

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-523179

(P2006-523179A)

(43) 公表日 平成18年10月12日(2006.10.12)

| (51) Int. Cl.                   | F I             | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|-----------------|-------------|
| <b>C07K 14/435 (2006.01)</b>    | C07K 14/435 ZNA | 4B024       |
| <b>A61P 35/00 (2006.01)</b>     | A61P 35/00      | 4B063       |
| <b>C12P 21/02 (2006.01)</b>     | C12P 21/02 C    | 4B064       |
| <b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>      | C12Q 1/02       | 4B065       |
| <b>G01N 33/53 (2006.01)</b>     | G01N 33/53 V    | 4C084       |
| 審査請求 有 予備審査請求 有 (全 97 頁) 最終頁に続く |                 |             |

|               |                              |          |  |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号     | 特願2004-525989 (P2004-525989) | (71) 出願人 | 504026203<br>イェール・ユニバーシテイ<br>アメリカ合衆国コネチカット州06511<br>ニューヘブーン・ツェーホイツトニーアベニュー |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年6月3日(2003.6.3)          | (74) 代理人 | 100060782<br>弁理士 小田島 平吉  |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成17年1月14日(2005.1.14)        | (72) 発明者 | ホクフィールド, スーザン<br>アメリカ合衆国コネチカット州06511<br>ニューヘブーン・ヒルハウスアベニュー1                |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2003/017500            | (72) 発明者 | マシユーズ, ラツセル・テイ<br>アメリカ合衆国コネチカット州06510<br>ニューヘブーン・トランバルストリートナン<br>バー3 7     |
| (87) 国際公開番号   | W02004/013356                |          |  |
| (87) 国際公開日    | 平成16年2月12日(2004.2.12)        |          |  |
| (31) 優先権主張番号  | 10/195,970                   |          |  |
| (32) 優先日      | 平成14年7月16日(2002.7.16)        |          |  |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          |  |
| 最終頁に続く        |                              |          |  |

(54) 【発明の名称】 BEHABおよび原発性CNS腫瘍に関する組成物、方法およびキット

## (57) 【要約】

本発明は原発性CNS腫瘍に関し、かつ、原発性CNS腫瘍を伴う哺乳動物における腫瘍体積を低下させかつ生存の長さを増大させてそれにより原発性CNS腫瘍の処置を提供するための有用な組成物および方法を提供する。本発明はまた、腫瘍体積を低下させかつ動物の生存を増大させるための化合物の同定方法にも関し、それは従って原発性CNS腫瘍を治療することに関する。本発明はまた腫瘍の検出および診断方法にも関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

約 130 kDa の分子量を有する、単離されたラットグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム。

## 【請求項 2】

該グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームをコードする単離された核酸が配列番号 5 の単離された核酸を含んでなる、請求項 1 に記載のグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム。

## 【請求項 3】

約 130 kDa の分子量を有する、単離されたラット過少グリコシル化 B E H A B アイソフォーム。 10

## 【請求項 4】

該過少グリコシル化 B E H A B アイソフォームをコードする単離された核酸が配列番号 5 の単離された核酸を含んでなる、請求項 3 に記載の過少グリコシル化 B E H A B アイソフォーム。

## 【請求項 5】

約 130 kDa の分子量を有する、単離されたラット未グリコシル化 B E H A B アイソフォーム。

## 【請求項 6】

該未グリコシル化 B E H A B アイソフォームをコードする単離された核酸が配列番号 5 の単離された核酸を含んでなる、請求項 5 に記載の未グリコシル化 B E H A B アイソフォーム。 20

## 【請求項 7】

約 150 kDa の分子量を有する、単離されたヒトグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム。

## 【請求項 8】

該グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームをコードする単離された核酸が配列番号 7 の単離された核酸を含んでなる、請求項 7 に記載のグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム。

## 【請求項 9】

約 150 kDa の分子量を有する、単離されたヒト過少グリコシル化 B E H A B アイソフォーム。 30

## 【請求項 10】

該過少グリコシル化 B E H A B アイソフォームをコードする単離された核酸が配列番号 7 の単離された核酸を含んでなる、請求項 9 に記載の過少グリコシル化 B E H A B アイソフォーム。

## 【請求項 11】

約 150 kDa の分子量を有する、単離されたヒト未グリコシル化 B E H A B アイソフォーム。

## 【請求項 12】

該未グリコシル化 B E H A B アイソフォームをコードする単離された核酸が配列番号 7 の単離された核酸を含んでなる、請求項 11 に記載の未グリコシル化 B E H A B アイソフォーム。 40

## 【請求項 13】

B E H A B タンパク質をコードする単離された核酸で細胞をトランスフェクトすること、およびそれからグリコシル化バリエーション B E H A B を単離することを含んでなる、グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームの作成方法。

## 【請求項 14】

細胞が O l i - n e u 細胞である、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

B E H A B タンパク質をコードする単離された核酸が配列番号 5 の単離された核酸を含んでなる、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

哺乳動物の生物学的サンプルを、グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム若しくはそのフラグメントと特異的に結合する抗体と接触させること、および哺乳動物におけるグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームを検出する、該生物学的サンプルとの抗体の結合を検出することを含んでなる、哺乳動物におけるグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームの検出方法。

【請求項 1 7】

哺乳動物がヒトである、請求項 1 6 に記載の方法。

10

【請求項 1 8】

抗体が B 5、B 6 若しくは B<sub>C R P</sub> より成る群から選択される、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

抗体がそれに共有結合された標識ポリペプチドを含んでなる、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 0】

原発性 C N S 腫瘍を有することが疑われる哺乳動物から生物学的サンプルを得ること、該生物学的サンプル中のグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのレベルを評価すること、および該生物学的サンプル中のグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのレベルを、原発性 C N S 腫瘍を有することが疑われない哺乳動物から得た生物学的サンプル中のグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのレベルと比較して（ここで、原発性 C N S 腫瘍を有することが疑われない哺乳動物からの生物学的サンプル中のグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのレベルと比較して原発性 C N S 腫瘍を有することが疑われる哺乳動物からの生物学的サンプル中のグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのより高レベルが、原発性 C N S 腫瘍を有することが疑われる哺乳動物が原発性 C N S 腫瘍を有することの指標である）それにより哺乳動物における原発性 C N S 腫瘍を診断することを含んでなる、哺乳動物における原発性 C N S 腫瘍の診断方法。

20

【請求項 2 1】

哺乳動物がヒトである、請求項 2 0 に記載の方法。

30

【請求項 2 2】

生物学的サンプルが、血液、神経組織、脳脊髄液、尿、唾液および脳組織よりなる群から選択される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

有効量のグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム阻害剤を哺乳動物に投与してそれにより哺乳動物における原発性 C N S 腫瘍を治療することを含んでなる、哺乳動物における原発性 C N S 腫瘍の治療方法。

【請求項 2 4】

哺乳動物がヒトである、請求項 2 3 に記載の方法。

40

【請求項 2 5】

グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム阻害剤が、抗体、タンパク質およびペプチド模倣物よりなる群から選択される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

抗体がグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム若しくはそのフラグメントに特異的に結合する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

哺乳動物への原発性 C N S 腫瘍の処置の実施前、その間若しくは後の前記哺乳動物におけるグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのレベルを評価して（ここで、原発性 C N S 腫瘍の処置の実施前の該哺乳動物におけるグリコシル化バリエーション B E H A B

50

アイソフォームのレベルと比較して原発性 CNS 腫瘍の処置の実施の間若しくは後の該哺乳動物におけるグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのより低レベルが、該哺乳動物における原発性 CNS 腫瘍の該処置の有効性の指標である)それにより該哺乳動物における原発性 CNS 腫瘍の処置の有効性を評価することを含んでなる、哺乳動物における原発性 CNS 腫瘍の処置の有効性の評価方法。

【請求項 28】

哺乳動物がヒトである、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

原発性 CNS 腫瘍の処置が、化学療法、放射線治療および外科手術よりなる群から選択される、請求項 28 に記載の方法。

10

【請求項 30】

細胞を試験化合物と接触させること、および、試験化合物と接触されないそれ以外は同一の細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム発現のレベルと該細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム発現のレベルを比較して(ここで、試験化合物と接触されないそれ以外は同一の細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム発現のレベルと比較して試験化合物と接触させた細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム発現のより高い若しくは低いレベルが、該試験化合物が細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームの発現に影響を及ぼすことの指標である)それにより細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームの発現に影響を及ぼす化合物を同定することを含んでなる、細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームの発現に影響を及ぼす化合物の同定方法。

20

【請求項 31】

請求項 30 に記載の方法により同定される化合物。

【請求項 32】

試験化合物と細胞を接触させること、および、試験化合物と接触されないそれ以外は同一の細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム発現のレベルと該細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム発現のレベルを比較して(ここで、該試験化合物と接触されないそれ以外は同一の細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム発現のレベルと比較して該試験化合物と接触させた細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム発現のより高い若しくは低いレベルが、該試験化合物が細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームの発現を低下させることの指標である)それにより細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームの発現を低下させる化合物を同定することを含んでなる、細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームの発現を低下させる化合物の同定方法。

30

【請求項 33】

請求項 32 に記載の方法により同定される化合物。

【請求項 34】

哺乳動物から細胞を単離すること、該細胞をグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム若しくはそのフラグメントと接触させること、およびそのように接触された細胞を哺乳動物に投与することを含んでなる、哺乳動物における原発性 CNS 腫瘍の治療方法

40

【請求項 35】

細胞が抗原提示細胞である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

細胞が樹状細胞である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 37】

グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームに対する抗体を含んでなり、その使用のための説明資料をさらに含んでなる、グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームを検出するためのキット。

【請求項 38】

50

グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームに対する抗体を含んでなり、さらにアプリケーション、およびその使用のための説明資料を含んでなる、哺乳動物における原発性 CNS 腫瘍を診断するためのキット。

【請求項 39】

グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム若しくはそのフラグメントと特異的に結合する抗体、および製薬学的に許容できる担体を含んでなる組成物を含んでなり、さらにアプリケーション、およびその使用のための説明資料を含んでなる、原発性 CNS 腫瘍を治療するためのキット。

【請求項 40】

グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム若しくはそのフラグメントを含んでなり、さらにアプリケーション、およびその使用のための説明資料を含んでなる、免疫治療で原発性 CNS 腫瘍を治療するためのキット。

10

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

原発性脳腫瘍、神経膠腫は制御および管理するのが悪名高く困難である。脳若しくは非神経膠性脳腫瘍に転移した二次性腫瘍と異なり、神経膠腫は癌性組織と健全な脳との間の明確な境界の欠如を特徴とする独特の浸潤能力を示す。外科手術、化学療法および放射線治療を包含する慣習的治療は、神経膠腫の浸潤的性質によりしばしば部分的のみに有効若しくは無効な処置である。従って、神経膠腫に苦しめられている患者の予後は一様に厳しい。

20

【0002】

予後がしばしば不良であるのみならず、しかし神経膠腫の診断は同様に困難かつ高価な過程である。脳腫瘍の検出は、全部の医療施設で容易に利用可能であるわけではない高価な画像化機器を必要とし、そして画像化の結果の確認は通常、該腫瘍の浸潤性かつ危険な外科的サンプリングを必要とする。

【0003】

脳中の細胞外マトリックス (ECM) の性質は癌細胞の浸潤能力においてある役割を演じているかもしれない。正常の発達の間脳中の細胞外マトリックスの組成は劇的に変化する。発達中の脳における細胞の増殖、移動、ニューロンおよび神経膠の生長ならびに新脈管形成は細胞の動きを許容する可溶性マトリックス中で起こる。成熟した発達した脳においては、しかしながら、細胞の移動性は顕著に低下されて成熟細胞から細胞への相互作用を安定化する (非特許文献 1)。

30

【0004】

発達した脳中の周囲組織へ浸潤するために悪性腫瘍により使用される機構は顕著に異なる。例えば、数種の悪性細胞はヒアルロン酸 (HA) のようなそれら自身の ECM 分子を産生してそれにより近隣の環境の均衡および構造を変化させることが可能である (非特許文献 2 ; 非特許文献 3 ; 非特許文献 4 ; 非特許文献 5 ; 非特許文献 6)。加えて、腫瘍細胞は、それらの細胞受容体の組成を変えること、例えば HA 結合分子 R H A M M および C D 4 4 のアップレギュレーションにより ECM 分子とのそれらの相互作用を変え得る (非特許文献 7 ; 非特許文献 8 ; 非特許文献 9 ; 非特許文献 10)。さらに、悪性細胞は周囲の ECM を消化するためのタンパク質分解酵素を産生することにより既存の正常マトリックスを分解し得る (非特許文献 11 ; 非特許文献 12 ; 非特許文献 13)。隣接組織中への腫瘍細胞の浸潤を助長する機構は多彩であるが、浸潤性の表現型を最良に特徴づけるものはおそらく、マトリックス分子の産生および消化を包含する周囲マトリックスの組成を改変する悪性腫瘍の能力である。

40

【0005】

浸潤過程におけるプロテアーゼの役割はほぼすべての組織型の腫瘍で示されており (非特許文献 11 ; 非特許文献 12 ; 非特許文献 13)、かつ、悪性神経膠腫 (high grade gliomas) の浸潤特性に強く関与している (非特許文献 14 ; 非特許文

50

献15；非特許文献16；非特許文献17；非特許文献18；非特許文献19；非特許文献20)。多数の文献が、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)、とりわけMMP-2およびMMP-9が神経膠腫で高度にアップレギュレートされていること、およびこれらのプロテアーゼの阻害が神経膠腫の浸潤性を低下させ得ることを示した(非特許文献21；非特許文献22；非特許文献23；非特許文献24；非特許文献25；非特許文献26；非特許文献16；非特許文献17；非特許文献18)。しかしながら、原発性腫瘍の処置のためにMMP阻害剤を使用する臨床試験は重篤かつ有害な副作用のため期待は不確実である(非特許文献27)。

#### 【0006】

神経膠腫の浸潤性および腫瘍の進行において重要な役割を演じている脳ECM分子の1つは脳に豊富なヒアルロンタン結合(brain-enriched hyaluronan binding)(BEHAB)タンパク質である(特許文献1)。BEHABはタンパク質のプロテオグリカンタンデム反復ファミリーの1メンバーであり、そして分泌型およびヒアルロンタン結合ドメインを伴うGPIアンカー型タンパク質の双方として存在する(非特許文献28；非特許文献29；非特許文献30)。最近の研究は、BEHABがヒト脳において発達が進行する際にダウンレギュレートされる脳特異的タンパク質であることを示した(非特許文献31)。重要なことに、BEHABは、今日までアッセイされたほぼ全部の成体ヒト神経膠腫サンプルにおいて約700%アップレギュレートされている(非特許文献32；非特許文献31)。

#### 【0007】

BEHAB切断は神経膠腫の進行において顕著な役割を演じている。Matthewsらによる最近の研究(非特許文献33)は、BEHABがメタロプロテイナーゼ(しかしMMPではない)によりGlu<sup>395</sup>-Ser<sup>396</sup>の間で50kDaおよび90kDaのフラグメントに切断されることを示した。代わりに、BEHABは、メタロプロテイナーゼのトロンボスポンジンモチーフをもつディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ(ADAMTS)ファミリーの1メンバー、とりわけADAMTS4により切断される。

#### 【0008】

不幸なことに、有害な副作用により、伝統的なメタロプロテイナーゼ阻害剤は神経膠腫の無効な治療方法であることが判明している。慣習的技術での神経膠腫の診断および治療双方の固有のリスク、ならびにメタロプロテイナーゼ阻害剤のようなより新たな処置レジメンの失敗を考えれば、原発性中枢神経系(CNS)腫瘍の診断および治療双方の方法に対する長い間の切実な必要性が存在する。本発明はこの必要性にかなう。

【特許文献1】Hockfieldら、1997、米国特許第5,635,370号明細書

【非特許文献1】Hockfield、1990、Semin.Dev.Biol.1:55-63

【非特許文献2】Delpechら、1997、International Journal of Cancer 72:942-948

【非特許文献3】Kosakiら、1999、Cancer Research、59:1141-1145

【非特許文献4】Turley、1992、Cancer and Metastasis Reviews 11:21-30

【非特許文献5】Tzanakakisら、1997 Biochimie.79:323-332

【非特許文献6】Zetter、1993、Seminars in Cancer Biology 4:219-229

【非特許文献7】Goldbrunnerら、1999、Acta Neurochirurgica 141:295-305

【非特許文献8】HallとTurley、1995、Journal of Neur

10

20

30

40

50

o - Oncology 26 : 221 - 229

【非特許文献9】Hall $\bar{b}$ 、1995、Cell 82 : 19 - 28

【非特許文献10】Merzak $\bar{b}$ 、1994、Cancer Research 54 : 3988 - 3992

【非特許文献11】Furcht $\bar{b}$ 、1994、Laboratory Investigation 70 : 781 - 783

【非特許文献12】MignattiとRifkin、1993、Physiological Reviews 73 : 161 - 195

【非特許文献13】Stetler-Stevenson $\bar{b}$ 、1993、FASEB Journal 7 : 1434 - 1441

【非特許文献14】DeClerck $\bar{b}$ 、1991、Cancer Research 51 : 2151 - 2157

【非特許文献15】Mohanam $\bar{b}$ 、1994、Journal of Neuro-Oncology 22 : 153 - 160

【非特許文献16】Nakagawa $\bar{b}$ 、1994、Journal of Neurosurgery 81 : 69 - 77

【非特許文献17】Rao $\bar{b}$ 、1993、Cancer Research 53 : 2208 - 2211

【非特許文献18】Rao $\bar{b}$ 、1994、Journal of Neuro-Oncology 18 : 129 - 138

【非特許文献19】Vaithilingham $\bar{b}$ 、1992、Journal of Neurosurgery 77 : 595 - 600

【非特許文献20】Yamamoto $\bar{b}$ 、1994、Journal of Neuro-Oncology 22 : 139 - 151

【非特許文献21】Deryugina $\bar{b}$ 、1997、Journal of Cell Science 110 : 2473 - 2482

【非特許文献22】Forsyth $\bar{b}$ 、1999、British Journal of Cancer 79 : 1828 - 1835

【非特許文献23】Hamasuna $\bar{b}$ 、1999、International Journal of Cancer 82 : 274 - 281

【非特許文献24】Rao $\bar{b}$ 、1996、Clinical and Experimental Metastasis 14 : 12 - 18

【非特許文献25】Sawaya $\bar{b}$ 、1996、Clinical and Experimental Metastasis 14 : 35 - 42

【非特許文献26】Uhm $\bar{b}$ 、1996、Clinical and Experimental Metastasis 14 : 421 - 433

【非特許文献27】HeathとGrochow、2000、Drugs 59 : 1043 - 1055

【非特許文献28】Jaworski $\bar{b}$ 、1994、J. Cell Biol. 125 : 495 - 509

【非特許文献29】Yamada $\bar{b}$ 、1994、J. Biol. Chem. 269 : 10119 - 10126

【非特許文献30】Seidenbecher $\bar{b}$ 、1995、J. Biol. Chem. 270 : 27206 - 27212

【非特許文献31】Gary $\bar{b}$ 、2000、Gene 256 : 139 - 147

【非特許文献32】Jaworski $\bar{b}$ 、1996、Cancer Research、56 : 2293 - 2298

【非特許文献33】Matthews $\bar{b}$ 、2000、J. Biol. Chem. 275 : 22695 - 22703

【発明の開示】

10

20

30

40

50

## 【0009】

## [ 発明の要約 ]

本発明は単離されたラットグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームを包含し、該グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームは約 130 kDa の分子量を有する。

## 【0010】

一局面において、該グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームは配列番号 5 の単離された核酸によりコードされる。

## 【0011】

本発明は単離されたラット過少グリコシル化 B E H A B アイソフォームを包含し、該過少グリコシル化 B E H A B アイソフォームは約 130 kDa の分子量を有する。

10

## 【0012】

一局面において、該過少グリコシル化 B E H A B アイソフォームは配列番号 5 の単離された核酸によりコードされる。

## 【0013】

本発明は単離されたラット未グリコシル化 B E H A B アイソフォームを包含し、該未グリコシル化 B E H A B アイソフォームは約 130 kDa の分子量を有する。

## 【0014】

一局面において、該未グリコシル化 B E H A B アイソフォームは配列番号 5 の単離された核酸によりコードされる。

20

## 【0015】

本発明は単離されたヒトグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームを包含し、該グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームは約 150 kDa の分子量を有する。

## 【0016】

一局面において、該ヒトグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームは配列番号 7 の単離された核酸によりコードされる。

## 【0017】

本発明は単離されたヒト過少グリコシル化 B E H A B アイソフォームを包含し、該過少グリコシル化 B E H A B アイソフォームは約 150 kDa の分子量を有する。

30

## 【0018】

一局面において、該ヒト過少グリコシル化 B E H A B アイソフォームは配列番号 7 の単離された核酸によりコードされる。

## 【0019】

本発明は単離されたヒト未グリコシル化 B E H A B アイソフォームを包含し、該未グリコシル化 B E H A B アイソフォームは約 150 kDa の分子量を有する。

## 【0020】

一局面において、該ヒト未グリコシル化 B E H A B アイソフォームは配列番号 7 の単離された核酸によりコードされる。

## 【0021】

本発明はグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームの作成方法を包含する。該方法は、B E H A B タンパク質をコードする単離された核酸で細胞をトランスフェクトすること、およびそれからグリコシル化バリエーション B E H A B を単離することを含んでなる。

40

## 【0022】

一局面において、細胞は O l i - n e u 細胞である。

## 【0023】

別の局面において、B E H A B タンパク質をコードする単離された核酸は配列番号 5 の単離された核酸を含んでなる。

## 【0024】

50

本発明は哺乳動物におけるグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームの検出方法を包含する。該方法は、哺乳動物の生物学的サンプルを、グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム若しくはそのフラグメントと特異的に結合する抗体と接触させること、および該生物学的サンプルとの抗体の結合を検出することを含んでなり、ここで該サンプルとの抗体の結合が哺乳動物におけるグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームを検出する。

【0025】

一局面において、哺乳動物はヒトである。

【0026】

別の局面において、抗体は B 5、B 6 若しくは B<sub>C R P</sub> より成る群から選択される。

10

【0027】

なお別の局面において、抗体はそれに共有結合された標識 ( t a g ) ポリペプチドを含んでなる。

【0028】

本発明は哺乳動物における原発性 C N S 腫瘍の診断方法を包含する。該方法は、原発性 C N S 腫瘍を有することが疑われる哺乳動物から生物学的サンプルを得ること、該生物学的サンプル中のグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのレベルを評価すること、および該生物学的サンプル中のグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのレベルを、原発性 C N S 腫瘍を有することが疑われない哺乳動物から得た生物学的サンプル中のグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのレベルと比較することを含んでなる。原発性 C N S 腫瘍を有することが疑われない哺乳動物からの生物学的サンプル中のグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのレベルと比較して原発性 C N S 腫瘍を有することが疑われる哺乳動物からの生物学的サンプル中のグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのより高レベルは、原発性 C N S 腫瘍を有することが疑われる哺乳動物が原発性 C N S 腫瘍を有することの指標であり、それにより哺乳動物における原発性 C N S 腫瘍を診断する。

20

【0029】

一局面において、哺乳動物はヒトである。

【0030】

なお別の局面において、生物学的サンプルは、血液、神経組織、脳脊髄液、尿、唾液および脳組織よりなる群から選択される。

30

【0031】

本発明は哺乳動物における原発性 C N S 腫瘍の治療方法を包含する。該方法は、有効量のグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム阻害剤を哺乳動物に投与してそれにより哺乳動物における原発性 C N S 腫瘍を治療することを含んでなる。

【0032】

一局面において、哺乳動物はヒトである。

【0033】

なお別の局面において、グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム阻害剤は、抗体、タンパク質およびペプチド模倣物よりなる群から選択される。

40

【0034】

さらに別の局面において、抗体はグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム若しくはそのフラグメントに特異的に結合する。

【0035】

本発明は哺乳動物における原発性 C N S 腫瘍の処置の有効性の評価方法を包含する。該方法は、哺乳動物への原発性 C N S 腫瘍の処置の実施前、間若しくは後の該哺乳動物におけるグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのレベルを評価して (ここで、原発性 C N S 腫瘍の処置の実施前の該哺乳動物におけるグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのレベルと比較して原発性 C N S 腫瘍の処置の実施の間若しくは後の該哺乳動物におけるグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのより低レベルが、該

50

哺乳動物における原発性CNS腫瘍の該処置の有効性の指標である)それにより前記哺乳動物における原発性CNS腫瘍の処置の有効性を評価することを含んでなる。

【0036】

一局面において、哺乳動物はヒトである。

【0037】

なお別の局面において、原発性CNS腫瘍の処置は化学療法、放射線治療および外科手術よりなる群から選択される。

【0038】

本発明は細胞中でのグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォームの発現に影響を及ぼす化合物の同定方法を包含する。該方法は、細胞を試験化合物と接触させること、および、試験化合物と接触されないそれ以外は同一の細胞中でのグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォーム発現のレベルと該細胞中でのグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォーム発現のレベルを比較して(ここで、試験化合物と接触されないそれ以外は同一の細胞中でのグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォーム発現のレベルと比較して試験化合物と接触させた細胞中でのグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォーム発現のより高若しくは低レベルが、該試験化合物が細胞中でのグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォームの発現に影響を及ぼすことの指標である)それにより細胞中でのグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォームの発現に影響を及ぼす化合物を同定することを含んでなる。

10

【0039】

一局面において、本発明は上の方法により同定される化合物を包含する。

20

【0040】

本発明は細胞中でのグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォームの発現を低下させる化合物の同定方法を包含する。該方法は、試験化合物と細胞を接触させること、および、試験化合物と接触されないそれ以外は同一の細胞中でのグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォーム発現のレベルと該細胞中でのグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォーム発現のレベルを比較して(ここで、該試験化合物と接触されないそれ以外は同一の細胞中でのグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォーム発現のレベルと比較して該試験化合物と接触させた細胞中でのグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォーム発現のより高若しくは低レベルが、該試験化合物が細胞中でのグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォームの発現を低下させることの指標である)それにより細胞中でのグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォームの発現を低下させる化合物を同定することを含んでなる。

30

【0041】

一局面において、本発明は上の方法により同定される化合物を包含する。

【0042】

本発明は哺乳動物における原発性CNS腫瘍の治療方法を包含する。該方法は、哺乳動物から細胞を単離すること、該細胞をグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォーム若しくはそのフラグメントと接触させること、およびそのように接触された細胞を哺乳動物に投与することを含んでなる。

40

【0043】

一局面において、細胞は抗原提示細胞である。

【0044】

別の局面において、細胞は樹状細胞である。

【0045】

本発明はグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォームを検出するためのキットを包含する。該キットはグリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォームに対する抗体を含んでなる。該キットはさらにその使用のための説明資料を含んでなる。

【0046】

本発明は哺乳動物における原発性CNS腫瘍を診断するためのキットを包含する。該キ

50

ットはグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームに対する抗体を含んでなる。該キットはさらに、アプリケーション、およびその使用のための説明資料を含んでなる。

【0047】

本発明は原発性 CNS 腫瘍を治療するためのキットを包含する。該キットは、グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム若しくはそのフラグメントと特異的に結合する抗体、および製薬学的に許容できる担体を含んでなる組成物を含んでなる。該キットはさらに、アプリケーションおよびその使用のための説明資料を含んでなる。

【0048】

本発明は免疫治療で原発性 CNS 腫瘍を治療するためのキットを包含する。該キットは、グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム若しくはそのフラグメントを含んでなり、該キットはさらにアプリケーションおよびその使用のための説明資料を含んでなる。

10

[ 発明の詳細な記述 ]

脳の細胞外マトリックス ( E C M ) の操作は原発性 CNS 腫瘍の進行および浸潤性の表現型において重要な役割を演じる。E C M の一成分、脳に豊富なヒアルロン酸結合 ( B E H A B ) タンパク質は神経膠腫細胞の移動性および従って浸潤性において不可欠である。本明細書に開示されるデータは、B E H A B 機能および/若しくは切断に影響を及ぼすことが原発性 CNS 腫瘍を伴う動物における腫瘍の大きさの減少および生存時間の延長を媒介することを初めて示す。従って、本発明は、限定されるものでないが神経膠腫、乏突起膠腫、星状細胞腫、神経膠肉腫、多形グリア芽腫、リンパ腫および脳外傷後の反応性神経膠症を挙げることができる原発性 CNS 腫瘍の処置のための組成物および方法を包含する。

20

【0049】

本発明はまた、哺乳動物における原発性 CNS 腫瘍を診断するための組成物および方法も包含する。すなわち、本明細書に開示されるデータは、限定されるものでないが神経膠腫、乏突起膠腫、星状細胞腫および神経膠肉腫を挙げることができる原発性 CNS 腫瘍が本明細書に開示される方法を使用して哺乳動物において診断されうることを示す。

【0050】

本発明はさらに、新規グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームを包含する。本明細書に開示されるデータは、本新規グリコシル化バリエーションアイソフォームが、以前に開示されていないカルシウム非依存性の様式で細胞膜に結合し、また、浸潤性神経膠腫において劇的にアップレギュレートされていることを初めて示す。従って、本発明は、グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームの生成のための組成物および方法、ならびにグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームに関する原発性 CNS 腫瘍の検出、処置および診断のための組成物、方法およびキットを包含する。

30

定義

本明細書で使用されるところの以下の用語のそれぞれは本節でそれと関連した目的の範囲を有する。

【0051】

冠詞「a」および「an」は、該冠詞の文法上の目的語の1個若しくは1個以上(すなわち最低1個)を指すのに本明細書で使用する。例として「an element (要素)」は1要素若しくは1以上の要素を意味している。

40

【0052】

「増幅」は、例えば逆転写、ポリメラーゼ連鎖反応およびリガーゼ連鎖反応によりポリヌクレオチド配列がコピーされかつ従って多数のポリヌクレオチド分子に拡大されるいかなる手段も指す。

【0053】

本明細書で使用されるところの「抗体」という用語は、抗原上の特異的1エピトープに特異的に結合することが可能である免疫グロブリン分子を指す。抗体は天然の供給源若しくは組換え供給源由来の無傷の免疫グロブリンであり得、また、無傷の免疫グロブリンの

50

免疫反応性部分であり得る。抗体は典型的には免疫グロブリン分子の四量体である。本発明における抗体は、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fv、FabおよびF(ab)<sub>2</sub>、ならびに一本鎖抗体およびヒト化抗体を包含する多様な形態で存在してよい(Harlowら、1999、Using Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク; Harlowら、1989、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor、ニューヨーク; Houstonら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 85: 5879 - 5883; Birdら、1988、Science 242: 423 - 426)。

10

**【0054】**

本明細書で使用される場所の「合成抗体」という用語により、例えば本明細書に記述される場所のバクテリオファージにより発現される抗体のような組換えDNA技術を使用して生成される抗体を意味している。該用語はまた、該抗体をコードしかつ抗体タンパク質を発現するDNA分子の合成により生成された抗体、若しくは該抗体を指定するアミノ酸配列を意味しているように解釈されるべきであり、ここで、該DNA若しくはアミノ酸配列は、当該技術分野で利用可能かつ公知である合成DNA若しくはアミノ酸配列技術を使用して得られている。

**【0055】**

「アンチセンス」はとりわけ、タンパク質をコードする二本鎖DNA分子の非コーディング鎖の核酸配列若しくは該非コーディング鎖に実質的に相同である配列を指す。本明細書で定義される場所のアンチセンス配列はタンパク質をコードする二本鎖DNA分子の配列に相補的である。アンチセンス配列がDNA分子のコーディング鎖のコーディング部分に単に相補的であることは必要でない。アンチセンス配列は、コーディング配列の発現を制御する、タンパク質をコードするDNA分子のコーディング鎖上の指定された制御配列に相補的であってもよい。

20

**【0056】**

該用語が本明細書で使用される場所の「アプリケーター」という用語により、本発明の変異体BEHAB核酸、タンパク質および/若しくは抗BEHAB抗体ならびにアンチセンスBEHAB核酸を哺乳動物に投与するための限定されるものでないが皮下シリンジ、ピペットなどを挙げるができるいかなる装置も意味している。

30

**【0057】**

該用語が本明細書で同義的に使用される場所の「BEHAB」「完全長BEHAB」若しくは「内因性BEHAB」は、そうでなければプレビカンとして知られる脳に豊富なヒアルロンタン結合(Brain-Enriched Hualuronan Binding)分子を指す。完全長BEHABはラットおよびマウスにおいて約150kDaより大きい、ならびにヒトにおいて約160kDaより大きい分子量を有し、かつ、それぞれラット完全長BEHABについて配列番号5 配列番号6、ならびにヒト完全長BEHABについて配列番号7および配列番号8に示されるヌクレオチドおよびアミノ酸配列により例示される。

40

**【0058】**

その用語が本明細書で使用される場所の「生物学的サンプル」は、BEHABの発現のレベル、存在するBEHABタンパク質のレベル若しくは双方を評価するのに使用し得る哺乳動物から得られる若しくはそれ中のサンプルを意味している。こうしたサンプルは、限定されるものでないが血液サンプル、神経組織サンプル、脳サンプルおよび脳脊髄液サンプルを挙げるができる。

**【0059】**

「切断」は、2アミノ酸を含んでなるポリペプチドを最低2フラグメントに分離する、ポリペプチド中の2アミノ酸間のペプチド結合の解離を指すのに本明細書で使用する。

**【0060】**

50

「切断阻害剤」は、切断の原因であるプロテアーゼを滴定すること ( t i t r a t i n g )、切断部位を封鎖すること、若しくは切断部位をプロテアーゼに対し別の方法で認識不可能にすることのいずれかによりポリペプチドの切断を予防する分子、化合物若しくは組成物を指すのに本明細書で使用する。

【 0 0 6 1 】

「切断阻害量」は切断阻害剤の有効量を指すのに本明細書で使用する。

【 0 0 6 2 】

「切断生成物」は、最初のポリペプチドの2個若しくはそれ以上のフラグメントへの切断から生じる最初のポリペプチドのフラグメントを指すのに本明細書で使用する。一例として、145 kDaのBEHABタンパク質の切断生成物は90 kDaおよび50 kDaのフラグメントを包含する。

10

【 0 0 6 3 】

「BEHABをコードする核酸の一部分若しくは全部に相補的な」により、BEHABタンパク質をコードしない核酸の配列を意味している。むしろ、細胞中で発現されている配列はBEHABタンパク質をコードする核酸の非コーディング鎖に同一であり、そして従ってBEHABタンパク質をコードしない。

【 0 0 6 4 】

本明細書で使用されるところの「相補的」および「アンチセンス」という用語は完全に同義ではない。「アンチセンス」はとりわけ、タンパク質をコードする二本鎖DNA分子の非コーディング鎖の核酸配列、若しくは該非コーディング鎖に実質的に相同である配列を指す。

20

【 0 0 6 5 】

本明細書で使用されるところの「相補的な」は、2種の核酸、例えば2個のDNA分子間のサブユニット配列の相補性の広範な概念を指す。該分子の双方中の1ヌクレオチド位置が相互と塩基対形成することが通常可能なヌクレオチドにより占有される場合には、該核酸はこの位置で相互に相補的であるとみなされる。従って、2種の核酸は、該分子のそれぞれ中の対応する位置のかなり数(最低50%)が相互と通常塩基対形成する(例えばA:TおよびG:Cヌクレオチド対)ヌクレオチドにより占有される場合に相互に相補的である。本明細書で定義されるところのアンチセンス配列は、タンパク質をコードする二本鎖DNA分子の配列に相補的である。アンチセンス配列がDNA分子のコーディング鎖のコーディング部分に単に相補的であることは必要でない。アンチセンス配列は、コーディング配列の発現を制御する、タンパク質をコードするDNA分子のコーディング鎖上の指定された制御配列に相補的であってもよい。

30

【 0 0 6 6 】

遺伝子の「コーディング領域」は、該遺伝子のコーディング鎖のヌクレオチド残基および該遺伝子の非コーディング鎖のヌクレオチドよりなり、それらは、該遺伝子の転写により産生されるmRNA分子のコーディング領域とそれぞれ相同若しくはそれに対し相補的である。

【 0 0 6 7 】

mRNA分子の「コーディング領域」もまた、該mRNA分子の翻訳の間に転移RNA分子のアンチコドン領域とマッチされる若しくは終止コドンにコードするmRNA分子のヌクレオチド残基よりなる。コーディング領域は、従って、該mRNA分子によりコードされる成熟タンパク質中に存在しないアミノ酸残基(例えばタンパク質の輸出シグナル配列中のアミノ酸残基)に対応するヌクレオチド残基を包含してもよい。

40

【 0 0 6 8 】

「コードすること」は、ヌクレオチド(すなわちrRNA、tRNAおよびmRNA)の定義された配列若しくはアミノ酸の定義された配列のいずれかおよびそれら由来の生物学的特性を有する、生物学的過程における他のポリマーおよび巨大分子の合成のための鑄型としてはたらくための遺伝子、cDNA若しくはmRNAのようなポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特定の配列の固有の特性を指す。従って、遺伝子は、その遺伝子に対応

50

する mRNA の転写および翻訳が細胞若しくは他の生物学的系中でタンパク質を産生する場合にタンパク質をコードする。ヌクレオチド配列が mRNA 配列に同一でありかつ通常は配列表に提供されるコーディング鎖、および遺伝子若しくは cDNA の転写のための鋳型として使用される非コーディング鎖の双方を、その遺伝子若しくは cDNA のタンパク質若しくは他の産物をコードすると称することができる。

**【0069】**

オリゴヌクレオチドの第一の領域は、2領域が相互に隣接する場合、若しくは2領域が約1000を超えないヌクレオチド残基、および好ましくは約100を超えないヌクレオチド残基により分離されている場合に、該オリゴヌクレオチドの第二の領域に「隣接する」。

10

**【0070】**

本明細書で使用されるものの、核酸に適用されるものの「フラグメント」という用語は、通常、長さが最低約20ヌクレオチド、典型的には最低約50ヌクレオチド、より典型的には約50から約100ヌクレオチド、好ましくは最低約100ないし約500ヌクレオチド、なおより好ましくは最低約500ヌクレオチドないし約1000ヌクレオチド、なおさらにより好ましくは最低約1000ないし約1500、なおより好ましくは最低約1500ヌクレオチドないし約2000ヌクレオチド、なおさらにより好ましくは最低約2000ないし約2500、なおより好ましくは最低約2500ヌクレオチドないし約2600ヌクレオチド、なおさらにより好ましくは最低約2600ないし約2650であってよく、そして、最も好ましくは、核酸フラグメントは長さが約2652ヌクレオチドより大きいことができる。

20

**【0071】**

タンパク質に適用されるものの、BEHABの「フラグメント」は長さが約20アミノ酸である。より好ましくは、BEHABのフラグメントは長さが約100アミノ酸、なおより好ましくは最低約200、なおより好ましくは最低約300、なおより好ましくは最低約400、なおより好ましくは最低約500、なおより好ましくは約600、およびより好ましくは、なおより好ましくは最低約700、なおより好ましくは最低約800、なおより好ましくは約850、およびより好ましくは最低約884アミノ酸である。

