

(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2004-525605

(P2004-525605A)

(43) 公表日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 31/7088</b>	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 33/24</b>	A 6 1 K 33/24	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 35/76</b>	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 5
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 202 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-518296 (P2002-518296)	(71) 出願人	503048305
(86) (22) 出願日	平成13年8月6日 (2001.8.6)		ルードヴィヒ インスティテュート フォー
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月4日 (2003.2.4)		ー キャンサー リサーチ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/003524		スイス国 セーアッシュー 8024 チュ
(87) 国際公開番号	W02002/012325		ーリッヒ, ポストファッハ
(87) 国際公開日	平成14年2月14日 (2002.2.14)	(74) 代理人	100057874
(31) 優先権主張番号	0019018.1		弁理士 曾我 道照
(32) 優先日	平成12年8月4日 (2000.8.4)	(74) 代理人	100110423
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 曾我 道治
(31) 優先権主張番号	0029996.6	(74) 代理人	100084010
(32) 優先日	平成12年12月8日 (2000.12.8)		弁理士 古川 秀利
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100094695
(31) 優先権主張番号	0112890.9		弁理士 鈴木 憲七
(32) 優先日	平成13年5月26日 (2001.5.26)	(74) 代理人	100111648
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 梶並 順
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抑制遺伝子

## (57) 【要約】

本発明は、腫瘍抑制遺伝子のファミリー（アポトーシス刺激タンパク質、ASP）の新しいメンバーの同定に関し、このファミリーは、p53の活性を調節し得るポリペプチドおよび前記腫瘍抑制ポリペプチドの活性を調節し得るポリペプチドをコードする。本発明の第1の局面に従って、以下を含むポリペプチドまたはこれらの部分が提供される：i) 少なくとも1つのアンキリンリピート；ii) ヘリックスドメイン；iii) SH3ドメイン；そしてこれらのポリペプチドは、p53の少なくともアポトーシス機能を刺激し得ることで特徴付けられる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

単離された組織サンプル中のポリペプチドの存在を検出するためのアッセイであって、該ポリペプチドは、p 5 3 アポトーシス活性のインヒビターであり、ここで、該ポリペプチドが、以下：

i ) 配列番号 3 によって示される配列からなる DNA 分子；  
 i i ) 配列番号 3 にハイブリダイズし、そして p 5 3 アポトーシス活性のインヒビターをコードする DNA 分子；ならびに  
 i i i ) i ) および i i ) に定義される DNA 配列に対する遺伝子コードの結果として縮重している DNA 分子、  
 からなる群より選択される核酸分子によってコードされ、  
 ここで、該アッセイが、試験される組織サンプルを提供する工程；薬剤による該ペプチドの検出に適した条件を提供する工程；および該薬剤によって該ポリペプチドの存在を検出する工程、を包含する、アッセイ。

10

## 【請求項 2】

前記組織サンプルが胸部組織である、請求項 1 に記載のアッセイ。

## 【請求項 3】

前記薬剤が抗体である、請求項 1 または 2 に記載のアッセイ。

## 【請求項 4】

前記アッセイが免疫アッセイである、請求項 3 に記載のアッセイ。

20

## 【請求項 5】

単離された胸部組織サンプル中の核酸分子の存在を検出するためのアッセイであって、該核酸は、p 5 3 アポトーシス活性のインヒビターをコードし、ここで、該分子が、以下：

i ) 配列番号 3 によって示される配列からなる核酸分子；  
 i i ) 配列番号 3 にハイブリダイズし、そして p 5 3 アポトーシス活性のインヒビターをコードする核酸分子；ならびに  
 i i i ) i ) および i i ) に定義される配列に対する遺伝子コードの結果として縮重している DNA 分子、  
 からなる群より選択され、  
 ここで、該アッセイが、試験される組織サンプルを提供する工程；薬剤による該核酸分子の検出に適した条件を提供する工程；および該薬剤によって該核酸分子の存在を検出する工程、を包含する、アッセイ。

