される。この実施態様に従うと、テスト化合物またはコントロール化合物を動物に投与し、ポリペプチドの発現に関するテスト化合物の効果を測定する。本明細書で規定されるポリペプチドの発現を変更するテスト化合物は、テスト化合物で処置された動物または動物群におけるポリペプチド(またはこれをコード化するmRNA)のレベルをコントロール化合物で処置された動物または動物群におけるポリペプチドまたはmRNAのレベルと比較することによって同定されうる。当業者に既知の技術、例えば、in situハイブリダイゼーションを用いて、mRNA及びタンパク質レベルを測定できる。動物は、テスト化合物の効果をアッセイするために剖検されてもあるいはされなくてもよい。

【0283】

他の実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドまたはこの生物学的に活性のある部分の活性を調節するテスト化合物は、ポリペプチドを発現する、非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、サル、ウサギ、及びモルモット）、好ましくは乳癌に関する非ヒト動物モデルで同定される。この実施態様に従うと、テスト化合物またはコントロール化合物を動物に投与し、ポリペプチドの活性に関するテスト化合物の効果を測定する。ポリペプチドの活性を変更するテスト化合物は、コントロール化合物で処置された動物及びテスト化合物で処置された動物をアッセイすることによって同定できる。ポリペプチドの活性は、ポリペプチドの細胞2次メッセンジャーの誘導（例えば、細胞内 Ca^{2+} 、ジアシルグリセロール、IP3など）を検出する、ポリペプチドまたはその結合パートナーの触媒若しくは酵素活性を検出する、レポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼまたは緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein)等の、検出可能なマーカーをコード化する核酸に操作により連結されるポリペプチドに応答できる調節要素）の誘導を検出する、または細胞の応答（例えば、細胞の分化若しくは細胞の増殖）を検出することによって、評価できる。当業者に既知の技術がポリペプチドの活性の変化を検出するのに使用できる（例えば、米国特許第5,401,639号を参照、これは参考により本明細書に引用される）。

【0284】

さらなる他の実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドのレベルまたは発現を調節するテスト化合物が、状態の一を有するヒト被検者で同定される。この実施態様に従うと、テスト化合物またはコントロール化合物をヒト被検者に投与して、発現に関するテスト化合物の効果を、生体試料（例えば、CSF）中のポリペプチドまたはこれをコード化するmRNAの発現を分析することによって測定される。ポリペプチドの発現を変更するテスト化合物は、コントロール化合物で処置した被検者若しくは被検者群におけるポリペプチドまたはこれをコード化するmRNAのレベルをテスト化合物で処置した被検者若しくは被検者群におけるのと比較することによって同定できる。または、ポリペプチドの発現の変化は、テスト化合物の投与前後の被検者若しくは被検者群におけるポリペプチドまたはこれをコード化するmRNAのレベルを比較することによって同定

してもよい。当業者に既知の技術を用いて、生体試料を得、mRNAまたはタンパク質の発現を分析できる。例えば、本明細書に記載される好ましい技術を用いて、本明細書で規定されるポリペプチドのレベルの変化を評価できる。

【0285】

他の実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドの活性を調節するテスト化合物が、一状態または複数の状態を有するヒト被検者で同定される。この実施態様においては、テスト化合物またはコントロール化合物をヒト被検者に投与して、ポリペプチドの活性に関するテスト化合物の効果を測定する。ポリペプチドの活性を変更するテスト化合物は、コントロール化合物で処置した被検者からの生体試料をテスト化合物で処置した被検者からの試料と比較することによって同定できる。または、ポリペプチドの活性の変化は、テスト化合物の投与前後の被検者若しくは被検者群におけるポリペプチドの活性を比較することによって同定してもよい。ポリペプチドの活性は、生体試料（例えば、CSF）においてポリペプチドの細胞2次メッセンジャーの誘導（例えば、細胞内の Ca^{2+} 、ジアシルグリセロール、IP3など）、ポリペプチド若しくはその結合パートナーの触媒若しくは酵素活性、または細胞の応答、例えば、細胞の分化若しくは細胞の増殖を検出することによって評価できる。当業者に既知の技術を用いて、ポリペプチドの2次メッセンジャーの誘導の変化または細胞応答の変化を検出することができる。例えば、RT-PCRが、細胞2次メッセンジャーの誘導の変化を検出するのに使用できる。

【0286】

好ましい実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドのレベルまたは発現をコントロールの被検者（例えば、目的とする状態のないヒト）で検出されるレベルに変化させるテスト化合物は、さらなる試験または治療用途を目的として選択される。他の好ましい実施態様においては、本明細書で規定されるポリペプチドの活性をコントロールの被検者（例えば、このような状態のないヒト）で見出される活性に変化させるテスト化合物は、さらなる試験または治療用途を目的として選択される。

【0287】

他の実施態様においては、このような状態に関連する一以上の兆候の重篤度を減少するテスト化合物が、このような状態を有するヒト被検者で同定される。この実施態様に従うと、テスト化合物またはコントロール化合物を被検者に投与して、このような状態の一以上の兆候に関するテスト化合物の効果を測定する。一以上の兆候を抑制するテスト化合物は、コントロール化合物で処置された被検者をテスト化合物で処置された被検者と比較することによって同定できる。状態に精通している医師に既知の技術を用いて、テスト化合物が状態に関連する一以上の兆候を抑制するかどうかを決定できる。0

【0288】

本発明は、被検者に有効量の本発明の化合物を投与することを有する処置（および予防）方法を提供するものである。好ましい態様では、化合物は実質的に精製される（例えば、その効果を制限するまたは望ましくない副作用をもたらす物質を実質的に含まない）。被検者は、好ましくは哺乳動物であり、このような哺乳動物としては、以下に制限されないが、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物が挙げられ、最も好ましくはヒトである。特定の実施態様においては、非ヒト哺乳動物が被検者である。

【0289】

化合物が核酸を含む際に使用できる配合物及び投与方法は上記したとおりである；さらなる適当な配合物及び投与経路を以下に記載する。

【0290】

例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセルへの封入、化合物を発現できる組換え細胞、レセプターが介するエンドサイトーシス（例えば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照）、レトロウィルス若しくは他のベクターの一部としての核酸の構築など、様々なデリバリーシステムが知られており、本発明の化合物を投与するのに使用できる。導入方法は、経腸または非経口であってもよく、以下に制限されないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、及び経口経路が挙げられる。化合物は、簡便な経路によって、例えば、輸注若しくは大量注射によって、上皮若しくは粘膜皮膚の内層（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸粘膜など）を介した吸収によって投与されてもよく、他

の生物学的に活性のある薬剤と一緒に投与されてもよい。投与は、全身であってもまたは局所であってもよい。加えて、脳室内及び髄腔内注射等の、適当な経路によって中枢神経系に本発明の薬剤組成物を導入することが望ましい；脳室内注射は、例えば、オマヤレザバー等の、レザバーに付けられた脳室内カテーテルによって容易に行なわれる。肺への投与もまた、吸入器またはネブライザーの使用、ならびにエアゾール剤(aerosolizing agent)による配合によって使用できる。