**【0072】**

本明細書で使用されるものの「グリコシル化バリエーションBEHABアイソフォーム」および「グリコシル化バリエーションBEHAB」は、完全長BEHABのグリコシル化パターンと比較して変えられたグリコシル化パターンとラットで約150kDa未満およびヒトで約160kDa未満の分子量を有するBEHABタンパク質を意味している。グリコシル化バリエーションBEHABアイソフォーム若しくはグリコシル化バリエーションBEHABという用語は、過少グリコシル化(underglycosylated)BEHAB、異なってグリコシル化されたBEHABおよび未グリコシル化BEHABを包含する。

30

**【0073】**

本明細書で使用されるものの「異なってグリコシル化されたBEHAB」および「異なってグリコシル化されたBEHABアイソフォーム」は、炭水化物および糖含量が完全長BEHABのものに類似であるがしかしアミノ酸バックボーンと連合した糖の組成が変えられている、変えられたグリコシル化パターンを有するBEHABタンパク質を指す。

40

**【0074】**

「過少グリコシル化BEHABアイソフォーム」および「過少グリコシル化BEHAB」は、完全長BEHABタンパク質若しくはそのフラグメントの一次アミノ酸配列を有するがしかし完全長BEHABタンパク質のグリコシル化含量未満を有し、しかし該タンパク質と連合した最低1個の糖若しくは炭水化物をなお有するBEHABタンパク質を指すのに本明細書で使用する。

**【0075】**

「未グリコシル化BEHABアイソフォーム」および「未グリコシル化BEHAB」は、完全長BEHABタンパク質若しくはそのフラグメントの一次アミノ酸配列を有するが

50

しかし該タンパク質と連合した糖若しくは炭水化物を有しない B E H A B タンパク質を指すのに本明細書で使用する。

【0076】

本明細書で使用されるところの「説明資料」は、本発明の組成物の指定される使用のためのその有用性を伝えるのに使用し得る刊行物、録音・録画、図、若しくはいかなる他の表現媒体も包含する。本発明のキットの説明資料は例えば組成物を含有する容器に添付されていてよいが、若しくは組成物を含有する容器と一緒に発送されてよい。あるいは、説明資料は、説明資料および組成物が受領者により共同して使用されるという意図を伴い容器と別個に発送してもよい。

【0077】

「単離された核酸」は、天然に存在する状態でそれに隣接する配列から分離されている核酸セグメント若しくはフラグメント、例えば、フラグメントに通常は隣接している配列、例えばそれが天然に存在するゲノム中でフラグメントに隣接する配列から取り出された DNA フラグメントを指す。該用語はまた、細胞中でそれに天然に付随する核酸例えば RNA 若しくは DNA またはタンパク質を天然に付随する他の成分から実質的に精製された核酸にも当てはまる。該用語は従って、例えば、ベクター、自律性に複製するプラスミド若しくはウイルス、または原核生物若しくは真核生物のゲノム DNA に組み込まれている、あるいは他の配列と独立に個別の分子として（例えば cDNA 若しくはゲノム、または PCR 若しくは制限酵素消化により生じられた cDNA フラグメントとして）存在する組換え DNA を包含する。それはまた、付加的なポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換え DNA も包含する。

10

20

【0078】

「変異体 B E H A B」は、プロテアーゼによる切断を阻害するようにアミノ酸配列が改変されている脳に豊富なヒアルロン結合 (Brain Enriched Hyaluronan Binding) 分子を指すのに本明細書で使用する。

【0079】

ある対象に適用されるところの「天然に存在する」は、該対象が天然で見出され得るという事実を指す。例えば、天然の供給源から単離され得かつ人により意図的に改変されていない生物体（ウイルスを包含する）中に存在するポリペプチド若しくはポリヌクレオチド配列は、天然に存在する。

30

【0080】

本発明の状況において、一般に存在する核酸塩基の以下の略語を使用する。「A」はアデノシンを指し、「C」はシチジンを指し、「G」はグアノシンを指し、「T」はチミジンを指し、そして「U」はウリジンを指す。

【0081】

別の方法で明記されない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、相互の縮重バージョンでありかつ同一アミノ酸配列をコードする全部のヌクレオチド配列を包含する。タンパク質および RNA をコードするヌクレオチド配列はイントロンを包含してよい。

【0082】

2種のポリヌクレオチドを「作動可能に連結される」として記述することにより、一本鎖若しくは二本鎖核酸部分が、該2種のポリヌクレオチドの少なくとも一方が特徴とする生理学的効果をそれが他者に対して発揮することが可能であるような様式で核酸部分内に配置された2種のポリヌクレオチドを含んでなることを意味している。例として、ある遺伝子のコーディング領域に作動可能に連結されたプロモーターは該コーディング領域の転写を促進することが可能である。

40

【0083】

「ポリヌクレオチド」は核酸の一本鎖若しくは平行および反平行鎖を意味している。従って、ポリヌクレオチドは一本鎖若しくは二本鎖いずれかの核酸であってよい。

【0084】

50

「核酸」という用語は典型的に大型のポリヌクレオチドを指す。

【0085】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、典型的には、一般に約50ヌクレオチドより大きくない短いポリヌクレオチドを指す。あるヌクレオチド配列がDNA配列（すなわちA、T、G、C）により表される場合にこれはまた「U」が「T」に置き換わっているRNA配列（すなわちA、U、G、C）も包含することが理解されよう。

【0086】

ポリヌクレオチド配列を記述するために本明細書で慣習的表記を使用する。すなわち、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左端は5'端であり；二本鎖ポリヌクレオチド配列の左方向は5'の方向と称する。

【0087】

新生RNA転写物に対するヌクレオチドの5'から3'の付加の方向は転写方向と称する。mRNAと同一の配列を有するDNA鎖を「コーディング鎖」と称し；該DNA上の参照点に対し5'に位置するDNA鎖上の配列を「上流配列」と称し；該DNA上の参照点に対し3'であるDNA鎖上の配列を「下流配列」と称する。

【0088】

ポリヌクレオチドの「部分」は、該ポリヌクレオチドの少なくとも最低約20の連続するヌクレオチド残基を意味している。ポリヌクレオチドの一部は該ポリヌクレオチドのすべてのヌクレオチド残基を包含するかもしれないことが理解される。

【0089】

「原発性CNS腫瘍」は、癌性細胞が身体の別の部分で発しかつ脳に転移しなかったことにおいて脳中に起源をもつ新形成を指すのに本明細書で使用する。原発性CNS腫瘍の例は、限定されるものでないが、神経膠腫、十分に分化した星状細胞腫、未分化星状細胞腫、多形グリア芽腫、上衣腫、乏突起膠腫、節細胞腫、混合性神経膠腫、脳幹神経膠腫、視神経膠腫、髄膜腫、松果体腫、下垂体腫瘍、下垂体腺腫、反応性神経膠症、未分化神経外胚葉性腫瘍、神経鞘腫、リンパ腫、血管腫およびリンパ腫を挙げることができる。

【0090】

「原発性CNS腫瘍を治療すること」は、腫瘍の体積を包含する原発性CNS腫瘍の症状の重症度、または該腫瘍のいずれかの症状若しくは兆候が患者により経験される頻度、あるいは双方が低下される、あるいは腫瘍の進行までの時間若しくは生存時間が延長される状況を指すのに本明細書で使用する。

【0091】

「プライマー」は、指定されたポリヌクレオチド鋳型に特異的にハイブリダイズしそして相補的ポリヌクレオチドの合成のための開始点を提供することが可能であるポリヌクレオチドを指す。こうした合成は、合成が誘導される条件下、すなわちヌクレオチド、相補的ポリヌクレオチド鋳型およびDNAポリメラーゼのような重合のための剤の存在下にポリヌクレオチドプライマーが置かれる場合に起こる。プライマーは典型的には一本鎖であるが、しかし二本鎖であってもよい。プライマーは典型的にはデオキシリボ核酸であるが、しかし広範な合成および天然に存在するプライマーが多く応用に有用である。プライマーは、それがハイブリダイズして合成の開始のための部位としてはたらくように指定されている鋳型に相補的であるが、しかし該鋳型の正確な配列を反映する必要はない。こうした場合、鋳型へのプライマーの特異的ハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに依存する。プライマーは例えば色原体、放射活性若しくは蛍光部分で標識しかつ検出可能な部分として使用し得る。

【0092】

「プローブ」は別のポリヌクレオチドの指定された配列に特異的にハイブリダイズすることが可能であるポリヌクレオチドを指す。プローブは標的の相補ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするが、しかし該鋳型の正確な相補配列を反映する必要はない。こうした場合、標的へのプローブの特異的ハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに依存する。プローブは例えば色原体、放射活性若しくは蛍

10

20

30

40

50

光部分で標識しかつ検出可能な部分として使用し得る。

【0093】

「組換えポリヌクレオチド」は天然と一緒に結合されていない配列を有するポリヌクレオチドを指す。増幅若しくは集成された組換えポリヌクレオチドを適するベクターに包含してよく、そして該ベクターを使用して適する宿主細胞を形質転換し得る。

【0094】

組換えポリヌクレオチドは非コーディング機能（例えばプロモーター、複製基点、リボソーム結合部位など）を同様に提供しうる。

【0095】

組換えポリヌクレオチドを含んでなる宿主細胞は「組換え宿主細胞」と称される。組換えポリヌクレオチドを含んでなる、組換え宿主細胞中で発現される遺伝子は「組換えポリペプチド」を産生する。

【0096】

「組換えポリペプチド」は組換えポリヌクレオチドの発現に際して産生されるものである。

【0097】

「ポリペプチド」はアミノ酸残基から構成されるポリマー、関連する天然に存在する構造バリエーション、ならびにペプチド結合を介して連結されたその合成の天然に存在しない類似物、関連する天然に存在する構造バリエーション、およびその合成の天然に存在しない類似物を指す。合成ポリペプチドは例えば自動ポリペプチド合成機を使用して合成し得る。

【0098】

「タンパク質」という用語は典型的に大型のポリペプチドを指す。

【0099】

「ペプチド」という用語は典型的に短いポリペプチドを指す。

【0100】

ポリペプチド配列を表現するのに慣習的表記を本明細書で使用する。すなわち、ポリペプチド配列の左端がアミノ末端であり；ポリペプチド配列の右端がカルボキシル末端である。

【0101】

本明細書で使用されるところの「プロモーター/制御配列」という用語は、プロモーター/制御配列に作動可能に連結された、遺伝子産物の発現に必要とされる核酸配列を意味している。いくつかの例において本配列はコアプロモーター配列であってよく、また、他の例において本配列はエンハンサー配列、および遺伝子産物の発現に必要とされる他の調節要素もまた包含してよい。プロモーター/制御配列は、例えば、組織特異的様式で遺伝子産物を発現するものであってよい。

【0102】

本明細書で使用されるところの「特異的に結合する」という用語により、B E H A B タンパク質の1エピトープを認識かつ結合するがしかしサンプル中の他の分子を実質的に認識若しくは結合しない抗体を意味している。

【0103】

「治療的」処置は、病理学の兆候を減少若しくは排除させる目的上それらの兆候を現す被験体を実施される処置である。

【0104】

化合物の「治療上有効な量」は、該化合物が投与される被験体に対する有益な効果を提供するのに十分である化合物の量である。

【0105】

本明細書で使用されるところの「トランスジーン (transgene)」は、アミノ酸配列をコードする核酸に作動可能に連結されているプロモーター/制御配列をコードする核酸を含んでなる外因性の核酸配列を意味しており、この外因性核酸は動物若しくは細胞によりコードされる。

10

20

30

40

50

## 【0106】

「ベクター」は、単離された核酸を含んでなりかつ該単離された核酸を細胞の内側に送達するのに使用し得る物質の組成物である。限定されるものでないが直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性若しくは両親媒性化合物と会合したポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを挙げることができる多数のベクターが当該技術分野で既知である。従って「ベクター」という用語は自律性に複製するプラスミド若しくはウイルスを包含する。該用語はまた、例えばポリリシン化合物、リボソームなどのような細胞中への核酸の移入を助長する非プラスミドおよび非ウイルス化合物を包含するようにも解釈されるべきである。ウイルスベクターの例は、限定されるものでないがアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどを挙げることができる。

10

## 【0107】

「発現ベクター」は、発現されるべきヌクレオチド配列に効果的に連結された発現制御配列を含んでなる組換えポリヌクレオチドを含んでなるベクターを指す。発現ベクターは発現のための十分な *cis* に作用する要素を含んでなり；発現のための他の要素は宿主細胞により若しくは *in vitro* 発現系中で供給し得る。発現ベクターは、組換えポリヌクレオチドを組込むコスミド、プラスミド（例えば裸の若しくはリボソーム中に含有される）およびウイルスのような当該技術分野で既知のものの全部を包含する。

記述

## I. 単離された核酸

## A. センス核酸

本発明は哺乳動物の変異体 BEHAB 分子若しくはそのフラグメントをコードする単離された核酸を包含し、ここで該核酸は配列番号 4 の配列を有する核酸と最低約 99.7% の同一性を共有する。哺乳動物は好ましくはヒトである。好ましくは、該核酸は本明細書に開示される配列番号 4 に約 99.8% 相同、より好ましくは、そして最も好ましくは約 99.9% 相同である。なおより好ましくは、該核酸は配列番号 4 である。本発明の単離された核酸は、本発明の変異体 BEHAB タンパク質をコードする RNA 若しくは DNA 配列、および該ヌクレオチド配列が細胞を含まない場合若しくはそれが細胞と会合されている場合にそれをより安定にする DNA 若しくは RNA の化学修飾を包含するそのいずれかの改変された形態を包含すると解釈されるべきである。ヌクレオチドの化学修飾はまた、ヌクレオチド配列が細胞により取り込まれる効率若しくはそれが細胞中で発現される効

20

30

## 【0108】

本発明は、本明細書に開示される核酸およびアミノ酸配列に単に制限されるとして解釈されるべきでない。本発明で一旦備えをすれば、本明細書に開示されるところの変異体 BEHAB ポリペプチドをコードする他の哺乳動物の変異体 BEHAB 核酸の生成について実験の詳細の節で本明細書に記述される手順（例えば部位特異的突然変異誘発、フレームシフト突然変異など）、および当該技術分野で公知若しくは開発されるべきである手順に従うことにより、変異体 BEHAB タンパク質をコードする他の核酸を得ることが当業者に容易に明らかである。

40

## 【0109】

さらに、例えば Sambrook ら (1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク) および Ausubel ら (1997、Current Protocols in Molecular Biology、Green & Wiley、ニューヨーク) に記述されるもののような当該技術分野で公知の組換え DNA の方法論を使用する変異体 BEHAB の誘導體若しくはバリエーションの形態の生成のために、いずれかの他の数の手順を使用してよい。

## 【0110】

ポリペプチドをコードする DNA 配列を変えることによるタンパク質若しくはポリペ

50

チド中のアミノ酸変化の導入のための手順は、当該技術分野で公知でありかつまた Sambrookら(1989、上記); Ausubelら(1997、上記)にも記述されている。

#### 【0111】

本発明は、標識ポリペプチドをコードする核酸が共有結合されている哺乳動物の変異体 BEHAB をコードする核酸を包含する。すなわち、本発明は、標識ポリペプチドをコードする核酸配列が変異体 BEHAB ポリペプチドをコードする核酸に共有結合されているキメラ核酸を包含する。こうした標識ポリペプチドは当該技術分野で公知であり、そして例えば緑色蛍光タンパク質(GFP)、myc、myc-ピルビン酸キナーゼ(myc-PK)、His<sub>6</sub>、マルトース結合タンパク質(MBP)、インフルエンザウイルスヘマグルチニン標識ポリペプチド、flag標識ポリペプチド(FLAG)およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)標識ポリペプチドを包含する。しかしながら、本発明は上に列挙された標識ポリペプチドをコードする核酸に制限されるといかなる方法でも解釈されるべきでない。むしろ、これらの標識ポリペプチドに実質的に類似の様式で機能しうるポリペプチドをコードするいかなる核酸配列も本発明に包含されると解釈されるべきである。

10

#### 【0112】

標識ポリペプチドをコードする核酸を含んでなる核酸を使用して、細胞、組織および/若しくは生物体全体(例えば哺乳動物の胚)内での変異体 BEHAB の位置を推定し(localize)、細胞から分泌される変異体 BEHAB を検出しそして細胞中での変異体 BEHAB の役割(1種若しくは複数)を研究し得る。さらに、標識ポリペプチドの付加は、本発明のタンパク質が産生かつ容易に精製され得るような「標識(tagged)」タンパク質の単離および精製を助長する。

20

#### B. アンチセンス核酸

ある状況においては、BEHAB の発現を阻害することが望ましいかもしれず、そして、本発明は従って BEHAB 発現の阻害に有用な組成物を包含する。従って、本発明は、転写に関して核酸がアンチセンスの向きである哺乳動物の BEHAB 分子をコードする核酸の一部分若しくは全部に相補的な単離された核酸を特徴とする。好ましくは、該アンチセンス核酸は配列番号5若しくはそのフラグメントとの最低約99.7%の相同性を有する核酸と相補的である。好ましくは、該核酸は、転写に関してアンチセンスの向きである、配列番号5若しくはそのフラグメントの配列を有する哺乳動物の BEHAB をコードする核酸の一部分若しくは全部に相補的な核酸に約99.8%相同、および最も好ましくは約99.9%相同である。最も好ましくは、該核酸は配列番号5若しくはそのフラグメントである核酸の一部分若しくは全部に相補的である。こうしたアンチセンス核酸は BEHAB 分子の発現、機能若しくは双方を阻害するようにはたらく。

30

#### 【0113】

あるいは、本発明のアンチセンス分子は合成で作成しそしてその後細胞に提供してもよい。約10ないし約30の間、およびより好ましくは約15ヌクレオチドのアンチセンスオリゴマーが好ましい。それらは容易に合成かつ標的細胞中に導入されるからである。本発明により企図している合成アンチセンス分子は、未修飾オリゴヌクレオチドに比較して改良された生物学的活性を有する、当該技術分野で既知のオリゴヌクレオチド誘導体を包含する(Cohen、1989、Oligodeoxyribonucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression、CRC Press、フロリダ州ボカレイトン中; Tullis、1991、米国特許第5,023,243号明細書(そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる)を参照されたい)。

40

#### II. 単離されたポリペプチド

本発明はまた哺乳動物の変異体 BEHAB 分子を含んでなる単離されたポリペプチドも包含する。好ましくは、哺乳動物の変異体 BEHAB 分子を含んでなる単離されたポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸配列を有するポリペプチド若しくはそのなんらかのフラ

50

グメントに最低約 99.6% 相同である。好ましくは、単離されたポリペプチドは配列番号 3 若しくはそのなんらかのフラグメントに約 99.7% 相同、より好ましくは約 99.8% 相同、より好ましくは、および最も好ましくは約 99.9% 相同である。最も好ましくは、変異体 B E H A B 分子を含んでなる単離されたポリペプチドは配列番号 3 である。

#### 【0114】

本発明はまた、本明細書に開示される場所の変異体 B E H A B 分子を含んでなるタンパク質若しくはペプチドの類似物も提供する。類似物は、保存的アミノ酸配列の差異若しくは配列に影響を及ぼさない修飾または双方により、天然に存在するタンパク質若しくはペプチドと異なってよい。例えば、タンパク質若しくはペプチドの一次配列を変えるとは言えその機能を通常は変えない保存的アミノ酸変化を行ってよい。保存的アミノ酸置換は、典型的には、以下の群すなわち

グリシン、アラニン；

バリン、イソロイシン、ロイシン；

アスパラギン酸、グルタミン酸；

アスパラギン、グルタミン；

セリン、トレオニン；

リシン、アルギニン；

フェニルアラニン、チロシン

内の置換を包含する。修飾（通常は一次配列を変えない）は、ポリペプチドの *in vivo* 若しくは *in vitro* の化学的誘導体化、例えばアシル化若しくはカルボキシル化を包含する。グリコシル化の修飾、例えばポリペプチドの合成およびプロセッシングの間若しくはさらなるプロセッシング段階においてにそのグリコシル化パターンを改変することにより；例えばグリコシル化に影響を及ぼす酵素、例えば哺乳動物のグリコシル化若しくは脱グリコシル化酵素にポリペプチドを曝露することによりなされるものもまた包含する。リン酸化アミノ酸残基、例えばホスホチロシン、ホスホセリン若しくはホスホトレオニンを有する配列もまた包含する。

#### 【0115】

タンパク質分解性の分解に対するポリペプチドの抵抗性を改良する若しくは溶解性の特性を至適化する若しくはそれらを治療薬としてより適するようにするよう通常分子生物学的技術を使用して修飾されたポリペプチドもまた包含する。こうしたポリペプチドの類似物は、天然に存在する L - アミノ酸以外の残基、例えば D - アミノ酸若しくは天然に存在しない合成アミノ酸を含有するものを包含する。本発明のペプチドは本明細書に列挙される特定の例示的方法のいずれかの産物に制限されない。

#### 【0116】

本発明はまた、生じるペプチド（若しくは DNA）が本明細書に列挙される配列に同一でないがしかし該ペプチドが本発明の変異体 B E H A B ペプチドの生物学的 / 生化学的特性を有するために本明細書に開示されるペプチドと同一の生物学的特性を有するような 1 個若しくはそれ以上のアミノ酸が変えられている（またはそれをコードするヌクレオチド配列に言及する場合は 1 個若しくはそれ以上の塩基対が変えられている）変異体 B E H A B ペプチドである、本発明のペプチド（若しくはそれをコードする DNA）の「誘導体」および「バリエーション」を包含すると解釈されるべきである。

#### 【0117】

変異体 B E H A B タンパク質の生物学的特性は、限定されるものでないが細胞から分泌される若しくは G P I 結合を介して固定される該ペプチドの能力、プロテアーゼにより切断されない能力などを挙げることができると解釈されるべきである。

#### 【0118】

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、変異体 B E H A B の生物学的活性が、限定されるものでないが、分子若しくは化合物の、脳組織中で発現される、脳組織中で検出される、細胞から分泌される、細胞に固定される、プロテアーゼにより切断されない、などの能力を挙げることができると理解するであろう。「変異体 B E H A B の活性」

10

20

30

40

50

は、変異体 B E H A B ( E C M 若しくは脳脊髄液中を循環するものまたは脳中で局所的に産生されるもののいずれか) の効果を包含する。変異体 B E H A B の生物学的活性は、とりわけ、腫瘍の進行、腫瘍の浸潤性、腫瘍の体積および大きさ、動物の生存などを媒介するか、それらと関連するか、若しくは双方である。

### I I I . ベクター

他の関連する局面において、本発明は、好ましくは核酸によりコードされるタンパク質の発現を指図することが可能であるようなプロモーター/制御配列を含んでなる核酸に作動可能に連結された哺乳動物の変異体 B E H A B をコードする単離された核酸を包含する。従って、本発明は、例えば S a m b r o o k ら ( 1 9 8 9 、 M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l 、 C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y 、 ニューヨーク) および A u s u b e l ら ( 1 9 9 7 、 C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y 、 J o h n W i l e y & S o n s 、 ニューヨーク) に記述されるもののような、細胞中での外因性 D N A の付随する発現を伴う、細胞中への外因性 D N A の導入のための発現ベクターおよび方法を包含する。

#### 【 0 1 1 9 】

なおかつ通常は正常な B E H A B を発現する細胞中での単独で若しくは検出可能な標識ポリペプチドに融合されたのいずれかの変異体 B E H A B の発現は、ベクターが導入される細胞中での標識を伴う若しくは伴わないタンパク質の発現を駆動するにはたらくプロモーター/制御配列に作動可能に連結された所望の核酸を含んでなるプラスミド、ウイルス若しくは他の型のベクターを生成することにより達成しうる。遺伝子の構成的発現を駆動するのに有用な多くのプロモーター/制御配列が当該技術分野で利用可能であり、かつ、限定されるものでないが、例えばサイトメガロウイルス前初期プロモーターエンハンサー配列、S V 4 0 初期プロモーター(その双方は本明細書に開示される実験で使用した)、ならびにラウス肉腫ウイルスプロモーターなどを挙げるができる。さらに、変異体 B E H A B をコードする核酸の誘導可能なおよび組織特異的発現は、標識を伴う若しくは伴わない変異体 B E H A B をコードする核酸を誘導可能な若しくは組織特異的プロモーター/制御配列の制御下に置くことにより達成しうる。本目的上有用である組織特異的若しくは誘導可能なプロモーター/制御配列の例は、限定されるものでないが M M T V L T R の誘導可能なプロモーターおよび S V 4 0 後期エンハンサー/プロモーターを挙げる 30  
ことができる。加えて、金属、グルココルチコイドなどのような誘導剤に応答して誘導される当該技術分野で公知であるプロモーターもまた本発明で企図している。従って、本発明は、既知若しくは未知のいずれかでありかつ作動可能に連結された所望のタンパク質の発現を駆動することが可能であるいかなるプロモーター/制御配列の使用も包含することが認識されるであろう。

#### 【 0 1 2 0 】

ベクターを使用した変異体 B E H A B の発現は大量の組換え的に産生されるタンパク質の単離を可能にする。さらに、完全長 B E H A B 発現の発現がこうした発現と関連する疾患、障害若しくは状態を引き起こす場合は、プロモーター/制御配列により駆動される変異体 B E H A B の発現は、限定されるものでないが、変異体 B E H A B が提供される遺伝子治療を挙げる 40  
ことができる有用な治療法を提供し得る。変異体 B E H A B の投与が有用であり得る、発現の増大されたレベル、タンパク質のレベル、またはタンパク質若しくはその切断生成物の切断および/若しくは活性の増大されたレベルと関連する疾患、障害若しくは状態は、限定されるものでないが、原発性 C N S 腫瘍、神経膠腫、十分に分化した星状細胞腫、未分化星状細胞腫、多形グリア芽腫、上衣腫、乏突起膠腫、節細胞腫、混合性神経膠腫、脳幹神経膠腫、視神経膠腫、髄膜腫、松果体腫、下垂体腫瘍、下垂体腺腫、未分化神経外胚葉性腫瘍、神経鞘腫、血管腫、リンパ腫などを挙げる 40  
ことができる。

#### 【 0 1 2 1 】

従って、本発明は、完全長 B E H A B の発現、翻訳、切断および/若しくは活性の阻害方法を包含するのみならず、しかしそれはまた B E H A B の発現、タンパク質レベル、切 50

断および/若しくは活性を低下させることに関する方法も包含する。BEHABの発現、切断および/若しくは活性を低下させること、または変異体BEHABの発現および/若しくは活性を増大させることが有効な治療薬の提供において有用であり得るからである。

#### 【0122】

いかなる特定のプラスミドベクター若しくは他のDNAベクターの選択も本発明における制限要因でなく、また、非常に多数のベクターが当該技術分野で公知である。さらに、特定のプロモーター/制御配列を選ぶことおよびそれらのプロモーター/制御配列を所望のポリペプチドをコードするDNA配列に作動可能に連結することが当業者の技能内に十分にある。こうした技術は当該技術分野で公知でありかつ例えばSambrookら(1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク)およびAusubelら(1997、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、ニューヨーク)に記述されている。

10

#### 【0123】

本発明は従って哺乳動物の変異体BEHABをコードする単離された核酸を含んでなるベクターを包含する。ベクター中への所望の核酸の組込みおよびベクターの選択は例えばSambrookら(1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク)およびAusubelら(1997、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、ニューヨーク)に記述されるとおり当該技術分野で公知である。

20

#### 【0124】

本発明はまたこうしたベクターを含有する細胞、ウイルス、プロウイルスなども包含する。ベクターおよび/若しくは外因性核酸を含んでなる細胞の製造方法は当該技術分野で公知である。例えばSambrookら(1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク)およびAusubelら(1997、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、ニューヨーク)を参照されたい。

30

#### 【0125】

変異体BEHABをコードする核酸は多様なプラスミドベクター中にクローン化してよい。しかしながら、本発明はプラスミド若しくはいずれかの特定のベクターに制限されると解釈されるべきでない。代わりに、本発明は、容易に入手可能かつ/若しくは当該技術分野で公知である非常に多数のベクターを包含すると解釈されるべきである。

#### IV. 組換え細胞

本発明は、とりわけ変異体BEHABをコードする単離された核酸、それに相補的なアンチセンス核酸、BEHAB若しくはその切断生成物を特異的に結合する抗体をコードする核酸などを含んでなる組換え細胞を包含する。一局面において、該組換え細胞は変異体BEHABをコードする核酸の一部をコードするプラスミドで一過性にトランスフェクトし得る。該核酸は細胞ゲノム中に組込まれる必要はなく、またそれは細胞中で発現される必要もない。さらに、該細胞は原核生物細胞であっても真核生物細胞であってもよく、そして、本発明はいずれかの特定の細胞株若しくは細胞型に制限されると解釈されるべきでない。こうした細胞は、限定されるものでないがニューロン、神経細胞、脳細胞、神経膠腫由来細胞株、グリア細胞株、非グリア細胞株、幹細胞株などを挙げることができる。

40

#### 【0126】

本発明はさらに、とりわけBEHABタンパク質をコードする単離された核酸を含んでなる組換え細胞中でのグリコシル化バリエーションBEHABアイソフォームの作成方法を包含する。すなわち、本明細書に開示されるデータにより示されるとおり、グリコシル化バリエーションBEHABアイソフォームは、BEHABをコードする単離された核酸若しくは

50

そのフラグメントで細胞をトランスフェクトすること、およびそれからグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームを単離することにより、組換え細胞中で産生させ得る。グリコシル化バリエーション B E H A B の産生に有用な細胞は例えば Oil - neu 細胞を包含する。さらに、細胞のトランスフェクト方法およびそれからのタンパク質の製造方法は当該技術分野で公知でありかつ本明細書の別の場所に詳細に記述されている。組換え細胞は、従って、完全長 B E H A B を発現するものおよびグリコシル化バリエーション B E H A B を発現するものを包含する。

【0127】

さらに、組換え細胞の目的は頭蓋内腫瘍の発生に制限されると解釈されるべきでないことに注意することが重要である。むしろ、本発明は、限定されるものでないが哺乳動物の変異体 B E H A B をコードする単離された核酸を含んでなる原核生物細胞および真核生物細胞を挙げることができる、哺乳動物の変異体 B E H A B をコードする核酸が導入されるいかなる細胞型も哺乳動物すると解釈されるべきである。

10

【0128】

本発明は、本発明の組換え遺伝子が以前に存在しなかったか若しくは細胞中で発現されていなかった、またはそれが今やトランスジーンが導入される前のものと異なるレベルで若しくは環境下で発現されている、本発明の組換え遺伝子が導入されかつ該所望の遺伝子によりコードされるタンパク質が発現される場合に利益が得られる真核生物細胞を包含する。こうした利益は、所望の遺伝子の発現を実験室で *in vitro* で若しくは細胞が存する哺乳動物中で研究し得る系、導入された遺伝子を含んでなる細胞を研究、診断および治療ツールとして使用し得る系、ならびに哺乳動物における選択された疾患状態の新たな診断および治療ツールの開発に有用である哺乳動物モデルが生成される系が提供されたという事実を包含する。

20

【0129】

変異体 B E H A B をコードする単離された核酸を発現する細胞は、完全長 B E H A B の発現、切断および/若しくは活性と関連する疾患、障害若しくは状態を治療若しくは軽減するのにより高レベルの変異体 B E H A B が有用であり得る細胞、組織若しくは哺乳動物全体に変異体 B E H A B を提供するのに使用し得る。こうした疾患、障害若しくは状態は、限定されるものでないが原発性 CNS 腫瘍、神経膠腫、十分に分化した星状細胞腫、未分化星状細胞腫、多形グリア芽腫、上衣腫、乏突起膠腫、節細胞腫、混合性神経膠腫、脳幹神経膠腫、視神経膠腫、髄膜腫、松果体腫、下垂体腫瘍、下垂体腺腫、未分化神経外胚葉性腫瘍、神経鞘腫、血管腫、リンパ腫などを挙げることができる。従って、本発明は、変異体 B E H A B の発現、タンパク質レベルおよび/若しくは活性を増大させることが疾患、障害若しくは状態を治療若しくは軽減するのに有用であり得る、変異体 B E H A B を発現させて完全長の B E H A B の発現、翻訳、切断および/若しくは活性を低下若しくは阻害する細胞を包含する。

30

【0130】

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、本発明の「ノックイン (knock - in)」若しくは「ノックアウト (knock - out)」ベクターがそれぞれ置換若しくは欠失されるべきである核酸の 2 部分に相同な最低 2 種の配列を含んでなることを認識するであろう。該 2 配列は該遺伝子に隣接する配列と相同であり；すなわち、1 配列は完全長 B E H A B をコードする核酸のコーディング配列の 5' 部分の若しくはその近くの領域と相同であり、かつ、他の配列は第一のものからさらに下流である。当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、本発明がいかなる特定の隣接核酸配列にも制限されないことを認識するであろう。代わりに、ターゲティングベクターは、哺乳動物ゲノムから若しくはそれ中にそれぞれ例えば完全長 B E H A B のいくらか若しくは全部を除去する (すなわち「ノックアウト」ベクター) または変異体 B E H A B をコードする核酸若しくはそのフラグメントを挿入する (すなわち「ノックイン」ベクター) 2 配列を含んでよい。ターゲティングベクターの決定的に重要な特徴は、それが、完全長 B E H A B をコードする核酸の全部若しくは一部分が哺乳動物の染色体上の位置から欠失されているような相同

40

50

的組換えによる欠失/挿入を起こさせるように「ノックアウト」ベクターの場合は完全長 B E H A B の読み取り枠 ( O R F ) の相対するすなわち 5 ' および 3 ' 端に向かって位置する 2 配列の十分な部分を含んでなることである。

【 0 1 3 1 】

トランスジーンならびにノックインおよびノックアウトターゲティングベクターの設計は当該技術分野で公知でありかつ S a m b r o o k ら ( 1 9 8 9 、 M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l 、 C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y 、 ニューヨーク ) のような標準的専門書および A u s u b e l ら ( 1 9 9 7 、 C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y 、 J o h n W i l e y & S o n s 、 ニューヨーク ) などに記述 10  
されている。ターゲティングベクターで使用されるべき B E H A B コーディング領域に隣接する若しくはそれ内の上流および下流部分は、既知の方法に基づき、かつ、哺乳動物の B E H A B および変異体 B E H A B の核酸およびアミノ酸配列を包含する本明細書に提供される開示に基づき本明細書に開示される教示に従って容易に選択しうる。これらの配列で備えをすれば、当業者は本発明のトランスジーンおよびノックアウトベクターを構築することが可能であろう。

【 0 1 3 2 】

当業者は、本開示に基づき、低下されたレベルの完全長 B E H A B タンパク質、低下されたレベルの B E H A B および/若しくは B E H A B 切断生成物の活性、または双方を含んでなる細胞が、限定されるものでないが B E H A B 発現の阻害剤 ( 例えばアンチセンス 20  
若しくはリボザイム分子、合成抗体若しくはイントラボディ ( i n t r a b o d y ) ) を発現する細胞を挙げることができることを認識するであろう。

【 0 1 3 3 】

培養物中で哺乳動物細胞を維持するのに有用な方法および組成物は当該技術分野で公知であり、ここで哺乳動物細胞は限定されるものでないがマウス、ラット、ヒトなどから得られた細胞を包含する哺乳動物から得られる。

【 0 1 3 4 】

本発明の組換え細胞は、腫瘍の進行および浸潤性に対する B E H A B レベルの質的および量的変化の影響を研究するのに使用し得る。これは、 B E H A B が分泌されかつヒアルロナン結合ドメインを有するという事実が、 B E H A B が E C M の機能、組成若しくは活性 30  
に関与していることを示すからである。さらに、該組換え細胞は治療および/若しくは診断目的上の使用のため変異体 B E H A B を製造するのに使用し得る。すなわち、変異体 B E H A B を発現する組換え細胞を使用して、 B E H A B の発現、活性および/若しくは切断と関連する若しくはそれにより引き起こされる疾患、障害若しくは状態を治療若しくは軽減するために投与し得る大量の精製かつ単離された変異体 B E H A B を製造し得る。

【 0 1 3 5 】

あるいは、変異体 B E H A B を発現する組換え細胞を、組換え細胞を投与することがそれにより細胞、組織および/若しくは哺乳動物に該タンパク質を投与する e x v i v o および i n v i v o 療法で投与し得る。加えて、該組換え細胞は B E H A B 受容体および B E H A B シグナル伝達経路の発見に有用である。 40

【 0 1 3 6 】

細胞が B E H A B を発現しないか若しくは切断可能性を欠く変異体 B E H A B を発現するように工作されている本発明の組換え細胞はまた、哺乳動物自身の細胞 ( 例えば神経細胞、脳細胞など ) 若しくは同系のマッチさせたドナーのものいずれかが本明細書の別の場所に記述されるとおり ( 例えば、 B E H A B の発現および/若しくはタンパク質のレベルがそれにより組換え細胞中で低下されるようなアンチセンス核酸若しくはノックアウトベクターの挿入により ) 組換え的に工作されかつ該組換え細胞がレシピエント哺乳動物に投与される、 e x v i v o および i n v i v o 細胞治療でも使用し得る。こうして、低下されたレベルで B E H A B を発現する組換え細胞を、それ自身の細胞が増大されたレベルの B E H A B を発現する哺乳動物に投与してそれにより本明細書の別の場所に開示さ 50

れるところの増大された B E H A B 発現と関連する若しくはそれにより媒介される疾患、障害若しくは状態を治療若しくは軽減し得る。

#### V. 抗体

B E H A B、B E H A B の切断生成物若しくはそれらのフラグメントを特異的に結合する抗体もまた包含される。

##### 【0137】

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、B E H A B および / 若しくは B E H A B 切断生成物を特異的に結合する抗体が B E H A B タンパク質、若しくはその免疫原性の部分、好ましくは本明細書の別の場所で論考される切断部位と結合することを理解するであろう。一態様において、抗体はアミノ酸配列、配列番号 6 を含んでなる哺乳動物の B E H A B に向けられる。

10

##### 【0138】

当業者は、本開示で備えをする場合に、本発明が過少グリコシル化 B E H A B アイソフォームおよび未グリコシル化 B E H A B アイソフォームを包含するグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームを結合する抗体をさらに含んでなることもまた理解するであろう。抗体の生成は本明細書の別の場所に記述され、そしてそれらの製造は当該技術分野で公知の技術および技能を使用して達成される。過少グリコシル化 B E H A B および未グリコシル化 B E H A B を包含するグリコシル化バリエーション B E H A B を結合する抗体は、限定されるものでないが、本明細書の実験の詳細および当該技術分野の別の場所 ( M a t t h e w s ら、2000、J . B i o l . C h e m . 275 : 22695 - 22703 ) に記述される B 5、B 6 および B<sub>C R P</sub> 抗体を挙げるができる。さらに、本明細書に記述される抗体は、ラットおよびヒトを包含する哺乳動物の B E H A B の多様な形態を結合し得、そして従って B E H A B と関連する原発性 C N S 腫瘍の検出、診断および処置のために本発明において有用である。

20

##### 【0139】

本発明は本明細書に列挙される抗体に制限されず、しかしむしろ将来発見および生成される抗グリコシル化バリエーション B E H A B 抗体もまた包含する。異なってグリコシル化された、過少グリコシル化および未グリコシル化 B E H A B を包含するグリコシル化バリエーション B E H A B に対する抗体は当該技術分野で公知の多様な方法で生成し得る。制限しない一例として、B E H A B をコードする核酸若しくはそのフラグメントを、E . c o l i (大腸菌) のようなそれが産生するタンパク質をグリコシル化しない生物体に形質転換し得る。E . c o l i (大腸菌) および他の原核生物種中でのタンパク質の産生方法は当該技術分野で公知でありかつ本明細書の別の場所に記述されている。グリコシル化しない原核生物種から単離したタンパク質をその後哺乳動物に投与して、本明細書に記述されるように抗体を生成させ得る。該抗体は未グリコシル化 B E H A B を包含するグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームを特異的に結合する。