30

## 【請求項 6】

前記薬剤が、前記核酸配列にハイブリダイズし得る核酸分子である、請求項 5 に記載のアッセイ。

## 【請求項 7】

前記核酸が、少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドである、請求項 6 に記載のアッセイ。

## 【請求項 8】

前記アッセイがポリメラーゼ連鎖反応アッセイである、請求項 6 または 7 に記載のアッセイ。

40

## 【請求項 9】

アポトーシスの誘導による癌の処置のための医薬の製造のための、配列番号 4 に示されるようなポリペプチドに結合し得る、抗体の使用。

## 【請求項 10】

前記癌が乳癌である、請求項 9 に記載の抗体の使用。

## 【請求項 11】

アポトーシスの誘導による癌の処置のための医薬の製造における使用のための、アンチセンス核酸分子の使用であって、以下：

i ) 配列番号 3 に示される配列からなる核酸分子；  
 i i ) 配列番号 3 にハイブリダイズする配列からなる核酸分子；ならびに

50

i i i ) i ) および i i ) に定義される D N A 配列に対する遺伝子コードの結果として縮重している配列からなる核酸分子、  
からなる群より選択されるセンス配列のアンチセンス配列を含む、アンチセンス核酸分子の使用。

【請求項 1 2】

細胞増殖阻害活性を有する薬剤の同定のためのスクリーニング方法であって、該方法は、以下：

- i ) a ) 配列番号 3 によって示される配列からなる D N A 分子；
  - b ) 配列番号 3 にハイブリダイズし、そして p 5 3 アポトーシス活性のインヒビターをコードする D N A 分子；ならびに
  - c ) a ) および b ) に定義される D N A 配列に対する遺伝子コードの結果として縮重している D N A 分子、からなる群より選択される核酸分子によりコードされるポリペプチドを提供する工程；
  - i i ) 少なくとも 1 つの候補薬剤を提供する工程；
  - i i i ) i ) および i i ) の組み合わせを形成する調製物を提供する工程；
  - i v ) 該薬剤の細胞増殖阻害活性を検出または測定する工程；ならびに必要に応じて
  - v ) 選択された細胞型の増殖および / または細胞分裂に対する該薬剤の効果を試験する工程、
- を包含する、スクリーニング方法。

10

【請求項 1 3】

前記ポリペプチドが、配列番号 3 に示される核酸配列によってコードされる、請求項 1 2 に記載の方法。

20

【請求項 1 4】

前記ポリペプチドが細胞によって発現される、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記細胞が癌細胞である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記ポリペプチドが過剰発現される、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7】

前記細胞が、前記ポリペプチドをコードする核酸分子で形質転換 / トランスフェクトされる、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 1 8】

組み合わせ薬学的調製物であって、以下：

- i ) 配列番号 3 に示される配列からなる核酸分子；
- i i ) 配列番号 3 にハイブリダイズする配列からなる核酸分子；および
- i i i ) i ) および i i ) に定義される D N A 配列に対する遺伝子コードの結果として縮重している配列からなる核酸分子、  
からなる群より選択されるセンス配列の少なくとも 1 つのアンチセンス核酸分子、ならびに化学療法剤を含む、組み合わせ薬学的調製物。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 に記載の調製物であって、ここで、前記化学療法剤が、以下：シスプラチン；カルボプラチン；シクロホスファミド；メルファラン；カルムスチン；メトトレキセート；5 - フルオロウラシル；シタラビン；メルカプトプリン；ダウノルビシン；ドキソルビシン；エピルビシン；ピンブラスチン；ピンクリスチン；ダクチノマイシン；マイトマイシン C；タキソール；L - アスパラギナーゼ；G - C S F；カリーチアミシンまたはエスペラミシンのようなエネジイン；クロラムブシル；A R A - C；ピンデシン；プレオマイシン；またはエトポシドからなる群より選択される抗癌剤である、調製物。

40

【請求項 2 0】

前記薬剤がシスプラチンである、請求項 1 9 に記載の調製物。

【請求項 2 1】

50

組み合わせ薬学的調製物であって、以下：

i) 配列番号 3 に示される配列からなる核酸分子；

ii) 配列番号 3 にハイブリダイズする配列からなる核酸分子；および

iii) i) および ii) に定義される DNA 配列に対する遺伝子コードの結果として縮重している配列からなる核酸分子、

からなる群より選択される核酸分子によってコードされるポリペプチドに結合し得る抗体、ならびに化学療法剤を含む、組み合わせ薬学的調製物。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の調製物であって、ここで、前記化学療法剤が、以下：シスプラチン；カルボプラチン；シクロホスファミド；メルファラン；カルムスチン；メトトレキセート；5 - フルオロウラシル；シタラピン；メルカプトプリン；ダウノルピシン；ドキソルピシン；エピルピシン；ビンブラスチン；ビンクリスチン；ダクチノマイシン；マイトマイシン C；タキソール；L - アスパラギナーゼ；G - C S F；カリーチアミシンまたはエスベラミシンのようなエネジイン；クロラムブシル；A R A - C；ビンデシン；プレオマイシン；またはエトポシドからなる群より選択される、調製物。