【0291】

特定の実施態様においては、処置の必要のある領域に局所的に本発明の薬剤組成物を投与することが望ましい；これは、例えば、以下に制限されるものではないが、外科手術中の局所注入、例えば、外科手術後の創傷被覆材と組み合わせた、局所適用によって、注射によって、カテーテルによって、坐剤によって、またはインプラントによって、達成されてもよい。この際、インプラントはシアラストリック膜(sialastic membrane)等の膜などの、多孔質、非多孔質、またはゲル状材料、または繊維からなる。

【0292】

他の実施態様においては、化合物は、ベシクル、特にリポソームにデリバリーされてもよい(Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327を参照；一般的に同書を参照)。

【0293】

さらなる他の実施態様においては、化合物は、制御放出系でデリバリーされてもよい。一実施態様においては、ポンプが使用されてもよい(Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照)。他の実施態様においては、ポリマー材料が使用されてもよい(Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger

and Peppas, J., 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; see also Levy et al., 1985, *Science* 228:190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105を参照)。さらなる他の実施態様においては、制御放出系を、治療のターゲットの付近に配置して、これにより全身系の投与量の一部のみを必要としてもよい(例えば、Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)を参照)。

【0294】

他の制御放出系は、Langer(1990, *Science* 249:1527-1533)によるレビューに記載される。

【0295】

本発明の化合物がタンパク質をコード化する核酸である特定の実施態様においては、核酸は、例えば、レトロウィルスベクター(米国特許第4,980,286号を参照)の使用によって、または直接注射によって、または微粒子の衝撃(microparticle bombardment)(例えば、遺伝子ガン; Biolistic, Dupont)の使用によって、または脂質若しくは細胞表面レセプター若しくはトランスフェクション剤(transfecting agent)で被覆することによって、または核に入ることが知られるホメオボックス様ペプチドに連結された核酸を投与する(例えば、Joliot et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868を参照)ことなどによって、適当な核酸の発現ベクターの一部としてこれを構築し、細胞内になるように投与することによって、インビボで投与されてそのコード化されたタンパク質の発現を促進することができる。または、核酸を、相同組換えによって、細胞内に導入して、発現用の宿主細胞DNA内に取り込んでもよい。

【0296】

本発明はまた、薬剤組成物を提供するものである。このような組成物は、本発明の概念に含まれゆえに少なくとも一の化合物を含む活性剤を治療上有効な量、及び製薬上許容できる担体を含む。特定の実施態様において、「製薬上許容できる」ということばは、連邦若しくは州政府の調節局(regulatory agency)によって認可されるまたは米国薬局方若しくは動物、より特にヒトで使用される他の通

常認識される薬局方に列挙されることを意味する。「担体」ということばは、これと共に治療剤が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはベヒクルを意味する。このような医薬品担体(pharmaceutical carrier)は、水及びピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油等の石油、動物、植物または合成由来のものなどの油などの、滅菌液体であってもよい。水は、薬剤組成物を静脈内に投与する際に好ましい担体である。生理食塩水ならびにデキストロース及びグリセロール水溶液もまた、特に注射溶液用の、液状担体として使用できる。適当な医薬品賦形剤(pharmaceutical excipient)としては、デンプン、グルコース、ラクトース、シヨ糖、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物は、必要であれば、少量の湿潤若しくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含んでもよい。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、ピル、カプセル、粉末、徐放性配合物などの形態をとりうる。組成物は、通常の場合の結合剤やトリグリセリド等の担体と共に、坐剤として配合されてもよい。経口用の配合物としては、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含んでもよい。適当な医薬品担体の例は、E.W. Martinによる"Remington's Pharmaceutical Sciences"に記載される。このような組成物は、患者への適当な投与形態を提供できるように適当な量の担体と共に、好ましくは精製形態の、治療上有効な量の化合物を含むであろう。配合物は、投与の形態に適合するものでなければならない。

【0297】

好ましい実施態様においては、組成物は、ヒトへの静脈内投与に適する薬剤組成物として定常的な方法に従って配合される。具体的には、静脈内投与用の組成物は、滅菌等張緩衝水溶液における溶液である。必要であれば、組成物はまた、可溶化剤及び注射部位での痛みを和らげるためにリドカインなどの局所麻酔剤を含んでもよい。通常、成分は、例えば、活性物質の量を示すアンプルまたはサッシュ等の密閉容器における乾燥凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として、

単位投与形態(unit dosage form)で別々にまたは一緒に混合して供給される。組成物を輸注によって投与しようとする際には、滅菌された医薬品グレードの水または生理食塩水を含む輸液ボトルで調剤されてもよい。組成物を注射によって投与する際には、注射用の滅菌水または生理食塩水のアンプルを、成分を投与前に混合するように提供してもよい。

【0298】

本発明の化合物は、中和または塩の形態として配合できる。製薬上許容できる塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等由来のものなどの遊離アミノ基で形成されたもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第2鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等由来のものなどの遊離カルボキシル基で形成されたものが挙げられる。

【0299】

目的とする状態の処置に有効であろう本発明の化合物の量は、標準的な臨床技術によって決定できる。加えて、インビボアッセイを、必要であれば、最適な投与量範囲の見極めるのを助けるのに使用してもよい。また、配合物中に使用される正確な投与量は、投与経路、及び病気または障害の重篤度によって異なるであろうし、開業医の判断や各患者の状況に従って決定されるべきである。しかしながら、静脈内投与に関する適当な投与量の範囲は、通常、体重1kg当たり約20~500 μ gの活性化合物である。鼻腔内投与に関する適当な投与量の範囲は、通常、約0.01pg/kg体重から約1mg/kg体重である。有効な投与量はインビトロまたは動物モデル試験系から引き出される用量反応曲線から外挿されてもよい。

【0300】

坐剤は、通常、0.5重量%~10重量%の範囲の活性成分を含む；経口用配合物は、10%~95%の活性成分を含むことが好ましい。

【0301】

本発明はまた、本発明の薬剤組成物の一以上の成分で充填された一以上の容器を有する医薬品パック(pharmaceutical pack)またはキットを提供するものであ

る。必要であれば、このような容器に、医薬または生物学的な製品の製造、使用または販売を規制する政府の局(governmental agency)によって定められた形態の注意書きをつけてもよい。この注意書きは、(a)ヒトへの投与に関する製造、使用または販売の局による認可、(b)使用に関する説明書、または両方を反映するものである。

【0302】

本発明の各態様の好ましい特徴は、必要であれば変更を加えて(mutatis mutandis)他の態様のそれぞれと同様である。本明細書で記載される従来技術の文献は、法律によって認められる最大で引用される。