30

##### 【0140】

さらに、グリコシル化バリエーション B E H A B に対する抗体は、B E H A B タンパク質バックボーンと連合した糖および炭水化物のいくつかが若しくは全部を除去するためにグリコシダーゼと完全長 B E H A B タンパク質を接触させることにより生成させ得る。こうしたグリコシダーゼは当該技術分野で公知であり、そして多数の適切なグリコシダーゼが本明細書の別の場所に記述されている。さらに、当業者は、本開示および本明細書に開示されるデータで備えをする場合に、B E H A B 分子上の糖および炭水化物上の他のファミリーを場合によっては保持しつつ糖若しくは炭水化物のあるファミリーの除去のために特定のグリコシダーゼを選択することが容易に可能であろう。B E H A B 分子は、グリコシダーゼでの処理後、その後にグリコシル化バリエーション B E H A B に対する抗体の生成のため動物に投与し得る。哺乳動物へのタンパク質の投与方法および抗体の生成方法は当該技術分野で公知でありかつ本明細書に記述されている。

40

##### 【0141】

本発明はさらにグリコシル化バリエーション B E H A B に特異的な抗体を生成させることを

50

含んでなる。こうした抗体は本明細書の別の場所に開示される組成物、方法およびキットで有用である。制限しない一例として、グリコシル化バリエーション B E H A B に特異的な抗体は B E H A B の一次アミノ酸配列のフラグメントを含んでなるペプチド若しくはタンパク質を投与することにより生成させ得る。こうしたフラグメントは B E H A B の一次アミノ酸配列中に存在するコンセンサスのグリコシル化部位を含み得る。当業者は、こうしたコンセンサスのグリコシル化部位をそれらの配列およびアミノ酸内容により容易に認識するであろう。一例として、O-結合糖は、通常、トレオニン若しくはセリン残基、およびいくつかの場合においてはヒドロキシリシン若しくはヒドロキシプロリン上のグリコシド結合を介して結合されている。さらに、N-結合糖は、しばしば、トレオニンに結合したいずれかのアミノ酸に結合したアスパラギンに結合したいずれかのアミノ酸の配列を有する部位で、アスパラギン残基に結合されている。従って、当業者は、本開示および本明細書に開示される方法で備えをする場合に、B E H A B の一次アミノ酸配列中のコンセンサスのグリコシル化部位を同定し、これらのコンセンサスのグリコシル化部位を含んでなる動物を免疫するためのペプチドを生成し、そしてグリコシル化バリエーション B E H A B を特異的に結合する抗体を生成させることが容易に可能であろう。こうした抗体は、限定されるものでないが原発性 CNS 腫瘍の形成に対し哺乳動物を免疫すること、原発性 CNS 腫瘍を治療すること、*in vivo* 若しくは *in vitro* のいずれかで哺乳動物中の原発性 CNS 腫瘍を検出すること、ならびに本明細書の別の場所に開示される他の方法および用途を挙げることができる治療的処置で有用である。

10

## 【0142】

20

ポリクローナル抗体の生成は、例えば Harlow ら (1988、Antibodies、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor、ニューヨーク中) に記述されるもののような標準的抗体製造方法を使用して所望の動物に抗原を接種することおよび該抗原を特異的に結合する抗体をそれから単離することにより達成される。こうした技術は、マルトース結合タンパク質の若しくはグルタチオン (GSH) 標識ポリペプチド部分のような別のタンパク質の一部、ならびに / または B E H A B 部分が免疫原性にされているような部分 (例えばキーホールリンペットヘモシアニンすなわち K L H と複合された B E H A B ) ならびにそれぞれのげっ歯類および / 若しくはヒト B E H A B アミノ酸残基を含んでなる一部分を含んでなるキメラタンパク質で動物を免疫することを包含する。該キメラタンパク質は、B E H A B をコードする適切な核酸 (例えば配列番号 5 を限定されるものでないが p M A L - 2 若しくは p C M X を挙げることができる本目的上適するプラスミドにクローン化することにより製造する。B E H A B およびその部分を特異的に結合する抗体の他の製造方法は Matthews ら (2000、J. Biol. Chem. 275: 22695 - 22703) に詳述されている。

30

## 【0143】

しかしながら、本発明は完全長 B E H A B を結合するポリクローナル抗体に単に制限されるとして解釈されるべきでない。むしろ、本発明は、哺乳動物の B E H A B 若しくはその部分に対する、その用語が本明細書の別の場所で定義されるところの他の抗体を包含するように解釈されるべきである。さらに、本発明は、とりわけ、B E H A B に結合し、かつウェスタンブロット上で、組織の免疫組織化学的染色 (それにより組織中の B E H A B の位置を推定する) において、および B E H A B の少なくとも一部分をコードする核酸で一過性に若しくは安定にトランスフェクトした細胞の免疫蛍光顕微鏡検査において存在する B E H A B を結合することが可能である抗体を包含するように解釈されるべきである。

40

## 【0144】

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、該抗体が該タンパク質のいずれかの部分と特異的に結合し得、また、完全長のタンパク質を使用してそれに特異的な抗体を生成させ得ることを認識するであろう。しかしながら、本発明は完全長のタンパク質を免疫原として使用することに制限されない。むしろ本発明は哺乳動物の B E H A B と特異的に結合する抗体を製造するために該タンパク質の免疫原性部分を使用することを包含する。すなわち、本発明は、B E H A B タンパク質の免疫原性部分すなわち抗原決定子、例えば切

50

断部位を含んでなるエピトープ若しくはタンパク質分解性の切断により生じられる新たな抗原性部位を使用して動物を免疫することを包含する。

【0145】

該抗体は、限定されるものでないがウサギ若しくはマウスのような動物をB E H A Bタンパク質若しくはその一部分で免疫することにより、またはB E H A Bの少なくとも一部分を含んでなるタンパク質若しくは例えば適切なB E H A Bアミノ酸残基を含んでなる一部分と共有結合されたマルトース結合タンパク質標識ポリペプチド部分を含んでなる標識ポリペプチド部分を包含する融合タンパク質を使用して動物を免疫することにより、産生し得る。当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、これらのタンパク質のより小さいフラグメントもまたB E H A Bを特異的に結合する抗体を製造するのに使用し得ることを認識するであろう。

10

【0146】

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、単離されたB E H A Bポリペプチドの多様な部分を使用して、B E H A Bの切断部位を含んでなるエピトープ若しくはB E H A Bの切断生成物上に存在するエピトープのいずれかに対する抗体を生成させ得ることを認識するであろう。B E H A Bの配列ならびに該タンパク質の多様なエピトープおよび切断生成物の位置を推定する詳述された分析で一旦備えをすれば、当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、当該技術分野で公知の若しくは開発されるべき方法を使用して哺乳動物のB E H A Bポリペプチドの多様な部分に特異的な抗体を得る方法を理解するであろう。

20

【0147】

従って、当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、本発明が、B E H A B若しくはB E H A Bの切断生成物を認識し得る、B E H A B活性を（例えば必要なB E H A B切断生成物受容体/リガンドの相互作用若しくはB E H A B切断を阻害することにより）中和かつ/若しくは阻害する抗体を包含することを認識するであろう。

【0148】

本発明は、本明細書に開示される抗体、若しくは本発明のタンパク質のいずれかの特定の免疫原性の部分に単に制限されるとして解釈されるべきでない。むしろ、本発明は、B E H A B若しくはその部分または配列番号6のアミノ酸配列を有するポリペプチドと最低約%の同一性を共有するタンパク質に対する、その用語が本明細書の別の場所で定義されるところの他の抗体を包含すると解釈されるべきである。好ましくは、該ポリペプチドはB E H A B（配列番号6）に約1%相同、より好ましくは約5%相同、より好ましくは約10%相同、なおより好ましくは約20%相同、より好ましくは約30%相同、好ましくは約40%相同、より好ましくは約50%相同、なおより好ましくは約60%相同、より好ましくは約70%相同、なおより好ましくは約80%相同、好ましくは約90%相同、より好ましくは約95%相同、なおより好ましくは約99%相同、および最も好ましくは約99.9%相同である。

30

【0149】

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、細胞中の関連するタンパク質の位置を推定しかつ細胞過程においてそれにより認識される抗原の役割（1種若しくは複数）を研究するのに該抗体を使用し得ることを認識するであろう。さらに、限定されるものでないがウェスタンブロッティングおよび酵素免疫測定法（E L I S A）を挙げることができる公知の方法を使用して生物学的サンプル中に存在するタンパク質を検出かつ若しくはその量を測定するのに該抗体を使用し得る。さらに、当該技術分野で公知の方法を使用して該抗体のコグネイトの抗原を免疫沈降かつ/若しくは免疫アフィニティー精製するのに該抗体を使用し得る。加えて、細胞中のB E H A B若しくはB E H A B切断生成物のレベルを低下させてそれにより細胞中のB E H A B若しくはB E H A B切断生成物の効果（1種若しくは複数）を阻害するのに該抗体を使用し得る。従って、該抗体を細胞若しくは哺乳動物の組織若しくは哺乳動物それ自身に投与することにより、必要とされるB E H A B受容体/リガンドの相互作用が従って阻害され、その結果B E H A B切断の影響もまた阻害さ

40

50

れる。当業者は、抗B E H A B抗体を使用してB E H A B切断を阻害することが、限定されるものでないが減少された腫瘍の大きさ、増大された生存などを挙げることができることを理解するであろう。

【0150】

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、本発明が、脳中のB E H A B切断を阻害するためにB E H A Bと特異的に結合する抗体を経口で、非経口で、脳室内に、硬膜下腔内に、脳実質内に若しくは複数の経路により投与することを包含することを認識するであろう。投与は、生物工作された(bioengineered)ポリマー、直接注入、Ommaya貯留槽(抗癌剤を脳脊髄液に送達するのに使用される頭皮下に埋植される装置により、若しくは神経外科学の当業者に公知の他のこうした手段による送達を包含し得る。

10

【0151】

本発明はポリクローナル、モノクローナル、合成抗体などを包含する。当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、本発明の抗体の決定的に重要な特徴は該抗体がB E H A Bと特異的に結合することであることを理解するであろう。すなわち、本発明の抗体は、ウェスタンブロット上、細胞の免疫染色においてB E H A B若しくはそのフラグメント(例えばその免疫原性の部分すなわち抗原決定子)を認識しかつ当該技術分野で公知の標準的方法を使用してB E H A Bを免疫沈降させる。

【0152】

あるタンパク質若しくはペプチドの完全長若しくはペプチドフラグメントに対し向けられたモノクローナル抗体は例えばHarlowら(1988、Antibodies、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor、ニューヨーク中)およびTuszynskiら(1988、Blood、72:109-115)に記述されるもののような公知のモノクローナル抗体製造手順を使用しても製造しうる。大量の所望のペプチドは化学合成技術を使用してもまた合成しうる。あるいは、所望のペプチドをコードするDNAをクローン化しかつ大量のペプチドの生成に適する細胞中で適切なプロモーター配列から発現させてよい。ペプチドに対し向けられたモノクローナル抗体は本明細書で引用されるところの標準的手順を使用して該ペプチドで免疫したマウスから生成させる。

20

【0153】

本明細書に記述される手順を使用して得られるモノクローナル抗体をコードする核酸は、当該技術分野で利用可能でありかつ例えばWrightら(1992、Critical Rev. Immunol. 12:125-168)およびその中に引用される参考文献に記述される技術を使用してクローン化かつシーケンシングしてよい。さらに、本発明の抗体は例えばWrightら(1992、Critical Rev. Immunol. 12:125-168)およびその中に引用される参考文献、ならびにGuら(1997、Thrombosis and Hematocyst 77:755-759)に記述される技術を使用して「ヒト化」してよい。本発明はB E H A Bのエピトープと特異的に反応性のヒト化抗体の使用もまた包含する。こうした抗体はB E H A B若しくはそのフラグメントを特異的に結合することが可能である。本発明のヒト化抗体はヒト枠組みを有しかつ抗体(限定されるものでないがB E H A B若しくはそのフラグメントと特異的に反応性のマウス抗体を挙げることができる)からの1個若しくはそれ以上の相補性決定領域(CDR)を有する。従って、例えば、B E H A Bに対するヒト化抗体は、神経膠腫、十分に分化した星状細胞腫、未分化星状細胞腫、多形グリア芽腫、上衣腫、乏突起膠腫、節細胞腫、混合性神経膠腫、脳幹神経膠腫、視神経膠腫、髄膜腫、松果体腫、下垂体腫瘍、下垂体腺腫、未分化神経外胚葉性腫瘍、神経鞘腫、血管腫、リンパ腫などのような原発性CNS腫瘍の処置で有用である。

30

40

【0154】

本発明で使用される抗体をヒト化する場合、該抗体はQueenら(米国特許第6,180,370号明細書)、Wrightら(1992、Critical Rev. Im

50

munol. 12: 125 - 168) およびその中に引用される参考文献、若しくは Gu  
 ら (1997、Thrombosis and Hematocyst 77(4): 7  
 55 - 759) に記述されるとおり生成させうる。Queenらにて開示される方法は、  
 部分的に、アクセプターヒト枠組み領域をコードするDNAセグメントに結合されたBE  
 H A Bのような所望の抗原に結合することが可能なドナー免疫グロブリンからのHおよび  
 L鎖相補性決定領域(CDR)をコードする組換えDNAセグメントを発現させることに  
 より製造されるヒト化免疫グロブリンを設計することに向けられる。一般的に言って、Q  
 ueenの特許における発明は、実質的にいかなるヒト化免疫グロブリンの設計に対しても  
 応用可能性を有する。Queenは、該DNAセグメントが、天然に連合した若しくは  
 異種のプロモーター領域を包含するヒト化免疫グロブリンのコーディング配列に作動可能  
 に連結された発現制御DNA配列を典型的に包含することができると説明している。発現  
 制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換若しくはトランスフェクトすることが可能なベ  
 クター中の真核生物プロモーター系であり得るか、または、該発現制御配列は、原核生物  
 宿主細胞を形質転換若しくはトランスフェクトすることが可能なベクター中の原核生物プ  
 ロモーター系であり得る。ベクターが適切な宿主に一旦組込まれば、導入されたヌクレ  
 オチド配列の高レベル発現に適する条件下で該宿主を維持し、そして、所望のとおり、ヒ  
 ト化L鎖、H鎖、L/H鎖二量体若しくは無傷の抗体、結合フラグメントまたは他の免疫  
 グロブリンの形態の収集および精製が後に続いてよい(Beychok、Cells o  
 f Immunoglobulin Synthesis、Academic Press、  
 ニューヨーク、(1979)、引用することにより本明細書に組み込まれる)。 10  
 20

#### 【0155】

多様なヒト細胞からのヒト定常領域(CDR)DNA配列は公知の手順に従って単離し  
 得る。好ましくは、ヒト定常領域のDNA配列は、第WO87/02671号明細書(引  
 用することにより本明細書に組み込まれる)に記述されるとおり不死化B細胞から単離す  
 る。本発明の抗体の製造で有用なCDRは、同様に、BEHABに結合することが可能な  
 モノクローナル抗体をコードするDNA由来であってよい。こうしたヒト化抗体は、限定  
 されるものでないがマウス、ラット、ウサギ若しくは他の脊椎動物を挙げるができる  
 抗体を産生することが可能ないずれかの便宜的な哺乳動物の供給源で公知の方法を使用し  
 て生成させうる。定常領域および枠組みのDNA配列に適する細胞、ならびに抗体が発現  
 かつ分泌される宿主細胞は多数の供給源、例えばAmerican Type Cult  
 ure Collection、バージニア州マナサスから得ることができる。 30

#### 【0156】

上で論考されたヒト化抗体に加え、天然の抗体配列に対する他の修飾は、当業者に公知  
 の多様な組換えDNA技術を利用して容易に設計かつ製造し得る。さらに、多様な異なる  
 ヒト枠組み領域は、BEHABに向けられた抗体をヒト化するための基礎として単独で若  
 しくは組合せで使用してよい。一般に、遺伝子の修飾は部位特異的突然変異誘発(Gil  
 lmanとSmith、Gene、8: 81 - 97(1979); Robert sら、1  
 987、Nature、328: 731 - 734)のような多様な公知の技術を使用して  
 容易に達成しうる。

#### 【0157】

あるいは、ファージ抗体ライブラリーを生成させうる。ファージ抗体ライブラリーを生  
 成させるために、最初に、該ファージ表面上で発現されるべき所望のタンパク質、例えば  
 所望の抗体を発現する細胞例えばハイブリドーマから単離されるmRNAからcDNAラ  
 イブラリーを得る。mRNAのcDNAコピーは逆転写酵素を使用して調製する。免疫グ  
 ロブリンフラグメントを指定するcDNAをPCRにより得、そして、生じるDNAを適  
 するバクテリオファージベクターにクローン化して、免疫グロブリン遺伝子を指定するD  
 NAを含んでなるバクテリオファージDNAライブラリーを生成させる。異種DNAを含  
 んでなるバクテリオファージライブラリーの作成手順は当該技術分野で公知でありかつ例  
 えばSambrookら(1989、Molecular Cloning: A Lab  
 oratory Manual、Cold Spring Harbor Labora 40  
 50

tory、ニューヨーク)に記述されている。

【0158】

所望の抗体をコードするバクテリオファージは、タンパク質の対応する結合タンパク質、例えば抗体が向けられる抗原に結合するためにそれが利用可能であるような様式でそれがその表面上に表示されるように工作してよい。従って、特異的抗体を発現するバクテリオファージを、対応する抗原を発現する細胞の存在下でインキュベートする場合に、バクテリオファージは該細胞に結合することができる。抗体を発現しないバクテリオファージは細胞に結合しないことができる。こうしたパニング技術は当該技術分野で公知でありかつ例えばWrightら(992、Critical Rev. Immunol. 12: 125-168)に記述されている。

10

【0159】

上述されたもののような方法はM13バクテリオファージディスプレイを使用するヒト抗体の製造のため開発された(Burtonら、1994、Adv. Immunol. 57: 191-280)。本質的には、抗体産生細胞の一集団から得たmRNAからcDNAライブラリーを生成させる。該mRNAは再配列された免疫グロブリン遺伝子をコードし、そして従って該cDNAはそれをコードする。増幅されたcDNAをM13発現ベクターにクローン化して、それらの表面上にヒトFabフラグメントを発現するファージのライブラリーを創製する。目的の抗体を表示するファージを抗原結合により選択し、そして細菌中で繁殖させて可溶性ヒトFab免疫グロブリンを産生させる。従って、慣習的モノクローナル抗体合成と対照的に、この手順は、ヒト免疫グロブリンを発現する細胞よりはむしろヒト免疫グロブリンをコードするDNAを不死化する。

20

【0160】

たった今提示された手順は抗体分子のFab部分をコードするファージの生成を記述する。しかしながら本発明はFab抗体をコードするファージの生成に単に制限されると解釈されるべきでない。むしろ、一本鎖抗体をコードするファージ(scFv/ファージ抗体ライブラリー)もまた本発明に包含する。Fab分子は完全なIg L鎖を含んでなる。すなわち、それらはL鎖の可変および定常双方の領域を含んでなるが、しかしH鎖の可変領域および第一の定常領域ドメイン(CH1)のみを包含する。一本鎖抗体分子はIg Fvフラグメントを含んでなるタンパク質の一本鎖を含んでなる。Ig Fvフラグメントは抗体のHおよびL鎖の可変領域のみを包含し、その中に含有される定常領域を有しない。scFv DNAを含んでなるファージライブラリーはMarksら(1991、J. Mol. Biol. 222: 581-597)に記述される手順に従って生成しうる。所望の抗体の単離のためそのように生成させたファージのパニングは、Fab DNAを含んでなるファージライブラリーについて記述されたものに類似の様式で実施する。

30

【0161】

本発明はまた、HおよびL鎖可変領域がほぼ全部の可能な特異性を包含するようにそれらが合成されていてよい合成のファージディスプレイライブラリーを包含するとも解釈されるべきである(Barbas、1995、Nature Medicine 1: 837-839; de Kruijffら 1995、J. Mol. Biol. 248: 97-105)。

40

VI. 組成物

本発明は、限定されるものでないが異なってグリコシル化された、過少グリコシル化BEHABおよび未グリコシル化BEHABを挙げることができるグリコシル化バリエーションBEHABアイソフォームを包含する。本発明のグリコシル化バリエーションBEHABは、変えられた、すなわち完全長のBEHAB上で見出される糖および炭水化物の完全な補充(complement)未満を伴うBEHAB分子を含んでなる。本明細書のデータにより開示されるとおり、グリコシル化バリエーションBEHABは、限定されるものでないが神経膠腫を挙げることができる原発性CNS腫瘍中のBEHABの主要なアップレギュレートされた形態である。従って、本発明は、とりわけ、原発性CNS腫瘍の診断ツール、癌を引き起こす突然変異、機能不全との神経細胞外マトリックスの相互作用を解明するた

50

めの研究ツールなどに有用であるグリコシル化バリエーション B E H A B を包含する。さらに、本発明のグリコシル化バリエーション B E H A B は原発性 C N S 腫瘍の検出、処置および診断のための組成物、方法およびキット中の試薬として有用である。

【0162】

グリコシル化バリエーション B E H A B は本明細書に開示される方法に従って作成し得る。すなわち、本発明は脳ホモジェネートの微粒分画からのグリコシル化バリエーション B E H A B の単離方法を含んでなり、かつ、さらに、完全長の B E H A B および G P I 結合型 B E H A B を包含する他の B E H A B 分子とのグリコシル化バリエーション B E H A B の識別方法を包含する。

【0163】

本発明は組換え細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B の生成方法をさらに含んでなる。すなわち、当業者は、本開示および本明細書のデータで備えをする場合に、B E H A B をコードする単離された核酸若しくはそのフラグメントで細胞をトランスフェクトすること、および細胞からグリコシル化バリエーション B E H A B を単離することによりグリコシル化バリエーション B E H A B を製造し得る。本目的上単離された核酸は、トランスフェクション方法および細胞中のタンパク質の発現方法がそうであるように本明細書の別の場所に開示されている。好ましくは、細胞は限定されるものでないが、*Oli-neu* 細胞を挙げることができるグリコシル化バリエーション B E H A B を発現する細胞である。

【0164】

本明細書に開示されるデータにより記述されるとおり、グリコシル化バリエーション B E H A B は多様な方法により完全長の B E H A B 若しくは G P I アンカー型 B E H A B と識別し得る。こうした方法は、S D S - P A G E 電気泳動、免疫蛍光および位置推定、免疫沈降などを包含する。さらに、当業者は、当該技術分野で既知かつ本明細書に記述される技術を使用してグリコシル化に基づきタンパク質の異なるアイソフォームを区別することが容易に可能であろう。

V I I . 方法

A . 原発性 C N S 腫瘍の治療方法

本発明は、部分的に、脳腫瘍を伴う哺乳動物の原発性 C N S 腫瘍の進行、浸潤性および生存時間において B E H A B が重要な役割を演じているという新規発見に基づく。本明細書に開示されるデータにより示されるとおり、B E H A B の切断は原発性 C N S 腫瘍の進行を増強し、そして、切断の阻害ならびに / 若しくは B E H A B およびその切断生成物の機能の阻害を哺乳動物における原発性 C N S 腫瘍の処置として使用し得る。全部の例において、原発性 C N S 腫瘍の治療であろうと診断であろうと、最も好ましい哺乳動物はヒトである。

【0165】

本発明は哺乳動物、好ましくはヒトにおける原発性 C N S 腫瘍の治療方法を包含する。これは、本明細書の別の場所に開示されるデータにより示されるとおり、B E H A B の切断ならびに / 若しくは B E H A B 切断生成物の機能、生物学的活性および発現が原発性 C N S 腫瘍の進行および浸潤性に決定的に重要であるからである。従って、本明細書に提示されるデータから明らかであるとおり、B E H A B の切断を阻害することならびに / 若しくは B E H A B 切断生成物の機能、生物学的活性および発現を阻害することが、原発性 C N S 腫瘍の処置としてはたらき得る。当業者は、本開示に基づき、B E H A B の切断を阻害することが、とりわけ、神経膠腫、十分に分化した星状細胞腫、未分化星状細胞腫、多形グリア芽腫、上衣腫、乏突起膠腫、節細胞腫、混合性神経膠腫、脳幹神経膠腫、視神経膠腫、髄膜腫、松果体腫、下垂体腫瘍、下垂体腺腫、未分化神経外胚葉性腫瘍、神経鞘腫、血管腫、リンパ腫、反応性神経膠症などの処置のための重要かつ新規の治療薬を提供することを認識するであろう。当業者はまた、原発性 C N S 腫瘍と同様に、グリア細胞の活性化および増殖が C N S すなわち脳および脊髄に対する傷害から生じることを認識するであろう。これらの傷害に由来するこうしたグリア細胞の活性化および増殖は当該技術分野で公知でありかつしばしば反応性神経膠症と称される。反応性神経膠症は例えば *S t r e*

10

20

30

40

50

it (2000、Toxicol. Pathol.、28:28-30) に詳述されている。本発明は哺乳動物、好ましくはヒトにおける反応性神経膠症の治療方法を包含する。

【0166】

B E H A B 切断の阻害剤を哺乳動物に投与し、それにより B E H A B 切断を低下させかつ治療的利益を提供する。当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、既知の若しくは将来開発されるべき広範な技術を使用して B E H A B 切断を阻害し得ることを認識するであろう。すなわち、本発明は哺乳動物における B E H A B の切断を阻害すること、ならびにそれにより原発性 C N S 腫瘍の進行および浸潤性を予防することを包含する。本発明は、哺乳動物における B E H A B 切断の阻害、例えば切断部位の封鎖、切断の原因であるプロテアーゼの滴定、および切断不可能な B E H A B 変異体の発現若しくは投与の方法を

10

【0167】

当業者は、本開示および本明細書に提示されるデータで備えをする場合に、B E H A B および/若しくはその切断生成物の機能、生物学的活性および発現の阻害剤を哺乳動物に投与することが、原発性 C N S 腫瘍を伴う哺乳動物に対する有益な治療薬を提供することをさらに理解するであろう。本発明は、B E H A B の発現ならびに切断生成物および/若しくはそれらのリガンドの結合の低下若しくは予防方法を包含する。本明細書に開示されるデータにより示されるとおり、B E H A B の増大されたレベルおよび B E H A B 切断生成物の生物学的活性が、原発性 C N S 腫瘍の高められた進行を媒介して低下された生存率およびより大きな腫瘍をもたらす。従って、B E H A B の発現または B E H A B 切断生成物の発現および/若しくは機能の阻害方法が本発明に包含される。

20

【0168】

当業者は、B E H A B 切断を阻害することが、切断部位を封鎖すること、切断の原因であるプロテアーゼを滴定すること、および切断不可能な B E H A B 変異体を発現かつ/若しくは投与することを包含することを理解するであろう。本発明はタンパク質上の切断部位を封鎖することによる B E H A B の切断の阻害方法を包含する。本明細書に開示されるとおり、切断部位は B E H A B タンパク質の G l u <sup>3 9 5</sup> - S e r <sup>2 9 6</sup> を含んでなる。従って、本切断部位のプロテアーゼへの接近不能が B E H A B の切断を予防し得る。本発明は従ってプロテアーゼによる切断部位への接近を封鎖することによる B E H A B の切断の阻害方法を包含する。一例として、該切断部位を含んでなるタンパク質の一部に対する抗体若しくは他のリガンド、または該切断部位と相互作用するペプチド若しくは小分子が、プロテアーゼによる該タンパク質への接近を封鎖してそれにより B E H A B 切断を阻害するとみられる。当業者は、該開示および本明細書に開示されるデータで備えをする場合に、抗体が切断部位を含んでなる短いペプチドを若しくは B E H A B タンパク質のより大きな部分に特異的に結合し得るが、但し該抗体若しくはリガンドが切断部位を封鎖することを認識するであろう。

30

40

【0169】

B E H A B に対する抗体の生成方法は当該技術分野で公知であり ( M a t t h e w s ら、2000、J . B i o l . C h e m . 275:22695-22703) そして本明細書の別の場所に開示されている。さらに、タンパク質のあるエピトープを特異的に結合する抗体の製造方法は当該技術分野で公知でありかつ本明細書および別の場所 ( H a r l o w ら (1988、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor、ニューヨーク) を参照されたい) に開示される標準的方法を使用して達成し得る。

【0170】

当業者は、タンパク質、タンパク質をコードする核酸構築物若しくは双方として抗体を

50

投与し得ることを認識するであろう。タンパク質若しくはタンパク質をコードする核酸構築物を細胞若しくは組織に投与するための本明細書の別の場所に開示される多数のベクターおよび他の組成物ならびに方法が公知である。従って、本発明は、BEHABに特異的である抗体若しくは抗体（合成抗体）をコードする核酸の投与方法を包含する（Sambrookら、1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク；Ausubelら、1997、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、ニューヨーク）。

**【0171】**

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、哺乳動物中に存在するBEHAB上の切断部位を封鎖するような抗体を投与し得ることを理解するであろう。さらに、本発明はBEHABと特異的に結合する抗体若しくは該抗体をコードする核酸を投与することを含んでなり、ここで、該分子は抗体がBEHABと結合しかつそのGPIアンカー型の発現若しくは分泌を予防するような細胞内保持配列をさらに含んでなる。頻りに「イントラボディ」と称されるこうした抗体は当該技術分野で公知でありかつ例えばMarascoら（米国特許第6,004,490号明細書）およびBeerliら（1996、Breast Cancer Research and Treatment 38:11-17）に記述されている。従って、本発明は、BEHABが哺乳動物中に存在する場合にBEHAB切断を阻害することを含んでなる方法、ならびに、細胞膜上にそのGPIで固定された形態若しくはその分泌された形態で存在しているBEHABを阻害することを含んでなるBEHAB切断の阻害方法、および将来既知になるような方法を包含する。

**【0172】**

本発明はさらに、有効量のグリコシル化バリエーションBEHABアイソフォーム阻害剤を哺乳動物に投与することによるヒトを包含する哺乳動物における原発性CNS腫瘍若しくは反応性神経膠症の治療方法を含んでなる。すなわち、本発明は、神経膠腫、十分に分化した星状細胞腫、未分化星状細胞腫、多形グリア芽腫、上皮腫、乏突起膠腫、節細胞腫、混合性神経膠腫、脳幹神経膠腫、視神経膠腫、髄膜腫、松果体腫、下垂体腫瘍、下垂体腺腫、未分化神経外胚葉性腫瘍、神経鞘腫、血管腫、リンパ腫などを包含する哺乳動物における原発性CNS腫瘍の治療方法を包含する。該方法は抗体を哺乳動物に投与することを含んでなり、ここで該抗体若しくは他のリガンドがグリコシル化バリエーションBEHABアイソフォームに結合しかつ従って原発性CNS腫瘍を治療する。これは、本明細書に開示されるデータにより示されるとおり、グリコシル化バリエーションBEHABは神経膠腫などを包含する原発性CNS腫瘍中に存在するBEHABの主要なアイソフォームであるからである。従って、本発明はCNS中のグリコシル化バリエーションBEHABの活性の阻害および従って原発性CNS腫瘍の治療において有用である。

**【0173】**

グリコシル化バリエーションBEHABアイソフォームを特異的に結合する抗体の生成および投与方法は当該技術分野で公知でありかつ本明細書の別の場所に記述されている。本発明は、過少グリコシル化BEHABアイソフォームおよび未グリコシル化BEHABアイソフォームを包含するグリコシル化バリエーションBEHABアイソフォームを結合するイントラボディ、タンパク質として投与される抗体、および抗体をコードする核酸構築物として投与される抗体をさらに含んでなる。

**【0174】**

本発明はまた、BEHAB切断の原因であるプロテアーゼを阻害することによるBEHAB切断の阻害方法も包含する。これは、本明細書に提示されるデータから明らかであるとおりに、BEHABが特定部位でプロテアーゼにより切断されるが、しかしBEHABの切断を阻害することがとりわけより小さな腫瘍体積および上昇された動物の生存率をもたらすからである。従って、本発明はBEHABを切断するプロテアーゼを阻害することによるBEHAB切断の阻害方法を包含する。

10

20

30

40

50

## 【0175】

当業者は、プロテアーゼを阻害することが有効量のプロテアーゼ阻害剤を哺乳動物に投与することを含んでなることを認識するであろう。こうした阻害剤は、限定されるものではないが、メタロプロテイナーゼ2の組織阻害剤、メタロプロテイナーゼ3の組織阻害剤、ADAMTSプロテアーゼの阻害剤を包含する化合物、小分子、抗体、若しくはBEHABを切断するプロテアーゼを特異的に結合する他の分子などを挙げるができる。特異的プロテアーゼ阻害剤は当該技術分野で公知でありかつ例えばMartel-Pelletierら(2001、Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. 15: 805-29)に論考されている。当業者は、本開示および本明細書の教示で備えをする場合に、哺乳動物へのプロテアーゼ阻害剤の投与方法を容易に理解することができ、かつ、従って、本発明は、原発性CNS腫瘍の処置としてのプロテアーゼ阻害剤を包含する。

10

## 【0176】

本発明はまた、BEHAB切断の原因であるプロテアーゼを滴定することによるBEHAB切断の阻害方法も包含する、これは、本明細書に提示されるデータから明らかであるとおり、BEHABが特定部位でプロテアーゼにより切断されるが、しかし本発明の変異体BEHABは*in vivo*および*in vitro*双方のアッセイで測定されたとおりプロテアーゼにより切断され得ないからである。さらに、BEHABを切断するプロテアーゼは他のメタロプロテイナーゼに比較して制限された量および制限された位置で身体中に存在する。従って、切断不可能なBEHABは、プロテアーゼが内因性BEHABを切断するために利用可能でないようにそれを滴定することが可能である。当業者は、プロテアーゼを滴定することが、BEHABを切断するのに利用可能である哺乳動物、好ましくはヒト中のプロテアーゼの機能的濃度を低下させる基質を提供することを包含することを認識するであろう。プロテアーゼを滴定することは、プロテアーゼにより認識かつ結合される基質を提供してBEHABを切断するのに利用可能なプロテアーゼ若しくはプロテアーゼの活性部位の数の減少をもたらすことをさらに包含する。

20

## 【0177】

本明細書の別の場所により完全に記述されるとおり、変異体の切断不可能な形態のBEHABを発現する腫瘍は、内因性BEHABの存在下であっても、動物においてとりわけより小さな腫瘍体積および増大された生存率をもたらす。これらのデータは、内因性BEHABが細胞中に存在する場合でさえ、切断不可能なBEHABの付加的な存在が技術で許容できる*in vivo*の原発性CNS腫瘍モデルにおいて原発性CNS腫瘍の低下された進行をもたらすことを示す。該データはさらに、外因性の変異体BEHABを発現する腫瘍を外因性の完全長BEHABを発現する腫瘍と比較する場合に、変異体BEHABを発現する腫瘍がより小さくかつより長い動物の生存時間をもたらすの双方であることを示す。いずれかの特定の論理により束縛されることを願わない一方で、本明細書に提示されるデータは、切断不可能なBEHAB変異体がBEHAB切断の原因であるプロテアーゼを滴定し、そして低下された切断の結果として低下された腫瘍の進行が続いて起こることを示す。

30

## 【0178】

当業者は、本開示および本明細書に開示されるデータに基づき、プロテアーゼの切断不可能な基質が原発性CNS腫瘍に苦しめられている動物における腫瘍の大きさを低下させかつ生存率を増大させることにより腫瘍の進行を阻害することを認識するであろう。従って、本発明は、BEHABを切断するプロテアーゼを滴定することによる原発性CNS腫瘍の治療方法を包含する。

40

## 【0179】

BEHABを切断するプロテアーゼを滴定するのに使用される化合物は、限定されるものではないがペプチド、タンパク質、ミメトープ(mimotope)およびペプチド模倣物を挙げるができる。本明細書の別の場所に開示されるとおり、切断不可能なBEHAB(変異体BEHAB、配列番号3)は切断部位の周囲のアミノ酸配列中の1個の突然

50

変異、とりわけGlu-Ser-Glu-Ser-Arg-GlyのGlu-Ser-Glu-Asn-Val-Tyr(それぞれ配列番号1および配列番号2)への突然変異を伴う天然のBEHABタンパク質を含んでなる。当業者は、完全長の変異体BEHAB由来のペプチドが配列番号3に示される完全長の変異体BEHABタンパク質と同一のプロテアーゼ滴定特性を表し得ることを容易に認識するであろう。それにより、本発明は完全長の変異体BEHABタンパク質、およびプロテアーゼ滴定活性を含んでなる短縮変異体BEHABペプチドを包含する。

## 【0180】

本明細書で使用されるところのアミノ酸は、以下の表に示されるところのそれらの完全な名称、それらに対応する三文字記号若しくはそれらに対応する一文字記号により表される：

10

## 【0181】

## 【表1】

| <u>完全な名前</u> | <u>三文字記号</u> | <u>一文字記号</u> |
|--------------|--------------|--------------|
| アスパラギン酸      | Asp          | D            |
| グルタミン酸       | Glu          | E            |
| リシン          | Lys          | K            |
| アルギニン        | Arg          | R            |
| ヒスチジン        | His          | H            |
| チロシン         | Tyr          | Y            |
| システイン        | Cys          | C            |
| アスパラギン       | Asn          | N            |
| グルタミン        | Gln          | Q            |
| セリン          | Ser          | S            |
| トレオニン        | Thr          | T            |
| グリシン         | Gly          | G            |
| アラニン         | Ala          | A            |
| バリン          | Val          | V            |
| ロイシン         | Leu          | L            |
| イソロイシン       | Ile          | I            |
| メチオニン        | Met          | M            |
| プロリン         | Pro          | P            |
| フェニルアラニン     | Phe          | F            |
| トリプトファン      | Trp          | W            |

20

30

40

## 【0182】

本発明のペプチドは、Stewartら(Solid Phase Peptide Synthesis、第2版、1984、Pierce Chemical Company、イリノイ州ロックフォード)により記述されるところの、およびBodanszkyとBodanszky(The Practice of Peptide Synthesis、1984、Springer-Verlag、ニューヨーク)により記述さ

50

れるところの標準的な十分に確立した固相ペプチド合成 (SPPS) により容易に製造しうる。最初に、適して保護されたアミノ酸残基をそのカルボキシル基により架橋ポリスチレン若しくはポリアミド樹脂のような誘導体化した不溶性ポリマー支持体に結合する。「適して保護された」は、アミノ酸の - アミノ基およびいずれかの側鎖官能基の双方上の保護基の存在を指す。側鎖保護基は一般に、合成を通じて使用される溶媒、試薬および反応条件に対し安定であり、そして最終的なペプチド生成物に影響を及ぼさないことができる条件下で除去可能である。オリゴペプチドの段階的合成は、最初のアミノ酸からの N - 保護基の除去、および所望のペプチドの配列中の次のアミノ酸のカルボキシル端のそれへの結合により実施する。このアミノ酸もまた適して保護されている。生じるアミノ酸のカルボキシルは、カルボジイミド、対称性酸無水物またはヒドロキシベンゾトリアゾール若しくはペンタフルオロフェニルエステルのような「活性エステル」基への形成のような反応性基への形成により、支持体に結合されたアミノ酸の N 末端と反応するように活性化し得る。

10

#### 【0183】

固相ペプチド合成方法の例は、 - アミノ保護基として tert - ブチルオクスカルボニルを利用した BOC 法、およびアミノ酸残基の - アミノを保護するために 9 - フルオレニルメチルオクスカルボニルを利用する FMOC 法を包含し、その双方の方法は当業者により公知である。