10

【請求項 2 3】

前記化学療法剤がシスプラチンである、請求項 2 2 に記載の調製物。

【請求項 2 4】

p 5 3 のトランス活性化活性を刺激する単離されたポリペプチドであって、ここで、該ポリペプチドが、以下：

20

i) 配列番号 1 または 2 に示される DNA 配列；

ii) (i) に示される配列にハイブリダイズする DNA 配列；ならびに

iii) 核酸配列によってコードされる該ポリペプチドの p 5 3 トランス活性化活性が該ポリペプチドのカルボキシル末端のアミノ酸 1 3 0 ~ 1 1 3 5 からなるポリペプチドのトランス活性化活性よりも大きいという点で特徴付けられる、i) および ii) に定義される DNA 配列に対する遺伝子コードの結果として縮重している DNA 配列、からなる群より選択される DNA 配列によってコードされる、単離されたポリペプチド。

【請求項 2 5】

前記 p 5 3 トランス活性化活性が約 2 倍である、請求項 2 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 6】

前記 p 5 3 トランス活性化活性が約 7 倍である、請求項 2 4 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 2 7】

前記トランス活性化活性が、p 5 3 応答性プロモーターに関する、請求項 2 4 ~ 2 6 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 2 8】

前記アポトーシス促進性プロモーターが、B a x アポトーシス促進性プロモーターまたは P I G - 3 アポトーシス促進性プロモーターに由来する、請求項 2 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 9】

請求項 2 4 ~ 2 8 のいずれかに記載のポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

40

【請求項 3 0】

請求項 2 9 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 3 1】

請求項 2 9 に記載の核酸または請求項 3 0 に記載のベクターで形質転換またはトランスフェクトした、細胞。

【請求項 3 2】

抗体またはその結合部分であって、ここで、該抗体が、請求項 2 4 ~ 2 8 のいずれかに記載のポリペプチドの一部に結合し、ここで、該一部が、該ポリペプチドのカルボキシル末端のアミノ酸 1 3 0 ~ 1 1 3 5 ではない、抗体またはその結合部分。

【請求項 3 3】

50

医薬品としての使用のための、請求項 24 ~ 28 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 34】

医薬品としての使用のための、請求項 30 に記載のベクター。

【請求項 35】

ポリペプチドのアポトーシス促進活性を調節し得る薬剤をスクリーニングするための方法であって、該方法は、以下；

- i) 請求項 24 ~ 28 のいずれかに記載のポリペプチドを発現する細胞を提供する工程；
  - ii) 試験される少なくとも 1 つの薬剤に該細胞を曝露する工程；および
  - iii) 該ポリペプチドの活性に対する該薬剤の効果をモニタリングする工程、
- を包含する、方法。

10

【請求項 36】

ポリペプチドのアポトーシス促進活性を調節し得る薬剤をスクリーニングするための方法であって、該方法は、以下；

- i) 請求項 24 ~ 28 のいずれかに記載のポリペプチドを提供する工程；
  - ii) 試験される少なくとも 1 つの薬剤に該ポリペプチドを曝露する工程；および
  - iii) 該ポリペプチドによる該薬剤の結合をモニタリングする工程、
- を包含する、方法。

【請求項 37】

請求項 35 または 36 に記載の方法によって同定される、薬剤。

【請求項 38】

請求項 24 ~ 28 のいずれかに記載のポリペプチドの存在を検出するためのアッセイであって、該アッセイは、以下；

- i) 試験されるサンプルを提供する工程；
  - ii) 薬剤による該ペプチドの検出に適した条件を提供する工程；および
  - iii) 該薬剤によって該ポリペプチドの存在を検出する工程、
- を包含する、アッセイ。