【0303】

実施例1：DPI-6は、神経精神及び神経障害で異なって発現する

神経精神及び神経障害に係るタンパク質の3種の異なる研究を、(特にここに記載される好ましいプロトコルを参照しながら完全に本明細書に引用される、米国特許第6,064,754号に記載される自動化技術を用いて)2次元ゲル電気泳動法を質量分析と組み合わせて行なった：双極性障害(Bipolar Affective Disorder)(BAD、係属特許出願第 _____号により詳細に記載される)、精神分裂病(係属特許出願第 _____号により詳細に記載される)、及び脈管性痴呆(Vascular Dementia)(係属特許出願第 _____号により詳細に記載される)。

【0304】

簡潔にいうと、上記方法を用いて、BADを有する5人の被検者(それぞれ(resp.)精神分裂病を有する5人の被検者、それぞれ(resp.)脈管性痴呆を有する5人の被検者)およびBADに関する5人の同様のコントロール被検者(それぞれ(resp.)精神分裂病に関する5人の同様のコントロール被検者、それぞれ(resp.)脈管性痴呆に関する5人の同様のコントロール被検者)からのCSFサンプルにおけるタンパク質を、等電点電気泳動さらにはSDS-PAGEによって分離し、分析した。ゲルを染色し、デジタルにより画像に写し、処理した。図1は、BAD研究で使用された正常なCSFの2次元電気泳動から得られた画像であり、これは、CSF1~CSF12で称される、12個のランドマーク特徴を同定できるように注釈されている。ランドマークによる同定を用いて、画像に検出され

る特徴の p I および MW を測定した。続いて、同様の研究からのゲルをクロスマッチして、統計学的な分析を行ない、ゲルの各特長に関する倍数変化 (fold change) を測定した。

【0305】

3種の神経精神及び神経障害における D P I - 6 の示差研究 (differential study) 結果を表 1 に示す。

【0306】

【表 1】

表 1 : 各神経状態における D P I - 6 に相当するゲル特徴の p I、MW 及び倍数変化による特徴付け

表 I : 各神経状態における D P I - 6 に相当するゲル特徴の p I、MW 及び倍数変化による特徴付け

病気	特徴番号	倍数変化	p I	MW (Da)
うつ病	DF-18	-13.03	4.29	62182
うつ病	DF-172	-17.63	4.29	53154
うつ病	DF-188	-4.27	4.31	63376
脈管性痴呆	VF-106	14.22	3.96	60192
精神分裂病	SF-20	-7.51	4.25	64918
精神分裂病	SF-230	2.86	4.31	63376
精神分裂病	SF-448	2.12	4.34	10961

【0307】

実施例 2 : うつ病研究における D P I - 6 の単離および特徴付け

2Dゲルからロボットで切り出した (robotically excised) タンパク質を、トリプシンで消化し、脱離用に 337 nm 波長および分析のレフレクトロン形式 (reflectron mode) を用いた MALDI - TOF - MS (Voyager STR, Applied Biosystems) によって分析した。D P I - 6 に関する一の選択された質量スペクトル ($[M + H] = 1155.61$) をさらに、ナノスプレーイオン源 (nanospray i

on source)(Micromass UK Ltd.)を備えたQTOF-MSを用いてタンデム質量分析(tandem mass spectrometry)によって特徴付けた。MALDI分析前に、サンプルを脱塩し、C18 Zip Tips™(Millipore)を用いて濃縮した。タンデムMSからのサンプルを、C18 SPE材料を含むナノLCシステム(nano LC system)(LC Packings)を用いて精製した。SEQUESTサーチプログラム(SEQUEST search program) (Eng et al., 1994, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5:976-989)、バージョンv. C. 1. を用いて、データベース同定に関する基準としては下記がある：トリプシンの切断特異性；データベースから戻されるペプチドにおけるa、b及びyイオンの1セットの検出、およびカルバミドメチル化を説明するすべてのCys残基に関する質量の増加)、トリプシン消化ペプチドの解明されないタンデム質量スペクトルを、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>でアクセスできるNational Centre for Biotechnology Information (NCBI) が有する非二重化(non-redundant)データベースにおけるタンパク質エントリーから構成される公的なドメインタンパク質のデータベースに対して検索した。データベース検索の結果、DPI-6のトリプシン消化ペプチドの下記アミノ酸配列が、「AF177396、ホモサピエンスdickkopf-3 (Homo sapiens dickkopf-3) (DKK-3) mRNA、完全cds」におけるトリプシン消化ペプチドとの適合から決定された：DQDGEILLPR。

【0308】

精神分裂病及び脈管性痴呆研究に存在するゲルの特徴に関して同様の分析を行ったところ、これらのうち、上記実施例1で記述したVF-106、SF-230及びSF-20が同定された。

【0309】

実施例3：CSFプロテオーム(proteome)におけるDPI-6の17種のイソ型の同定

精神分裂病で検出されたDPI-6の2種のイソ型(実施例1)から、翻訳後修飾が実施例1に記載される2Dゲル技術によって検出される際にDPI-6の様々な異なる形態に反応可能であることが示唆される。

【0310】

実施例1に記載される3種の神経変性疾患(neurodegenerative disease)研究から構成されるCSFプロテオーム(proteome)データベースで行なわれたDPI-6のイソ型に関する検索から、同じdickkopf-3 mRNAに属する17種の別のタンパク質イソ型が同定された(表2)。

【0311】

これらのイソ型のうち12種を、代表的なCSF 2Dゲルで図2に示す。

【0312】

【表2】

表2：3種の別の神経変性疾患研究において
特徴付けられたDPI-6の異なるイソ型

イソ型番号	p I	MW (Da)
1	3.96	60192
2	4.08	60926
3	4.09	65957
4	4.15	60009
5	4.18	60742
6	4.25	65205
7	4.28	63825
8	4.29	53154
9	4.30	60192
10	4.31	56560
11	4.37	59828
12	4.37	63192
13	4.41	62004
14	4.43	53154
15	4.43	58927
16	4.45	62028
17	4.45	63184
18	4.34	10961
17	4.45	63184

【0313】

実施例4：DPI-6の翻訳後修飾の同定

上記で同定されたDPI-6タンパク質イソ型（実施例3）はすべて、より高い分子量及び初期遺伝子配列から予想されるものとは異なるpIを有する（38291Daの推定分子量及び4.55の理論pI）。

【0314】

Krupnik et al. (Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering T

W, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K, Chang B, Duong T, Goddard AD, Gearing DP, Sokol SY, McCarthy SA, Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family, *Gene* 1999 Oct 1 238:2 301-13)によって報告されるように、ヒト Dkk-3 における4個の推定上のN-連結グリコシル化部位が、ニワトリ及びマウスの Dkk-3 では保存されるが、他の Dkk 群のものでは保存されない。ヒト胚腎臓 293T 細胞 (human embryonic kidney 293T cells) で発現するフラグエピトープ-標識 Dkk-3 (flag epitope-tagged Dkk-3) は、45 ~ 65 kDa の異種バンドとして泳動する：N-グルカナーゼ処理後では、45 ~ 65 kDa 及び 40 kDa の2種の形態が代わりに現れる (Krupnik et al. 1999)。