#### 【0184】

N および / 若しくは C - 封鎖基の組込みは固相ペプチド合成法に慣習的なプロトコルを使用してもまた達成し得る。C 末端封鎖基の組込みのためには、例えば、所望のペプチドの合成は、典型的に、樹脂からの切断が所望の C 末端封鎖基を有するペプチドをもたらすように化学的に修飾されている支持樹脂を固相として使用して実施する。C 末端が一級アミノ封鎖基をもつペプチドを提供するためには、例えば、ペプチド合成が完了した場合にヒドロフッ素酸での処理が所望の C 末端でアミデート化されたペプチドを遊離するように p - メチルベンズヒドリルアミン (MBHA) 樹脂を使用して合成を実施する。同様に、C 末端での N - メチルアミン封鎖基の組込みは、HF (ヒドロフッ素酸) 処理に際して N - メチルアミデート化された C 末端をもつペプチドを遊離する N - メチルアミノエチル誘導体化 DV B 樹脂を使用して達成される。エステル化による C 末端の封鎖はまた慣習的手順を使用しても達成し得る。これは、所望のアルコールとのその後の反応を見込むように樹脂からの側鎖ペプチドの遊離を可能にしてエステル官能基を形成させる樹脂 / 封鎖基の組合せの使用を必要とする。メトキシアルコキシベンジルアルコール若しくは同等のリンカーで誘導体化した DV B 樹脂と組合せの FMOC 保護基をこの目的上使用し得、支持体からの切断はジクロロメタン中 TFA により遂げられる。その後、例えば DCC での適して活性化されたカルボキシル官能基のエステル化を、所望のアルコールの付加、次いで脱保護およびエステル化されたペプチド生成物の単離により進行させ得る。

20

30

#### 【0185】

N 末端封鎖基の組込みは、例えば適する無水物およびニトリルでの処理により、合成されたペプチドが未だ樹脂に結合されている間に達成し得る。N 末端にアセチル封鎖基を組込むためには、例えば、樹脂に結合されたペプチドをアセトニトリル中 20% 無水酢酸で処理し得る。その後、N - 封鎖ペプチド生成物を樹脂から切断し、脱保護しかつその後単離し得る。

40

#### 【0186】

化学的若しくは生物学的いずれかの合成技術から得たペプチドが所望のペプチドであることを確実にするために、ペプチド組成の分析を実施すべきである。こうしたアミノ酸組成分析は、高分解能質量分析計を使用して実施して、ペプチドの分子量を決定しうる。あるいは、若しくは付加的には、ペプチドのアミノ酸含量は、水性酸中でペプチドを加水分解すること、ならびに HPLC 若しくはアミノ酸分析機を使用して混合物の成分を分離、同定かつ定量することにより確認し得る。ペプチドを連続的に分解しかつアミノ酸を順序よく同定するタンパク質シーケンサーもまたペプチドの配列を決定的に決定するのに使

50

用してよい。

【0187】

ペプチドはその使用前に精製して汚染物質を除去する。この点に関して、ペプチドは適切な規制当局により若しくは特定の用途のために設定された基準に合致するように精製することができることが認識されるであろう。例えばC<sub>4</sub>-、C<sub>8</sub>-若しくはC<sub>18</sub>-シリカのようなアルキル化シリカカラムを使用する逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を包含する多数の慣習的精製手順のいずれか1つを使用して必要とされるレベルの純度を達成しうる。増大する有機物含量の勾配移動相、例えば通常は少量のトリフルオロ酢酸を含有する水性緩衝液中のアセトニトリルを一般に使用して精製を達成する。イオン交換クロマトグラフィーもまた、それらの電荷に基づきペプチドを分離するのに使用し得る。

10

【0188】

当業者は、BEHABを切断するプロテアーゼを滴定することが可能な変異体BEHABタンパク質若しくはペプチドを変異体BEHABタンパク質若しくはペプチドをコードする単離された核酸として哺乳動物に投与してよいことを容易に認識するであろう。細胞若しくは哺乳動物中での所望のタンパク質の発現方法は当該技術分野で公知であり、そして、本開示および本明細書のデータと組合せられる場合に、当業者は、過度の実験を伴わずに細胞若しくは哺乳動物中で変異体BEHABタンパク質若しくはペプチドを発現させることが可能であろう。

【0189】

当業者は、所望のタンパク質若しくはペプチドをコードする単離された核酸を含んでなるベクター若しくは発現ベクターの細胞若しくは哺乳動物中への導入を包含する、細胞若しくは哺乳動物中でのタンパク質若しくはペプチドの発現のための多くの方法が存在することを認識するであろう。当業者はさらに、ベクターは配列番号4の単離された核酸若しくはそのなんらかの生物学的に活性の部分を含み得ることを認識するであろう。

20

【0190】

本発明はまた本発明の変異体BEHABタンパク質およびペプチドのミメトープも包含する。本明細書で使用されるところの変異体BEHABタンパク質若しくはペプチドのミメトープは、こうした変異体BEHABタンパク質若しくはペプチドの活性（例えばBEHABを切断するプロテアーゼを滴定してそれにより天然のBEHABの切断を予防する能力）を模倣することが可能であるいかなる化合物も指す。しばしば、ミメトープは変異体BEHABタンパク質若しくはペプチドを模倣する構造を有するからである。しかしながら、ミメトープは該ミメトープが変異体BEHABタンパク質若しくはペプチドを機能的に模倣する限りは該タンパク質に類似の構造を有する必要はないことが注目されるべきである。ミメトープは、限定されるものでないが：分解に対するそれらの感受性を低下させるよう修飾されているペプチド；抗イディオタイプおよび/若しくは触媒的酵素またはそれらのフラグメント；単離されたタンパク質の非タンパク質性の免疫原性の部分（例えば炭水化物構造）；核酸を包含する合成若しくは天然の有機若しくは無機分子；ならびに/またはいずれかの他のペプチド模倣化合物を挙げることができる。本発明のミメトープは本発明の変異体BEHABタンパク質若しくはペプチドのコンピュータで生成させた構造を使用して設計し得る。ミメトープはまた、オリゴヌクレオチド、ペプチド若しくは他の有機分子のような分子の無作為サンプルを生成させること、および対応する結合パートナー（例えばBEHABを切断するプロテアーゼ若しくは抗BEHAB抗体）を使用するアフィニティークロマトグラフィー技術によりこうしたサンプルをスクリーニングすることによっても得ることができる。好ましいミメトープは、本発明の変異体BEHABタンパク質若しくはペプチド、とりわけ変異体BEHABタンパク質の切断部位に構造的にかつ/若しくは機能的に類似であるペプチド模倣化合物である。ミメトープおよびペプチド模倣物の生成方法は当該技術分野で公知でありかつ例えばKazmierski (1999, Peptidomimetics Protocols (Methods in Molecular Medicine Vol. 23) Humana Press、ニュ

30

40

50

ージャー州トトワ)に詳述されている。

【0191】

本発明はまた、哺乳動物におけるBEHABの発現および/若しくは活性の阻害方法も包含する。当業者は、本開示および本明細書に開示されるデータで備えをする場合に、より高レベルのBEHAB発現が、原発性CNS腫瘍に苦しめられている哺乳動物において腫瘍の大きさを増大させかつ生存率を低下させることを理解するであろう。すなわち、本明細書の別の場所に提示されるデータは、BEHABを過剰発現する原発性CNS腫瘍を伴う哺乳動物が、正常レベルのBEHABを発現する哺乳動物若しくは変異体BEHABを発現する哺乳動物と比較した場合により大きな腫瘍体積およびより短い生存時間を有することを最初に示す。従って、当業者は、原発性CNS腫瘍の治療方法がBEHAB発現を阻害することを包含することを確実に認識するであろう。

10

【0192】

BEHABの発現および/若しくは活性の阻害剤を哺乳動物に投与してそれによりBEHABを減少させかつ治療的利益を提供する。当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、当該技術分野で公知の若しくは将来開発されるべき非常に多数の技術を使用してBEHABを阻害し得ることを認識するであろう。すなわち、本発明はBEHAB発現を阻害すること、例えば転写および/若しくは翻訳の阻害を包含する。これは、本明細書の別の場所に開示されるデータにより示されるとおり、低下されたレベルのBEHAB発現および/若しくは活性が、限定されるものでないが低下された腫瘍の大きさおよび上昇された生存率を挙げることができる多様な効果を媒介したからである。従って、BEHABを阻害することは、限定されるものでないが該タンパク質をコードする核酸の翻訳および/若しくは転写を阻害することを挙げることができる。

20

【0193】

さらに、当業者は、本明細書の別の場所に提供される開示に基づき、BEHABの阻害が限定されるものでないが該分子の生物学的活性を阻害することを挙げることができることを理解するであろう。これは、本明細書の別の場所に開示されるデータが示すように、BEHAB活性の阻害が、BEHABが内因性プロテアーゼにより切断されないために、原発性CNS腫瘍の進行を制限するからである。これらのデータは、BEHAB活性の阻害が限定されるものでないが原発性CNS腫瘍などを挙げることができる疾患の処置に治療的利益を提供することを示す。

30

【0194】

本発明はBEHABをコードする核酸の発現を阻害することによりBEHABを阻害することを包含する。遺伝子の発現の阻害方法は当業者に公知であり、そしてリボザイム若しくはアンチセンス核酸分子の使用を包含する。

【0195】

アンチセンス核酸分子はmRNA分子のなんらかの部分に相補的であるDNA若しくはRNA分子である。細胞中に存在する場合、アンチセンス核酸は既存のmRNA分子にハイブリダイズしかつ遺伝子産物への翻訳を阻害する。アンチセンス核酸分子を使用して遺伝子の発現を阻害することは、アンチセンス核酸分子の細胞中での発現方法がそうであるように(Inoue、1993、米国特許第5,190,931号明細書)当該技術分野で公知である(Marcus-Sekura、1988、Anal.Biochem.172:289)。

40

【0196】

本発明はリボザイムを使用してBEHABの発現を阻害することを包含する。遺伝子発現を阻害するためにリボザイムを使用することは当業者に公知である(Cechら、1992、J.Biol.Chem.267:17479-17482;Hampelら、1989、Biochemistry28:4929-4933;Altmanら、1992、米国特許第5,168,053号明細書)。リボザイムは他の一本鎖RNA分子を切断する能力をもつ触媒的RNA分子である。リボザイムは配列特異的であることが既知であり、そして従って特定のヌクレオチド配列を認識するよう改変し得(Cechら、1

50

988、J. Amer. Med. Assn. 260:3030-3034)、特定のmRNA分子の選択的切断を可能にする。BEHABのヌクレオチド配列が当該技術分野で公知である(Hockfieldら、1997、米国特許第5,635,370号明細書)ことを考えれば、当業者は、本明細書に組込まれる開示および参考文献を提供されて、過度の実験を伴わずにアンチセンスポリヌクレオチド若しくはリボザイムを合成し得る。

【0197】

当業者は、本開示および本明細書に提示されるデータで備えをする場合に、BEHABの切断が原発性CNS腫瘍の進行を媒介することをさらに認識するであろう。いずれかの特定の論理により束縛されることを願わない一方、BEHABは通常は低レベルで内因性に発現されかつ正常の発現の間に原発性CNS腫瘍を必ずしも引き起こさない一方で、BEHABの切断若しくはより具体的には切断事象の産物が哺乳動物において原発性CNS腫瘍の進行を媒介すると理論上想定し得る。それにより、当業者により認識されるであろうとおり、BEHAB切断生成物の活性を阻害することを、原発性CNS腫瘍に苦しめられている哺乳動物の治療方法として使用し得る。

10

【0198】

本発明はまた、本発明の方法を実施するための適切な抗体、タンパク質若しくはペプチド、ミメトープ、ペプチド模倣物、および/または単離された核酸の製薬学的組成物の使用も包含し、該組成物は適切な抗体、タンパク質若しくはペプチド、ミメトープ、ペプチド模倣物、および/または単離された核酸ならびに製薬学的に許容できる担体を含んでなる。

20

【0199】

本明細書で使用されるところの「製薬学的に許容できる担体」という用語は、適切な抗体、タンパク質若しくはペプチド、ミメトープ、ペプチド模倣物、および/または単離された核酸を組合せることができかつ組合せ後に適切な抗体、タンパク質若しくはペプチド、ミメトープ、ペプチド模倣物、および/または単離された核酸を哺乳動物に投与するのに使用し得る化学的組成物を意味している。

【0200】

本発明を実施するのに有用な製薬学的組成物は1ng/kg/日と100mg/kg/日との間の用量を送達するように投与しうる。一態様において、本発明は、哺乳動物において1μMと10μMとの間の本発明の化合物の濃度をもたらす用量の投与を想像している。

30

【0201】

本発明の方法で有用である製薬学的組成物は、経口の固体製剤、眼、坐剤、エアゾル剤、局所若しくは他の類似の製剤で全身に投与してよい。それらは硬膜下腔内に、脳室内に、脳実質内に、直接注入を介して、若しくは生物工作されたポリマーを介してCNS中に直接投与し得る。適切な抗体、タンパク質若しくはペプチド、ミメトープ、ペプチド模倣物、および/または単離された核酸に加え、こうした製薬学的組成物は、製薬学的に許容できる担体および薬物投与を高めかつ助長することが既知の他の成分を含有してよい。ナノ粒子、リボソーム、再封止赤血球および免疫学に基づく系のような他の可能な製剤もまた、本発明の方法に従って適切なヒペリシン誘導体を投与するのに使用してよい。

40

【0202】

本明細書に記述される方法のいずれかを使用して同定される化合物を本明細書に開示される疾患の処置のため処方かつ哺乳動物に投与してよいを今や記述する。

【0203】

本発明は、有効成分として本明細書に開示される疾患の治療に有用な化合物を含んでなる製薬学的組成物の製造および使用を包含する。こうした製薬学的組成物は、被験体への投与に適する形態の有効成分単独よりなっており、あるいは、製薬学的組成物は、有効成分および1種若しくはそれ以上の製薬学的に許容できる担体、1種若しくはそれ以上の付加的な成分またはこれらのなんらかの組合せを含んでよい。有効成分は、当該技術分野で公知であるような生理学的に許容できる陽イオン若しくは陰イオンと組合せでのような

50

生理学的に許容できるエステル若しくは塩の形態で製薬学的組成物中に存在してよい。

【0204】

本明細書で使用されるところの「製薬学的に許容できる担体」という用語は、有効成分を組合せてよくかつ組合せ後に有効成分を被験体に投与するのに使用し得る化学的組成物を意味している。

【0205】

本明細書で使用されるところの「生理学的に許容できる」エステル若しくは塩という用語は、該組成物が投与されるべきである被験体に対し有害でない、製薬学的組成物のいずれの他の成分とも適合性である有効成分のエステル若しくは塩の形態を意味している。

【0206】

本明細書に記述される製薬学的組成物の製剤は薬理学の技術分野で既知の若しくはこの後に開発されるいかなる方法により製造してもよい。一般に、こうした調製 ( p r e p a r a t o r y ) 方法は、有効成分を担体または1種若しくはそれ以上の他の付属成分との連合にもたらず段階、およびその後必要な若しくは所望の場合は生成物を所望の単一若しくは複数用量単位に造形若しくは包装する段階を包含する。

10

【0207】

本明細書に提供される製薬学的組成物の記述は原則的にヒトへの倫理的投与に適する製薬学的組成物に向けられるとは言え、こうした組成物は全部の種類哺乳動物への投与に一般に適することが当業者により理解されるであろう。製薬学的組成物を多様な動物への投与に適するようにするためのヒトへの投与に適する該組成物の改変は十分に理解されており、そして、通常に熟練した家畜薬理学者は単に通常の(あれば)実験でこうした改変を設計かつ実施し得る。本発明の製薬学的組成物の投与を企図している被験体は、限定されるものでないがヒトおよび他の霊長類、畜牛、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコおよびイヌのような商業的に関連する哺乳動物を包含する哺乳動物、げっ歯類(ラットおよびマウスを包含する)、ニワトリ、アヒル、ガチョウおよびシチメンチョウのような商業的に関連する鳥類を包含する鳥類を挙げることができる。

20

【0208】

本発明の方法で有用である製薬学的組成物は、経口、直腸、膺、非経口、局所、肺、鼻内、頬側、眼、硬膜下腔内、脳室内、脳実質内若しくは別の投与経路に適する製剤で製造、包装若しくは販売してよい。他の企図している製剤は突起状ナノ粒子、リポソーム製剤、有効成分を含有する再封止赤血球および免疫学に基づく製剤を包含する。

30

【0209】

本発明の製薬学的組成物は、バルクで、単一単位用量として若しくは複数の単一単位用量として製造、包装若しくは販売してよい。本明細書で使用されるところの「単位用量」は予め決められた量の有効成分を含んでなる製薬学的組成物の個別の量である。有効成分の量は一般に、被験体に投与されるであろう有効成分の投薬量、または例えばこうした投薬量の1/2若しくは1/3のようなこうした投薬量の便宜的画分に等しい。

【0210】

本発明の製薬学的組成物中の有効成分、製薬学的に許容できる担体およびいずれかの付加的な成分の相対量は、治療される被験体の正体 ( i d e n t i t y )、大きさおよび状態に依存して、また、該組成物が投与されるべきである経路にさらに依存して変動することができる。例として、該組成物は0.1%と100%(w/w)との間の有効成分を含んでよい。

40

【0211】

有効成分に加え、本発明の製薬学的組成物は1種若しくはそれ以上の付加的な製薬学的有効成分をさらに含んでよい。とりわけ企図している付加的な剤は制吐薬、ならびにシアン化物およびシアン酸塩スカベンジャーのようなスカベンジャーを包含する。

【0212】

本発明の製薬学的組成物の制御放出若しくは徐放性製剤を、慣習的技術を使用して作成してよい。

50

## 【0213】

経口投与に適する本発明の製薬学的組成物の製剤は、それぞれ予め決められた量の有効成分を含有する、限定されるものでないが錠剤、硬若しくは軟カプセル剤、カシエ剤、トローチ剤または舐剤を挙げることができる個別の固体の投与単位の形態で製造、包装若しくは販売してよい。経口投与に適する他の製剤は、限定されるものでないが粉末状若しくは顆粒状製剤、水性若しくは油性懸濁剤、水性若しくは油性溶液または乳剤を挙げることができる。

## 【0214】

本明細書で使用されるところの「油性」液体は炭素含有液体分子を含んでなりかつ水より小さい極性の特徴を表すものである。

## 【0215】

有効成分を含んでなる錠剤は、例えば、場合によっては1種若しくはそれ以上の付加的な成分とともに有効成分を圧縮若しくは成形することにより作成してよい。圧縮錠剤は、結合剤、滑沢剤、賦形剤、表面活性剤および分散助剤の1種若しくはそれ以上と場合によっては混合される粉末若しくは顆粒状調製物のような自由に流動する形態の有効成分を適する装置中で圧縮することにより製造してよい。成形錠剤は、有効成分、製薬学的に許容できる担体、および該混合物を湿らせるのに少なくとも十分な液体の混合物を適する装置中で成形することにより作成してよい。錠剤の製造で使用される製薬学的に許容できる賦形剤は、限定されるものでないが不活性希釈剤、顆粒化剤および崩壊剤、結合剤ならびに滑沢剤を挙げることができる。既知の分散助剤は、限定されるものでないがバレイシヨデンプンおよびデンプングリコール酸ナトリウムを挙げることができる。既知の表面活性剤は限定されるものでないがラウリル硫酸ナトリウムを挙げることができる。既知の希釈剤は、限定されるものでないが炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、乳糖、微晶質セルロース、リン酸カルシウム、リン酸水素カルシウムおよびリン酸ナトリウムを挙げることができる。既知の顆粒化剤および崩壊剤は限定されるものでないがトウモロコシデンプンおよびアルギン酸を挙げることができる。既知の結合剤は、限定されるものでないがゼラチン、アラビアゴム、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンおよびヒドロキシプロピルメチルセルロースを挙げることができる。既知の滑沢剤は限定されるものでないがステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、シリカおよびタルクを挙げることができる。

## 【0216】

錠剤はコーティングしなくてもよいが、若しくはそれらは被験体の胃腸管中での遅延崩壊を達成してそれにより有効成分の持続性の放出および吸収を提供するための既知の方法を使用してコーティングしてよい。例として、グリセリルモノステアレート若しくはグリセリルジステアレートのような物質を使用して錠剤をコーティングしてよい。さらに例として、錠剤は、米国特許第4,256,108号；同第4,160,452号；および同第4,265,874号明細書に記述される方法を使用してコーティングして浸透圧制御放出錠剤を形成してもよい。錠剤は、製薬学的に洗練されかつ味のよい製剤を提供するために、甘味料、着香料、着色剤、保存剤若しくはこれらのなんらかの組合せをさらに含んでもよい。

## 【0217】

有効成分を含んでなる硬カプセルはゼラチンのような生理学的に分解可能な組成物を使用して作成してよい。こうした硬カプセル剤は有効成分を含んでなり、そして例えば炭酸カルシウム、リン酸カルシウム若しくはカオリンのような不活性の固体の希釈剤を包含する付加的な成分をさらに含んでもよい。

## 【0218】

有効成分を含んでなる軟ゼラチンカプセルはゼラチンのような生理学的に分解可能な組成物を使用して作成してよい。こうした軟カプセル剤は、水またはラッカセイ油、流動パラフィン若しくはオリーブ油のような油媒体と混合されていてもよい有効成分を含んでなる。

10

20

30

40

50

## 【0219】

経口投与に適する本発明の製薬学的組成物の液体製剤は、液体の形態で、または使用前の水若しくは別の適するベヒクルとの再構成に意図されている乾燥生成物の形態でのいずれかで製造、包装かつ販売してよい。

## 【0220】

液体懸濁剤は、水性若しくは油性ベヒクル中の有効成分の懸濁の慣習的達成方法を使用して製造してよい。水性ベヒクルは例えば水および等張の生理的食塩水を包含する。油性ベヒクルは、例えばアーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油若しくはヤシ油のような植物油、分画植物油および流動パラフィンのような鉱物油を包含する。液体懸濁剤は、限定されるものでないが懸濁化剤、分散助剤若しくは湿潤剤、乳化剤、粘滑剤、保存剤、緩衝剤、塩、着色料、着色剤および甘味料を挙げることができる1種若しくはそれ以上の付加的な成分をさらに含んでもよい。油性懸濁剤は増粘剤をさらに含んでもよい。既知の懸濁化剤は、限定されるものでないがソルビトールシロップ、硬化可食脂肪、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガム、アラビアゴム、およびカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースのようなセルロース誘導体を挙げることができる。既知の分散助剤若しくは湿潤剤は、限定されるものでないがレシチンのような天然に存在するホスファチド、脂肪酸、長鎖脂肪アルコール、脂肪酸およびヘキシトール由来の部分エステル、若しくは脂肪酸およびヘキシトール無水物由来の部分エステルとのアルキレンオキシドの縮合生成物（例えばそれぞれポリオキシエチレンステアレート、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエートおよびポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）を挙げることができる。既知の乳化剤は限定されるものでないがレシチンおよびアラビアゴムを挙げることができる。既知の保存剤は、限定されるものでないがパラヒドロキシ安息香酸メチル、エチル若しくはn-プロピル、アスコルビン酸およびソルビン酸を挙げることができる。既知の甘味料は例えばグリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、ショ糖およびサッカリンを包含する。油性懸濁剤のための既知の増粘剤は例えばミツロウ、固形パラフィンおよびセチルアルコールを包含する。

10

20

## 【0221】

水性若しくは油性溶媒中の有効成分の液体溶液は液体懸濁剤と実質的に同一の様式で製造してよく、主な差異は有効成分が溶媒に懸濁されるよりはむしろ溶解されることである。本発明の製薬学的組成物の液体溶液は液体懸濁剤に関して記述された化合物のそれぞれを含んでよく、懸濁化剤は溶媒中での有効成分の溶解を必ずしも補助するものではないことができることが理解される。水性溶媒は例えば水および等張の生理的食塩水を包含する。油性溶媒は例えばアーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油若しくはヤシ油のような植物油、分画植物油および流動パラフィンのような鉱物油を包含する。

30

## 【0222】

本発明の製薬学的製剤の粉末状および顆粒状製剤は既知の方法を使用して製造してよい。こうした製剤を被験体に直接投与してよく、例えば錠剤を形成するため、カプセルを充填するため、またはそれへの水性若しくは油性ベヒクルの添加により水性若しくは油性の懸濁剤若しくは溶液を製造するために使用してよい。これらの製剤のそれぞれは、分散助剤若しくは湿潤剤、懸濁化剤および保存剤の1種若しくはそれ以上をさらに含んでもよい。増量剤および甘味料、着色料若しくは着色剤のような付加的な賦形剤もまたこれらの製剤中に包含してよい。

40

## 【0223】

本発明の製薬学的組成物は水中油型乳剤若しくは油中水型乳剤の形態で製造、包装若しくは販売してもまたよい。油相はオリーブ油若しくはラッカセイ油のような植物油、流動パラフィンのような鉱物油、またはこれらの組合せであってよい。こうした組成物は、アラビアゴム若しくはトラガカントガムのような天然に存在するガム、ダイズ若しくはレシ

50

チンホスファチドのような天然に存在するホスファチド、ソルビタンモノオレエートのような脂肪酸およびヘキシトール無水物の組合せ由来のエステル若しくは部分エステル、ならびにポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートのようなエチレンオキシドとこのようにした部分エステルの縮合生成物のような1種若しくはそれ以上の乳化剤をさらに含んでもよい。これらの乳剤はまた、例えば甘味料若しくは着香料を包含する付加的な成分も含有してよい。

【0224】

本発明の製薬学的組成物は直腸投与に適する製剤で製造、包装若しくは販売してよい。こうした組成物は例えば坐剤、保持浣腸製剤および直腸若しくは結腸灌注のための溶液の形態であってよい。

10

【0225】

坐剤製剤は、通常室温(すなわち約20)で固体でありかつ被験体の直腸温(すなわち健康なヒトで約37)で液体である非刺激性の製薬学的に許容できる賦形剤と有効成分を組合せることにより作成してよい。適する製薬学的に許容できる賦形剤は、限定されるものでないがカカオバター、ポリエチレングリコールおよび多様なグリセリドを挙げることができる。坐剤製剤は限定されるものでないが抗酸化剤および保存剤を挙げることができる多様な付加的な成分をさらに含んでもよい。

【0226】

保持浣腸製剤または直腸若しくは結腸灌注のための溶液は、製薬学的に許容できる液体担体と有効成分を組合せることにより作成してよい。当該技術分野で公知であるとおり、浣腸製剤は被験体の直腸の解剖学に適合された送達装置を使用して投与してよく、また、それ内に包装してよい。浣腸製剤は限定されるものでないが抗酸化剤および保存剤を挙げることができる多様な付加的な成分をさらに含んでもよい。

20

【0227】

本発明の製薬学的組成物は膣投与に適する製剤で製造、包装若しくは販売してよい。こうした組成物は例えば坐剤、含浸若しくは被覆されたタンポンのような膣に挿入可能な物質、灌注製剤、またはゲル剤若しくはクリーム剤あるいは膣灌注のための溶液の形態であってよい。

【0228】

化学的組成物での物質の含浸若しくは被覆方法は当該技術分野で既知であり、そして、限定されるものでないが、その後の乾燥を伴う若しくは伴わない、表面上への化学的組成物の堆積若しくは結合方法、物質の合成の間の物質の構造中への化学的組成物の組込み方法(すなわち生理学的に分解可能な物質を用いるような)、および吸収性素材中への水性若しくは油性の溶液若しくは懸濁液の吸収方法を挙げることができる。

30

【0229】

膣灌注のための灌注製剤若しくは溶液は、製薬学的に許容できる液体担体と有効成分を組合せることにより作成してよい。当該技術分野で公知であるとおり、灌注製剤は、被験体の膣の解剖学に適應された送達装置を使用して投与してよく、また、それ内に包装してよい。灌注製剤は限定されるものでないが抗酸化剤、抗生物質、抗真菌薬および保存剤を挙げることができる多様な付加的な成分をさらに含んでもよい。

40

【0230】

本明細書で使用されるところの製薬学的組成物の「非経口投与」は、被験体の組織の物理的断裂および組織中の該断裂を通る製薬学的組成物の投与を特徴とするいかなる投与経路も包含する。非経口投与は、従って、限定されるものでないが組成物の注入、外科的創を通る組成物の適用、組織浸透性の非外科的創傷を通る組成物の適用などによる製薬学的組成物の投与を挙げることができる。とりわけ、非経口投与は、限定されるものでないが皮下、腹腔内、筋肉内、胸骨内注入、および腎透析注入技術を挙げることができることを企図している。

【0231】

非経口投与に適する製薬学的組成物の製剤は、滅菌水若しくは滅菌の等張の生理的食塩

50

水のような製薬学的に許容できる担体と組合せられた有効成分を含んでなる。こうした製剤は、ポーラス投与若しくは連続投与に適する形態で製造、包装若しくは販売してよい。注入可能な製剤は、アンプル若しくは保存剤を含有する複数用量の容器中のような単位投与剤形で製造、包装若しくは販売してよい。非経口投与のための製剤は、限定されるものでないが油性若しくは水性ベヒクル中の懸濁剤、溶液、乳剤、パスタ剤、および埋込可能な徐放性若しくは生物分解性の製剤を挙げることができる。こうした製剤は、限定されるものでないが懸濁化剤、安定剤若しくは分散助剤を挙げることができる1種若しくはそれ以上の付加的な成分をさらに含んでもよい。非経口投与のための製剤の一態様において、有効成分は、再構成された組成物の非経口投与前に適するベヒクル（例えば滅菌の発熱性物質を含まない水）との再構成のための乾燥した（すなわち粉末若しくは顆粒状の）形態で提供される。

10

#### 【0232】

製薬学的組成物は滅菌の注入可能な水性若しくは油性の懸濁剤若しくは溶液の形態で製造、包装若しくは販売してよい。この懸濁剤若しくは溶液は既知技術に従って処方してよく、そして、有効成分に加え、本明細書に記述される分散助剤、湿潤剤若しくは懸濁化剤のような付加的な成分を含んでよい。こうした滅菌の注入可能な製剤は、例えば水若しくは1,3-ブタンジオールのような非毒性の非経口で許容できる希釈剤若しくは溶媒を使用して製造してよい。他の許容できる希釈剤および溶媒は、限定されるものでないがリンゲル液、等張の塩化ナトリウム溶液、および合成のモノ若しくはジグリセリドのような不揮発性油を挙げることができる。有用である他の非経口で投与可能な製剤は、微晶質の形態で、リボソーム製剤中に、若しくは生物分解性のポリマー系の一成分として有効成分を含んでなるものを包含する。持続放出若しくは埋込のための組成物は乳剤、イオン交換樹脂、ほとんど不溶性のポリマー若しくはほとんど不溶性の塩のような製薬学的に許容できるポリマー性若しくは疎水性物質を含んでよい。

20

#### 【0233】

局所投与に適する製剤は、限定されるものでないが、リニメント剤、ローション剤のような液体若しくは半液体製剤、クリーム剤、軟膏剤若しくはパスタ剤のような水中油型若しくは油中水型乳剤、および溶液または懸濁剤を挙げることができる。局所で投与可能な製剤は例えば約1%から約10%（w/w）までの有効成分を含んでよいが、とは言え有効成分の濃度は溶媒中の有効成分の溶解性の限界くらい高くてもよい。局所投与のための製剤は本明細書に記述される付加的な成分の1種若しくはそれ以上をさらに含んでもよい。

30

#### 【0234】

本発明の製薬学的組成物は頬腔を介する肺投与に適する製剤で製造、包装若しくは販売してよい。こうした製剤は、有効成分を含んでなりかつ約0.5から約7ナノメートルまで、および好ましくは約1から約6ナノメートルまでの範囲の直径を有する乾燥粒子を含んでよい。こうした組成物は、便宜的に、噴射剤の流れが粉末を分散するように向けられてよい乾燥粉末貯留槽を含んでなる装置を使用する、または封止容器中の低沸点噴射剤に溶解若しくは懸濁された有効成分を含んでなる装置のような自己噴射性溶媒/粉末分注容器を使用する投与のための乾燥粉末の形態にある。好ましくは、こうした粉末は、粒子重量の最低98%が0.5ナノメートルより大きい直径を有しかつ粒子数の最低95%が7ナノメートル未満の直径を有する粒子を含んでなる。より好ましくは、粒子重量の最低95%が1ナノメートルより大きい直径を有しかつ粒子数の最低90%が6ナノメートルより小さい直径を有する。乾燥粉末組成物は、好ましくは糖のような固体の微細な粉末希釈剤を包含しかつ単位投与剤形で便宜的に提供される。

40

#### 【0235】

低沸点噴射剤は一般に大気圧で65°Fより下の沸点を有する液体噴射剤を包含する。一般に、噴射剤は組成物の50ないし99.9%（w/w）を構成してよく、そして有効成分は組成物の0.1ないし20%（w/w）を構成してよい。噴射剤は、液体の非イオン性若しくは固体の陰イオン性界面活性剤または固体の希釈剤（好ましくは有効成分を含

50

んでなる粒子と同一次の粒子径を有する)のような付加的な成分をさらに含んでもよい。

【0236】

肺送達のため処方される本発明の製薬学的組成物は溶液、懸濁液若しくは遅延放出ポリマーの液滴の形態の有効成分もまた提供してもよい。こうした製剤は、有効成分を含んでなる場合によっては滅菌の水性若しくは希薄アルコール性の溶液若しくは懸濁剤として製造、包装若しくは販売してよく、そして、便宜的には、いかなる噴霧化(nebulization)若しくは噴霧化(atomization)装置を使用して投与してもよい。こうした製剤は、限定されるものでないが、サッカリンナトリウム、揮発性油のような着香料、緩衝剤、表面活性剤、若しくはヒドロキシ安息香酸メチルのような保存剤を挙げることができる1種若しくはそれ以上の付加的な成分をさらに含んでもよい。本投与経路により提供される液滴は、好ましくは約0.1から約200ナノメートルまでの範囲の平均直径を有する。

10

【0237】

肺送達に有用であるとして本明細書に記述される製剤はまた、本発明の製薬学的組成物の鼻内送達にも有用である。

【0238】

鼻内投与に適する別の製剤は、有効成分を含んでなりかつ約0.2から500マイクロメートルまでの平均粒子を有する粗い散剤である。こうした製剤は嗅剤が服用される様式で、すなわち鼻孔近くに保持された散剤の容器からの鼻通路を通る急速な吸入により投与する。

20

【0239】

別の製剤は遅延放出ポリマー中に組込まれた有効成分である。こうしたポリマーは製薬学的技術で公知であり、そして例えば米国特許明細書(第4,728,512号;第4,728,513号;第5,084,287号;第5,285,186号)に詳述されている。

【0240】

鼻投与に適する製剤は、例えば約0.1%(w/w)および約100%(w/w)の有効成分からを含んでよく、そして、本明細書に記述される付加的な成分の1種若しくはそれ以上をさらに含んでもよい。

【0241】

本発明の製薬学的組成物は頬側投与に適する製剤で製造、包装若しくは販売してよい。こうした製剤は、例えば慣習的方法を使用して作成される錠剤若しくは舐剤の形態にあってよく、かつ、例えば0.1ないし20%(w/w)の有効成分よく、該均衡は経口で溶解可能な若しくは分解可能な組成物および場合によっては本明細書に記述される付加的な成分の1種若しくはそれ以上を含んでなる。あるいは、頬側投与に適する製剤は、有効成分を含んでなる散剤、またはエアゾル化若しくは噴霧化される溶液若しくは懸濁剤を含んでよい。こうした粉末状、エアゾル化若しくはエアゾル化される製剤は、分散される場合に好ましくは約0.1から約200ナノメートルまでの範囲の平均粒子若しくは液滴径を有し、また、本明細書に記述される付加的な成分の1種若しくはそれ以上をさらに含んでもよい。

30

40

【0242】

本発明の製薬学的組成物は眼投与に適する製剤で製造、包装若しくは販売してよい。こうした製剤は例えば、例えば水性若しくは油性の液体担体中の有効成分の0.1~1.0%(w/w)の溶液若しくは懸濁剤を包含する点眼剤の形態にあってよい。こうした滴剤は緩衝剤、塩、または本明細書に記述される付加的な成分の1種若しくはそれ以上の他者をさらに含んでもよい。有用である他の眼で投与可能な製剤は、微晶質の形態の若しくはリポソーム製剤中に有効成分を含んでなるものを包含する。

【0243】

本発明の製薬学的組成物は直接CNS投与に適する製剤で製造、包装若しくは販売し得る。こうした製剤は、例えば、Ommaya貯留槽、硬膜下腔内若しくは脳室内投与、直

50

接脳実質内注入、遅延放出ポリマー、または製薬学および神経学的分野で公知の他のこうした方法により投与される液体の形態にあってもよい。

【0244】

本明細書で使用されるところの「付加的な成分」は、限定されるものでないが以下すなわち賦形剤；表面活性剤；分散助剤；不活性希釈剤；顆粒化剤および崩壊剤；結合剤；滑沢剤；甘味料；着香料；着色剤；保存剤；ゼラチンのような生理学的に分解可能な組成物；水性ベヒクルおよび溶媒；油性ベヒクルおよび溶媒；懸濁化剤；分散助剤若しくは湿潤剤；乳化剤、粘滑剤；緩衝剤；塩；増粘剤；増量剤；乳化剤；抗酸化剤；抗生物質；抗真菌薬；安定剤；ならびに製薬学的に許容できるポリマー性若しくは疎水性物質の1種若しくはそれ以上を挙げることができる。本発明の製薬学的組成物に包含されうる他の「付加的な成分」は当該技術分野で既知でありかつ例えば Genaro 編、1985、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co.、フィラデルフィア州イーストン（引用することにより本明細書に組み込まれる）に記述されている。

10

【0245】

典型的には、哺乳動物、好ましくはヒトに投与してよい本発明の化合物の投薬量は、動物の体重1キログラムあたり1 $\mu$ gから約100gまでの量の範囲にわたる。一方で、投与される正確な投薬量は、限定されるものでないが治療されている動物の型および疾患状態の型、動物の齢ならびに投与経路を挙げることができるいずれかの数の因子に依存して変動することができる。好ましくは、該化合物の投薬量は動物の体重1キログラムあたり約1mgから約10gまで変動することができる。より好ましくは、該投薬量は動物の体重1キログラムあたり約10mgから約1gまで変動することができる。

20

【0246】

該化合物は1日数回程度頻繁に哺乳動物に投与してよいか、あるいは、それは1日1回、週1回、2週ごとに1回、月1回のようにより少なく頻繁に、あるいは数ヶ月ごとに1回、または年1回若しくはより少なくさえのようなおより少なく頻繁に投与してよい。投与の頻度は当業者に容易に明らかであることができ、かつ、限定されるものでないが、治療されている疾患の型および重症度、動物の型および齢などを挙げることができるいずれかの数の因子に依存することができる。

【0247】

本発明はさらに、免疫治療を使用する原発性CNS腫瘍の治療方法を含んでなる。すなわち、本発明は、免疫エフェクター細胞によるグリコシル化バリアントBEHABを発現する腫瘍の認識を助長するために免疫系を調節してそれにより腫瘍を破壊することによる原発性CNS腫瘍の治療方法を包含する。これは、本明細書に開示されるデータにより示されるとおり、グリコシル化バリアントBEHABはアッセイされる全部のヒト神経膠腫サンプルで独占的に発現されかつ健康なヒト脳組織で発現されないからである。従って、本発明は、健康な組織を害することを伴わない、原発性CNS腫瘍の免疫治療に媒介される処置方法を提供する。