20

【請求項 39】

請求項 29 に記載の核酸の存在を検出するためのアッセイであって、該アッセイは、以下；

- i) 試験されるサンプルを提供する工程；
  - ii) 薬剤による該核酸の検出に適した条件を提供する工程；および
  - iii) 該薬剤によって該核酸の存在を検出する工程、
- を包含する、アッセイ。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、腫瘍抑制遺伝子ファミリーのメンバー（アポトーシス刺激タンパク質（ASP））に関し、これらメンバーは、p53 の活性を改変し得るポリペプチドをコードし、またこの ASP ポリペプチドの活性を改変し得るポリペプチドをもコードする。

【0002】

腫瘍抑制遺伝子は、細胞増殖または分化を阻害するのに機能するタンパク質をコードし、それ故、正常細胞の増殖（proliferation）、増殖（growth）および分化を維持することに関し重要である。腫瘍抑制遺伝子中の変異は、異常な細胞周期の進行を生じ、そのことによって、例えば、DNA が損傷を受けた場合に細胞周期を静止する正常な細胞周期チェックポイントは、無視され、そして損傷を受けた細胞は、制御不能に分化する。腫瘍抑制遺伝子産物は、細胞全ての部分（例えば、細胞表面、細胞質、核）において、細胞周期（すなわち、G1、S、G2、M および細胞質分裂）を介した細胞損傷の継代を防ぐように機能する。

40

【0003】

多くの腫瘍抑制遺伝子が単離され配列決定されている。これらとしては、単なる例として挙げると、網膜芽細胞腫遺伝子（Rb）（これの変異は、癌（例えば、骨癌（骨癌腫）、

50

膀胱癌、小細胞肺癌、および乳癌ならびに網膜芽細胞腫)に関連する)およびウィルムス腫瘍 - 1 遺伝子 (WT - 1) (これの変異は、腎芽細胞腫および神経線維腫に関連する)が挙げられる。

#### 【0004】

腫瘍抑制遺伝子ファミリー (MAD (Mothers against dpp) (デカペンタペルジック (decapentapelic) 遺伝子) および MADR (MAD 関連遺伝子)) は、多くの種において同定されている。これらの遺伝子は、セリン/スレオニンレセプターシグナル伝達に必要なシグナル伝達経路に関するタンパク質をコードする。MADR1 は、dpp 経路のシグナル伝達に必須である。MADR2 は、別の MADR であり、この遺伝子における変異は、結腸直腸癌に関連する (散在性の結腸直腸癌の 6 % )。MADR2 遺伝子の配列はまた、Smad2 として公知であり、WO98/07849 において開示される。

10

#### 【0005】

恐らく、最も熱心に研究されてきた対象である腫瘍抑制遺伝子は、p53 である。p53 は、転写因子として機能するタンパク質をコードし、細胞分化周期の重要な制御因子である。これは、1978年 (Lane および Crawford、1979) に SV40 ラージ T 抗原に、親和性を持って結合することを示すタンパク質として発見された。p53 遺伝子は、分子量 53 kDa である 393 アミノ酸ポリペプチドをコードする。

#### 【0006】

p53 の転写活性により制御される遺伝子は、その 5' 領域に p53 認識配列を含む。これらの遺伝子は、細胞での p53 のレベルが、例えば DNA 損傷に起因して上昇する場合に、活性化される。p53 に応答する遺伝子の例としては、mdm2 (Momand ら、1992)、Bax (Miyashita および Reed、1995) および PIG-3 (Polyak ら、1997) が挙げられる。Bax および PIG-3 は、p53 の最も重要な機能の 1 つである、アポトーシス誘導に関する。アポトーシス、すなわちプログラムされた細胞死は、損傷した細胞を取り除く自然のプロセスである。これは、細胞での多くのプロセス (前癌性細胞の除去、細胞/組織の発生および恒常性が挙げられる) に重要である。