【0315】

2Dゲル電気泳動によって単離された D P I - 6 由来のトリプシンペプチドを、PerSeptive Biosystems Voyager-DE™ STR Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) 質量分析計を用いた質量分析によって分析した。MALDI-TOF で同定された一連の分子量は、N-グリコシル化共通配列及びこれの相当するグリカン構造を有する下記 D P I - 6 ペプチドに一致した (Keiser N., Venkataraman G., Shriver Z. and Sasisekharan R.: Direct isolation and sequencing of specific protein-binding glycosaminoglycans, *Nature Medicine*, 2001, 7 (1), 123-8; Papac DI, Briggs JB, Chin ET, and Jones AJ: A high-throughput microscale method to release N-linked oligosaccharides from glycoproteins for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis, *Glycobiology*, 1998, 8 (5), 445-54) :

a) 観察された MALDI 分子量 : 3228 Da

この分子量は、104番目のアミノ酸及び113番目のアミノ酸間のトリプシンペプチドによるものである：VGNNTIHVHR - ペプチド配列による分子量 : 1147 Da。

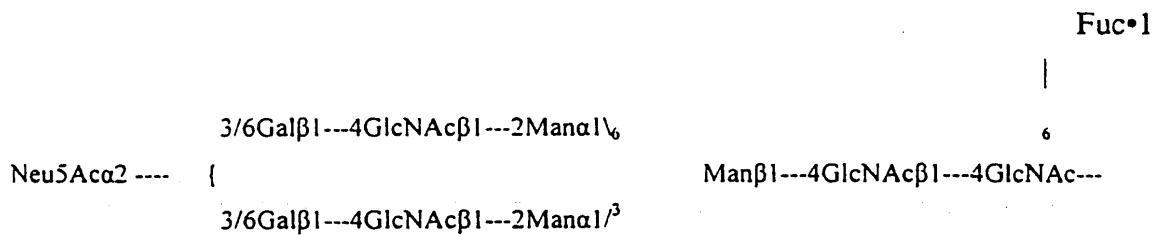
【0316】

ヒト CSF D P I - 6 タンパク質のこのペプチドにマッチするグリカン構造

は、1シアリル化、ガラクトシル化された2触角(mono-sialylated-, galactosylated biantennary)であった - 分子量：2082 Da (質量分析条件下でのペプチドとの反応 (H₂Oの損失分、-18 Da) 及びナトリウムイオンの付加 (+23 Da) 後)。

【0317】

【化1】



【0318】

この構造に関する参考文献は、製品番号C - 124301の、Online Catalog of GlyKo (<http://www.glyko.com/>)から見出せる。さらに、このグリカンは数多くのヒトタンパク質で従来同定されており、例えば：

- ・ alpha-FETOPROTEIN (swiss-prot entry P02771)に結合；アミノ酸ASN - 251、グリコシダーゼ処理、レクチン認識、及びメチル化分析によって同定される(Yamashita K, Taketa K, Nishi S, Fukushima K, Ohkura T, Sugar chains of human cord serum alpha-fetoprotein: characteristics of N-linked sugar chains of glycoproteins produced in human liver and hepatocellular carcinomas, Cancer Res 1993 Jul 1;53(13):2970-5)。

【0319】

- ・ LACTOTRANSFERRIN (swiss-prot entry P02788)に結合、脱アミノ化分析、グリコシダーゼ処理、メチル化分析、単糖分析、プロトンNMRによって同定される(Spik G, Strecker G, Fournet B, Bouquelet S, Montreuil J, Dorland L, van Halbeek H, Vliegthart JF, Primary structure of the glycans from human lactotransferrin, Eur J Biochem 1982 Jan;121(2):413-9)。

【0320】

このリストは、GlycoSuiteDB website (<http://www.glycosuite.com/>)での検

索として徹底的なものではなく (non-exhaustive)、グリカンが下記ヒトタンパク質に結合して同定されることが明らかになった：免疫グロブリンガンマ、メタロプロテイナーゼ阻害剤 I (swiss-prot entry p01033)、胆汁酸塩 - 活性化リパーゼ (swiss-prot entry p19835)、t 細胞表面グリコプロテイン cd 4 (t-cell surface glycoprotein cd4) (swiss-prot entry p01730)、凝固第 X 因子 (swiss-prot entry p00742)、エリトロポエチン (swiss-prot entry p01588)、組織プラスミノゲン活性化因子 (swiss-prot entry p00750)、ウロモデュリン (uromodulin) (swiss-prot entry p07911)、グリコデルリン - a (glycodelin-a) (swiss-prot entry p09466)、プロスミノゲン (swiss-prot entry p00747)、インテグリン アルファ - 5 / ベータ - 1 (integrin alpha-5/beta-1) (swiss-prot entry p08648)、cd 59 グリコプロテイン (cd59 glycoprotein) (swiss-prot entry p13987)、凝固第 V I I I 因子 (swiss-prot entry p00451)、及び間質性コラゲナーゼ (interstitial collagenase) (swiss-prot entry p03956)。

【0321】

b) 観察された MALDI 分子量：3101 Da

この分子量は、202番目のアミノ酸及び212番目のアミノ酸間のトリプシンペプチドによるものである。

【0322】

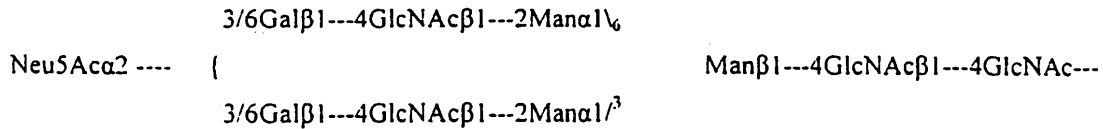
GSNGTICDNQR - ペプチド配列による分子量：1165 Da。

【0323】

ヒト CSF DPI - 6 タンパク質のこのペプチドにマッチするグリカン構造は、1シアル化、ガラクトシル化された2触角 (mono-sialylated-, galactosylated biantennary) であった - 分子量：1937 Da (質量分析条件下でのペプチドとの反応 (H₂Oの損失分、-18 Da) 及びナトリウムイオンの付加 (+23 Da) 後)。

【0324】

【化2】



【0325】

この構造に関する参考文献は、製品番号 C - 1 2 4 3 0 0 の、Online Catalog of GlyKo (<http://www.glyko.com/>)から見出せる。さらに、このグリカンは数多くのヒトタンパク質で従来同定されており、例えば：

・VITRONECTIN (swiss-prot entry P04004)に結合する、2 D - H P L C - C F 標準、グリコシダーゼ処理によって同定される(Ogawa H, Yoneda A, Seno N, Hayashi M, Ishizuka I, Hase S, Matsumoto I, Structures of the N-linked oligosaccharides on human plasma vitronectin, Eur J Biochem 1995 Jun 15;230(3):994-1000)。