30

【0248】

免疫治療は抗腫瘍効果を直接若しくは間接的に媒介し得るエフェクター細胞のような確立した腫瘍免疫反応性を伴う剤の送達を含み得る。エフェクター細胞の例は、グリコシル化バリアントBEHABを発現するT細胞、Tリンパ球（CD8+細胞傷害性Tリンパ球およびCD4+Tヘルパー腫瘍浸潤リンパ球のような）、キラー細胞（ナチュラルキラー細胞およびリンホカイン活性化型キラー細胞のような）、B細胞ならびに抗原提示細胞（樹状細胞およびマクロファージのような）を包含する。T細胞受容体およびグリコシル化バリアントBEHABに特異的な抗体受容体を、養子免疫治療のために他のベクター若しくはエフェクター細胞中にクローン化し、それら中で発現させかつそれらに移入してよい。

40

【0249】

エフェクター細胞は、一般に、当該技術分野で公知の技術を使用して患者から得そして

50

十分な量が免疫治療に利用可能となるまで *in vitro* で増殖させてよい。 *in vivo* での抗原認識の保持を伴う数十億の数までの抗原特異的エフェクター細胞の増殖のための培養条件は当該技術分野で公知である。こうした *in vitro* 培養条件は、典型的には、しばしばサイトカイン (IL-2 のような) および非分裂フィーダー細胞の存在下でのグリコシル化バリアント BEHAB での間欠的刺激を含むとみられる。とりわけ、樹状細胞、マクロファージ、単球、線維芽細胞および/若しくは B 細胞のような抗原提示細胞にグリコシル化バリアント BEHAB を間欠的に投与しかつ *ex vivo* 免疫治療のため増殖させ得る。抗原特異的免疫エフェクター細胞を得る方法および培養方法は当該技術分野で公知でありかつ例えば Cheever ら (1997、Imm. Rev. 157: 177-194) に記述されている。

10

## 【0250】

あるいは、BEHAB タンパク質を発現するベクターは患者から採取した樹状細胞のような抗原提示細胞に導入しかつ同一患者に戻す移植のため *ex vivo* でクローン性に繁殖し得る。トランスフェクトした細胞は、当該技術分野で既知のいずれかの手段を使用して好ましくは静脈内、腔内、腹腔内若しくは腫瘍内投与により無菌形態で患者に再導入してよい。免疫エフェクター細胞のトランスフェクション、増殖および再導入方法は当該技術分野で公知でありかつ例えば米国特許第 6,500,641 号明細書および Cheever ら (1997、Imm. Rev. 157: 177-194) に記述されている。

## 【0251】

本明細書に記述される免疫治療の投与の経路および頻度ならびに投薬量は個体ごとに変動することができ、かつ、当該技術分野で公知の標準的技術を使用して容易に確立しうる。原発性 CNS 腫瘍の免疫治療に対する応答は、患者中の抗腫瘍抗体を測定することにより、若しくは免疫治療の実施後に *in vitro* で患者の腫瘍細胞を殺すことが可能な細胞溶解性エフェクター細胞の生成によりモニターし得る。こうした免疫治療はまた、治療した患者において未治療の患者に比較して改良された臨床転帰 (例えばより高頻度の寛解、完全若しくは部分的またはより長い疾患を伴わない生存) に至る免疫応答を引き起こすことが可能でもあるはずである。

20

## B. 原発性 CNS 腫瘍の診断方法

本発明はさらに、限定されるものでないが神経膠腫、十分に分化した星状細胞腫、未分化星状細胞腫、多形グリア芽腫、上衣腫、乏突起膠腫、節細胞腫、混合性神経膠腫、脳幹神経膠腫、視神経膠腫、髄膜腫、松果体腫、下垂体腫瘍、下垂体腺腫、未分化神経外胚葉性腫瘍、神経鞘腫、血管腫、リンパ腫などを挙げることができる原発性 CNS 腫瘍、他の中枢神経系の腫瘍、および BEHAB に関連する他の神経病理学的障害の診断方法を包含する。これは、本明細書の別の場所に開示されるデータにより示されるとおり、BEHAB の過剰発現が原発性 CNS 腫瘍などの進行および浸潤性と高度に相関するからである。本発明は、従って、哺乳動物における BEHAB の発現のレベルの測定方法および従って原発性 CNS 腫瘍の診断方法を包含する。本明細書で列挙される全部の例において、原発性 CNS 腫瘍の治療であろうと診断であろうと、最も好ましい哺乳動物はヒトである。

30

## 【0252】

本発明は哺乳動物における原発性 CNS 腫瘍の診断方法を包含する。該方法は、第一の哺乳動物から生物学的サンプルを得ること、および、そのサンプル中の BEHAB (発現、量、活性) のレベルをそれ以外は第一の哺乳動物に同一であるがしかし原発性 CNS 腫瘍に苦しめられていない正常の第二の哺乳動物から得たサンプル中の BEHAB のレベルと比較することを含んでなる。原発性 CNS 腫瘍に苦しめられていない第二のそれ以外は同一の哺乳動物から得たサンプル中の BEHAB のレベルと比較して第一の哺乳動物からのサンプル中の BEHAB のより高レベルは、第一の哺乳動物が原発性 CNS 腫瘍に苦しめられていることの指標である。これは、本明細書の別の場所で開示されるとおり、BEHAB 発現の増大されたレベルがとりわけより大きな腫瘍体積および低下された生存率と関連するからである。

40

## 【0253】

50

本発明はまた、*in vivo*若しくは*in vitro*でのヒトを包含する哺乳動物における原発性CNS腫瘍の診断方法も包含する。すなわち、本発明は哺乳動物若しくは哺乳動物からの生物学的サンプルいずれかでの原発性CNS腫瘍の診断方法を包含する。該方法は、原発性CNS腫瘍を有することが疑われる哺乳動物におけるグリコシル化バリアントBEHABのレベルを評価しかつ原発性CNS腫瘍を有することが疑われない哺乳動物におけるグリコシル化バリアントBEHABのレベルと比較することを含んでなる。原発性CNS腫瘍を有することが疑われない哺乳動物と比較した場合の原発性CNS腫瘍を有することが疑われる哺乳動物におけるグリコシル化バリアントBEHABのより高レベルは、原発性CNS腫瘍を有することが疑われる動物が実際に原発性CNS腫瘍を有することの指標であり、それにより原発性CNS腫瘍を診断する。

10

## 【0254】

生物学的サンプル中のグリコシル化バリアントBEHABのレベルを比較することは、ELISA、イムノプロットング技術のような抗体での検出、SDS-PAGE電気泳動のようなタンパク質検出技術、PCRおよびLCRのような核酸技術、サザンプロットング、ノーザンプロットングを包含する核酸ハイブリダイゼーション技術、ならびに当該技術分野で公知の他の技術を包含する本明細書に開示される若しくは当該技術分野で既知の方法のいずれかを使用して達成し得る。一例として、生物学的サンプルを哺乳動物から得かつそのサンプル中のグリコシル化バリアントBEHABのレベルについて評価し得る。生物学的サンプルは、限定されるものでないが血液、尿、糞便、神経組織、脳脊髄液、唾液、脳組織などを挙げるができる。生物学的サンプルは得られるべき生物学的サンプルに依存して多様な方法により得ることができる。例えば血液は静脈穿刺により得ることができ；尿、糞便および唾液は試料容器に捕捉し得る、などである。限定されるものでないが脳組織および神経組織を挙げることができる組織サンプルは生検若しくは当該技術分野で公知の類似の方法により得ることができる。脳脊髄液は当該技術分野で公知の方法を使用する脊椎穿刺により収集し得る。

20

## 【0255】

グリコシル化バリアントBEHABの*in vivo*検出若しくはグリコシル化バリアントBEHABに係る原発性CNS腫瘍の診断のために、当業者は、哺乳動物におけるグリコシル化バリアントBEHABの検出のために標識抗体若しくは核酸を使用し得る。こうした抗体は本明細書の別の場所に記述される技術を使用して生成し得、そしてその後多数の方法により標識若しくは検出の可能な他の分子に複合し得る。標識若しくは他の分子の抗体への複合方法は当該技術分野で公知でありかつ本明細書の別の場所に記述されるタンパク質化学における技術を使用して達成し得る。一例として、グリコシル化バリアントBEHABを結合する抗体を放射活性同位元素に複合し得、そして、同位元素標識抗体の結合をX線フィルムのような放射活性に感受性のフィルム上で検出し得る。抗体はまた、磁気共鳴画像化技術に対し可視的な標識にも結合し得る。さらに、本発明は、ルシフェラーゼ若しくは緑色蛍光タンパク質のような蛍光分子、またはワサビペルオキシダーゼ、蛍光分子、酵素、金、ビオチン、放射活性同位原子若しくはガドリニウムのような別の標識に抗体を複合し、そして標識を可視化することが可能な画像化系によりグリコシル化バリアントBEHABアイソフォームへの該抗体の結合を検出する方法を包含する。蛍光標識の*in vivo*検出のためのバイオフォトンニック(biophotonic)画像化系の使用は当該技術分野で公知でありかつこうした系は商業的に入手可能である(Xenogen、カリフォルニア州アラメダ)。本発明はさらに哺乳動物における原発性CNS腫瘍の進行の診断方法を包含する。本開示および本明細書のデータで一旦備えをすれば当業者により認識されるであろうとおり、BEHAB切断は脳腫瘍の進行を媒介し、とりわけより大きな腫瘍体積および短縮された生存時間をもたらす。従って、本発明は哺乳動物における脳腫瘍の進行の診断方法を包含する。該方法は、第一の哺乳動物から生物学的サンプルを得ること、および、標準的神経学的指標を使用して当業者に容易に測定され得るとおり、そのサンプル中のBEHAB切断のレベルを、それ以外は第一の哺乳動物に同一であるがしかし原発性CNS腫瘍に苦しめられていない正常な第二の哺乳動物、若しく

30

40

50

は該第二の哺乳動物における原発性CNS腫瘍まで進行していない原発性CNS腫瘍に苦しめられているから得たサンプル中のBEHAB切断のレベルと比較することを含んでなる。第二のそれ以外は同一の哺乳動物から得たサンプル中のBEHAB切断のレベルと比較して第一の哺乳動物からのサンプル中のBEHAB切断のより高レベルは、第一の哺乳動物がより高速で進行する原発性CNS腫瘍に苦しめられていることの指標である。これは、本明細書の別の場所で開示されるとおり、BEHAB切断の増大されたレベルがより大きな腫瘍体積および低下された生存率などに関連するからである。

【0256】

当業者は、本開示および本明細書のデータで備えをする場合に、BEHAB切断のレベルの測定方法が限定されるものでないがウェスタンブロッティング、ELISAおよび当該技術分野で公知の他の免疫検出アッセイを挙げることができることを認識するであろう。

10

【0257】

一局面において、生物学的サンプルは血液サンプル、神経学的組織生検、脳脊髄液サンプル、尿、唾液などより成る群から選択される。

【0258】

本発明は哺乳動物における原発性CNS腫瘍の処置の有効性の評価方法を包含する。該方法は、増大されたBEHAB発現により媒介される若しくはそれに関連する疾患、障害若しくは状態（例えば原発性CNS腫瘍など）の指定された1クールの処置の前、間および後にBEHAB発現、量および/若しくは活性のレベルを評価することを含んでなる。これは、本明細書の別の場所に以前に述べられたとおり、増大されたBEHAB発現、量および/若しくは活性が、より大きな腫瘍体積および低下された動物の生存率と関連するか若しくはそれらを媒介するからであり、これは原発性CNS腫瘍による増大された死亡の一特徴である。

20

【0259】

従って、BEHAB発現/量/活性に対する1クールの処置の効果を評価することは、より低レベルのBEHAB発現、量若しくは活性が該処置方法が成功裏であることを示すような処置の有効性を示す。

【0260】

評価されるべき治療のクールは、限定されるものでないが、本明細書に開示される原発性CNS腫瘍に対する外科手術、化学療法、放射線治療および/若しくは複数の治療様式を挙げることができる。

30

【0261】

本発明はまた哺乳動物における原発性CNS腫瘍の処置の有効性の評価方法も包含する。該方法は、原発性CNS腫瘍の処置の実施の前、間若しくは後の哺乳動物におけるグリコシル化バリエーションBEHABのレベルを評価することを含んでなる。一例として、哺乳動物からの生物学的サンプルを原発性CNS腫瘍の治療の実施前に得、そして他のサンプルは原発性CNS腫瘍の治療が実施されている間および後に得る。生物学的サンプルの収集は当該技術分野で公知かつ本明細書の別の場所に記述される方法に従って達成される。グリコシル化バリエーションBEHABのレベルを本明細書の別の場所に開示される方法に従って評価する。過少グリコシル化BEHABおよび未グリコシル化BEHABを包含するグリコシル化バリエーションBEHABのレベルを原発性CNS腫瘍の治療の前、間および後に採取した生物学的サンプル間で比較して、原発性CNS腫瘍の処置の有効性の指標を提供する。

40

【0262】

本発明はまた、原発性CNS腫瘍の処置の前、間および後に哺乳動物における原発性CNS腫瘍の処置の有効性を評価することも包含する。原発性CNS腫瘍の治療の有効性は、本明細書の別の場所に開示されかつ当該技術分野で公知の技術を使用して哺乳動物で評価し得る。すなわち、本発明は、本明細書の別の場所に開示される方法を使用して*in vivo*でグリコシル化バリエーションBEHABアイソフォームのレベルを比較することに

50

よる原発性CNS腫瘍の処置の有効性の評価方法を包含する。

【0263】

本発明はBEHAB遺伝子の発現、量若しくは活性を検出するためのプローブおよびプライマーを包含する。当業者は、本開示および本明細書に開示されるデータで備えをする場合に、BEHAB遺伝子のDNA若しくはRNAに特異的にハイブリダイズすることが可能であるプローブが提供されることを認識するであろう。本発明の目的上、プローブは、高若しくは中程度いずれかのストリンジェンシー(Sambrookら(1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク)を参照されたい)の条件下でそれらがBEHAB遺伝子にハイブリダイズするがしかし無関係の遺伝子には有意に若しくは検出可能にしない場合にBEHABのDNA若しくはRNAに「ハイブリダイズすることが可能」である。好ましくは、プローブは、65 °Cでの5×SSPE、1×Denhardt溶液、0.1% SDS中でのハイブリダイゼーション、および65 °Cで0.2×SSC、1×Denhardt溶液、0.1% SDSの存在下でのハイブリダイズされないプローブを除去するための最低1回の洗浄のような高ストリンジェンシー条件下で適するヌクレオチド配列にハイブリダイズする。それ以外は本明細書に提供されるところを除き、プローブの配列はBEHAB遺伝子へのハイブリダイゼーションを可能にするがしかし他の遺伝子からのDNA若しくはRNA配列にはしないように設計する。プローブを使用して、例えば、患者から単離された限定されるものでないが血液、脳脊髄液、リンパ若しくは組織を挙げるができる生物学的サンプル中に存在する核酸にハイブリダイズさせる。その後、ハイブリダイズされたプローブを検出し、それにより所望の細胞性核酸の存在を示す。当業者は、該細胞性核酸をハイブリダイゼーションの前にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のような増幅処置にかけ得ることを認識するであろう。あるいは、BEHAB遺伝子を増幅しかつ増幅産物をDNAシーケンシングにかけ得る。BEHAB遺伝子は、DNA配列分析、若しくは、特定のアレルへのハイブリダイゼーションを可能にするのに十分な条件下および時間の間のBEHAB特異的オリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションにより検出し得る。典型的に、ハイブリダイゼーション緩衝液は塩化テトラメチルアンモニウムなどを含有し得る。Sambrookら(1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク)を参照されたい。

【0264】

本発明の核酸プローブは、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、核酸類似物(例えばペプチド核酸)若しくはそれらのいずれかの組合せのいずれかから構成されてよく、そして、長さが約12ヌクレオチド、通常は長さが約14ないし18ヌクレオチド、およびおそらくほぼBEHAB遺伝子の配列全体であり得る。プローブの大きさの選択はプローブの使用にいくぶん依存し、そして当該技術分野の技能内に十分にある。

【0265】

適するプローブは当該技術分野で公知である技術を使用して構築かつ標識し得る。例えば12塩基のより短いプローブを合成で生成させかつT<sub>4</sub>ポリヌクレオチドキナーゼを使用して<sup>32</sup>Pで標識し得る。約75塩基ないし1.5kb未満のより長いプローブは、好ましくは、例えば、限定されるものでないが[<sup>32</sup>P]dCTP、ジゴキシゲニン-dUTP若しくはビオチン-dATPを挙げるができる標識前駆体の存在下でのPCR増幅により生成させる。1.5kb以上のプローブは、一般に、適切なプローブを含有するプラスミドで細胞をトランスフェクトすること、トランスフェクトした細胞を大量に増殖させること、およびトランスフェクトした細胞から適切な配列を精製することにより最も容易に増幅される。Sambrookら(1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク)を参照されたい。

【0266】

プローブは、例えば放射活性マーカー、蛍光マーカー、酵素マーカーおよび色原体マーカーを包含する多様なマーカーにより標識し得る。<sup>32</sup>Pの使用は特定のプローブの標識 (marking) すなわち標識 (labeling) のほんの一例である。

【0267】

プローブを利用してサンプル内のBEHAB mRNA若しくはDNAの存在を検出し得ることが本発明の本局面の一特徴である。しかしながら、関連するサンプルが制限された数のみで存在する場合には、該適切な配列がより容易に検出され若しくは得られうるようにそれを増幅することが有益であり得る。

【0268】

選択された配列を増幅するために、例えばRNA増幅 (Lizardiら、1988 Bio/Technology 6:1197-1202; Kramerら、1989、Nature 339:401-402; Lomeliら、1989、Clinical Chem. 35:1826-1831; 米国特許第4,786,600号明細書を参照されたい)、ならびにリガーゼ連鎖反応 (LCR) 若しくはPCRを利用するDNA増幅 (米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号および同第4,800,159号明細書) (断裂しやすい結合の使用を含んでなる代替の検出/増幅系を記述する米国特許第4,876,187号および同第5,011,769号明細書もまた参照されたい)、または当該技術分野の通常の技能のレベル内に十分にある他の核酸増幅手順を包含する多様な方法を利用してよい。例えば、PCRに関して、該方法は当該技術分野で既知のとおり改変し得る。PCRの転写増強は、主要なオリゴヌクレオチドの1つ中へのバクテリオファージT7 RNAポリメラーゼプロモーター配列の組込みにより達成し得、また、高められた放射体 (emitter) からの生成物の免疫酵素検出は、抗RNA:DNA抗体 (Blais、1994、Appl. Environ. Microbiol. 60:348-352) を使用して遂げてよい。PCRは、逆ドットプロットハイブリダイゼーション (Iidaら、1993、FEMS Microbiol. Lett. 114:167-172) と組合せてもまた使用し得る。PCR産物はdUTPの取り込みにより定量的に分析することができ (Duplaaら、1993、Anal. Biochem. 212:229-236)、そして、PCR遺伝子プローブ検出のためサンプルをフィルターサンプリングしうる (Bejら、1991、Appl. Environ. Microbiol. 57:3529-3534)。

【0269】

本発明は、BEHAB DNAを検出するのにPCRを使用する、BEHABの過剰発現の検出方法、および従って原発性CNS腫瘍の診断方法を包含する。一例として、一本鎖DNAを生成させるために、DNAサンプルを約92°ないし95°で変性させる。DNAサンプルはRNAから生成させたcDNAであり得る。その後、プライマー中のAT/GCの比率および当該技術分野で公知の他の因子に依存して約37°ないし約70°で特異的プライマーを一本鎖DNAにアニーリングさせる。鋳型に対する反対鎖を生成させるために、プライマーを例えばTaq DNAポリメラーゼ若しくは別の熱安定性DNAポリメラーゼで約72°で伸長させる。これらの段階が1周期を構成し、選択した配列を増幅するためにこれを反復し得る。より大きな特異性のためにネステッドPCRを実施し得る。ネステッドPCRにおいては、第一の増幅産物内の配列由来のプライマーの第二の組を使用して第二の増幅を実施する。十分な数のプライマーを使用して例えばcDNAからBEHABのコーディング領域全体を増幅して、それらの配列を決定するのに便宜的な大きさであるフラグメント長さを生成させうる。必要なプライマーの数は当業者に公知であろう。

【0270】

本発明はさらに、LCR増幅を増幅に利用する方法を包含する。上流プライマーの5'塩基が、BEHAB遺伝子の特異的に検出するための所望の遺伝子中の唯一の塩基対にハイブリダイズすることが可能であるようなLCRプライマーを合成し得る。

【0271】

10

20

30

40

50

本発明の態様内で、標的核酸配列をPCRにより増幅し、そしてその後所望の産物を例えば比色的オリゴヌクレオチド連結アッセイ(OLA)(Nickersonら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:8923-8927)により測定する自動化した非同位元素の戦略で、該プローブを使用し得る。

#### 【0272】

選択した配列の増幅のためのプライマーは、BEHABに高度に特異的でありかつ標的配列と安定な二重鎖を形成する配列から選択すべきである。当該技術分野で公知であるとおり、プライマーはまた、とりわけ3'端で非相補的であるべきであり、それら自身若しくは他のプライマーと二量体を形成するべきでなく、そしてDNAの他の領域と二次構造若しくは二重鎖を形成すべきでない。一般に、約18ないし約20ヌクレオチドのプライマーが好ましく、そして当該技術分野で公知の技術を使用して容易に合成し得る。PCR産物および他の核酸増幅産物は、当該技術分野で公知の技術(Duplaaら、1993、Anal. Biochem. 212:229-236; Higuchiら、1993、Bio/Technology 11:1026-1030)を使用して定量しうる。

10

#### 【0273】

当業者は、本開示および本明細書に開示されるデータで備えをする場合に、哺乳動物におけるBEHAB核酸の過剰発現を検出することが可能である診断薬を開発し得ることを容易に理解するであろう。これは、本明細書の別の場所のデータにより示されるとおり、哺乳動物におけるBEHABの増大された発現は、正常な内因性BEHAB発現を伴う哺乳動物若しくは切断不可能なBEHAB変異体の過剰発現を伴う哺乳動物と比較した場合により大きな腫瘍および減少された生存時間をもたらすからである。それにより、哺乳動物若しくは細胞中でのBEHAB発現のレベルを測定することは、とりわけ原発性CNS腫瘍などの検出のための強力かつ新規の診断技術として使用し得る。

20

#### C. 有用な化合物の同定方法

本発明はさらに、細胞中でのグリコシル化バリエーションBEHABアイソフォームを包含するBEHABの発現に影響を及ぼす化合物の同定方法を包含する。該方法は、細胞を試験化合物と接触させること、および、そのように接触させた細胞中のBEHABの発現のレベルを該化合物と接触されないそれ以外は同一の細胞中のBEHABの発現のレベルと比較することを含んでなる。BEHABの発現のレベルが、試験化合物と接触されないそれ以外は同一の細胞中のBEHABの発現のレベルと比較して該試験化合物と接触させた細胞中でより高い若しくは低い場合、これは該試験化合物が細胞中のBEHABの発現に影響を及ぼすことの指標である。

30

#### 【0274】

本発明はBEHABの発現に影響を及ぼす化合物の同定方法を包含する。当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、BEHABのレベルを評価することがプローブ(例えばBEHABのと特異的に結合する抗体および/若しくは核酸プローブ)を使用して実施し得、その結果該方法がBEHABの発現に選択的に影響を及ぼす化合物を同定し得ることを認識するであろう。こうした化合物はBEHABの発現を阻害するのに有用である。当業者は、こうした化合物がBEHABの増大された発現により媒介されかつ/若しくはそれと関連する(例えばBEHABの増大されたレベルは原発性CNS腫瘍と関連し、また、BEHAB発現は増大された腫瘍体積および低下された生存率と関連する)疾患、障害若しくは状態を阻害するのに有用であり得ることを理解するであろう。従って、当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、BEHABの発現を低下させることが有用でありうることを認識するであろう。

40

#### 【0275】

同様に、本発明は、細胞中でのグリコシル化バリエーションBEHABを包含するBEHABの発現を低下させる化合物の同定方法を包含する。該方法は、細胞を試験化合物と接触させること、および、該化合物と接触させた細胞中のBEHABの発現のレベルを該化合物と接触されていないそれ以外は同一の細胞中のBEHABの発現のレベルと比較することを含んでなる。BEHABの発現のレベルが、該化合物と接触されなかった細胞中のレ

50

ベルに比較して該化合物と接触させた細胞中でより低い場合には、それは該試験化合物が細胞中でのB E H A B若しくはグリコシル化バリエーションB E H A Bの発現を低下させることの指標である。

【0276】

本発明はまた細胞中のB E H A Bの切断を減少させる化合物の同定方法も包含する。該方法は、細胞を試験化合物と接触させること、および、化合物と接触させた細胞中のB E H A B切断のレベルを該化合物と接触されていないそれ以外は同一の細胞中のB E H A B切断のレベルと比較することを含んでなる。B E H A B切断のレベルが、該化合物と接触されなかった細胞中のレベルに比較して該化合物と接触させた細胞中でより低い場合には、それは該試験化合物が細胞中のB E H A Bの切断を減少させることの指標である。

10

【0277】

細胞中のB E H A Bの切断を減少させる化合物は、B E H A B切断が原発性C N S腫瘍の進行および浸潤性と関連することが本明細書で示されているために、有用である。加えて、本明細書に開示されるデータは、B E H A B切断がより大きな腫瘍体積および低下された動物の生存率を媒介若しくはそれと関連することを示している。従って、B E H A B切断を減少させる化合物の同定方法は、限定されるものでないが原発性C N S腫瘍を挙げることができる多様な疾患を治療するのに使用し得る。

【0278】

当業者は、本発明が細胞若しくは動物における有用な化合物の同定方法に制限されないことをさらに認識するであろう。すなわち、本発明は細胞を含まない系における有用な化合物の同定方法を包含する。本明細書で使用される細胞を含まない系は、反応が起こるのに必要な成分が存在するがしかし細胞と会合していない*in vitro*アッセイを指す。こうした成分は、細胞性酵素、転写因子、タンパク質、核酸などを包含し得るが、但しそれらは実質的に細胞を含まない。本明細書のデータにより開示されるとおり、B E H A B切断アッセイは、細胞若しくは動物を含まずに実施し得、免疫沈降アッセイなどの使用を包含する。それにより、本発明は、細胞を含まない系における原発性C N S腫瘍を治療するための有用な化合物の同定方法を包含する。

20

【0279】

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、細胞中のB E H A Bの発現のレベルがB E H A Bをコードするm R N Aの発現のレベルを測定することにより測定しうることを認識するであろう。あるいは、B E H A Bの発現および/若しくは切断のレベルは、抗B E H A B抗体を使用するウェスタンブロット分析を使用して本明細書で例示される場所のB E H A Bの産生および切断を評価するための免疫学的方法を使用することにより測定し得る。さらに、ノーザンブロットおよびP C Rアッセイなどのような核酸に基づく検出方法を同様に使用し得る。加えて、細胞中のB E H A B活性および/若しくは切断のレベルは、例えば腫瘍体積、腫瘍の浸潤性および動物の生存率のようなB E H A B活性および/若しくは切断により影響され得る多様なパラメータのレベルを測定することによってもまた評価し得る。従って、当業者は、該開示および本明細書に提供される実務への簡約(*reduction*)に基づき、本明細書に開示されるものを包含する細胞中のB E H A B活性および切断のレベルを評価するのに使用し得る当該技術分野で公知である多数の方法ならびに将来開発されるかもしれない他者が存在することを認識するであろう。

30

40

【0280】

加えて、B E H A B若しくはその切断生成物と特異的に結合するタンパク質、例えば受容体若しくは他のB E H A B関連タンパク質は、例えば酵母2ハイブリッドアッセイを使用して同定し得る。酵母2ハイブリッドアッセイ法は当該技術分野で公知でありかつ十分に報告された技術、例えばBartelとFields(*The Yeast Two-Hybrid System*, Oxford University Press、コネチカット州ケアリー)に記述されるものを使用して実施し得る。従って、本明細書に提供される教示、例えばB E H A Bタンパク質の完全なアミノ酸および核酸配列で一旦備えをすれば、当業者は、限定されるものでないがB E H A B標的若しくは受容体タンパク質を

50

挙げることができる、B E H A B若しくはその切断生成物と特異的に結合するタンパク質を容易に同定し得る。

【0281】

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、本発明が本明細書の別の場所で論考される方法を使用して同定されるいかなる分子も包含することを理解するであろう。すなわち、限定されるものでないがB E H A B受容体タンパク質若しくはB E H A B標的タンパク質を挙げることができるB E H A Bと会合する分子を使用して、原発性C N S腫瘍、神経膠腫、十分に分化した星状細胞腫、未分化星状細胞腫、多形グリア芽腫、上衣腫、乏突起膠腫、節細胞腫、混合性神経膠腫、脳幹神経膠腫、視神経膠腫、髄膜腫、松果体腫、下垂体腫瘍、下垂体腺腫、未分化神経外胚葉性腫瘍、神経鞘腫、血管腫およびリンパ腫のようなB E H A B関連タンパク質とのB E H A B切断生成物の相互作用により媒介される疾患、障害若しくは状態の治療薬および診断薬を開発し得る。すなわち、当業者は、B E H A Bと特異的に結合する抗体の論考において本明細書の別の場所でより十分に示されたとおり、B E H A B関連タンパク質を使用してB E H A B切断生成物受容体/リガンドの相互作用および他のB E H A B結合相互作用を阻害することにより細胞中のB E H A B切断生成物の活性を阻害する治療薬を開発し得ることを認識するであろう。

10

【0282】

上に開示された方法により同定されるB E H A B関連タンパク質は、B E H A B関連タンパク質若しくはその一部分と細胞を接触させることによりB E H A Bの相互作用を阻害するのに直接使用し得るか、または、B E H A BとのB E H A B関連タンパク質の相互作用を阻害してそれによりB E H A Bの機能、活性および切断を阻害し得る抗体および/若しくはペプチド模倣物を開発するのにそれらを使用し得る。従って、B E H A B受容体タンパク質若しくはB E H A B切断生成物タンパク質を包含するB E H A B関連タンパク質は有用でありかつ本発明により包含される。

20

V I I I . キット

本発明は、変異体B E H A Bをコードする核酸、変異体B E H A Bポリペプチド、B E H A Bを特異的に結合する抗体、B E H A Bをコード核酸に相補的しかしアンチセンスの向きの核酸、B E H A B切断生成物に対する抗体を包含する化合物、アプリケーション、および本発明の方法を実施するための化合物の使用を記述する説明資料を含んでなる多様なキットを包含する。モデルキットを下述するとは言え、他の有用なキットの内容は本開示に照らして当業者に明らかであろう。これらのキットのそれぞれを本発明内で企図している。

30

【0283】

一局面において、本発明は原発性C N S腫瘍を治療するためのキットを包含する。該キットは本発明について本明細書に開示される方法と同一の様式で使用する。簡潔には、該キットを使用して本発明の変異体B E H A B分子をコードする核酸と細胞を接触させてよい。加えて、該キットは、アプリケーションおよび該キットの使用のための説明資料を含んでなる。これらの説明は単に本明細書に提供される例を例示する。

【0284】

該キットはさらに製薬学的に許容できる担体を包含する。該組成物は本明細書の別の場所に示されるところの適切な量で提供される。さらに、投与経路および投与頻度は本明細書の別の場所で以前に示されたとおりである。

40

【0285】

別の局面において、本発明は原発性C N S腫瘍を治療するためのキットを包含する。該キットは本発明について本明細書に開示される方法と同一の様式で使用する。簡潔には、該キットを使用して本発明の変異体B E H A Bポリペプチド分子と細胞を接触させてよい。加えて、該キットはアプリケーションおよび該キットの使用のための説明資料を含んでなる。これらの説明は単に本明細書に提供される例を例示する。該キットはさらに製薬学的に許容できる担体を包含する。該組成物は本明細書の別の場所に示されるところの適切な量で提供される。さらに、投与経路および投与頻度は本明細書の別の場所で以前に示され

50

たとおりである。

【0286】

本発明はさらに原発性CNS腫瘍の処置のためのキットを包含する。当業者は、該キットを本明細書に示される方法に従って使用し得ることを認識するであろう。該キットは、抗体、小分子、若しくはBEHABを結合するペプチド、またはそれらのなんらかのフラグメント、アプリケーション、ならびに本明細書に提供される実施例に実質的に類似の説明資料を含んでなる。該キットはさらに製薬学的に許容できる担体を包含し、その組成、投与経路および投与頻度は本明細書の別の場所で以前に開示されたとおりである。

【0287】

さらに、本発明は、哺乳動物のBEHAB分子をコードする核酸に相補的なアンチセンス核酸若しくはその何らかのフラグメントを含んでなるキットを含んでなる。こうしたキットを本発明の方法に従って使用してBEHABの低下された発現を媒介させ得る。加えて、該キットはアプリケーションおよび該キットの使用のための説明資料を含んでなる。これらの説明は単に本明細書に提供される例を例示する。該キットはさらに製薬学的に許容できる担体を包含する。アンチセンス核酸および製薬学的に許容できる担体は本明細書の別の場所に示されるところの適切な量で提供される。さらに、投与経路および投与頻度は本明細書の別の場所で以前に示されたとおりである。

【0288】

本発明はさらに原発性CNS腫瘍の処置のためのキットを包含する。簡潔には、該キットは、抗体、小分子、若しくはBEHAB切断生成物に特異的に結合するペプチド、またはそれらのなんらかのフラグメントを含んでなり、そして本明細書の別の場所に示される方法に従って使用し得る。本発明のキットはさらにアプリケーションおよび該キットの使用のための本明細書に示される方法に類似の説明資料を含んでなる。該キットはまた製薬学的に許容できる担体も含んでなり、その組成、投与の経路および頻度ならびに投薬量は本明細書で以前に示されている。

【0289】

本発明はさらにグリコシル化バリエーションBEHABアイソフォームを検出するためのキットを含んでなる。該キットはグリコシル化バリエーションBEHABアイソフォームに対する抗体を含んでなる。こうした抗体は本明細書の別の場所に開示されかつ示されている。該キットはさらに、本明細書の別の場所に示される方法を達成するための説明を包含するグリコシル化バリエーションBEHABアイソフォームの検出のための抗体の使用法に関する情報を含んでなる説明資料を含んでなる。

【0290】

本発明はさらに哺乳動物における原発性CNS腫瘍を診断するためのキットを含んでなる。該キットは、グリコシル化バリエーションBEHABアイソフォームを特異的に結合する抗体、アプリケーションおよび該キットの使用のための説明方法を含んでなる。アプリケーションの用途および原発性CNS腫瘍の診断方法は本明細書の別の場所に開示されている。

【0291】

本発明はまた原発性CNS腫瘍を治療するためのキットも包含する。該キットは、グリコシル化バリエーションBEHABアイソフォームを特異的に結合する抗体若しくはそのフラグメント、を含んでなる組成物、製薬学的に許容できる担体およびアプリケーションを包含する。抗体およびアプリケーションの使用方法は本明細書の別の場所に示されている。説明資料は原発性CNS腫瘍の処置のための本明細書に開示される方法を含んでなる。

【0292】

本発明はさらに免疫治療を使用して原発性CNS腫瘍を治療するためのキットを包含する。該キットは原発性CNS腫瘍を治療するための哺乳動物由来の細胞の刺激における使用のためのグリコシル化バリエーションBEHABアイソフォーム若しくはそのフラグメントを含んでなる。該キットはさらに、原発性CNS腫瘍に苦しめられている哺乳動物に免疫治療を提供するように細胞が刺激された後の哺乳動物へのグリコシル化バリエーションBEHABで刺激された細胞の投与のためのアプリケーションを含んでなる。該キットはまた、原

発性CNS腫瘍の免疫治療のための本明細書に開示される方法を含んでなる説明資料も包含する。

【実施例】

【0293】

[実験実施例]

本発明は今や以下の実施例に関して記述する。これらの実施例は具体的説明のみの目的上提供され、そして本発明はこれらの実施例に制限されるとしていかなる方法でも解釈されるべきでなく、しかしむしろ本明細書に提供される教示の結果として明らかになるいかなるおよび全部の変形も包含すると解釈されるべきである。

【0294】

本実施例で提示される実験で使用した材料および方法を今や記述する。

【0295】

部位特異的突然変異誘発：完全長BEHAB cDNAを、Zhangら(1998、Journal of Neuroscience 18:2370-2376)に記述されるとおり真核生物発現ベクターpCDNA3(Invitrogen、カリフォルニア州カールスバード)のEcoRI部位にクローン化した。完全長BEHABの発現ベクターを製造元のプロトコル(Stratagene、カリフォルニア州ラホヤ)に従ってクイックチェンジ(QUICKCHANGE)部位特異的突然変異誘発キットを使用して突然変異させた。適切な突然変異の組込みは蛍光標識ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーター法を使用するシーケンシングにより確認した。

【0296】

細胞培養およびトランスフェクション：CNS-1細胞(American Type Culture Collection、バージニア州マナサス)は10%ウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI中で増殖かつ維持した。細胞は4日ごとに分割(1:6ないし1:10)かつ再プレATINGした。75%コンフルエントの細胞を60mm組織培養プレートにプレATINGし、そして製造元のプロトコル(Roche、インジアナ州インジアナポリス)に従って4μgの適切な発現構築物およびFugene 6を使用してトランスフェクトした。簡潔には、DNAおよびFugene 6をそれらの標準培地中の細胞とともに6時間インキュベートし、その後培地を除去しかつ新鮮培地で一夜置換した。翌日、G-418(80μg/μl、Invitrogen)を用いて細胞をトランスジェンの発現について選択した。トランスフェクトした細胞の安定なプールは、G-418補充した培地中で細胞を2.5週間維持することにより生じさせた。選択後、安定にトランスフェクトされた細胞プールは(40μg/μl)の濃度のG-418を含有する培地中で維持した。

【0297】

in vitro増殖および細胞死アッセイ：細胞増殖および細胞死に対するトランスフェクションの影響を評価した。双方のアッセイについて、細胞は、200μlの培地中ウェルあたり $4 \times 10^4$ 細胞の初期プレATING密度で96ウェル組織培養プレート中で増殖させた。細胞増殖はMTT(臭化3,4,5-ジメチルチアゾル-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム;Sigma Chemical Co.、ミズーリ州セントルイス)の細胞の取り込みにより測定した。簡潔には、100μlの培地を除去しそして細胞死アッセイのため保存した。25μlのMTT(ダルベッコのリン酸緩衝生理的食塩水;DPBS中2mg/ml)を残存細胞および培地に添加しそして加湿インキュベーター(空气中5%CO<sub>2</sub>)中37°Cで3時間インキュベートした。100μlのイソプロパノール中40mM塩酸を添加して、生じる生成物を可溶化し、そしてサンプルを37°Cで2時間インキュベートした。サンプルはマイクロプレートリーダーを使用して550nmでの吸光度を測定することにより四重で分析した。

【0298】

100μlの細胞を含まない培地を細胞死アッセイに使用した。培地は、製造元の説明書(Roche、インジアナ州インジアナポリス)に従って細胞傷害性検出キットを使用

10

20

30

40

50

して乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性についてアッセイした。簡潔には、培地を乳酸 (LDH によりピルビン酸に酸化されかつ  $\text{NAD}^+$  を  $\text{NADH}$  に還元する) とともにインキュベートした。 $\text{NADH}$  はジアフォラーゼの存在下で黄色のテトラゾリウム塩の赤色のホルマザン塩への転化を触媒する。サンプルは、マイクロプレートリーダーを使用して  $450\text{nm}$  での吸光度を測定することにより四重で分析した。