20

#### 【0007】

上記のように、p53 の最も重要な腫瘍抑制機能の 1 つは、そのアポトーシスを誘導する能力である。いくつかのプロアポトーシス遺伝子 (例えば、Bax) の発現を上方制御する能力は、どの様に p53 がアポトーシスを誘導するのかのおよその証拠を提供した。しかし、p53 (-/-) および p53 (+/+) のトランスジェニックマウスおよび野生型における Bax 発現の比較により、限定された数の組織においてのみ、Bax の発現が、DNA 損傷に反応して p53 により制御されたことが明らかである。従って、なぜ p53 の発現が Bax の発現を、細胞型特異的な様式においてのみ誘導し得たのかについては不明のままである。最近、p53 の変異がプロモーター特異性を変え得ることが示された。2 つの腫瘍由来の変異 p53 遺伝子は、Bax プロモーターのトランス活性化には不備であるが、p53 標的標的遺伝子 (例えば、mdm2 および p21 waf1) の他のプロモーターのトランス活性化に対し適格であることが示された。これらの知見は、Bax の

30

40

#### 【0008】

p53 が、転写依存的経路および転写非依存的経路を介してアポトーシスを誘導し得ることは公知である。さらに、p53 誘導性アポトーシスは、オンコジーン bcl-2 によりブロックされ得る。しかし、bcl-2 は、p53 のトランス活性化機能を阻害しない。今までのところ、どの様に bcl-2 が p53 誘導性アポトーシスを阻害するのかの分子メカニズムについては、ほとんど知られていない。

#### 【0009】

53BP2 は、Iwabuchi ら (1994) により最初に発見された p53 結合タン

50

パク質である。53BP2は、酵母のツーハイブリッドスクリーニングにおいて単離されて、そしてタンパク質のC末端から528アミノ酸のアミノ酸からなることが見出された。これは、プロリンリッチ配列、4つのアンキリンリピートおよびSH3ドメインを含む。引き続いて、これは、Bcl-2と相互作用するタンパク質として同定された(NaumovskiiおよびCleary、1996)。このタンパク質のより長いバージョンが単離されて、bBP2/53BP2として名づけられた。インビトロ翻訳データに基づいて、この著者ら(NaumovskiiおよびCleary、1996)は、bBP2/53BP2タンパク質が、1005アミノ酸からなると予測した。

#### 【0010】

p53のアポトーシス機能がインビボでどの様に調節され得るのかを理解しようとして、本発明者らは、53BP2に対する抗体を産生し、試験したほとんどの細胞において、53BP2の発現レベルが低いことを示した。本発明者らはまた、内因性bBP2/53BP2が、予想外なことに、NaumovskiiおよびClearyにより予測された1005アミノ酸より大きいタンパク質をコードすることを観察した。このタンパク質、ASP-2は、1135アミノ酸からなる。

10

#### 【0011】

明確にするため、以下の命名法を用いる：

i) 528アミノ酸ポリペプチドを、53BP2またはASP-2/53BP2(607~1135)と称す。

ii) 1005アミノ酸ポリペプチドを、bBP2/53BP2またはASP-2/Bbp2(130~1135)と称す。

iii) 1135アミノ酸ポリペプチドを、ASP-2/53BP2または単にASP-2(1~1135)と称す。

括弧中の数字は、ASP-2の等価なアミノ酸を示す。

20

#### 【0012】

本発明者らは、bBP2/53BP2のC末端の半分が、p53の活性に有意な影響を与えないことを示した。しかし、ASP-2/53BP2は、p53のトランス活性化機能を刺激した。最も興味あることに、ASP-2/53BP2は、p53のトランス活性化機能を、プロアポトーシス関連遺伝子(例えば、BaxおよびPIG-3)に由来するプロモータ上で、特異的に増強し得る。

30

#### 【0013】

ASP-2のcDNA配列を用いて、本発明者らは、BLAST検索を実施し、bBP2/BP53をコードする核酸配列に対して顕著な相同性を有するクローンを同定し、KIAA0771として名づけて、この新たに同定された配列は、アポトーシス刺激タンパク質(ASP)をコードする遺伝子ファミリーのメンバーであることが示唆された。このファミリーのメンバーは、ASP-1として示される。当該分野において公知の技術であるPCR-RACEを用いて、本発明者らは、KIAA0771に対して5'上流にあるASP-1 cDNAの100bpをクローニングした。このクローニングした100bpの配列を用いて、BLAST検索を実施した。このことは、本発明者に、この100bp配列に重複し、ASP-1の5'配列をさらに700bp含む別のESTクローン(EMBOエントリーAI625004)を同定することができた。本発明者らは、ESTクローンAI625004およびKIAA0771を得て、両方ともにサブクローニングして、ASP-1 cDNAの全長クローンを、図1Bに示すように産生した。