【0326】

・胆汁酸塩 - 活性化リパーゼ(bile-salt-activated LIPASE)(swiss-prot entry P19835)に結合する；アミノ酸 A S N - 2 0 7、フラグメント化、グリコシダーゼ処理、M A L D I - T O F M S によって同定される(Nakagawa H, Kawamura Y, Kato K, Shimada I, Arata Y, Takahashi N, Identification of neutral and sialyl N-linked oligosaccharide structures from human serum glycoproteins using three kinds of high-performance liquid chromatography, Anal Biochem 1995 Mar 20;226(1):130-8)。

【0327】

このリストは、GlycoSuiteDB website (<http://www.glycosuite.com/>)での検索として徹底的なものではなく(non-exhaustive)、グリカンは下記ヒトタンパク質に結合して同定されることが明らかになった： - フェトプロテイン(swiss-prot entry P02771)、ラクトトランスフェリン(swiss-prot entry P02788)、免疫グロブリンガンマ、t細胞表面グリコプロテイン c d 4 (swiss-prot entry P01730)、凝固第X因子(swiss-prot entry P00742)、グリコプロテインホルモン鎖 - ルトロピン(glycoprotein hormones alpha chain - lutropin)(swiss-prot entry P01215)、ウロモデュリン(swiss-prot entry P07911)、グリコデリン - a (s

wiss-prot entry P09466)、プラスミノゲン(swiss-prot entry P06868)、プラスミノゲン(swiss-prot entry P00747)、インテグリン アルファ - 5 / ベータ - 1 (swiss-prot entry P08648)、フォリトロピン 及び 鎖(swiss-prot entry P01225 and P01215)、ロドブシン(swiss-prot entry P08100)、c d 5 9 グリコプロテイン(cd59 glycoprotein)(swiss-prot entry P13987)、及びルトロピン鎖(swiss-prot entry P01229)。

【 0 3 2 8 】

実施例 5 : 神経精神または神経障害の診断及び処置

下記実施例は、神経精神若しくは神経疾患のスクリーニング若しくは診断、神経精神若しくは神経疾患を有する被検者の予後の決定、または神経精神若しくは神経障害疾患の有効性のモニターを目的とする本発明の D P I - 6 の使用を詳細に説明するものである。下記実施例はまた、神経精神または神経疾患を処置または予防するための本発明の D P I - 6 の調節剤 (例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト) の使用を詳細に説明するものである。

【 0 3 2 9 】

D P I - 6 は、3 8 2 9 1 D a の推定分子量及び 4 . 5 5 の理論 p I 及び 5 3 1 5 4 D a ~ 6 5 9 5 7 D a の C S F イソ型の実測分子量及び 3 . 9 6 ~ 4 . 4 5 の実測 p I を有する分泌性の 3 5 0 アミノ酸長の糖タンパク質である。W n t タンパク質は細胞表面としっかり会合することが知られている(Smolich BD, McMahon JA, McMahon AP, Papkoff J, Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface, Mol Biol Cell 1993 Dec 4:12 1267-75)ので、D k k のカルボキシ末端ドメインでの、特に第二のシステインリッチなドメイン (C y s - 2) でのコリパーゼのひだ(colipase fold)が、W n t 機能を調節するために、D k k タンパク質を脂質及びさらにはW n t タンパク質と相互作用させることができる(Aravind L, Koonin EV, A colipase fold in the carboxy-terminal domain of the Wnt antagonists--the Dickkopfs, Curr Biol 1998 Jul 2 8:14 R477-8)。

【 0 3 3 0 】

それぞれ、6 3 3 7 6 D a の分子量及び 4 . 3 1 の p I、6 0 1 9 2 D a 及び

3.96のpI、62182Da及び4.29のpIならびに64918及び4.25を有するDPI-6の4種のイソ型の発現は、精神分裂病、脈管性痴呆及びうつ病等の神経精神または神経疾患を有する被検者の髄液(cerebrospinal fluid)(CSF)では、神経精神または神経疾患のない被検者のCSFと比較すると、有意に異なって発現することがここで示された。ゆえに、CSFにおけるDPI-6の定量的な検出は、神経精神若しくは神経疾患を診断するのに、神経精神若しくは神経疾患の進行を決定するのにまたは神経精神若しくは神経疾患の治療の有効性をモニターするのに使用できる。

【0331】

本発明の一実施態様においては、DPI-6の発現、活性または発現及び活性の双方を調節する(即ち、アップレギュレートするまたはダウンレギュレートする)化合物は、神経精神または神経疾患の処置が必要である被検者にまたはこのような疾患の予防を目的として被検者に投与される。DPI-6の発現、活性または発現及び活性の双方を調節する抗体は、この目的に適する。加えて、DPI-6のすべて若しくは一部をコードする核酸、またはDPI-6のすべて若しくは一部と相補的である核酸が投与されてもよい。DPI-6、またはDPI-6ポリペプチドの断片がまた投与されてもよい。

【0332】

本発明はまた、DPI-6の発現またはDPI-6の活性を調節するさらなる化合物を同定するためのスクリーニングアッセイを提供するものである。インビトロでDPI-6の発現を調節する化合物は、テスト化合物で処置された細胞におけるDPI-6の発現をコントロール化合物(例えば、生理食塩水)で処置された細胞におけるDPI-6の発現と比較することによって同定されうる。DPI-6の発現の検出方法は、当該分野において既知であり、(例えば、ノーザンブロット分析またはRT-PCRによって)DPI-6 RNAのレベルを測定する、および(例えば、イムノアッセイまたはウェスタンブロット分析によって)DPI-6タンパク質を測定することを含む。DPI-6の活性を調節する化合物は、Frizzled活性化の遮断能等の、テスト化合物のDPI-6の機能の作動(agonize)または拮抗(antagonize)能、活性またはFrizzledレ

セプターへのWntの結合性、Dishevelledの活性化、GSK-3のリン酸化、Wnt調節遺伝子の発現の変化を、コントロール化合物(例えば、生理食塩水)のDPI-6の同じ機能の阻害能と比較することによって同定できる。WntへのDPI-6の結合性、またはFrizzledレセプターへのWntまたはDPI-6活性を調節することができる化合物は、神経精神または神経疾患の処置に有用な化合物としてのさらなる開発に適する化合物として同定される。

【0333】

WntレセプターであるFrizzledの、DPI-6及びその結合パートナーであるWnt間の結合性は、例えば、DPI-6をWntを発現することが知られている細胞およびまたはFrizzledレセプターと接触させて、DPI-6及び細胞表面レセプターのWnt間の結合の程度をアッセイすることによって、または細胞を用いないアッセイ、即ち、DPI-6及びWntおよびまたはFrizzledレセプターが単離され、好ましくは組換えにより製造されるアッセイにおいてDPI-6をそのレセプターと接触させて、DPI-6及びWntおよびまたはFrizzledレセプター間の結合の程度をアッセイすることによって、測定できる。このようなアッセイを用いることにより、候補化合物について、DPI-6のそのWntおよびまたはFrizzledレセプターへの結合性の作動または拮抗能を試験してもよい。

【0334】

DPI-6の発現または活性に影響を及ぼすインビトロで同定された化合物は、その治療効果を決定するために、神経精神または神経疾患の動物モデルで、または神経精神または神経疾患を有する被検者で、インビボで試験されてもよい。