#### 【0299】

動物試験：雌性 Lewis ラット (Charles River Laboratories、マサチューセッツ州ウィルミントン) を麻酔し ( $75\text{mg/kg}$  ケタミン、 $5\text{mg/kg}$  キシラジン)、そして耳内線の  $3.0\text{mm}$  下に切歯バーを設定した定位機器 (David Kopf Instruments、カリフォルニア州タハンガ) 中に配置した。約  $70\% \sim 80\%$  コンフルエントの CNS-1 細胞を、トリプシンを使用して  $100\text{mm}$  組織培養プレートから収集した。細胞を DPBS 中で 1 回洗浄し、そして  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の  $\text{MgCl}_2$ 、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の  $\text{CaCl}_2$  および  $0.1\%$  ブドウ糖を補充したリン酸緩衝生理的食塩水 (PBS) 中に、細胞の濃度が  $1 \times 10^5$  細胞/ $\mu\text{l}$  であった阻害剤を用いる生存曲線の場合を除き、 $5 \times 10^4$  細胞/ $\mu\text{l}$  の濃度で懸濁した。26 ゲージの面取りした針を取り付けた  $10\mu\text{l}$  ハミルトンシリンジを使用して、プレグマに対し  $2.8\text{mm}$  後方、正中線に対し  $2.2\text{mm}$  側方および硬膜に対し  $5.0\text{mm}$  腹側の座標で右視床に視床内注入を行った。合計  $3\mu\text{l}$  の容量の細胞懸濁液を 3 分にわたり注入し、そして、針は、ゆっくりとした引き抜きの前に追加の 1 分間その場所に残した。

10

#### 【0300】

動物の健康状態および生存率を 6 時間ごとに評価した。それらの側に置かれた 15 秒以内にそれら自身を立ち直らせることが可能でなかった動物は生存の終点に達したとみなしそして殺した。殺した日を生存の最終日として記録した。

20

#### 【0301】

組織学：ラットを深く麻酔し、そして PBS、次いで氷冷  $4\%$  PBS - パラホルムアルデヒドで経頭蓋灌流した。 $40\mu\text{M}$  の凍結切片をクライオスタット上で薄片に切断し、また、トランスフェクトした CNS-1 細胞を埋植した動物からの脳は冠状に薄片に切断した。腫瘍体積の推定のため 5 切片ごとにクレシルバイオレットで染色した。

#### 【0302】

画像解析および腫瘍体積推定：組織切片は NIH Image (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) を使用して解析した。腫瘍領域は、実験条件に対し盲検にされた研究者により 5 切片ごとに腫瘍全体で人的に境界を定めた。腫瘍体積は形態計測学的体積の Cavalieri の推定量 (Rosen と Harry、1990、Journal of Neuroscience Methods 35: 115 - 124) を使用して再構成した。

30

#### 【0303】

電気泳動およびウェスタン分析：サンプルを  $8\%$  SDS - PAGE ゲル上で電気泳動し、そしてその後タンパク質をニトロセルロースに電気泳動的に転写した (Laemmli ら、1970、Nature 227: 680 - 685; Towbin ら、1979、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 4350 - 4354)。プロットはウサギアフィニティー精製抗血清 ( $1:10,000$ ) 若しくは B50 ( $1:50,000$ ) (Matthews ら、2000、J. Biol. Chem. 275: 22695 - 22703)、次いでアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG 二次抗体 ( $1:4000$ 、Jackson ImmunoResearch Labs、ペンシルバニア州ウェストグローブ) とともにインキュベートした。免疫反応性のバンドをニトロブルーテトラゾリウムおよび 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドイルホスファターゼで可視化した。

40

#### 【0304】

統計学的解析：トランスフェクトした細胞株を埋植した動物間の比較の有意性は一元配置分散分析 (ANOVA) により決定した。in vitro 増殖および細胞死アッセイ

50

からの結果は、4 × 7 (細胞株 × 日) の対応のあるANOVAを使用して解析した。

【0305】

本実施例に提示される実験の結果を今や記述する。

【0306】

BEHAB切断に対するNVY突然変異の影響：原発性CNS腫瘍におけるBEHAB切断の役割を研究するために、BEHAB切断を封鎖若しくは阻害した構築物を生成した。完全長タンパク質の切断に対するBEHABのGlu<sup>395</sup>-Ser<sup>396</sup>切断を突然変異させることの影響を検査した。BEHABのGlu<sup>395</sup>-Ser<sup>396</sup>部位に非常に類似の切断部位を有するアグレカンでの以前の研究は、切断部位のすぐ下流の3アミノ酸のARGからNVYへの突然変異が切断を完全に封鎖したことを示した(Fosangら、2000、J. Biol. Chem. 275:33027-33037)。従って、部位特異的突然変異誘発を使用して、BEHAB切断に対するNVY突然変異の影響を検査した。この突然変異はアミノ酸切断部位を<sup>393</sup>Glu-Ser-Glu-Ser-Arg-Gly<sup>398</sup>から<sup>393</sup>Glu-Ser-Glu-Asn-Val-Tyr<sup>398</sup>(それぞれ配列番号1および配列番号2)に変えた。BEHAB切断に対するNVY突然変異の影響を評価するために、CNS-1細胞を完全長BEHAB若しくは変異させたBEHAB構築物のいずれかで一過性にトランスフェクトし、そしてB6およびB50抗体(それぞれC末端およびBEHAB切断により形成されるネオエピトープ(neo-epitope)を特異的に結合する、Matthewsら、2000、J. Biol. Chem. 275:22695-22703)を用いるウェスタンブロットにより、生じるタンパク質を分析した。

【0307】

正常および変異させた双方のBEHABで一過性にトランスフェクトした細胞はB6抗体を用いて示されるとおり(図1A)完全長の産物を産生した。正常の完全長BEHABは、B50抗体を用いて示されるとおり<sup>393</sup>Glu-Ser-Glu-Ser-Arg-Gly<sup>398</sup>切断部位で切断された。非常に対照的に、NVY変異体構築物でトランスフェクトした細胞により大量の完全長タンパク質が作成された一方で切断は検出されなかった(図1A)。NVY変異体のBEHABが切断されることが完全に不可能であったかどうかを決定するために、サンプルをB50抗体で免疫沈降させて痕跡量のそうした切断生成物を検出した。このより高感度のアッセイを用いてさえ反応性産物は検出されず、NVY突然変異が完全長タンパク質の切断を完全に阻害したことを示した。

【0308】

BEHABの切断に対するNVY突然変異の影響を、正常の完全長BEHABおよびNVY構築物でCNS-1細胞をコトランスフェクトすることによりさらに検討した。これらの実験は、NVY変異体BEHABが正常基質の切断を阻害し得るかどうかを決定するように設計した。細胞を、2 μgの完全長BEHAB発現構築物および0、1、2若しくは4 μgいずれかの変異させたBEHAB構築物でコトランスフェクトした。NVY変異体構築物の添加は完全長BEHABの量を増大させた一方、それは完全長BEHABタンパク質を切断するプロテアーゼの能力に対する影響を有しなかった(図1B)。これらの結果は、いずれかの特定の論理により束縛されることを願わないとは言え、変異体のBEHABはそれ自身で切断不可能である一方でそれは必ずしもプロテアーゼを阻害しないことを示唆する。

【0309】

細胞増殖および細胞死に対するNVY変異体の影響：細胞増殖および細胞死に対するBEHABのNVY切断部位突然変異の影響を評価するため、CNS-1細胞を、緑色蛍光タンパク質(GFP)発現ベクター(CNS-1-GFP)、正常BEHAB発現ベクター(CNS-1-FL)若しくはNVY変異させたベクター(CNS-1-NVY)のいずれかで安定にトランスフェクトした。安定にトランスフェクトされた細胞のプールをG418中で選択しそして上述されたとおり分析した。一過性トランスフェクションを使用して観察されたとおり、CNS-1-NVY細胞のプールは完全長BEHABを作成した

がしかしそれを切断しなかった(図1C)。

#### 【0310】

MTTアッセイを使用して、安定にトランスフェクトされた細胞で細胞増殖を *in vitro* で分析した。MTTはコハク酸-テトラゾリウム還元酵素系(ミトコンドリア呼吸鎖の酵素系)により色素に転化されてそれにより生存可能細胞の数の尺度を提供する。増殖は7日にわたって評価した。トランスフェクトした細胞のいずれでも細胞増殖に差異は存在しなかった(図2A)。さらに、トランスフェクトしたプールのいずれも、トランスフェクトしていない親CNS-1細胞とのいかなる差異も示さなかった。

#### 【0311】

細胞死はLDHアッセイを使用して評価した。LDHは通常細胞質中にのみ存在する酵素である。死んだ若しくは死につつある細胞により放出される場合にのみLDHが存在する、培地中でLDH活性を測定した。全細胞株において、最初の4日にわたって約2%ないし約3%という低レベルの細胞死が存在した。細胞死はその後毎日わずかに増加したが、しかしながらいかなる時間点でもいかなる細胞株間でも細胞死パーセントの差異は存在しなかった(図2B)。従って、変異させた構築物は切断不可能である一方でそれは *in vitro* の細胞の増殖若しくは死に対する明らかな影響を有しない。

#### 【0312】

NVY切断不可能BEHABはCNS-1腫瘍の表現型に影響を及ぼさない: 以前の研究は、正常の完全長BEHABでトランスフェクトしたCNS-1細胞がGFPでトランスフェクトした対照より大きな腫瘍を形成することを示した。しかしながら、BEHABを産生も切断もしない9L細胞においては、完全長BEHABでのトランスフェクションは腫瘍の表現型を変化させない(Zhangら、1998、*J. of Neurosci* 18:2370-2376)。腫瘍の進行におけるBEHAB切断の役割を検討するために、上述された発現ベクターで安定にトランスフェクトされたCNS-1細胞のプールを頭蓋内移植片として増殖させた。腫瘍埋植8日後に動物(n=8)を灌流しかつそれらの脳を組織学のため処理した。5切片ごとにクレシルバイオレットで染色し、そして画像解析により腫瘍面積を推定した。体積はこれらの解析から再構成した。以前の結果と一致して、CNS-1-FL腫瘍はCNS-GFPより大きくかつより浸潤性であった。CNS-1-NVY腫瘍は大きさがCNS-1-GFP腫瘍と有意に異ならなかった。しかしながら、重要なことに、CNS-1-NVY腫瘍はCNS-1-FL腫瘍より有意により小さかった(表1、図3)。いずれかの特定の論理により束縛されることを願わない一方、これらの結果は、BEHAB単独の産生が腫瘍の進行を増大させるのに不十分であるが、しかし完全長タンパク質の切断がこの過程で決定的に重要な役割を演じていることを示す。

#### 【0313】

腫瘍の進行に対する変異させたBEHABの影響をさらに検討するために、動物(n=6)の生存に対する変異体BEHAB構築物の影響を検討した。CNS-1-FL腫瘍が動物の生存を低下させることが以前に発見された(Nuttら、2001、*Cancer Res.* 61:7056-7059)。これらの結果に一致して、CNS-1-FL腫瘍を埋植した動物はCNS-1-GFP腫瘍を埋植した動物より平均3日より早く生存の終点に達した。しかしながら、CNS-1-NVYを埋植した動物は対照より早く生存の終点に達しなかった。事実、CNS-1-NVY腫瘍を伴う動物はCNS-1-GFPを埋植した動物よりわずかにより長く生存したが、とは言え今日までのこの研究における動物の数では該差異は有意でない。CNS-1-NVYを埋植した動物はCNS-1-FLを埋植した動物より平均4日より長く生存した(生存の23%増加)(表1、図4)。

#### 【0314】

10

20

30

40

【表 2】

表1

| 腫瘍型       | 腫瘍体積<br>(mm <sup>3</sup> ) | CNS-1-FLに<br>比較した有意性 | 生存日数        | CNS-1-FLに<br>比較した有意性 |
|-----------|----------------------------|----------------------|-------------|----------------------|
| CNS-1-FL  | 9.2 ± 4.3                  |                      | 17.6 ± 0.76 |                      |
| CNS-1-GFP | 4.4 ± 3.4                  | p<0.05               | 20.5 ± 0.88 | p<0.05               |
| CNS-1-NVY | 4.0 ± 4.2                  | p<0.05               | 21.6 ± 1.1  | p<0.05               |

10

## 【0315】

## [実施例2]

ラット脳の細胞成分分画：

生後数日齢の雌性 Lewis ラットをハロタン下に深く麻酔しそして断頭により殺した。在胎齢 14 ないし 18 日の胚を氷上の終末麻酔妊娠ラットから迅速に取り出しかつ断頭した。前脳を氷上で迅速に切開しかつ 0.32 M ショ糖 (TS 緩衝液) およびプロテアーゼ阻害剤カクテル (完全に EDTA を含まない、Roche、インジアナ州インジアナポリス) を含有する 10 容量の 25 mM トリス HCl、pH 7.4 中でホモジェナイズした。ホモジェネートを 950 g で 10 分間遠心分離し、そして核ペレット (P1) を TS 緩衝液中での迅速な再ホモジェナイズにより 1 回洗浄しかつ上のとおり遠心分離した。後核上清 (post-nuclear supernatant) を合わせかつ 100,000 g で 60 分間遠心分離して全微粒子および可溶性分画を調製した。

20

## 【0316】

成体ラット前脳サンプルからのさらなる細胞成分分画のため、上で示されたとおり得た後核上清を、確立したプロトコル (Rodriguez de Lores ら、1967、J. Neurochem 14: 215-225) に従って遠心分離して、ミトコンドリア/シナプトソームペレット (P2)、軽ミトコンドリアペレット (P3) および最終可溶性分画を生じた。ミトコンドリアおよびシナプトソーム膜を分離するために、P2 ペレットを例えば (Jones と Matus、1974、Biochim. Biophys. Acta 356: 276-287) に記述されるような不連続的ショ糖勾配中で分離した。タンパク質の電気泳動のための細胞成分分画を調製するために、10 mM EDTA を含有する 40 mM トリス HCl / 40 mM 酢酸ナトリウム、pH 8 (CH 緩衝液) 中 1~2 mg/ml の最終総タンパク質濃度で膜および可溶性分画のアリコート平衡化し、そして 0.25 U/ml のプロテウス ブルガリス (Proteus vulgaris) からのプロテアーゼを含まないコンドロイチナーゼ ABC (EC 4.2.2.4、生化学工業、マサチューセッツ州ファルマス) で 37 °C で 8 時間処理した。コンドロイチナーゼの反応は 1 × ゲル負荷緩衝液の存在下でサンプルを沸騰させることにより停止した。

30

40

## 【0317】

脳膜からの BEHAB アイソフォームの遊離：

多様な BEHAB アイソフォームの細胞膜との会合を特徴づけるため、ラット前脳から得た全膜 (1 ないし 2 mg 全タンパク質/ml) を、10 mM EDTA 若しくは 0.2% Triton X-100 の存在若しくは非存在下 50 mM トリス HCl 緩衝液、pH 7.4 に 4 °C で 1 時間再懸濁した。あるいは、膜は 100 mM 炭酸ナトリウム、pH 11.3 に 4 °C で 30 分間再懸濁した。インキュベーション後に膜を 20,800 g で 20 分

50

間遠心分離した。遊離されたBEHABを上清中で回収し、そして保持されたBEHABを含有する膜を50mMトリスHCl緩衝液で2回洗浄しかつ同一の初期容量に再懸濁した。最終的に全サンプルをCH緩衝液で平衡化しかつタンパク質電気泳動前にコンドロイチナーゼABCで処理した。免疫沈降研究のため、膜を0.6%w/v CHAPSを含有する50mMトリスHCl、pH7.4中4で1時間抽出し、そして標準的プロトコルに従ってさらに処理した。

#### 【0318】

PI-PLC処理およびTriton X-114での洗剤抽出：

BEHABのGPIアンカー型アイソフォームを示すため、ラット脳ミクロソーム膜を、0.25U/mlのコンドロイチナーゼABCおよび1U/mlのパチルスセレウス(Bacillus cereus)からのホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼC(PI-PLC、EC 3.1.4.10、Sigma、ミズーリ州セントルイス)を含むCH緩衝液に37で8時間再懸濁した。その後サンプルをSDS-PAGEにより分離した。BEHABのGPIアンカーを遊離させる前のGPIアンカー型BEHABの電気泳動移動度を測定するために、洗剤Triton X-114(Sigma、ミズーリ州セントルイス)を使用して、コンドロイチナーゼ処理したラット脳膜でタンパク質抽出を実施した。Triton X-114は、以前に確立した手順(Bordier、1981、J. Biol. Chem. 256:1604-1607)に従って、疎水性若しくはGPI結合型タンパク質からの水溶性の膜会合型タンパク質の分離を可能にする。簡潔には、ミクロソーム膜を2mg全タンパク質/mlでCH緩衝液に再懸濁し、そして前濃縮した10%v/vのTriton X-114を2%v/vの最終濃度まで添加することにより氷上で60分間洗剤抽出した。可溶化したタンパク質は、該抽出物を低温遠心機中20,800gで20分間遠心分離した後に上清から回収した。この上清を37で加温して水層および洗剤含有層を生じさせた。双方の層を室温で2000gで10分間の遠心分離により単離し、そして交差汚染を回避するため徹底的に洗浄した。洗剤層中の抽出されたタンパク質を-20で酸性エタノールで沈殿させ、冷アセトンで洗浄し、そして0.6%w/vのCHAPSの存在下に少量のCH緩衝液に再可溶化した。水層および洗剤層からのサンプルをSDS-PAGE前にPI-PLCで37で8時間処理した。

#### 【0319】

細胞培養およびトランスフェクション：

ラットCNS-1神経膠腫細胞株(Dr. W. Hickey、Dartmouth-Hitchcock Medical Center、ニューハンプシャー州レバノンにより恵与さる)を、10%FCS(Hyclone、ユタ州ローガン)、50μg/mlペニシリンおよび50μg/mlストレプトマイシン(Gibco、カリフォルニア州ラホヤ)を補充したRPMI-1640培地中5%CO<sub>2</sub>で増殖させた(Kruseら、1994、J. Neurooncol. 22:191-200)。マウス乏突起細胞前駆細胞Oli-neu株(Dr. J. Trotter、Department of Neurobiology、University of Heidelberg、ドイツにより恵与さる)は、25μg/mlジェネチシン(Gibco、カリフォルニア州ラホヤ)を補充したサトウ培地(Jungら、1995、Eur. J. Neurosci. 7:1245-1265)中ポリ-D-リシンプレート(Beckton-Dickinson、ニュージャージー州フランクリンレイクス)上で増殖させた。CNS-1細胞は例えばZhangら(1998、J. Neurosci. 18:2370:2376)、Dr. Yu Yamaguchi、Burnham Instituteにより恵与さる)を含有するpCDNA3.1ベクター(Invitrogen、カリフォルニア州ラホヤ)でトランスフェクトした(Yamadaら、1995、Biochem. Biophys. Res. Commun. 216:957-963)。対照細胞はGFPをコードするcDNA挿入物を含有するpCDNA3.1ベクター(Dr. Tom Hughes

、Yale Universityにより恵与さる)でトランスフェクトした。安定なトランスフェクタントを1mg/ml ジェネチシン(Gibco、カリフォルニア州ラホヤ)中で選択した。Oli-neu細胞は同一のラットBEHAB cDNAで一過性にトランスフェクトした。加えて、完全長ラットBEHAB cDNAをpCDNA3.1/V5-6xHisベクターにサブクローニングしてV5/6xHis標識BEHABを生じさせ、これもまたOli-neu細胞に一過性にトランスフェクトした。全部の場合で、所望のトランスジーンの発現をノーザンブロット分析(Zhangら、1998、J. Neurosci. 18:2370:2376)により確認し、また、BEHABタンパク質の存在は本明細書の別の場所に記述されることのウェスタンブロット分析により確認した。

10

## 【0320】

細胞膜の調製および免疫細胞化学：

細胞はトランスフェクション後24~48時間にルーチンで収集し、そしてプロテアーゼ阻害剤カクテル(完全、EDTAを含まない、Roche、インディアナ州インディアナポリス)および2U/mlのRNアーゼを含まないDNアーゼI(Roche、インディアナ州インディアナポリス)を含有する25mMリン酸緩衝液、pH7.4中でホモジェナイズした。全膜を20,800g×30分の遠心分離により得、そしてタンパク質の電気泳動のため調製した。

## 【0321】

トランスフェクトしたOli-neu細胞の生存免疫細胞化学染色のため、培養物を、V5/6xHis標識完全長BEHAB cDNAでのトランスフェクション前に24ウェルプレート中ガラス製カバーガラス上で24~48時間増殖させた。未固定の浸透化されない培養物を、血清を含まないDMEM(Gibco、カリフォルニア州ラホヤ)ですすぎ、そしてその後モノクローナル抗V5抗体(Invitrogen、カリフォルニア州ラホヤ)とともに4で30分間インキュベートした。培養物をDMEMですすぎ、4%パラホルムアルデヒド、pH7.4中20分間固定し、すすぎ、そしてその後Alexa結合ヤギ抗マウスIgG<sub>1</sub>二次抗体(Molecular Probes、オレゴン州ユージーン)とともに60分間インキュベートした。培養物を最後にPBSですすぎ、ヨウ化プロビジウム(0.2μg/ml)で短く対染色しそして蛍光顕微鏡検査のため調製した。

20

30

## 【0322】

頭蓋内移植片：

安定にトランスフェクトされたCNS-1細胞の頭蓋内移植片は例えばJaworskiら(1996、Cancer Res. 56:2293-2298)に記述されるとおり実施した。簡潔には、細胞を80%コンフルエンスで収集し、PBSで洗浄しそして注入緩衝液(1μg/mlのMgCl<sub>2</sub>、1μg/mlのCaCl<sub>2</sub>および0.1%w/v D(+))ブドウ糖を補充したPBS)に5×10<sup>4</sup>細胞/μlの濃度で再懸濁した。細胞懸濁液(3μl)を45日齢雌性Lewisラットの視床中に5分の期間にわたって定位注入した。動物をそれらのケージに戻し、そして損なわれた神経学的機能の兆候について2週間の間モニターした。2週間後にラットを終末麻酔かつ断頭し、そして脳を迅速に切開し、ドライアイス上で凍結させかつさらなる処理のため-70で保存した。脳を粗く切断しそして可視化した腫瘍ならびに腫瘍が検出されなかった脳の反対側の同等な領域からサンプルを得た。正常ラット脳およびラット脳神経膠腫の可溶性および微粒子分画を本明細書の別の場所に記述されるとおり調製した。

40

## 【0323】

グリコシダーゼ処理：

BEHABアイソフォーム中に存在するO-結合オリゴ糖を除去するために、コンドイチナーゼ処理したサンプルを10mMトリスHCl、10mM酢酸ナトリウム、100mM NaCl、pH7中で平衡化し、そして肺炎双球菌(Diplococcus pneumoniae)からの20mU/mlのO-グリコシダーゼ(EC 3.2.1.

50

97、Roche、インジアナ州インジアナポリス)およびアルトロバクター ウレアフアシエンズ (*Arthrobacter ureafaciens*)からの100mU/mlのノイラミニダーゼ (EC 3.2.1.18、Roche、インジアナ州インジアナポリス)で処理した。同様に、N-結合オリゴ糖は、クリセオバクテリウム メニンゴセプチウム (*Chryseobacterium meningosepticum*)からの100U/mlのグリコペプチダーゼF (EC 3.5.1.52、Sigma、ミズーリ州セントルイス)とのインキュベーションにより除去した。全部の場合で、サンプルはプロテアーゼ阻害剤の存在下37で8時間酵素とともにインキュベートした。酵素消化はサンプルを1xゲル負荷緩衝液中で沸騰させることにより停止した。

#### 【0324】

ウェスタンブロット分析：

サンプルを還元7%SDSポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、そしてタンパク質をニトロセルロースに電気泳動的に転写した。ブロットを、ラットBEHABのGAG結合領域(アミノ酸506-529)に対応する合成ペプチドに対し生じさせたアフィニティー精製したウサギポリクローナル抗体(B6)とともにインキュベートした。あるいは、BEHABは、ラットBEHABのアミノ酸60-73(抗体B5)およびヒトBEHABのアミノ酸859-879(抗体BCRP)に対応する合成ペプチドに対し生じさせたアフィニティー精製したウサギポリクローナル抗体を使用することにより検出した。BEHABの50kDaの切断生成物は、完全長タンパク質のタンパク質分解性プロセッシングにより発生されたネオエピトープに対し向けられた抗体(B50)で検出した。抗体B6、B5およびB50は検出若しくはラット脳サンプル中のラットBEHABについて以前に記述されている(Matthewsら、2000、*J. Biol. Chem.* 275:38885-38890)。V5/His標識組換え完全長BEHABはモノクローナル抗体抗B5エピトープ(Invitrogen、カリフォルニア州ラホヤ)で検出した。全部の場合で、アルカリホスファターゼ結合二次抗体を使用した。免疫反応性のバンドをニトロブルーテトラゾリウムおよび5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェートで可視化した。

#### 【0325】

本実施例に提示される実験の結果を今や記述する。

#### 【0326】

ラット脳中の新規の発達的に調節されるBEHABアイソフォームの同定。

#### 【0327】

BEHABタンパク質はラット脳中で約胚第18日(E18)に検出され、レベルは生後の発達中に増大して生後第21日(P21)までに成体の発現レベルに達した(図5)。E14での検出可能なタンパク質の欠如は、BEHAB mRNAがE16後にのみラット皮質中でのin situハイブリダイゼーションにより最初に検出されたことを示す以前の観察結果(Jaworskiら、1995、*J. Neurosci.* 15:1352-1362)と矛盾しなかった。コンドロイチナーゼ処理によるGAG鎖の除去後に、BEHABの最大のアイソフォームが約150kDaで移動した(完全長BEHAB)。完全長BEHABアイソフォームは主として発達の早期に可溶性分画で検出されたが、しかし後には可溶性および微粒子双方の分画で見出された。

#### 【0328】

発達の経過にわたる完全長BEHABの発現の増大と同時に、完全長BEHABの主要な切断生成物もまた増大した(図5)。完全長BEHABおよびその切断生成物は最初に可溶性分画中で検出されるが、しかし、発達の経過にわたってラット脳ホモジェネートの微粒子分画にますます局在化する。

#### 【0329】

本明細書に開示される免疫化学的分析はまた、微粒子分画中の約130kDaの分子量をもつ新たなグリコシル化バリエーションBEHABアイソフォームを示す。該グリコシル化バリエーションBEHABは早期の生後発達の間(P3からP14まで)にアップレギュレー

10

20

30

40

50

トされた一方、完全長 B E H A B の最大発現は発達の後のほう、すなわち P 2 1 から成体までであった。

#### 【0330】

グリコシル化バリエーション B E H A B は G P I 結合型 B E H A B アイソフォームと異なるグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームおよび G P I 結合型 B E H A B アイソフォームはラット脳単離物の微粒子分画に共局在する。グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームおよび G P I 結合型アイソフォームの共通の微粒子局在化を考え、これら 2 種のアイソフォーム間の差異を検討した。完全長 B E H A B およびグリコシル化バリエーション B E H A B の双方が T r i t o n X - 1 0 0 のような非イオン性洗剤 ( 図 6 A ) および C H A P S のような双極性イオン性洗剤により微粒子分画から遊離された。実際、双方のアイソフォームは約 0 . 2 % w / v の T r i t o n X - 1 0 0 の洗剤濃度により遊離され、膜とのそれらの疎水性相互作用の破壊に対する特段の感受性を示した。この観察結果はグリコシル化バリエーション B E H A B が G P I 結合型タンパク質でないかもしれないことを示唆した。多くの G P I 結合型タンパク質が原形質膜塊 ( r a f t ) 中に存し、かつ T r i t o n X - 1 0 0 中で低い溶解性を有する傾向があるからである ( S c h r o e d e r ら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12130-12134)。しかしながら、G P I 結合型 B E H A B アイソフォームは T r i t o n X - 1 0 0 抽出に対し感受性であった ( S e i d e n b e c h e r ら、1995、J. Biol. Chem. 270:27206-27212)。逆に、膜会合型の膜タンパク質を遊離させるがしかし G P I 結合型若しくは内在性膜タンパク質はしないアルカリ性の炭酸ナトリウムでの短い処理もまた、微粒子分画から完全長 B E H A B およびグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォーム双方を遊離させた ( 図 6 A )。一緒にすれば、これらの結果は、完全長 B E H A B およびグリコシル化バリエーション B E H A B の双方が細胞膜と周辺で会合していることがありそうであることを示す。

#### 【0331】

グリコシル化バリエーション B E H A B が G P I 結合型 B E H A B アイソフォームでありうるかどうかをさらに試験するため、成体ラット脳からの膜を P I - P L C ( G P I 結合型タンパク質を遊離させ得る酵素 ) で処理した。P I - P L C 処理はおよそ 120 k D a の 1 本のバンドを生成させ、ここでは、非還元 7 % アクリルアミドゲル中で完全長 B E H A B およびグリコシル化バリエーション B E H A B と明確に識別された ( 図 6 B )。この 120 k D a のバンドは P I - P L C により完全に遊離され、そして生じる微粒子 ( 膜 ) 分画中で検出されなかった ( 図 6 C )。脳ホモジェネートの可溶性分画の P I - P L C での処理は 120 k D a のバンドを生じさせず、120 k D a のバンドをもたらす G P I 結合型アイソフォームが、G P I 結合型タンパク質について予測されるであろうとおり、微粒子分画に特異的に局在したことを示した。生じる上清 ( s ) およびペレット分画 ( p ) をウェスタンブロットにより分析し、120 k D a のバンドが P I - P L C 処理により膜から完全に遊離される一方で 130 k D a のバンドは遊離されないことを示した。水層中の B E H A B アイソフォームは P I - P L C 処理 ( H<sub>2</sub>O + P L C ) 後に移動度を移動しないが、しかし洗剤層中の 150 k D a のバンドは P I - P L C 処理 ( T x + P L C ) 後におよそ 120 k D a に移動し、これが B E H A B の G P I 結合型スプライズバリエーションであることを確認する ( 図 6 )。矢印は完全長 B E H A B ( B / b<sub>F L</sub> )、グリコシル化バリエーション B E H A B ( B / b<sub>g</sub> ) および G P I 結合型 B E H A B アイソフォームを示す。

#### 【0332】

完全長 B E H A B は G A G 結合を伴いおよび伴わずに検出された ( Y a m a g u c h i、1996、Perspect. Dev. Neurobiol. 3:307-317)。従って、P I - P L C により遊離される 120 k D a のバンドの検出はコンドロイチナーゼ A B C での前処理を必要としたため、該データは、G P I 結合型アイソフォームの大部分がコンドロイチン硫酸プロテオグリカンに付随していることを示唆した。

#### 【0333】

P I - P L C 処理が 120 k D a のバンドの発生に至った一方、グリコシル化バリエア

10

20

30

40

50

ト B E H A B の免疫反応性は影響されなかった。この結果は、120 kDa のバンドがグリコシル化バリエーション B E H A B 由来ではなかったこと、および従ってグリコシル化バリエーション B E H A B が G P I 結合型 B E H A B アイソフォームでなかったことを示した。G P I アンカー型 B E H A B アイソフォームの P I - P L C 処理後に免疫反応性のバンドのいずれの明らかな枯渇も存在しなかったため、G P I アンカー型 B E H A B アイソフォームの脂質アンカーの除去前のその分子量を検討した。G P I アンカー型 B E H A B アイソフォームの分子量を決定するために、G P I 結合型アイソフォームを脂質アンカーの除去前に全部の他の B E H A B アイソフォームから単離した。その目的のため、膜分画を洗剤 T r i t o n X - 1 1 4 で抽出した。

#### 【0334】

T r i t o n X - 1 1 4 は 4 で水とともに均質な溶液を形成するがしかし 37 で水層および洗剤層に分配する。内在型膜および G P I 結合型タンパク質を包含する大きな疎水性のドメインをもつタンパク質のみが洗剤層に分配する一方、膜会合型タンパク質は水層に分配する ( B o r d i e r , 1 9 8 1 , J . B i o l . C h e m . 2 5 6 : 1 6 0 4 - 1 6 0 7 ) 。従って、全部の B E H A B アイソフォームは水層に分配して G P I アンカー型アイソフォームのみを洗剤層に残すはずである。T r i t o n X - 1 1 4 抽出は最終洗剤層中におよそ 150 kDa のバンドの単一バンドのみをもたらした ( 図 6 D ) 。この層から沈殿されたタンパク質を P I - P L C で処理した場合、150 kDa のバンドが消失しそしておよそ 120 kDa のバンド ( G P I 結合型 B E H A B アイソフォームのアンカーを伴わないそれについて以前に観察された位置 ) により置換された。さらに、グリコシル化バリエーション B E H A B を包含した水溶性層中のタンパク質の P I - P L C 処理は 150 kDa のバンドのいかなる喪失にも至らず、また、およそ 120 kDa のバンドの出現に至らなかった。これらの結果は、グリコシル化バリエーション B E H A B が B E H A B のグリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型 ( g l y p i a t e d ) アイソフォームでないことを確認した。さらに、該結果は、G P I 結合型 B E H A B の脂質アンカーの除去前にそれが優勢な分泌型のアイソフォームすなわち完全長 B E H A B と類似の分子量で泳動し、従って該 2 形態の同時検出は前抽出なしで困難であることを示す。

#### 【0335】

グリコシル化バリエーション B E H A B は完全長 B E H A B の切断生成物でない

本明細書に記述される結果は、グリコシル化バリエーション B E H A B が B E H A B の G P I 結合型アイソフォームと異なることを示した。グリコシル化バリエーション B E H A B の別の可能な起源は、それが完全長すなわち完全長 B E H A B の切断生成物であることである。グリコシル化バリエーション B E H A B 上の完全長 B E H A B の N および C 末端エピトープの存在を使用して、グリコシル化バリエーション B E H A B が完全長 B E H A B の切断生成物であるかどうかを検討した。完全長 B E H A B を、ラット B E H A B の G A G 結合領域中の 1 エピトープを認識する抗体 B 6 を使用してラット脳膜調製物から免疫沈降させた ( 図 7 A ) 。免疫沈降させたタンパク質を、B E H A B の N ( B 5 ) および C ( B C R P ) 末端の 10 kDa 以内に位置するエピトープに対する抗体でイムノプロットした ( 図 7 A ) 。グリコシル化バリエーション B E H A B が完全長 B E H A B の末端短縮切断生成物を表す場合、N 若しくは C 末端抗体の一方がグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームを検出することに失敗するとみられる。しかしながら、完全長 B E H A B およびグリコシル化バリエーション B E H A B の双方が抗 B E H A B 抗体の全 3 種により検出され ( 図 7 B ) 、グリコシル化バリエーション B E H A B が完全長 B E H A B の切断生成物でなかったことを示唆した。さらに、C 末端 B C R P 抗体によるグリコシル化バリエーション B E H A B の検出はグリコシル化バリエーション B E H A B が G P I 結合型アイソフォームでなかったことの直接の証拠を提供した。C R P ドメインは G P I 結合型スプライズバリエーションに存在しないからである。

#### 【0336】

これらのデータは、グリコシル化バリエーション B E H A B が G P I 結合型アイソフォームでもなく、また、それが完全長転写物の切断生成物でもないことを示した。グリコシル化

10

20

30

40

50

バリエーション B E H A B の分子供給源をさらに検討するため、ラット神経膠腫細胞株 C N S - 1 を、完全長ラット B E H A B タンパク質をコードする B E H A B c D N A でトランスフェクトした。トランスフェクトした C N S - 1 細胞は完全長 B E H A B およびグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームの双方を産生し、そして双方は全 3 種の抗 B E H A B 抗体で検出された。さらに、完全長 B E H A B およびグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームの分布はラット脳で観察されたものと緊密に一致し、完全長 B E H A B は主として培地中に見出されかつグリコシル化バリエーション B E H A B は独占的に膜と会合して見出された ( 図 7 C ) 。

#### 【 0 3 3 7 】

完全長および G P I 結合型双方の B E H A B m R N A を内因性に発現するマウス乏突起細胞前駆細胞株 O l i - n e u における B E H A B 発現もまた検討した。抗体はラット B E H A B を認識したがしかしマウス B E H A B はしなかったため、完全長のラット B E H A B をコードする c D N A で O l i - n e u 細胞をトランスフェクトした。C N S - 1 細胞と対照的に、われわれはトランスフェクトした O l i - n e u 細胞中でグリコシル化バリエーションアイソフォームのみを検出した。しかしながら、C N S - 1 細胞と同様に、発現されたグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームは膜分画に独占的に見出された ( 図 7 D ) 。これらの結果を確認するために、C 末端 V 5 / 6 x H i s エピトープを伴う完全長ラット B E H A B c D N A で O l i - n e u 細胞をトランスフェクトした。再度、O l i - n e u 細胞は標識グリコシル化バリエーションアイソフォームを発現したのみであり ( 抗 B E H A B 抗体および抗 V 5 抗体双方で検出された ) ( 図 7 D ) 、膜会合型のグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームが完全長 B E H A B タンパク質を表すことのさらなる証拠を提供した。

#### 【 0 3 3 8 】

完全長 B E H A B およびグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームは単一コアタンパク質の差次的グリコシル化から生じる

グリコシル化バリエーション B E H A B は完全長 B E H A B と同一の m R N A 由来でありかつタンパク質分解性プロセッシングの結果でなかったため、異なる翻訳後修飾がこれら 2 種のアイソフォーム間の大きさの差異の原因であるに違いないことが可能である。B E H A B は N - 結合糖、コンドロイチン硫酸 G A G 鎖および付加的な O - 結合糖を運搬する。従って、グリコシル化の差異がグリコシル化バリエーション B E H A B と完全長 B E H A B との間の大きさの差異を説明するかもしれない。完全長 B E H A B と異なり、グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームはコンドロイチン硫酸鎖を欠くようであった。コンドロイチナーゼ A B C 処理はバンドの見かけの分子量を移動も高めもせず、若しくはその免疫反応性を低下させた。さらに、N - および O - 結合糖を除去する酵素の組合せは、完全長 B E H A B のバンドをグリコシル化バリエーション B E H A B の位置に向かって移動させた ( 図 8 ) 。対照的に、グリコシル化バリエーション B E H A B の電気泳動移動度はグリコシダーゼでの処理により影響を受けず、このアイソフォームが完全長 B E H A B 上に存在する N - および O - 結合糖の大部分を欠いたことを示した。これらの結果は、グリコシル化バリエーション B E H A B が B E H A B / プレピカンの別個の未グリコシル化若しくは過少グリコシル化アイソフォームであることを示した。

#### 【 0 3 3 9 】

グリコシル化バリエーション B E H A B はカルシウム非依存性の機構により脳膜と会合する  
グリコシル化バリエーション B E H A B 、および完全長 B E H A B の膜会合成分が膜調製物から遊離された条件を検討した。B E H A B はカルシウム依存性の機構によりテナシン - R および硫酸化糖脂質のサブセットに結合されている ( A s p e r g ら、1997、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 94 : 10116 - 10121 ; M i u r a ら、1999、J . B i o l . C h e m . 274 : 11431 - 11438 ) 。膜と B E H A B のカルシウム依存性の会合を、二価の陽イオンキレート剤 E D T A を使用して検討した。完全長 B E H A B は E D T A により部分的に遊離され、膜とのカルシウム依存性の会合を確認した。極めて対照的に、グリコシル化バリエーション B E H A B は E D T A によ

10

20

30

40

50

り遊離されず、カルシウム非依存性の機構による膜との会合を示した。細胞膜へのグリコシル化バリエーション B E H A B のカルシウム非依存性の結合は V 5 / 6 x H i s - B E H A B でトランスフェクトした O l i - n e u ( 図 9 B ) および C N S - 1 細胞によりさらに支持された。これら 2 細胞株における細胞膜とのグリコシル化バリエーション B E H A B の会合はまた E D T A 非感受性でもあり、ラット脳グリコシル化バリエーション B E H A B の挙動を模倣した。