【0335】

さらに、成熟DKK-3タンパク質は、これらの細胞系での培地で以外では検出されなかった{ヒト胚腎臓293T細胞(human embryonic kidney 293T cells)}で発現するフラグエピトープ-標識Dkk-3(flag epitope-tagged Dkk-3)は、45~65kDaの異種バンドとして泳動する：N-グルカナーゼ処理後では、45~65kDa及び40kDaの2種の形態が代わりに現れる(Krupnik et

al. 1999) ; D k k - 3 mRNAは、脳及び心臓で非常に発現し、脾臓、腎臓、肝臓、小腸、胎盤及び肺では低レベルが検出できる(Tsuji T, Miyazaki M, Sakaguchi M, Inoue Y, Namba M, A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines, Biochem Biophys Res Commun 2000 Feb 5 268:1 20-4)。マウスのD k k - 3 mRNAは、皮質及び海馬のニューロンで発現する(Krupnik et al., supra) }。したがって、ヒトCSFにおけるDKK - 3の検出は、明らかに成人ヒトCNSコンパートメントにおける第一の記載であると考えられる。

【0336】

要約：

幾つかの論拠から、神経精神または神経障害におけるマーカーおよび/または治療ターゲットとしてのこのタンパク質の重要な役割が示唆される：

- ・アルツハイマー病：Wnt経路は、GSK3、プレセニリン(Presenilin)及び恐らくまた -シクレーターゼ(g-secretase)を介したTauリン酸化に関連しているかもしれない。

【0337】

- ・うつ病：リチウム、うつ病の処置の主要な治療剤が、Wntシグナル伝達経路内でGSK、中枢成分(central component)を標的とする。

【0338】

- ・精神分裂病：Dishevelled遺伝子が精神分裂病の表現型に関わりがある。

【0339】

- ・脈管性痴呆：Wnt経路がニューロン細胞の死に関連しているかもしれない。

【0340】

前記に加えて様々な公報が本明細書中に挙げられ、これらの開示は参考により完全に本明細書に引用される。本明細書における引用文献の列挙は、このような引用文献が本発明に対する従来技術として利用されると認めることと見なすべきではない。

【0341】

本発明を特定の実施態様、様々な特定の材料、方法及び実施例を参照することによって本明細書において記載及び説明してきたが、本発明は材料の特定の材料の組み合わせ、及び上記を目的として選択される方法に限定されないと理解される。本明細書に記載されるものに加えて本発明の様々な修飾が前記説明及び添付図面から当業者には明らかになるであろう。このような修飾は添付の特許請求の範囲の概念に含まれるものである。

【0342】

さらに、核酸またはポリペプチドに関して示される、すべての塩基の大きさまたはアミノ酸の大きさ、及びすべての分子量または分子質量値は概算であり、説明のために提供されると理解される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

N C B Iデータベースに記載され、受託番号A A F 0 2 6 7 6によって同定される、ヒトD K K - 3のアミノ酸配列を示すものである。

【図2】

受託番号A F 1 7 7 3 9 6でN C B Iに提示される、ヒトD K K - 3の相当するm R N A及び完全なC D Sを示すものである。

【図3】

図1に記載されるD K K - 3のアミノ酸配列からトリプシン消化ペプチドとの一致で比較することから決定されたD P I - 6のトリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列を表わすものである。

【図4】

C S F 1 ~ C S F 1 2で称される、12個のランドマーク特徴を同定できるように注釈された正常なC S Fの2次元電気泳動から得られた画像である。

【図5】

12個のD P I - 6 イソ型を示す、図4のものと同様の2次元ゲル画像である。

。

【図1】

オリジン

```

1 mqrllgatllc lllaaavpta papaptatsa pvkpgpalsy pqueatlnem freveelmed
61 tqhklrsave emeaeaaaak assevnlanl ppsyhnetnt dtkvgnntih vhrefhkitn
121 nqtgqmvfse tvitsvgdee grrsheciid edcgpsmycq fasfqtccq crgqrmcltr
181 dseccgdqlc vwghctkmat rgsngticdn qrdcqpglcc afqrgllfpv ctplpvegel
241 chdpasrild litwelepdg aldrpcasg llcqphshsl vyvckptfvg srdqdgeill
301 prevpdeyev gsfmevrqe ledlerslte emalgepaaa aaallggee

```

//

【図2】

塩基数

オリジン

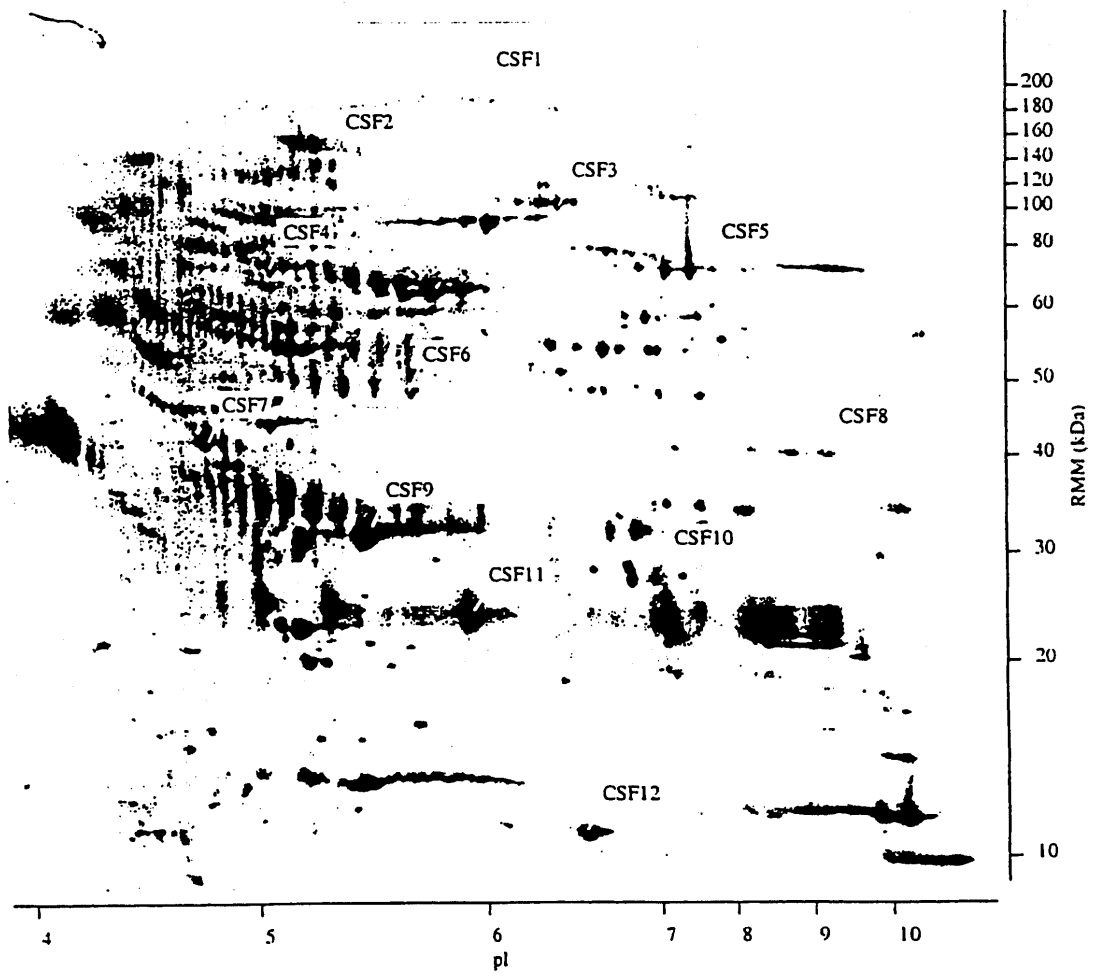
	625 a	618 c	668 g	567 t	1 others	
1	ggcacgaggg	ggcggcggt	gcgggcgag	agcggagatg	cagcggcttg	gggccaccct
61	gctgtgcctg	ctgctggcgg	cgccggctcc	cacggccccc	gcccgcgctc	cgacggcgac
121	ctcggctcca	gtcaagccc	gcccggctct	cagctacccg	caggaggagg	ccaccctcaa
181	tgagatgttc	cgcgaggttg	aggaactgat	ggaggacacg	cagcacaagt	tgcgcagcgc
241	ggtggaagag	atggaggcag	aagaagctgc	tgctaaagca	tcatcagaag	tgaacctggc
301	aaacttacct	cccagctatc	acaatgagac	caacacagac	acgaagggtg	gaaataatac
361	catccatgtg	caccgagaaa	ttcacaagat	aaccaacaac	cagactggac	aaatggtctt
421	ttcagagaca	gttatcacat	ctgtgggaga	cgaagaaggc	agaaggagcc	acgagtgcac
481	catcgacgag	gactgtgggc	ccagcatgta	ctgccagttt	gccagcttcc	agtacacctg
541	ccagccatgc	cggggccaga	ggatgctctg	caccggggac	agtgagtgtc	gtggagacca
601	gctgtgtgtc	tgggtcact	gcacaaaat	ggccaccagg	ggcagcaatg	ggaccatctg
661	tgacaaccag	aggactgcc	agccggggct	gtgctgtgcc	ttccagagag	gctgtctgtt
721	ccctgtgtgc	acaccctgc	ccgtggagg	cgagctttgc	catgaccccc	ccagccggct
781	tctggacctc	atcacctggg	agctagagcc	tgatggagcc	ttggaccgat	gcccttgtgc
841	cagtggcctc	ctctgccagc	cccacagcca	cagcctggtg	tatgtgtgca	accgacctt
901	cgtggggagc	cgtgaccaag	atggggagat	cctgctgccc	agagaggccc	ccgatgagta
961	tgaagtggc	agctcatg	aggaggtg	ccaggagctg	gaggacctgg	agaggagcct
1021	gactgaagag	atggcgctgg	gggagcctgc	ggctgccgcc	gctgcactgc	tgggagggga
1081	agagatttag	atctggacca	ggctgtgggt	agatgtgcaa	tagaaatagc	taatttattt
1141	ccccangtgt	gtgctttaag	cgtgggctga	ccaggcttct	tcctacatct	tcttccagct
1201	aagtttcccc	tctggcttga	cagcatgagg	tgttgtgcat	ttgttcagct	ccccaggct
1261	gttctccagg	cttcacagtc	tgggtgcttg	gagagtcagg	cagggttaaa	ctgcaggagc
1321	agtttgccac	ccctgtccag	attattggct	gctttgcctc	taccagttgg	cagacagccg
1381	tttgttctac	atggcttga	taattgtttg	aggggaggag	atggaaacaa	tgtggagtct
1441	ccctctgatt	ggttttgggg	aaatgtggag	aagagtgcc	tgctttgcaa	acatcaacct
1501	ggcaaaaatg	caacaaatga	atthtccacg	cagttctttc	catgggcata	ggtaagctgt
1561	gccttcagct	gttcagatg	aaatgttctg	ttcacctgc	attacatgtg	ttattcatc
1621	cagcagtggt	gtcagctcc	tacctctgtg	ccagggcagc	atthtcatat	ccaagatcaa
1681	ttccctctct	cagcacagcc	tggggagggg	gtcattgttc	tcctctgcca	tcagggattt
1741	cagaggctca	gagactgcaa	gctgcttggc	caagtacac	agctagtga	gaccagagca
1801	gtttcatctg	gttgtagctc	taagctcagt	gctctctcca	ctaccccaca	ccagccttgg
1861	tgccacaaa	agtgtcctcc	aaaaggagg	agaatgggat	ttttcttttg	aggcatgac
1921	atctggaatt	aaggtaaac	taattctcac	atccctctaa	aagtaacta	ctgttaggaa
1981	cagcagtggt	ctcacagtg	ggggcagccg	tccttctaat	gaagacaatg	atattgacac
2041	tgtccctctt	tggcagttgc	attagtaact	ttgaaaggta	tatgactgag	cgtagcatac
2101	aggttaacct	gcagaaacag	tacttaggta	attgtagggc	gaggattata	aatgaaattt
2161	gcaaaatcac	ttagcagcaa	ctgaagacaa	ttatcaacca	cgtggagaaa	atcaaaccca
2221	gcagggtctg	gtgaaacatg	gttgtaatat	gcgactgcga	acactgaact	ctacgccact
2281	ccacaaatga	tgttttcagg	tgtcatggac	tgttgccacc	atgtattcat	ccagagttct
2341	taaagtttaa	agttgcacat	gattgtataa	gcatgctttc	tttgagtttt	aaattatgta
2401	taaacataag	ttgcatttag	aaatcaagca	taaatcactt	caactgctaa	aaaaaaaaaa
2461	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa				

//

【図3】

DQDGEILLPR

【図4】



【図5】



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/IB 01/00259

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 G01N33/68 G01N33/574 A61P25/00 A61K38/17		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EP0-Internal, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, EMBL, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 98 46755 A (MCCARTHY SEAN A ;MILLENNIUM BIOTHERAPEUTICS INC (US)) 22 October 1998 (1998-10-22) abstract claims 8-22	11,12 1-10,14
X A	WO 98 27932 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;RUBEN STEVEN M (US); SOPPET DANIEL R (U)) 2 July 1998 (1998-07-02) page 25 -page 27, line 10	11 1-10,14
X A	WO 99 22000 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH ;GLINKA ANDREI (DE); NIEHRS CHRISTOF (DE)) 6 May 1999 (1999-05-06) claims 3,4,10	11 1-10,14

	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 December 2001		Date of mailing of the international search report 19. 12. 2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, B