#### 【 0 3 4 0 】

グリコシル化バリエーション B E H A B はミクロソーム膜分画中で濃縮されておりかつ細胞表面上に存在する

完全長 B E H A B はラット脳の主要な細胞成分分画の大部分で検出された一方、グリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームは軽ミクロソーム分画中で濃縮されており ( 図 1 0 ) 、細胞膜との会合と矛盾しなかった。グリコシル化バリエーション B E H A B はまた重ミトコンドリア/シナプトソーム分画でも検出されたが、しかし、不連続的シヨ糖勾配中でのさらなる細分画は、グリコシル化バリエーション B E H A B がシナプトソーム細胞成分に制限されたことを示し、このアイソフォームが原形質膜に局在化されていることがありそうであることのさらなる証拠を提供した。

#### 【 0 3 4 1 】

シナプトソームおよびミクロソーム分画は小胞体膜を含有するため、グリコシル化バリエーション B E H A B のオリゴ糖の欠如と一緒にあったミクロソーム中でのその検出は、グリコシル化バリエーション B E H A B が翻訳後グリコシル化の欠如により細胞内分泌経路に保持される分泌型 B E H A B の前駆体であるかもしれないという可能性を提起した。O l i - n e u 細胞中でのグリコシル化バリエーション B E H A B の細胞成分局在化の検査を使用して、グリコシル化バリエーション B E H A B が細胞表面に輸送されたかどうかを決定した。本明細書に記述されるとおり、B E H A B c D N A でトランスフェクトした O l i - n e u 細胞はグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームのみを発現し ( 図 7 D ) 、それにより完全長 B E H A B アイソフォームの非存在下でのその細胞の局在化を研究するためのモデルを提供する。生存の V 5 / 6 x H i s - B E H A B でトランスフェクトした O l i - n e u 細胞の染色はこのアイソフォームが細胞外表面上で実際に検出されたことを示した ( 図 1 1 ) 。これらの結果は、グリコシル化バリエーション B E H A B がそのグリコシル化の欠如にもかかわらず分泌経路を通して細胞表面に輸送されることを示す。

#### 【 0 3 4 2 】

グリコシル化バリエーション B E H A B は浸潤性神経膠腫のラットモデルにおいてアップレギュレートされている B E H A B の主要なアイソフォームである

本明細書の別の場所に詳述されるとおり、B E H A B m R N A はヒト神経膠腫ならびに浸潤性神経膠腫のラットモデルにおいて高度にアップレギュレートされている。完全長 B E H A B およびグリコシル化バリエーション B E H A B が浸潤性神経膠腫のラットモデルにおいて差次的にアップレギュレートされたかどうかを決定するために、B E H A B c D N A でトランスフェクトした C N S - 1 細胞の定位的配置後に成体ラット脳で生じられた腫瘍中の B E H A B アイソフォームの発現を検査した。ラット脳神経膠腫組織は B E H A B c D N A でトランスフェクトした C N S - 1 細胞を置いた大脳半球から得た一方、対照組織は反対の未処理の大脳半球から得た ( 図 1 2 ) 。対照側での B E H A B アイソフォームの発現は完全長のラット脳について上述されたもの ( 図 5 ) に同一であった。神経膠腫サンプルの可溶性分画中での完全長 B E H A B 発現は対照に比較して低下されていたが、とは言えこれらの腫瘍は正常組織よりはるかに多くの汚染する血液タンパク質を含有し、偽性の全タンパク質示度により可溶性タンパク質の正確な評価を困難にしていた。しかしながら、神経膠腫サンプルの微粒子分画中では、グリコシル化バリエーション B E H A B は対照に比較して劇的にアップレギュレートされており、また、完全長 B E H A B は、それが対照に比較してほとんど検出不可能となったようにダウンレギュレートされていた。

#### 【 0 3 4 3 】

グリコシル化バリエーション B E H A B はヒト神経膠腫組織中でのみ検出されかつ健康な組

10

20

30

40

50

織中でされない

B E H A B m R N A はヒト神経膠腫ならびに浸潤性神経膠腫のラットモデルにおいて高度にアップレギュレートされている。グリコシル化バリエーション B E H A B は、神経膠腫のラットモデルおよびまたヒト神経膠腫の外科的サンプル中での主要なアップレギュレートされた B E H A B アイソフォームを代表する。完全長 B E H A B およびグリコシル化バリエーション B E H A B がヒト神経膠腫中で差次的に調節されたかどうかを決定するために、ヒト神経膠腫の外科的サンプル中の B E H A B アイソフォームの発現を死後の正常ヒト脳サンプルと比較した。脳ホモジェネートは本質的に本明細書の別の場所に記述されるとおり調製した。正常ヒト脳サンプル中では、55日齢から72歳までの検査した全年齢で、完全長 B E H A B アイソフォームが 160 k D a (コンドロイチナーゼでの処理後)のおよその分子量を伴い検出された(図13)。ヒト完全長 B E H A B はラット完全長 B E H A B より 10 k D a より大きく泳動することに注意することが重要である。これは部分的にヒト B E H A B の一次アミノ酸配列がラットのものより長いという事実による。ヒト神経膠腫サンプルからの可溶性分画において、B E H A B 発現は正常レベルを超えて検出可能に増大されなかった。神経膠腫における B E H A B m R N A の発現の顕著な増大(Jaworskiら、1996、Cancer Research、56:2293-2298; Garyら、2000、Gene 256:139-147)は、神経膠腫サンプルからの微粒体(膜)分画中でのみ検出されるグリコシル化バリエーション B E H A B の劇的なアップレギュレーション(図13)の代わりに生じることがありそうである。ラットのグリコシル化バリエーション B E H A B はラットの完全長 B E H A B より 20 k D a より小さい一方、ヒトのグリコシル化バリエーション B E H A B はヒトの完全長 B E H A B より約 10 k D a のみより小さい。ラットおよびヒトの双方において、グリコシル化バリエーション B E H A B は膜分画中でのみ見出される。しかしながら、成体ヒトのグリコシル化バリエーション B E H A B は神経膠腫中でのみ検出されかつ正常脳中でされない一方、双方のアイソフォームは正常ラット脳中で検出される。B E H A B の m R N A およびタンパク質の発現は成体ヒト脳中でダウンレギュレートされている(Garyら、2000、Gene 256:139-147)一方、発現レベルはラットにおいて成人期へ高いまま留まる。多様な年齢からのヒト脳の15を超えるサンプルのアッセイにおいて、グリコシル化バリエーション B E H A B は正常ヒト脳中で検出されていないが、しかしヒトグリコシル化バリエーション B E H A B はアッセイしたすべての神経膠腫サンプル中で検出された。これらのデータは、グリコシル化バリエーション B E H A B が神経膠腫特異的アイソフォームを表しかつ神経膠腫における B E H A B の主要なアップレギュレートされたアイソフォームであることを示す。

10

20

30

#### 【0344】

ヒトのグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームは、ラットでのように、完全長 B E H A B の切断生成物でない。完全長 B E H A B の N および C 末端エピトープもまたグリコシル化バリエーション B E H A B 上で検出された。完全長 B E H A B を、ヒト B E H A B の G A G 結合領域中の 1 エピトープを認識する抗体 B 6 を使用して正常ヒト脳および神経膠腫膜調製物から免疫沈降させた(図7)。免疫沈降させたタンパク質を、B E H A B の N (B5) および C (B<sub>CRP</sub>) 末端の 10 k D a 以内に位置するエピトープに対する抗体でイムノプロットした(図7A)。グリコシル化バリエーション B E H A B が完全長 B E H A B の末端短縮切断生成物を表した場合、N 若しくは C 末端抗体の一方は神経膠腫で見出されるグリコシル化バリエーション B E H A B アイソフォームを検出することに失敗するとみられる。しかしながら、ラットグリコシル化バリエーション B E H A B での実験で示されたとおり、ヒト完全長 B E H A B およびヒトグリコシル化バリエーション B E H A B の双方が抗 B E H A B 抗体の全3種により検出され(図14)、グリコシル化バリエーション B E H A B が完全長 B E H A B の切断生成物でないことを示した。さらに、C 末端 B<sub>CRP</sub> 抗体による神経膠腫サンプル中のグリコシル化バリエーション B E H A B の検出は、グリコシル化バリエーション B E H A B が G P I 結合型 B E H A B アイソフォームでなかったことの直接の証拠を提供した。C R P ドメインは G P I 結合型スプライスバリエーションに存在しないからであ

40

50

る。

【0345】

グリコシル化バリエーション B E H A B は完全長 B E H A B と同一の m R N A 由来でありかつタンパク質分解性プロセッシングの結果でなかったため、異なる翻訳後修飾がこれら 2 種のアイソフォーム間の大きさの差異の原因であるかもしれない。加えて、ラットのグリコシル化バリエーション B E H A B はラットの完全長 B E H A B より 20 k D a より小さい一方、ヒトのグリコシル化バリエーション B E H A B は完全長のヒト B E H A B より 10 k D a のみより小さく (図 5 および 13)、翻訳後修飾における種差を示唆する。ラットおよびヒト双方の B E H A B は N - 結合糖、コンドロイチン硫酸 G A G 鎖および付加的な O - 結合糖を運搬する。従って、グリコシル化の差異がグリコシル化バリエーション B E H A B と完全長 B E H A B との間、ならびにラットからの B E H A B とヒトからの B E H A B の間の大きさの差異を説明するかもしれない。完全長 B E H A B と異なり、グリコシル化バリエーション B E H A B はコンドロイチン硫酸鎖を欠くようであった。コンドロイチナーゼ A B C 処理はバンドの見かけの分子質量を移動も高めもせず、若しくはその免疫反応性を低下させた (図 15)。さらに、N - および O - 結合糖を除去した酵素の組合せは、正常脳および神経膠腫双方において完全長 B E H A B のバンドをグリコシル化バリエーション B E H A B の位置に向かって移動させた (図 15)。対照的に、神経膠腫中のグリコシル化バリエーション B E H A B の電気泳動移動度はグリコシダーゼでの処理により影響を受けず、グリコシル化バリエーション B E H A B が、完全長 B E H A B 上に存在する N - および O - 結合糖の全部でない場合は大部分を欠いたことを示した。これらの結果は、グリコシル化バリエーション B E H A B が B E H A B の別個の未グリコシル化若しくは過少グリコシル化アイソフォームであることを示した。興味深いことに、ラット脳中では、完全長 B E H A B が 150 k D a のおよその分子量で泳動し、また、脱グリコシル化された場合に 130 k D a のおよその分子量に移動する (図 8)。対照的に、完全長のヒト B E H A B は 160 k D a のおよその分子量で泳動するが、しかし酵素的脱グリコシル化により 150 k D a に対し 10 k D a のみだけ移動される (図 15)。これは、グリコシル化の種差がラットおよびヒトにおけるこれらのアイソフォームの大きさの差異を説明することを示す。さらに、これらの結果は、これらの大きさの差異にもかかわらず、ラットおよびヒトのグリコシル化バリエーション B E H A B が、共通の機構により生じられるようでありかつ生化学的に類似の分子であることを示唆する。

10

20

30

【0346】

ヒトのグリコシル化バリエーション B E H A B、および完全長 B E H A B の膜会合成分が正常ヒト脳および神経膠腫膜調製物から遊離された条件を検討した。B E H A B はカルシウム依存性の機構によりテナシン - R および硫酸化糖脂質のサブセットに結合されている (Aspergら、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 10116 - 10121; Miuraら、1999、J. Biol. Chem. 274: 11431 - 11438)。膜と B E H A B のカルシウム依存性の会合を、二価の陽イオンキレート剤 E D T A を使用して検討した。完全長 B E H A B は正常ヒト脳および神経膠腫双方からのサンプル中で E D T A により部分的に遊離され、ラットで立証されたところの膜とのカルシウム依存性の会合を確認した。極めて対照的に、グリコシル化バリエーション B E H A B は神経膠腫サンプル中では E D T A により遊離されず、カルシウム非依存性の機構による膜との会合を示した (図 16)。ヒト神経膠腫中のグリコシル化バリエーション B E H A B はラット脳のグリコシル化バリエーション B E H A B の挙動を模倣し、ラットおよびヒトからのグリコシル化バリエーション B E H A B が分子的に類似の若しくは同一の機構により細胞膜に結合していることを示唆する。

40

考察

以前の研究は、非浸潤性腫瘍として増殖する 9 L 神経膠肉腫細胞株が B E H A B の 5' フラグメントでトランスフェクトされる場合に浸潤性となることを示した (Zhangら、1998、J. Neuroscience 18: 2370 - 2376)。しかしながら、完全長 B E H A B での 9 L 細胞のトランスフェクションは腫瘍の表現型を野性型 9 L

50

細胞から変化させない。極めて対照的に、完全長 B E H A B でトランスフェクトした C N S - 1 細胞は腫瘍の大きさおよび浸潤性を増大させる。多様な細胞株の表現型の差異はこれら 2 細胞株の B E H A B を切断する能力の差異により説明される。C N S - 1 細胞は完全長タンパク質を G l u <sup>3 9 5</sup> - S e r <sup>3 9 6</sup> の切断部位で切断して 9 0 k D a および 5 0 k D a のフラグメントを創製する。対照的に、9 L 細胞は完全長タンパク質をタンパク質分解的にプロセシングしない。加えて、以前の研究は、C N S - 1 細胞中での B E H A B 切断が A D A M T S - 4 により媒介されることを示した ( M a t t h e w s ら、2 0 0 0、J . B i o l . C h e m . 2 7 5 : 2 2 6 9 5 - 2 2 7 0 3 )。神経膠腫の進行における B E H A B 切断の役割を、変異させた切断不可能な形態の B E H A B でトランスフェクトした C N S - 1 細胞を使用して評価した。腫瘍の進行および動物の生存に対する本構築物の影響が研究され、そして、神経膠腫の進行における B E H A B 切断の役割を初めて確実に示す。 10

【 0 3 4 7 】

<sup>3 9 3</sup> G l u - S e r - G l u - S e r - A r g - G l y <sup>3 9 8</sup> から <sup>3 9 3</sup> G l u - S e r - G l u - A s n - V a l - T y r <sup>3 9 8</sup> (それぞれ配列番号 1 および配列番号 2) への B E H A B / プレビカン切断部位の突然変異は該タンパク質を C N S - 1 細胞により完全に切断不可能にした。重要なことに、この切断不可能な変異体はラット C N S - 1 腫瘍に対し正常な完全長の構築物と異なる影響を有した。C N S - 1 - F L 腫瘍は対照腫瘍を伴う動物に関してより大きくかつ動物の生存時間を減少させた一方、C N S - 1 - N V Y 腫瘍は対照腫瘍と表現型上識別可能でなかった。これらの研究は、切断およびプロセシングの双方が原発性 C N S 腫瘍における B E H A B の機能において演じている決定的に重要な役割を明確に示す。 20

【 0 3 4 8 】

C N S - 1 - N V Y 腫瘍は C N S - 1 - F L 腫瘍より小さかったがしかし対照腫瘍と表現型上同様であった。この結果は、とりわけ、脳中で増殖される場合に内因性 B E H A B を発現するように C N S - 1 細胞が誘導されるという事実を照らして、神経膠腫における B E H A B 切断に媒介される影響の機構についての情報を提供する。従って、これらの実験で使用される細胞株の全 3 種が正常レベルの内因性 B E H A B を発現し ; C N S - 1 - F L 腫瘍は内因性 B E H A B に加え切断可能な形態の外因性 B E H A B を発現し ; そして C N S - 1 - N V Y 腫瘍は内因性 B E H A B に加え切断不可能な形態の外因性 B E H A B を発現する。従って、N V Y 変異体が C N S - 1 細胞腫瘍においてドミナントネガティブとして作用していた場合は、C N S - 1 - N V Y 腫瘍は B E H A B の正常な機能を破壊することにより対照腫瘍 ( C N S - 1 - G F P ) より有意により小さいとみられることが期待されようが、これは真実でない。むしろ、C N S - 1 - N V Y 腫瘍は、対照腫瘍に比較してそれらの表現型の変化を生じさせない分子で代わりにトランスフェクトされていたようであり、B E H A B の切断生成物が完全長タンパク質により媒介されない独特の相互作用および / 若しくは機能を媒介することを示唆する。一例として、B E H A B 切断生成物がマトリックスを単に可溶化しかつ細胞の動きを可能にした場合は、切断不可能な B E H A B の産生はこの効果を打ち消すとみられる。しかしながら、切断不可能な基質を伴う若しくは伴わない腫瘍は非常に類似であるようである。これらの結果は、B E H A B 切断生成物が、完全長のタンパク質それ自身により媒介されない独特の機能を有することを示唆する。本明細書で明らかでないデータは、B E H A B 切断が原発性 C N S 腫瘍の進行を増強すること、および B E H A B 切断を阻害することが腫瘍の進行を低下させ得ることを示す。これらの研究は、B E H A B 切断の阻害が重要な新たな治療戦略を表すかもしれないことを強く示し、そして従って、B E H A B 切断若しくは切断生成物の機能の阻害が原発性 C N S 腫瘍の有効かつ新規の治療方法としてはたらくであろう。 30 40

【 0 3 4 9 】

本明細書で引用されるそれぞれのおよびすべての特許、特許出願および刊行物の開示はこれによりそっくりそのまま引用することにより本明細書に組込まれる。

【 0 3 5 0 】

本発明は特定の態様に関して開示された一方、本発明の他の態様および変形が本発明の真の技術思想および範囲から離れることなく当業者により考案されることが明らかである。付属として付けられる請求の範囲は、全部のこうした態様および同等の変形を包含すると解釈されることを意図している。

【図面の簡単な説明】

【0351】

本発明を具体的に説明する目的上、本発明のある態様を図面に描く。しかしながら、本発明は図面に描かれる態様の正確な配置および手段に制限されない。

【図1】図1Aから1Cを含んでなる、完全長および/若しくは変異体BEHABで安定に(図1C)若しくは一過性に(図1Aおよび1B)トランスフェクトした細胞からの培地のウェスタンブロット分析の像を描く。図1Aは完全長(FL)および変異体(NVY)BEHABで一過性にトランスフェクトした細胞からの培地のウェスタンブロットを描く。双方の細胞株は145kDaの完全長タンパク質の強い染色を表す。対照的に、切断生成物はB50抗体を使用してNVY変異体で検出されなかった一方、50kDaの切断生成物がFLでトランスフェクトした細胞の培地中で検出された。図1Bは2μgのFL構築物および0、1、2若しくは4μgのNVY変異体構築物で一過性にコトランスフェクトした細胞からの培地のウェスタンブロットを描く。NVY変異体のトランスフェクションは完全長BEHABの量を増大させたが、しかしB50抗体を使用してみられるとおり正常BEHABの切断に対する影響を有しなかった。図1Cは完全長(FL)および変異体(NVY)BEHABで安定にトランスフェクトされた細胞からの培地のウェスタンブロットを描く。BEHABの発現を、B6およびB50抗体を使用してCNS-1-FLおよびCNS-1-NVY細胞中で検査した。一過性トランスフェクションでのように、CNS-1-FLで安定にトランスフェクトされた細胞はBEHABを産生かつ切断した一方、CNS-1-NVYで安定にトランスフェクトされた細胞は完全長タンパク質を産生したがしかしそれを切断しなかった。

【図2】図2Aおよび2Bを含んでなる、細胞増殖および細胞死に対する安定なトランスフェクションの影響を描く。CNS-1-FL、CNS-1-GFPおよびCNS-1-NVY安定細胞株を、細胞増殖(図2A)および細胞死(図2B)に対するCNS-1-FL、CNS-1-GFPおよびCNS-1-NVYトランスフェクションの影響について親CNS-1細胞と比較した。図2AはMTTアッセイを使用した7日にわたる細胞増殖を描くグラフである。データは吸光度の変化を示す。CNS-1-FL、CNS-1-GFPおよびCNS-1-NVYを使用するトランスフェクションは細胞増殖に対する影響を有しなかった。図2BはLDHアッセイを使用して評価したところの7日にわたる細胞死を描くグラフである。CNS-1-FL、CNS-1-GFPおよびCNS-1-NVYを使用するトランスフェクションは細胞死に対する影響を有しなかった。

【図3】図3Aから3Dを含んでなる、腫瘍体積に対するCNS-1-FL、CNS-1-GFPおよびCNS-1-NVYを使用するトランスフェクションの影響を描く。安定にトランスフェクトされた細胞をラットに頭蓋内に8日間埋植し、そして生じた腫瘍の相対的大きさを組織学的に評価した。図3AはCNS-1-GFP細胞由来の代表的腫瘍の像を描く。図3BはCNS-1-FL細胞由来の代表的腫瘍の像を描く。図3CはCNS-1-NVY細胞由来の代表的腫瘍の像を描く。CNS-1-FL腫瘍はCNS-1-GFPおよびCNS-1-NVY腫瘍より大きくかつより浸潤性である。図3DはCNS-1-FL、CNS-1-GFPおよびCNS-1-NVY細胞由来の腫瘍の体積を描くグラフである。これらのデータは画像分析および体積再構成により定量化し、また、個々のデータ点を\*印により表す。

【図4】CNS-1-FL、CNS-1-GFPおよびCNS-1-NVYで安定にトランスフェクトした細胞由来の腫瘍の動物の生存に対する影響を描くグラフである。CNS-1-FL腫瘍を伴う動物は、CNS-1-GFP腫瘍若しくはCNS-1-NVY腫瘍を伴う動物より有意により短時間生存した。CNS-1-NVY腫瘍を伴う動物における生存は、CNS-1-GFP対照腫瘍を伴う動物における生存と有意に異ならなかった。

【図5】図5Aおよび5Bを含んでなる、ラットにおける胚(e)、生後(P)および成体(Ad)の発達段階にわたるBEHABアイソフォームの発現を描く一連の像である。ラット脳からの全ホモジェネートを可溶性(s)および膜微粒子(p)分画に分離した。生じる分画をコンドロイチナーゼABCで処理しかつウェスタンブロッティングのため処理した(図5A)。完全長BEHAB(B/b<sub>FL</sub>)および90kDaのBEHAB切断生成物(B/b<sub>90</sub>)をB6抗体で検出し、50kDaの切断生成物(B/b<sub>50</sub>)はB50抗体で検出した(図5B)。矢印は、完全長BEHABアイソフォーム(B/b<sub>FL</sub>)ならびに膜会合型グリコシル化バリエーションBEHABアイソフォーム(B/b<sub>g</sub>)の位置を示す。

【図6】図6Aから6Dを含んでなる、GPIアンカー型BEHABとグリコシル化バリエーションBEHABとの間の差違を描く一連の像である。図6Aは、トリスHCl緩衝液(Tris)、Triton X-100を含むトリス緩衝液(Tx100)若しくはNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)に再懸濁した成体ラット脳的全膜(M)上清(s)およびペレット(p)を描く。図6BはPI-PLCの非存在(ctrl)若しくは存在(PI-PLC)下にコンドロイチナーゼABCを含むCH緩衝液に再懸濁した成体ラット脳膜を描く。GPIアンカー型アイソフォームを表す新たな120kDaのバンドがPI-PLC処理後に検出された。図6Cは上のように酵素で処理しかつその後遠心分離により分離したラット脳膜を描く。図6Dは、CH緩衝液(S)に再懸濁しかつTriton X-114で抽出して不溶性ペレット(In)水層(H<sub>2</sub>O)および洗剤層(Tx)を生じたラット脳膜を描く。矢印は、完全長BEHAB(B/b<sub>FL</sub>)、グリコシル化バリエーションBEHAB(B/b<sub>g</sub>)およびGPI結合型BEHABアイソフォームを示す。

【図7】図7Aから7Dを含んでなる、グリコシル化バリエーションBEHABがGPI結合型BEHABでないことを示す一連の画像である。図7AはBEHABの構造ならびに抗体B6、B5およびB<sub>CRP</sub>により認識される免疫原性エピトープの位置を描く略図である。HABD、HA結合ドメイン;GAG、GAG結合領域;EGF、表皮増殖因子反復配列;CRP、相補性制御タンパク質様ドメイン。図7BはB6抗体の非存在(mock)若しくは存在(B6)下で免疫沈降させた可溶化ラット脳膜(M)を描くプロットの像である。免疫沈降したサンプルはB6、B5およびB<sub>CRP</sub>抗体を使用して免疫検出した。図7Cは、完全長のラットBEHAB cDNAで安定にトランスフェクトしかつB6、B5およびB<sub>CRP</sub>抗体で検出したCNS-1ラット神経膠腫細胞株からの培地(m)および細胞膜(c)を描くプロットの像である。再度、全部の抗体は完全長BEHABおよびグリコシル化バリエーションBEHABを検出し、これら2種のバンド間の大きさの差異が切断により生成されないことを示した。\*印はB<sub>CRP</sub>抗体により検出されないBEHABのC末端短縮分解生成物に対応するバンドを示す。図7Dは、未標識若しくはV5/6xHis標識BEHAB cDNAを発現しかつB6若しくはV5抗体でそれぞれイムノプロットしたマウスOli-neu細胞からの培地(m)および細胞膜(c)を描く像である。双方の場合において、ラットグリコシル化バリエーションBEHABアイソフォームのみがこれらの細胞中で検出された。

【図8】完全長BEHABおよびグリコシル化バリエーションBEHABが単一コアタンパク質の差次的グリコシル化から生じることを描く像である。矢印は、完全長BEHAB(B/b<sub>FL</sub>)およびグリコシル化バリエーションBEHAB(B/b<sub>g</sub>)アイソフォームを示す。

【図9】図9Aおよび9Bを含んでなる、グリコシル化バリエーションBEHABの細胞膜とのカルシウム非依存性の会合を描く一連の像である。図9Aは成体ラット脳からの全膜(M)を描き、また、図9BはV5/6xHis-BEHAB cDNAでトランスフェクトしかつEDTAを含む(EDTA)若しくは含まない(Tris)トリスHCl緩衝液に再懸濁したOli-neu細胞からの全膜を描く。生じる上清(s)およびペレット分画(p)をコンドロイチナーゼABCで処理しかつB6(ラット脳)若しくはV5(Oli-neu細胞)抗体でイムノプロットした。矢印は完全長BEHAB(B/b<sub>FL</sub>)およびグリコシル化バリエーションBEHAB(B/b<sub>g</sub>)アイソフォームを示す。

【図10】軽膜細胞成分分画中のグリコシル化バリエーションB E H A Bの濃縮を描く像である。全ラット脳ホモジェネート(H)を細胞成分分画にかけ、そして、生じる分画をB6抗体でのウェスタンブロッティング前にコンドロイチナーゼABCで処理した。図10中の分画は：核ペレット(Nuc)、重ミトコンドリアペレット(HM)、軽ミトコンドリアペレット(Mc)および可溶性上清(Sol)である。重ミトコンドリアペレットは、不連続的ショ糖勾配中で以下の下位分画すなわち浮遊性ミエリン分画(My)、軽膜分画(LM)、シナプトソーム分画(Syn)およびミトコンドリアペレット(Mit)に細分画した。矢印は完全長B E H A B (B/b<sub>FL</sub>)およびグリコシル化バリエーションB E H A B (B/b<sub>g</sub>)アイソフォームを示す。

【図11】細胞表面上のグリコシル化バリエーションB E H A Bの位置を描く一連の像である。V5/His標識ラットB E H A B cDNAでトランスフェクトしたOli-neu細胞を抗V5抗体(V5)で生存染色して(live stained)標識グリコシル化バリエーションB E H A Bを検出した。細胞をヨウ化プロピジウム(PI)で対染色した。図11Aは、グリコシル化バリエーションB E H A Bの細胞外の位置を示す、抗V5で染色したB E H A Bでトランスフェクトした細胞を描く。図11Bは抗V5で染色した対照(ベクター)でトランスフェクトした細胞を描き；そして図Cは非免疫血清で染色したB E H A Bでトランスフェクトした細胞を描く。棒=20μm。

【図12】神経膠腫のラットモデルにおけるグリコシル化バリエーションB E H A Bのアップレギュレーションを描く像である。トランスフェクトしたCNS-1細胞の頭蓋内注入により生じさせたラット脳神経膠腫腫瘍からのサンプル(Gli)を可溶性(s)および微粒(p)分画に分画し、コンドロイチナーゼABCで処理しそしてウェスタンブロッティングのため処理した。脳の反対側に対応する対にした対照サンプル(ctl)ならびに未処理の成体動物からの別個の対照サンプル(ad)を同一に処理した。B E H A BはB6抗体を使用して検出した。矢印は完全長B E H A B (B/b<sub>FL</sub>)およびグリコシル化バリエーションB E H A B (B/b<sub>g</sub>)を示す。

【図13】55日(d)から72歳(yr)齢までの死後脳組織中および外科的神経膠腫(Gli)サンプル中でのヒトの発達にわたってのB E H A Bアイソフォームの発現を示すイムノプロットを描く像である。(S)はヒト脳ホモジェネートからの可溶性分画を示し、また、(P)はヒト脳ホモジェネートの膜微粒分画を描く。生じる分画をコンドロイチナーゼABCで処理しかつウェスタンブロッティングのため処理した。ヒト完全長B E H A B (B/b<sub>FL</sub>)はB6抗体で検出した。矢印は完全長B E H A Bアイソフォーム(B/b<sub>FL</sub>)および膜会合型グリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォーム(B/b<sub>g</sub>)の位置を示す。

【図14】ヒト神経膠腫特異的グリコシル化バリエーションB E H A B (B/b<sub>g</sub>)が完全長B E H A Bアイソフォームのタンパク質分解性切断の産物でないことを描くイムノプロットの像である。正常ヒト脳および神経膠腫からの可溶化膜(M)をB6抗体の非存在(mock)若しくは存在(B6)下で免疫沈降させた。免疫沈降したサンプルをB6、B5およびB<sub>CRP</sub>抗体を使用して免疫検出した。矢印は完全長B E H A Bアイソフォーム(B/b<sub>FL</sub>)および膜会合型グリコシル化バリエーションB E H A Bアイソフォーム(B/b<sub>g</sub>)の位置を示す。

【図15】ヒト完全長B E H A Bおよび神経膠腫特異的グリコシル化バリエーションB E H A Bが単一コアタンパク質の差次的グリコシル化から生じることを描く像である。サンプルをコンドロイチナーゼ(CH'ase)PNGアーゼF(N-glyc F)、O-グリコシダーゼ(O-glycos.)および/若しくはシアリダーゼで処理した。矢印は完全長B E H A B (B/b<sub>FL</sub>)およびグリコシル化バリエーションB E H A B (B/b<sub>g</sub>)を示す。

【図16】グリコシル化バリエーションB E H A Bの細胞膜とのカルシウム非依存性の会合を描く像である。成体ヒト脳および神経膠腫からの全膜(M)を、EDTAを含む(EDTA)若しくは含まない(Tris)トリスHCl緩衝液に再懸濁した。生じる上清(s)およびペレット分画(p)をコンドロイチナーゼABCで処理しかつB6抗体でイムノブ

ロットした。矢印は完全長 B E H A B ( B / b <sub>F L</sub> ) およびグリコシル化バリエント B E H A B ( B / b <sub>g</sub> ) アイソフォームを示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> YALE UNIVERSITY  
Hockfield, Susan  
Matthews, Russell T.  
Viapiano, Mariano S.

<120> COMPOSITIONS, METHODS AND KITS RELATING TO BEHAB AND PRIMARY CNS  
TUMORS

<130> 044574-5118-01WO

10

<150> US 10/195,970

<151> 2002-07-16

<150> US 06/306,046

<151> 2001-07-17

<160> 8

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Rattus sp.

20

<400> 1

Glu Ser Glu Ser Arg Gly  
1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 2

Glu Ser Glu Asn Val Tyr  
1 5

30

<210> 3

<211> 883

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 3

Met Ile Pro Leu Leu Leu Ser Leu Leu Ala Ala Leu Val Leu Thr Gln  
1 5 10 15

Ala Pro Ala Ala Leu Ala Asp Asp Leu Lys Glu Asp Ser Ser Glu Asp  
20 25 30

Arg Ala Phe Arg Val Arg Ile Gly Ala Ala Gln Leu Arg Gly Val Leu  
35 40 45

40

Gly Gly Ala Leu Ala Ile Pro Cys His Val His His Leu Arg Pro Pro  
 50 55 60  
 Pro Ser Arg Arg Ala Ala Pro Gly Phe Pro Arg Val Lys Trp Thr Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Ser Gly Asp Arg Glu Val Glu Val Leu Val Ala Arg Gly Leu Arg  
 85 90 95  
 Val Lys Val Asn Glu Ala Tyr Arg Phe Arg Val Ala Leu Pro Ala Tyr  
 100 105 110  
 Pro Ala Ser Leu Thr Asp Val Ser Leu Val Leu Ser Glu Leu Arg Pro  
 115 120 125  
 Asn Asp Ser Gly Val Tyr Arg Cys Glu Val Gln His Gly Ile Asp Asp  
 130 135 140  
 Ser Ser Asp Ala Val Glu Val Lys Val Lys Gly Val Val Phe Leu Tyr  
 145 150 155 160  
 Arg Glu Gly Ser Ala Arg Tyr Ala Phe Ser Phe Ala Gly Ala Gln Glu  
 165 170 175  
 Ala Cys Ala Arg Ile Gly Ala Arg Ile Ala Thr Pro Glu Gln Leu Tyr  
 180 185 190  
 Ala Ala Tyr Leu Gly Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Ser  
 195 200 205  
 Asp Gln Thr Val Arg Tyr Pro Ile Gln Asn Pro Arg Glu Ala Cys Tyr  
 210 215 220  
 Gly Asp Met Asp Gly Tyr Pro Gly Val Arg Asn Tyr Gly Val Val Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Asp Asp Leu Tyr Asp Val Tyr Cys Tyr Ala Glu Asp Leu Asn Gly  
 245 250 255  
 Glu Leu Phe Leu Gly Ala Pro Pro Gly Lys Leu Thr Trp Glu Glu Ala  
 260 265 270  
 Arg Asp Tyr Cys Leu Glu Arg Gly Ala Gln Ile Ala Ser Thr Gly Gln  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ala Ala Trp Asn Gly Gly Leu Asp Arg Cys Ser Pro Gly Trp  
 290 295 300  
 Leu Ala Asp Gly Ser Val Arg Tyr Pro Ile Ile Thr Pro Ser Gln Arg  
 305 310 315 320  
 Cys Gly Gly Gly Leu Pro Gly Val Lys Thr Leu Phe Leu Phe Pro Asn  
 325 330 335  
 Gln Thr Gly Phe Pro Ser Lys Gln Asn Arg Phe Asn Val Tyr Cys Phe  
 340 345 350

10

20

30

Arg Asp Ser Ala His Pro Ser Ala Phe Ser Glu Ala Ser Ser Pro Ala  
 355 360 365  
 Ser Asp Gly Leu Glu Ala Ile Val Thr Val Thr Glu Lys Leu Glu Glu  
 370 375 380  
 Leu Gln Leu Pro Gln Glu Ala Val Glu Ser Glu Asn Val Tyr Ala Ile  
 385 390 395 400  
 Tyr Ser Ile Pro Ile Thr Glu Asp Gly Gly Gly Ser Ser Thr Pro  
 405 410 415  
 Glu Asp Pro Ala Glu Ala Pro Arg Thr Pro Leu Glu Ser Glu Thr Gln  
 420 425 430  
 Ser Val Ala Pro Pro Thr Gly Ser Ser Glu Glu Glu Gly Glu Ala Leu  
 435 440 445  
 Glu Glu Glu Glu Arg Phe Lys Asp Thr Glu Thr Pro Lys Glu Glu Lys  
 450 455 460  
 Glu Gln Glu Asn Leu Trp Val Trp Pro Thr Glu Leu Ser Ser Pro Leu  
 465 470 475 480  
 Pro Thr Gly Leu Glu Thr Glu His Ser Leu Ser Gln Val Ser Pro Pro  
 485 490 495  
 Ala Gln Ala Val Leu Gln Leu Gly Ala Ser Pro Ser Pro Arg Pro Pro  
 500 505 510  
 Arg Val His Gly Pro Pro Ala Glu Thr Leu Gln Pro Pro Arg Glu Gly  
 515 520 525  
 Ser Leu Thr Ser Thr Pro Asp Gly Ala Arg Glu Val Ala Gly Glu Thr  
 530 535 540  
 Gly Ser Pro Glu Leu Ser Gly Val Pro Arg Glu Ser Glu Glu Ala Gly  
 545 550 555 560  
 Ser Ser Ser Leu Glu Asp Gly Pro Ser Leu Leu Pro Ala Thr Trp Ala  
 565 570 575  
 Pro Val Gly Thr Arg Glu Leu Glu Thr Pro Ser Glu Glu Lys Ser Gly  
 580 585 590  
 Arg Thr Val Leu Thr Gly Thr Ser Val Gln Ala Gln Pro Val Leu Pro  
 595 600 605  
 Thr Asp Ser Ala Ser Arg Gly Gly Val Ala Val Ala Pro Ser Ser Gly  
 610 615 620  
 Asp Cys Ile Pro Ser Pro Cys His Asn Gly Gly Thr Cys Leu Glu Glu  
 625 630 635 640  
 Lys Glu Gly Phe Arg Cys Leu Cys Leu Pro Gly Tyr Gly Gly Asp Leu  
 645 650 655

10

20

30

Cys Asp Val Gly Leu His Phe Cys Ser Pro Gly Trp Glu Ala Phe Gln  
 660 665 670  
 Gly Ala Cys Tyr Lys His Phe Ser Thr Arg Arg Ser Trp Glu Glu Ala  
 675 680 685  
 Glu Ser Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ala His Leu Thr Ser Ile Cys Thr  
 690 695 700  
 Pro Glu Glu Gln Asp Phe Val Asn Asp Arg Tyr Arg Glu Tyr Gln Trp  
 705 710 715 720  
 Ile Gly Leu Asn Asp Arg Thr Ile Glu Gly Asp Phe Leu Trp Ser Asp  
 725 730 735  
 Gly Ala Pro Leu Leu Tyr Glu Asn Trp Asn Pro Gly Gln Pro Asp Ser  
 740 745 750  
 Tyr Phe Leu Ser Gly Glu Asn Cys Val Val Met Val Trp His Asp Gln  
 755 760 765  
 Gly Gln Trp Ser Asp Val Pro Cys Asn Tyr His Leu Ser Tyr Thr Cys  
 770 775 780  
 Lys Met Gly Leu Val Ser Cys Gly Pro Pro Pro Gln Leu Pro Leu Ala  
 785 790 795 800  
 Gln Ile Phe Gly Arg Pro Arg Leu Ala Tyr Ala Val Asp Thr Val Leu  
 805 810 815  
 Arg Tyr Arg Cys Arg Asp Gly Leu Ala Gln Arg Asn Leu Pro Leu Ile  
 820 825 830  
 Arg Cys Gln Glu Asn Gly Leu Trp Glu Ala Pro Gln Ile Ser Cys Val  
 835 840 845  
 Pro Arg Arg Pro Ala Arg Ala Leu Arg Ser Met Thr Ala Pro Glu Gly  
 850 855 860  
 Pro Arg Gly Gln Leu Pro Arg Gln Arg Lys Ala Leu Leu Thr Pro Pro  
 865 870 875 880  
 Ser Ser Leu

10

20

<210> 4  
 <211> 2652  
 <212> DNA  
 <213> Rattus sp.