3

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB 01/00259

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 00 52047 A (MILLENNIUM PHARM INC) 8 September 2000 (2000-09-08) abstract claims 8,19-22 -----	1-12,14
X	WO 99 14328 A (CHEN JIAN ; GENENTECH INC (US); PENNICA DIANE (US); YUAN JEAN (US);) 25 March 1999 (1999-03-25) abstract; examples 60-62 -----	12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB 01/00259**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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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.:

all claims in so far as they relate to the screening/diagnosis of neuropsychiatric/neurological conditions or screening for modulators of DKK-3
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

Continuation of Box I.1

Although claims 4, 6-10 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-11,14

Diagnosis/treatment of neurological disorders using Dickkopf-3 as marker/target

2. Claim : 12

Screening for compounds that modulate Dickkopf-3 expression

3. Claim : 13

Monitoring of breast cancer treatment in a patient

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Patent Application No

PCT/IB 01/00259

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9846755	A	22-10-1998	AU 7137398 A	11-11-1998
			EP 0975755 A1	02-02-2000
			WO 9846755 A1	22-10-1998
WO 9827932	A	02-07-1998	AU 5613498 A	17-07-1998
			EP 0954575 A2	10-11-1999
			JP 2001507227 T	05-06-2001
			WO 9827932 A2	02-07-1998
WO 9922000	A	06-05-1999	DE 19747418 C1	15-07-1999
			WO 9922000 A1	06-05-1999
			EP 1027440 A1	16-08-2000
WO 0052047	A	08-09-2000	AU 3510200 A	21-09-2000
			WO 0052047 A2	08-09-2000
WO 9914328	A	25-03-1999	AU 9317898 A	05-04-1999
			EP 1027434 A2	16-08-2000
			JP 2001516580 T	02-10-2001
			WO 9914328 A2	25-03-1999
			ZA 9808460 A	19-03-1999
			AU 9312198 A	05-04-1999
			AU 9484398 A	05-04-1999
			WO 9914327 A2	25-03-1999
			WO 9914234 A2	25-03-1999
			AU 9395998 A	05-04-1999
			WO 9914241 A2	25-03-1999
			AU 9317498 A	05-04-1999
			AU 1126099 A	17-05-1999
			AU 1288399 A	17-05-1999
			EP 1029046 A2	23-08-2000
			EP 1027437 A1	16-08-2000
			WO 9921998 A1	06-05-1999
			WO 9921999 A2	06-05-1999
			AU 735081 B2	28-06-2001
			AU 1532499 A	15-06-1999
			EP 1032667 A2	06-09-2000
			WO 9927098 A2	03-06-1999
AU 733222 B2	10-05-2001			
AU 1703399 A	15-06-1999			
EP 1032668 A1	06-09-2000			
WO 9927100 A1	03-06-1999			

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 K 48/00		A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/18		25/24	
		25/28	
		25/28	
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	C
		33/15	Z
		33/483	C
		33/50	Z
		33/50	
// C 0 7 K 14/47	Z N A	C 0 7 K 14/47	Z N A
		19/00	
		19/00	
		A 6 1 K 37/02	
(31)優先権主張番号	0 0 0 6 2 8 5 . 1		
(32)優先日	平成12年3月15日(2000 . 3 . 15)		
(33)優先権主張国	イギリス (G B)		
(31)優先権主張番号	0 0 2 8 7 3 4 . 2		
(32)優先日	平成12年11月24日(2000 . 11 . 24)		
(33)優先権主張国	イギリス (G B)		
(31)優先権主張番号	0 9 / 7 2 4 , 3 9 1		
(32)優先日	平成12年11月28日(2000 . 11 . 28)		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
(31)優先権主張番号	0 9 / 7 5 0 , 3 9 5		
(32)優先日	平成12年12月28日(2000 . 12 . 28)		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
(31)優先権主張番号	0 0 3 0 0 5 0 . 9		
(32)優先日	平成12年12月8日(2000 . 12 . 8)		
(33)優先権主張国	イギリス (G B)		
(31)優先権主張番号	6 0 / 2 5 4 , 8 3 0		
(32)優先日	平成12年12月12日(2000 . 12 . 12)		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		

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

(72)発明者 パレク, ラジェシュ, ピクフ
イギリス, ニアー ウェンドルバリー オーエックス6 0エヌエス, ラングフォード レイン, アルチェスター ハウス

(72)発明者 ロルフ, クリスチャン
イギリス, オックスフォード オーエックス1 2アールエー, リューレイ ロード
19

(72)発明者 パテル, サコルライ, パーショタンハイ
イギリス, ホートン-クム-ステュッドレイ オーエックス33 1エーダブリュー, チャーチ レイン, ノーク ハウス

Fターム(参考) 2G054 AA06 CA22 CA23 CE02 EA03
GA04
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ01 QQ02
QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR55
QR62 QS16 QS25 QS34 QS36
QX02
4C084 AA01 AA13 DA01 DA32 NA14
ZA12 ZA15 ZA18
4C085 AA13 AA14 BB11 BB17
4H045 AA30 BA10 BA41 CA40 EA50

专利名称(译)	DPI-6在神经精神和神经疾病，推定的治疗靶点和生物标志物中		
公开(公告)号	JP2003528300A	公开(公告)日	2003-09-24
申请号	JP2001562208	申请日	2001-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	OXFORD GLYCOSCI英国		
申请(专利权)人(译)	牛津科学格力高塞特(英国)有限公司		
[标]发明人	ヘラスヘラスムジャンセラゲアスラチャンドラシリ パレクラジェシュビクフ ロルフクリスチャン パテルサコルライパーショタンハイ		
发明人	ヘラス,ヘラス,ムジャンセラゲ,アスラ,チャンドラシリ パレク,ラジェシュ,ビクフ ロルフ,クリスチャン パテル,サコルライ,パーショタンハイ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P25/00 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 C07K14/47 C07K19/00 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/15 G01N33/483 G01N33/50 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/00 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 C07K14/47 G01N33/6896 G01N2500/00		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.M A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 C12Q1/68.A G01N21/78.C G01N33/15.Z G01N33/483.C G01N33/50.Z C07K14/47.ZNA C07K19/00 A61K37/02		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ01 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA01 4C084/AA13 4C084/DA01 4C084/DA32 4C084/NA14 4C084/ZA12 4C084/ZA15 4C084/ZA18 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB17 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/EA50		
优先权	2000004412 2000-02-24 GB 2000004415 2000-02-24 GB 2000006285 2000-03-15 GB 2000028734 2000-11-24 GB 09/724391 2000-11-28 US 09/750395 2000-12-28 US 2000030050 2000-12-08 GB 60/254830 2000-12-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了筛查，诊断和预后诸如BAD，精神分裂症和血管性痴呆之类的神经精神病学或神经病学病症，用于监测所有上述病症的治疗功效，以及用于药物。提供了用于开发的方法和组合物。描述了可通过脑脊髓液，血清或血浆的二维电泳检测到的BAD相关特征(DFs)。本发明进一步提供了可在脑脊髓液，血清或血浆中检测到的BAD相关蛋白同工型(DPI)，其含有对DPI具有免疫特异性的分离的DPI的制剂。抗体和具有以上技术的试剂盒。