30

<400> 4  
 atgatcccat tgcttctgtc cctgetggca gctctggtec tgaccaagc ccctgcagcc 60  
 ctgctgatg acctgaaaga agacagctca gaggatcgag ctttctgggt gcgcatcggt 120  
 gccgcgcagc tgcgggggtg gctggggcgt gccctggcca tcccatgcca cgtccaccac 180

otgaggccgc cgcccagccg ccgggcccgc ccgggctttc cccgagtcaa atggaccttc 240  
 ctgtccgggg accgggaggt ggaggtgctg gtggcgcgcg ggctgocgct caaggtaaac 300  
 gaagcctatc ggttccgcgt ggcgctgcct gcctaccccg catcgtcac agatgtgtct 360  
 ttagtattga gcgaactgcg gcccaatgat tccgggtct atcgtgcga ggtccagcac 420  
 ggtatcgacg acagcagtga tgctgtgaa gtcaaggtca aaggggtcgt ctctctctac 480  
 cgagagggtc ctgcccgcta tgccttctcc ttcgctggag cccaggaagc ctgtgctcgc 540  
 atcggagccc gaattgccac cctgagcag ctgtatgctg cctacctcgg cggctatgaa 600  
 cagtgtgatg ctggctggct gtccgaccaa accgtgaggt accccatcca gaaccacga 660  
 gaagcctggt atggagacat ggatggctac cctggagtgc ggaattacgg agtggtggtg 720  
 cctgatgac tctacgatgt ctactgttat gcogaagacc taaatggaga actgttccta 780  
 ggtgcccctc ccggcaagct gaogtggag gaggtcggg actactgtct ggaacgcggt 840  
 gctcagatcg ctagcacggg ccagctatac gcggcatgga atggcggctt ggacagatgt 900  
 agccctggct ggttggtgca tggcagtgtg cgttaccca tcatcacgcc cagccaacgc 960  
 tgtgggggag gcctgccagg agtcaagacc ctcttctct tcccaacca gactggcttc 1020  
 cccagcaagc agaaccgctt caatgtctac tgcctccgag actctgcca tccctctgcc 1080  
 ttctctgagg cctccagccc agcctctgat ggactagagg ccattgtcac agtgacagag 1140  
 aagctggagg aactgcagtt gcctcaggaa gctgtggaga gcgagaatgt ttacgcgatc 1200  
 tactccatcc ccatacaga agatggggga ggaggaagct ctaccccaga agaccagca 1260  
 gaggcccca ggaactctct agaatacaga acccaatccg ttgcaccacc tacgggtcc 1320  
 tcagaagagg aaggcgaagc cctggaggaa gaagaaagat tcaaagacac agagactccg 1380  
 aaggaagaga aggagcagga gaacctgtgg gtgtggccca cggagctcag cagccctctc 1440  
 cctactggct tggaaacaga gcaactactc tcccaggtgt ccccaccagc ccaggcagtt 1500  
 ctacagctgg gtgcatcacc ttctccagg cctccaaggg tccatggacc gcctgcagag 1560  
 actttgcaac cccaagga ggaagcctc acatctactc cagatggggc aagagaagta 1620  
 ggggggaaa ctgggagccc tgagctctct ggggttcctc gagaaagcga ggaggcagga 1680  
 agctocagct tggaggatgy cccttccctc cttccagcga catgggccc tgtgggtacc 1740  
 agggagctgy agacccctc agaagagaag tctggaagaa ctgttctgac aggcacatca 1800  
 gtgcaggccc agccagtgt gccaccgac agtgccagcc gaggtggagt ggctgtggct 1860  
 ccctcatcag gtgactgtat cccagcccc tgcacaatg gtgggacatg cttggaggag 1920

10

20

30

aaggagggtt tccgctgcct ctgtttgcca ggctatgggg, gggacctgtg cgatgttggc 1980  
ctccacttct gcagcccggg ctgggaggcc ttccagggtg cctgctacaa gcacttttcc 2040  
acacgaagga gttgggagga ggcagaaagc cagtgcogag cgctaggggc tcatctgacc 2100  
agcatctgca cccctgagga gcaggacttt gtcaacgacg gatacaggga gtaccagtgg 2160  
attgggctca atgacaggac catcgagggt gacttcctgt ggtcagatgg tgcccctctg 2220  
ctctatgaaa actggaaccc tgggcagcct gacagctact tcctgtctgg ggagaactgt 2280  
gtggctcatg tgtggcatga ccagggacag tggagtgatg taccctgcaa ctaccaccta 2340  
tcctacacct gcaagatggg gcttgtgtca tgtggacctc caccacagct gcccttggct 2400  
caaatatttg gtgcacctcg gctggcctac gcggtggaca ctgtgcttcg atatcgggtg 2460  
cgagacgggc tgcccagcg caacttgcg ttgatccgct gccaggagaa tgggctttgg 2520  
gaggccccctc agatttcttg cgtgccccga agacctgcc gtgotctccg ctcaatgacc 2580  
gccccagaag gaccacgggg acagctcccg aggcagagga aagcactgtt gacacctccc 2640  
tccagtctct ag 2652

<210> 5  
<211> 2652  
<212> DNA  
<213> Rattus sp.

10

<400> 5  
atgatcccat tgcttctgtc cctgctggca gctctgggtcc tgaoccaaagc ccctgcagcc 60  
ctcgctgatg acctgaaaga agacagctca gaggatcgag cctttcgggt gcgcatcggt 120  
gccgcgcagc tgcgggggtgt gctgggctgt gccctggcca tcccatgcca cgtccaccac 180  
ctgagggcgc cggccagcgg ccgggcccgg ccgggctttc cccagatcaa atggaccttc 240  
ctgtccgggg accgggaggt ggagggtgctg gtggcgcgcg ggtgcgcggt caaggtaaac 300  
gaagcctatc ggttccgctt ggcgctgcct gcctaccocg catcgctcac agatgtgtct 360  
ttagtattga gcgaactgcg gcccaatgat tccggggtct atcgctgca ggtccagcac 420  
ggtatcgacg acagcagtga tgctgtggaa gtcaagggtca aaggggtcgt ctctctctac 480  
cgagaggggt ctgcccgcta tgctttctcc ttcgctggag cccaggaagc ctgtgctcgc 540  
atcggagccc gaattgccac ccctgagcag ctgtatgctg cctacctcgg cggctatgaa 600  
cagtgatgat ctggctggct gtcogaccaa accgtgaggt accccatcca gaaccacga 660  
gaagcctgtt atggagacat ggatggctac cctggagtgc ggaattacgg agtggtgggt 720  
cctgatgatc tctacgatgt ctactgttat gccgaagacc taaatggaga actgttccta 780

20

30

ggtgccccctc ccggcaagct gaogtgggag gaggtcggg actactgtct ggaacgcggt 840  
 gctcagatcg ctagcacggg ccagctatac gggcatgga atggcggctt ggacagatgt 900  
 agccctggct ggctggctga tggcagtgtg cggtacccc tcatcacgcc cagccaacgc 960  
 tgtgggggag gcctgccagg agtcaagacc ctcttctct ttccaacca gactggcttc 1020  
 cccagcaagc agaaccgctt caatgtctac tgettccgag actctgccc tccctctgcc 1080  
 ttctctgagg cctccagccc agcctctgat ggactagagg ccattgtcac agtgacagag 1140  
 aagctggagg aactgcagtt gcctcaggaa gctgtggaga gcgagtctcg tggggcgcac 1200  
 tactocatcc ccatcacaga agatggggga ggaggaagct ctaccccaga agaccagca 1260  
 gaggccccca ggactctct agaatcagaa acccaatcog ttgcaccacc tacgggtcc 1320  
 tcagaagagg aaggcgaagc cctggaggaa gaagaaagat tcaaagacac agagactccg 1380  
 aaggaaagaga aggagcagga gaacctgtgg gtgtggcca cggagctcag cagccctctc 1440  
 cctactggct tggaaacaga gcactcactc tcccaggtgt ccccaccagc ccaggcagtt 1500  
 ctacagctgg gtgcatcacc ttctcccagg cctccaaggg tccatggacc gcctgcagag 1560  
 actttgcaac ccccaagga gggaaagctc acatctactc cagatggggc aagagaagta 1620  
 gcgggggaaa ctgggagccc tgagctctct ggggttctc gagaaagca ggaggcagga 1680  
 agctccagct tggaggatgg cccttccctc cttccagcga catgggccc tgtgggtacc 1740  
 agggagctgg agaccccctc agaagagaag totggaagaa ctgttctgac aggcacatca 1800  
 gtgcaggccc agccagtgt gccaccgac agtgccagcc gaggtggagt ggetgtggct 1860  
 cctcatcag gtgactgtat cccagcccc tgccacaatg gtgggacatg cttggaggag 1920  
 aaggagggtt tccgtgcct ctgtttgcca ggctatgggg gggacctgtg cgatgttggc 1980  
 ctocacttct gcagcccggg ctgggaggcc ttccagggtg cctgctacaa gcacttttcc 2040  
 acacgaagga gtgggagga ggcagaaaagc cagtgccgag cgctaggggc tcatctgacc 2100  
 agcatctgca cccctgagga gcaggacttt gtcaacgata gatacagga gtaccagtgg 2160  
 attgggctca atgacaggac catcgagggt gacttctctg ggtcagatgg tgcccctctg 2220  
 ctctatgaaa actggaacc tgggcagcct gacagctact tctgtctgg ggagaactgt 2280  
 gtggtcatgg tgtggcatga ccagggacag tgagtgatg taccctgcaa ctaccaccta 2340  
 tcctacacct gcaagatggg gcttgtgtca tgtggacctc caccacagct gccctggct 2400  
 caaatatttg gtcgccctcg gctggcctac ggggtggaca ctgtgcttog atatcgggtc 2460

10

20

30

cgagacgggc tggcccagcg caacttgccg ttgatccgct gccaggagaa tgggctttgg 2520  
gaggcccctc agatttcttg cgtgccccga agacctgccg gtgctctccg ctcaatgacc 2580  
gccccagaag gaccacgggg acagctcccg aggcagagga aagcactggt gacacctccc 2640  
tccagtctct ag 2652

<210> 6  
<211> 883  
<212> PRT  
<213> Rattus sp.

<400> 6

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

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

10

20

30

Ser Leu Thr Ser Thr Pro Asp Gly Ala Arg Glu Val Ala Gly Glu Thr  
 530 535 540  
 Gly Ser Pro Glu Leu Ser Gly Val Pro Arg Glu Ser Glu Glu Ala Gly  
 545 550 555 560  
 Ser Ser Ser Leu Glu Asp Gly Pro Ser Leu Leu Pro Ala Thr Trp Ala  
 565 570 575  
 Pro Val Gly Thr Arg Glu Leu Glu Thr Pro Ser Glu Glu Lys Ser Gly  
 580 585 590  
 Arg Thr Val Leu Thr Gly Thr Ser Val Gln Ala Gln Pro Val Leu Pro  
 595 600 605  
 Thr Asp Ser Ala Ser Arg Gly Gly Val Ala Val Ala Pro Ser Ser Gly  
 610 615 620  
 Asp Cys Ile Pro Ser Pro Cys His Asn Gly Gly Thr Cys Leu Glu Glu  
 625 630 635 640  
 Lys Glu Gly Phe Arg Cys Leu Cys Leu Pro Gly Tyr Gly Gly Asp Leu  
 645 650 655  
 Cys Asp Val Gly Leu His Phe Cys Ser Pro Gly Trp Glu Ala Phe Gln  
 660 665 670  
 Gly Ala Cys Tyr Lys His Phe Ser Thr Arg Arg Ser Trp Glu Glu Ala  
 675 680 685  
 Glu Ser Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ala His Leu Thr Ser Ile Cys Thr  
 690 695 700  
 Pro Glu Glu Gln Asp Phe Val Asn Asp Arg Tyr Arg Glu Tyr Gln Trp  
 705 710 715 720  
 Ile Gly Leu Asn Asp Arg Thr Ile Glu Gly Asp Phe Leu Trp Ser Asp  
 725 730 735  
 Gly Ala Pro Leu Leu Tyr Glu Asn Trp Asn Pro Gly Gln Pro Asp Ser  
 740 745 750  
 Tyr Phe Leu Ser Gly Glu Asn Cys Val Val Met Val Trp His Asp Gln  
 755 760 765  
 Gly Gln Trp Ser Asp Val Pro Cys Asn Tyr His Leu Ser Tyr Thr Cys  
 770 775 780  
 Lys Met Gly Leu Val Ser Cys Gly Pro Pro Pro Gln Leu Pro Leu Ala  
 785 790 795 800  
 Gln Ile Phe Gly Arg Pro Arg Leu Ala Tyr Ala Val Asp Thr Val Leu  
 805 810 815  
 Arg Tyr Arg Cys Arg Asp Gly Leu Ala Gln Arg Asn Leu Pro Leu Ile  
 820 825 830

10

20

30

Arg Cys Gln Glu Asn Gly Leu Trp Glu Ala Pro Gln Ile Ser Cys Val  
 835 840 845

Pro Arg Arg Pro Ala Arg Ala Leu Arg Ser Met Thr Ala Pro Glu Gly  
 850 855 860

Pro Arg Gly Gln Leu Pro Arg Gln Arg Lys Ala Leu Leu Thr Pro Pro  
 865 870 875 880

Ser Ser Leu

<210> 7  
 <211> 2878  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 7  
 tgtggcactg cctgcgtacc caaccccagc cctgggtagc ctgcagcatg gccagctgt 60  
 tcctgcccct getggcagcc ctggctcctgg ccagagctcc tgcagcttta gcagatgttc 120  
 tggaaggaga cagctcagag gaccgcgctt ttgcggtgcg catcgcgggc gacgcgccac 180  
 tgcaggcgt gctcggcggc gccctcacca tcccttgcca cgtccactac ctgcggccac 240  
 cgccgagccg cgggctgtg ctgggctctc cgcgggtcaa gtggacttcc ctgtcccggg 300  
 gccgggagggc agaggtgctg gtggcgggg gagtgcgct caaggtgaac gaggcctacc 360  
 ggttccgct ggcactgct gcgtaccag cgtcgtcac cgacgtctcc ctggcgtga 420  
 gcgagctgcg ccccaagcag tcaggtatct atcgtgtga ggtccagcag gccatcagtg 480  
 acagcagcga cgtgtggag gtcaaggtca aagggtcgt ctttctctac cgagagggt 540  
 ctgcccgcta tgccttctcc ttttctgggg ccaggagggc ctgtgccgcg attggagccc 600  
 acatcggccac ccgggagcag ctctatgccc cctaccttgg gggctatgag caatgtgatg 660  
 ctggctggct gtggatcag accgtgaggt atcccatcca gacccaoga gaggcctggt 720  
 aoggagacat ggatggcttc cccggggtcc ggaactatgg tgtggtggac ccgatgacc 780  
 tctatgatgt gtactgttat gctgaagacc taaatggaga attgttctctg ggtgaccctc 840  
 cagagaagct gacattggag gaagcacggg cgtactgcca ggagcggggg gcagagattg 900  
 ccaccacggg ccaactgtat gcagcctggg atgggtggcct ggaccactgc agcccagggt 960  
 ggctagctga tggcagtgty cgtacacca tcgtcacacc cagccagcgc tgtggtgggg 1020  
 gcttgctgty tgtcaagact ctcttctct tcccacaacca gactggcttc cccaataagc 1080  
 acagccgctt caacgtctac tcttccgag actcggccca gccttctgcc atccctgagg 1140  
 cctccaaccc agcctcaaac ccagcctctg atggactaga ggctatcgtc acagtgcag 1200

20

30

agaccctgga ggaactgcag ctgcctcagg aagccacaga gagtgaatcc cgtggggcca 1260  
 tctactccat ccccatcatg gaggacggag gaggtggaag ctccactcca gaagaccag 1320  
 cagaggcccc taggacgctc ctagaatttg aaacacaatc catggtaccg cccacgggg 1380  
 tctcagaaga ggaaggtgag gcattggagg aagaagagaa atatgaagat gaagaagaga 1440  
 aagaggagga agaagaagag gaggaggtgg aggatgaggc tctgtgggca tggcccagcg 1500  
 agctcagcag cccgggccct gaggcctctc tcccactga gccagcagcc caggaggagt 1560  
 cactctccca gggccagca agggcagtc tgcagcctgg tgcacacca cttcctgatg 1620  
 gagagtcaga agcttcagg cctccaaggg tccatggacc acctactgag actctgcca 1680  
 ctcccagga gaggaacctc gcaccccat caccttcac tctggtgag gcaagagagg 1740  
 tgggggagge aactggtggt cctgagctat ctggggtccc tcgaggagag agcgaggaga 1800  
 caggaagctc cgaggggtgc ccttccctgc ttccagccac acggggccct gagggtacca 1860  
 gggagctgga gggcccctct gaagataatt ctggaagaac tgcccagca gggaoctcag 1920  
 tgcaggccca gccagtgtg cccactgaca ggcagcccg aggtggagtg gccgtgtcc 1980  
 ccgcatcagg tgactgtgtc cccagcccct gccacaatgg tgggacatgc ttggaggagg 2040  
 aggaaggggt ccgctgccta tgtctgcctg gctatggggg ggacctgtgc gatgttggcc 2100  
 tccgcttctg caaccocggc tgggacgctc tccagggcgc ctgctacaag cacttttcca 2160  
 cacgaaggag ctgggaggag gcagagacc agtgccggat gtacggcgcg catctggcca 2220  
 gcacagcac acccgaggaa caggacttca tcaacaaccg gtaccggag taccagtga 2280  
 toggactcaa cgacaggacc atcgaaggcg acttcttgtg gtccgatggc gtcccctgc 2340  
 totatgagaa ctggaaccct gggcagcctg acagctactt cctgtctgga gagaactcg 2400  
 tggatcatgt gtggcatgat cagggacaat ggagtgcgt gccctgcaac taccacctgt 2460  
 cctacacctg caagatggg ctggtgtcct gtgggcccgc accggagctg cccctggctc 2520  
 aagtgttogg ccgccacgg ctgcgctatg aggtggacac tgtgcttgc taccgggtgcc 2580  
 gggaggact gcccagcgc aatctgccgc tgatccgatg ccaagagaa ggtcgttggg 2640  
 agcccccca gatctcctgt gtcccagaa gaactgccg agctctgcac ccagaggagg 2700  
 acccagaagg acgtcaggg aggtactgg gacgtggaa ggcgtgtg atccccctt 2760  
 ccagcccat gccaggtccc taggggcaa ggccttgaac actgccgcc acagcactgc 2820  
 cctgtcacc aaattttccc tcacacctg cgtcaccac aggaagtgc aacatgac 2878

10

20

30

<210> 8  
 <211> 911  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met Ala Gln Leu Phe Leu Pro Leu Leu Ala Ala Leu Val Leu Ala Gln  
 1 5 10 15  
 Ala Pro Ala Ala Leu Ala Asp Val Leu Glu Gly Asp Ser Ser Glu Asp  
 20 25 30  
 Arg Ala Phe Arg Val Arg Ile Ala Gly Asp Ala Pro Leu Gln Gly Val  
 35 40 45 10  
 Leu Gly Gly Ala Leu Thr Ile Pro Cys His Val His Tyr Leu Arg Pro  
 50 55 60  
 Pro Pro Ser Arg Arg Ala Val Leu Gly Ser Pro Arg Val Lys Trp Thr  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Ser Arg Gly Arg Glu Ala Glu Val Leu Val Ala Arg Gly Val  
 85 90 95  
 Arg Val Lys Val Asn Glu Ala Tyr Arg Phe Arg Val Ala Leu Pro Ala  
 100 105 110  
 Tyr Pro Ala Ser Leu Thr Asp Val Ser Leu Ala Leu Ser Glu Leu Arg  
 115 120 125 20  
 Pro Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Arg Cys Glu Val Gln His Gly Ile Asp  
 130 135 140  
 Asp Ser Ser Asp Ala Val Glu Val Lys Val Lys Gly Val Val Phe Leu  
 145 150 155 160  
 Tyr Arg Glu Gly Ser Ala Arg Tyr Ala Phe Ser Phe Ser Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Glu Ala Cys Ala Arg Ile Gly Ala His Ile Ala Thr Pro Glu Gln Leu  
 180 185 190  
 Tyr Ala Ala Tyr Leu Gly Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu  
 195 200 205  
 Ser Asp Gln Thr Val Arg Tyr Pro Ile Gln Thr Pro Arg Glu Ala Cys  
 210 215 220 30  
 Tyr Gly Asp Met Asp Gly Phe Pro Gly Val Arg Asn Tyr Gly Val Val  
 225 230 235 240  
 Asp Pro Asp Asp Leu Tyr Asp Val Tyr Cys Tyr Ala Glu Asp Leu Asn  
 245 250 255  
 Gly Glu Leu Phe Leu Gly Asp Pro Pro Glu Lys Leu Thr Leu Glu Glu  
 260 265 270

Ala Arg Ala Tyr Cys Gln Glu Arg Gly Ala Glu Ile Ala Thr Thr Gly  
 275 280 285

Gln Leu Tyr Ala Ala Trp Asp Gly Gly Leu Asp His Cys Ser Pro Gly  
 290 295 300

Trp Leu Ala Asp Gly Ser Val Arg Tyr Pro Ile Val Thr Pro Ser Gln  
 305 310 315 320

Arg Cys Gly Gly Gly Leu Pro Gly Val Lys Thr Leu Phe Leu Phe Pro  
 325 330 335

Asn Gln Thr Gly Phe Pro Asn Lys His Ser Arg Phe Asn Val Tyr Cys  
 340 345 350

Phe Arg Asp Ser Ala Gln Pro Ser Ala Ile Pro Glu Ala Ser Asn Pro  
 355 360 365

Ala Ser Asn Pro Ala Ser Asp Gly Leu Glu Ala Ile Val Thr Val Thr  
 370 375 380

Glu Thr Leu Glu Glu Leu Gln Leu Pro Gln Glu Ala Thr Glu Ser Glu  
 385 390 395 400

Ser Arg Gly Ala Ile Tyr Ser Ile Pro Ile Met Glu Asp Gly Gly Gly  
 405 410 415

Gly Ser Ser Thr Pro Glu Asp Pro Ala Glu Ala Pro Arg Thr Leu Leu  
 420 425 430

Glu Phe Glu Thr Gln Ser Met Val Pro Pro Thr Gly Phe Ser Glu Glu  
 435 440 445

Glu Gly Lys Ala Leu Glu Glu Glu Glu Lys Tyr Glu Asp Glu Glu Glu  
 450 455 460

Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Val Glu Asp Glu Ala Leu Trp  
 465 470 475 480

Ala Trp Pro Ser Glu Leu Ser Ser Pro Gly Pro Glu Ala Ser Leu Pro  
 485 490 495

Thr Glu Pro Ala Ala Gln Glu Glu Ser Leu Ser Gln Ala Pro Ala Arg  
 500 505 510

Ala Val Leu Gln Pro Gly Ala Ser Pro Leu Pro Asp Gly Glu Ser Glu  
 515 520 525

Ala Ser Arg Pro Pro Arg Val His Gly Pro Pro Thr Glu Thr Leu Pro  
 530 535 540

Thr Pro Arg Glu Arg Asn Leu Ala Ser Pro Ser Pro Ser Thr Leu Val  
 545 550 555 560

Glu Ala Arg Glu Val Gly Glu Ala Thr Gly Gly Pro Glu Leu Ser Gly  
 565 570 575

10

20

30

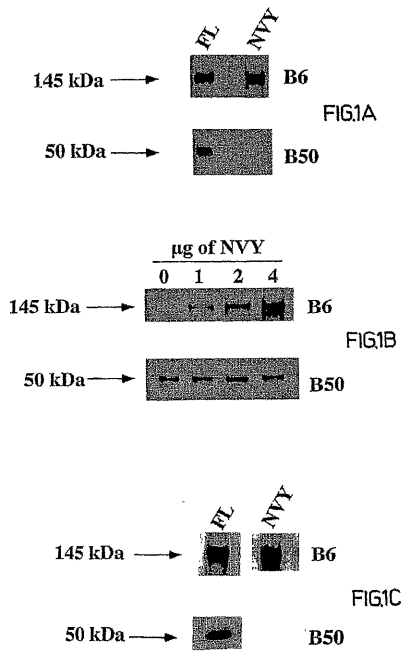
Val Pro Arg Gly Glu Ser Glu Glu Thr Gly Ser Ser Glu Gly Ala Pro  
 580 585 590  
 Ser Leu Leu Pro Ala Thr Arg Ala Pro Glu Gly Thr Arg Glu Leu Glu  
 595 600 605  
 Ala Pro Ser Glu Asp Asn Ser Gly Arg Thr Ala Pro Ala Gly Thr Ser  
 610 615 620  
 Val Gln Ala Gln Pro Val Leu Pro Thr Asp Ser Ala Ser Arg Gly Gly  
 625 630 635 640  
 Val Ala Val Val Pro Ala Ser Gly Asp Cys Val Pro Ser Pro Cys His  
 645 650 655  
 Asn Gly Gly Thr Cys Leu Glu Glu Glu Gly Val Arg Cys Leu Cys  
 660 665 670  
 Leu Pro Gly Tyr Gly Gly Asp Leu Cys Asp Val Gly Leu Arg Phe Cys  
 675 680 685  
 Asn Pro Gly Trp Asp Ala Phe Gln Gly Ala Cys Tyr Lys His Phe Ser  
 690 695 700  
 Thr Arg Arg Ser Trp Glu Glu Ala Glu Thr Gln Cys Arg Met Tyr Gly  
 705 710 715 720  
 Ala His Leu Ala Ser Ile Ser Thr Pro Glu Glu Gln Asp Phe Ile Asn  
 725 730 735  
 Asn Arg Tyr Arg Glu Tyr Gln Trp Ile Gly Leu Asn Asp Arg Thr Ile  
 740 745 750  
 Glu Gly Asp Phe Leu Trp Ser Asp Gly Val Pro Leu Leu Tyr Glu Asn  
 755 760 765  
 Trp Asn Pro Gly Gln Pro Asp Ser Tyr Phe Leu Ser Gly Glu Asn Cys  
 770 775 780  
 Val Val Met Val Trp His Asp Gln Gly Gln Trp Ser Asp Val Pro Cys  
 785 790 795 800  
 Asn Tyr His Leu Ser Tyr Thr Cys Lys Met Gly Leu Val Ser Cys Gly  
 805 810 815  
 Pro Pro Pro Glu Leu Pro Leu Ala Gln Val Phe Gly Arg Pro Arg Leu  
 820 825 830  
 Arg Tyr Glu Val Asp Thr Val Leu Arg Tyr Arg Cys Arg Glu Gly Leu  
 835 840 845  
 Ala Gln Arg Asn Leu Pro Leu Ile Arg Cys Gln Glu Asn Gly Arg Trp  
 850 855 860  
 Glu Ala Pro Gln Ile Ser Cys Val Pro Arg Arg Pro Ala Arg Ala Leu  
 865 870 875 880  
 His Pro Glu Glu Asp Pro Glu Gly Arg Gln Gly Arg Leu Leu Gly Arg  
 885 890 895  
 Trp Lys Ala Leu Leu Ile Pro Pro Ser Ser Pro Met Pro Gly Pro  
 900 905 910

10

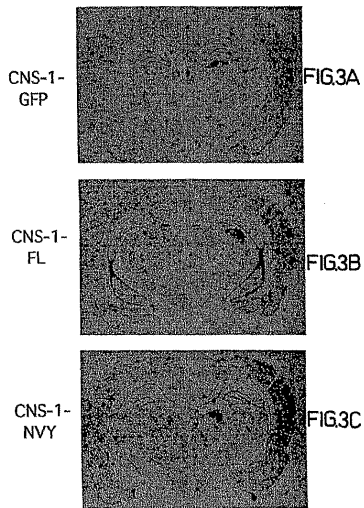
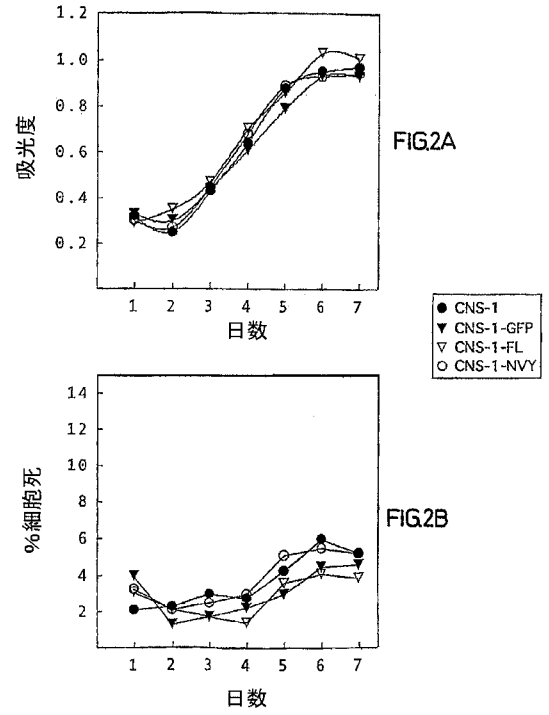
20

30

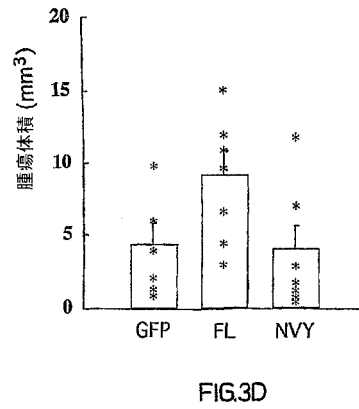
40



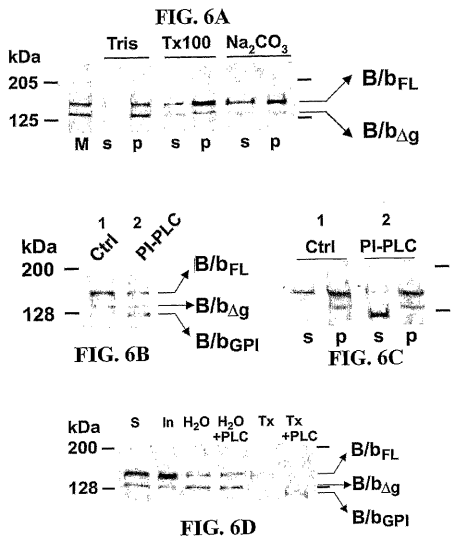
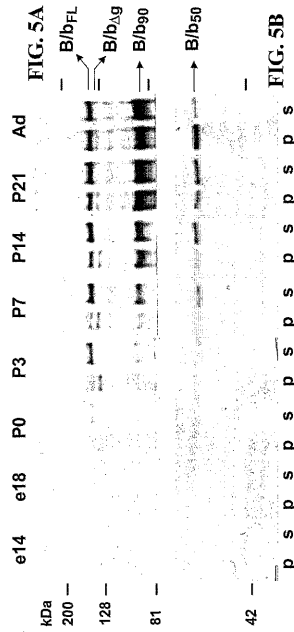
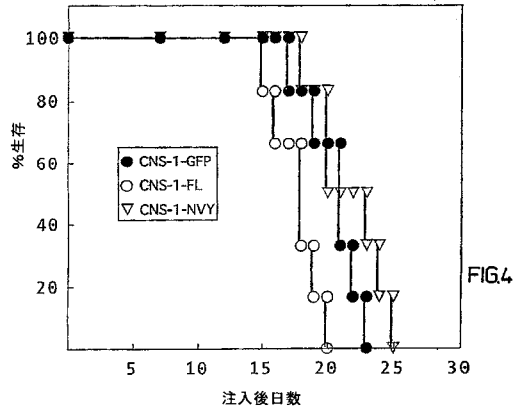
【 図 2 A - B 】



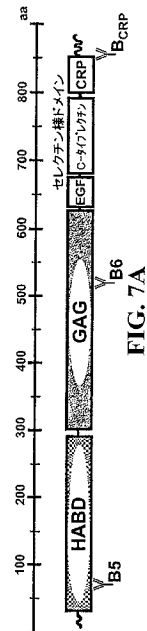
【 図 3 D 】



【 図 4 】



【 図 7 A 】







【 図 16 】

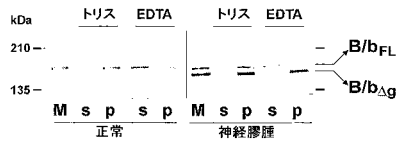


FIG. 16

## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |   | International application No.<br>PCT/US03/17500                     |  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
|--|---|---|--|--|-----|---|-----|---|-----|--|-----|---|-----|--|-----|--|-----|---|-----|--|--|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(7) : C12Q 1/68; A01N 43/04; C07H 21/04; A61K 31/07<br>US CL : 435/6, 325, 375, 91.1; 514/44; 536/24.5, 23.1, 24.3<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |   |   |  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>U.S. : 435/6, 325, 375, 91.1; 514/44; 536/24.5, 23.1, 24.3<br><br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br><br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>Please See Continuation Sheet   |   |   |  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |   |  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.   |  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| X  | JAWORSKI et al. BEHAB, a new member of the proteoglycan tandem repeat family of hyaluronan-binding proteins that is restricted to the brain. The Journal of Cell Biology. April 1994, Vol. 125, No. 2, pages 495-509, see entire article.   | 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 14, 16-19, and 30-33                         |  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| X  | GARY et al. cDNA cloning, chromosomal localization, and expression analysis of human BEHAB/brevican, a brain specific proteoglycan regulated during cortical development and in glioma. Gene. 2000 Vol. 256, pages 139-147, see entire article.   | 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 14, 16-19, and 30-33                         |  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| X  | MATTHEWS et al. Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/Brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member. Journal of Biological Chemistry. 28 July 2000, Vol. 275, No. 30, pages 22695-22703, see entire article. | 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 14, 16-19, and 30-33                         |  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| X  | WO 95/27785 A1 (YALE UNIVERSITY) 19 October 1995, (19.10.1995), see claims 1-10 and Abstract  | 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 14, 16-19, and 30-33                         |  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| A,P  | NUTT et al. Brain enriched hyaluronan binding (BEHAB)/Brevican increases aggressiveness of CNS-1 gliomas in Lewis rats. Cancer Research. 01 October 2001, Vol. 61, pages 7056-7059, see entire article.   | 1-40  |  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.   |   |   |  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| * Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T"</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"B"</td> <td>earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table> |   |   | "A"  | document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention | "B" | earlier application or patent published on or after the international filing date | "X" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone | "L" | document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art | "O" | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" | document member of the same patent family | "P" | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed |  |  |
| "A"  | document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  | "T"   | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| "B"  | earlier application or patent published on or after the international filing date   | "X"   | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| "L"  | document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)   | "Y"   | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| "O"  | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  | "&"   | document member of the same patent family  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| "P"  | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |   |  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>25 August 2003 (25.08.2003)   |   | Date of mailing of the international search report<br>03 NOV 2003   |  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US<br>Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450<br>Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. (703)305-3230   |   | Authorized officer<br>Tara C. Gibbs<br>Telephone No. (703) 308-0196 |  |  |     |   |     |   |     |  |     |   |     |  |     |  |     |   |     |  |  |  |

PCT/US03/17500

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|---|--|-----------------------|
| Category *  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| A,E   | VIAPIANO et al. A novel membrane associated glycovariant of BEHAB/Brevican is up-regulated during rat brain development and in a rat model of invasive glioma. Journal of Biological Chemistry. 29 August 2003, Vol. 278, No. 35, pages 33329-33247, see entire article. | 1-40                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/17500

**Continuation of Item 4 of the first sheet:**

The title has a mis-spelled word, PCT Rule 4.3,

SUGGESTED NEW TITLE: "Compositions, methods, and kits relating to BEHAB and primary CNS tumors".

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

Medline, CaPlus, EmBase, CancerLit

search terms: BEHAB, Brevican, Brain enriched hyaluronan binding protein, glycosylated, unglycosylated, antisense, ribozyme, antibody

## フロントページの続き

| (51) Int. Cl.                  | F I     |       | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|---------|-------|-------------|
| <b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b> | A 6 1 K | 37/02 | 4 H 0 4 5   |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01)        | C 1 2 N | 15/00 | A           |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01)         | C 1 2 N | 5/00  | B           |

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

(72) 発明者 ビアピアノ, マリアノ・エス

アメリカ合衆国コネチカット州 0 6 5 1 1 ニューヘブン・アパートメント 1 0 6 ・ハウストリート  
8 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 EA04  
4B063 QQ20 QR77 QS33  
4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA01 DA03 DA05 DA13  
4B065 AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA44  
CA46  
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 BA34 ZB261  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 EA28 EA50 FA74

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | BEHAB和原发性CNS肿瘤的组合物，方法和试剂盒  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2006523179A</a>  | 公开(公告)日 | 2006-10-12 |
| 申请号            | JP2004525989   | 申请日     | 2003-06-03 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 耶鲁大学   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 耶鲁大学指定   |         |            |
| [标]发明人         | ホクフィールドスーザン<br>マシユーズラツセルテイ<br>ピアピアノマリアノエス  |         |            |
| 发明人            | ホクフィールド,スーザン<br>マシユーズ,ラツセル・テイ<br>ピアピアノ,マリアノ・エス   |         |            |
| IPC分类号         | C07K14/435 A61P35/00 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/53 A61K38/00 C12N15/09 C12N5/10 A61K48/00 C07H21/04 C07K14/47   |         |            |
| CPC分类号         | A61K38/00 A61K48/00 A61P35/00 C07H21/04 C07K14/47 C07K14/4725 C07K2319/00 C07K2319/20 C07K2319/40  |         |            |
| FI分类号          | C07K14/435.ZNA A61P35/00 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/53.V A61K37/02 C12N15/00.A C12N5/00.B   |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B063/QQ20 4B063/QR77 4B063/QS33 4B064/AG01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA03 4B064/DA05 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA34 4C084/ZB261 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74 |         |            |
| 优先权            | 10/195970 2002-07-16 US  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |

摘要(译)

本发明涉及原发性CNS肿瘤，并提供了有用的组合物和方法，用于在患有原发性CNS肿瘤的哺乳动物中减少肿瘤体积并增加生存期，从而提供了对原发性CNS肿瘤的治疗。本发明还涉及鉴定用于减少肿瘤体积和增加动物存活率的化合物的方法，因此涉及治疗原发性CNS肿瘤。

(P2006)  
(43)公表日 平成18年10月12日(20)

|                              |                 |            |
|------------------------------|-----------------|------------|
| (51) Int. Cl.                | F I             | テームコード (3) |
| <b>C07K 14/435</b> (2006.01) | C07K 14/435 ZNA | 4B024      |
| <b>A61P 35/00</b> (2006.01)  | A61P 35/00      | 4B063      |
| <b>C12P 21/02</b> (2006.01)  | C12P 21/02 C    | 4B064      |
| <b>C12Q 1/02</b> (2006.01)   | C12Q 1/02       | 4B065      |
| <b>G01N 33/53</b> (2006.01)  | G01N 33/53 V    | 4C084      |
| 審査請求 有 予備審査請求 有 (全 97 頁) 最終  |                 |            |

|               |                              |          |   |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号     | 特願2004-525989 (P2004-525989) | (71) 出願人 | 504026203<br>イェール・ユニバーシティ   |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年6月3日 (2003.6.3)         |          | アメリカ合衆国コネチカット州<br>ニューヘヴン・ツェーホイツトニ<br>ー                            |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成17年1月14日 (2005.1.14)       |          |   |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2003/017500            |          |   |
| (87) 国際公開番号   | W02004/013956                |          |   |
| (87) 国際公開日    | 平成16年2月12日 (2004.2.12)       | (74) 代理人 | 100060782<br>弁理士 小田島 平吉   |
| (31) 優先権主張番号  | 10/195,970                   |          |   |
| (32) 優先日      | 平成14年7月16日 (2002.7.16)       | (72) 発明者 | ホクフィールド, スーザン<br>アメリカ合衆国コネチカット州<br>ニューヘヴン・ヒルハウスアベ<br>ニ            |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | マシユーズ, ラツセル・テイ<br>アメリカ合衆国コネチカット州<br>ニューヘヴン・トランバルスト<br>リ<br>バー 3 7 |