40

#### 【0014】

本発明者らは、この新規の核酸配列をASP-1(アポトーシス刺激タンパク質1)(Apoptosis Stimulating Protein 1)と名づけた。これは、53BP2/bBP2に対する配列相同性を有するポリペプチドをコードする。ASP-1とASP-2の間の配列相同性を、タンパク質配列のレベルで、図8Aに示す。ASP-1とASP-2の間の最も高い相同性は、タンパク質のN末端部分およびC末端部分で見出される。

50

## 【0015】

これら2つの遺伝子の染色体上の位置もまた同定された。ASP-1は、第14染色体上に位置する遺伝子によりコードされる。17個のエキソンおよびイントロンについての境界を、図1Cに図示する。エキソンおよびイントロンのほとんどは、EMBOエンタリーA1049840にあるゲノムクローンの範囲内である。このプロモーター領域ならびに5'末端エキソンおよびイントロンは、EMBOエンタリーCNS01DTDのゲノムクローンの範囲内に位置する。

## 【0016】

さらに本発明者らは、ASP-2のp53刺激効果を阻害するASP-2の調節因子を同定した。本発明者は、この調節因子をI-ASPと呼んだ。ASP-1およびASP-2を発現する腫瘍において、I-ASPの発現は、対応する正常コントロールに比べて上方制御されている。このことは、p53の腫瘍抑制機能が、ASPおよびI-ASPにより、インビボでポジティブおよびネガティブに制御され得ることを示唆する。

10

## 【0017】

本発明の第1の局面に従って、以下を含むポリペプチドまたはこれらの部分が提供される：

- i) 少なくとも1つのアンキリンリピート；
- ii) ヘリックドメイン；
- iii) SH3ドメイン；そして

これらのポリペプチドは、p53の少なくともアポトーシス機能を刺激し得ることで特徴付けられる。

20

## 【0018】

本発明のさらに好ましい実施形態において、このポリペプチドは、図1cまたは図1dに示されるポリペプチド配列の少なくとも1つの領域に対する抗体（好ましくはモノクローナル抗体）に結合し得ることにより、特徴付けられる。

## 【0019】

本発明のなおさらに好ましい実施形態において、このポリペプチドは、p53と結合し得る結合部位を含み、これにより、p53と会合する。好ましくは、この会合が、アポトーシスを誘導および/または亢進し得る。

## 【0020】

本発明の好ましい実施形態において、このポリペプチドは、哺乳動物起源（理想的には、ヒト）である。

30

## 【0021】

本発明の好ましい実施形態において、このポリペプチドは、図1cまたは1dのアミノ酸配列により示され、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、付加、置換によりさらに改変される。

## 【0022】

本発明の第2の局面に従って、以下から選択されるDNA配列を含む核酸分子が提供される：

- i) 図1aまたは図1bにおいて示されるようなDNA配列；
- ii) 本発明に従う腫瘍抑制ポリペプチドをコードする、図1aまたは図1bに示される配列にハイブリダイズするDNA配列；および
- iii) (i)および(ii)に規定されるDNA配列に対し、遺伝子コードの結果として、縮重しているDNA配列。

40

## 【0023】

本発明の好ましい実施形態において、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、図1aまたは1bに示される配列にアニーリングする、単離された核酸分子が提供される。

## 【0024】

本発明のなおよりさらに好ましい実施形態において、この核酸分子は、cDNAである。

50

## 【0025】

本発明のなおよびさらに好ましい実施形態において、この核酸分子は、ゲノムDNAである。

## 【0026】

本発明のさらに好ましい実施形態において、本発明に従う核酸分子によりコードされる、単離されたポリペプチドが提供される。

## 【0027】

本発明の第3の局面に従って、核酸分子が、この核酸分子によりコードされるポリペプチドの組換え発現を容易にするように適用される、ベクターの一部であることで特徴付けられる核酸分子が提供される。

10

## 【0028】

本発明のさらに好ましい実施形態において、このベクターは、真核生物の遺伝子発現のために適用される発現ベクターである。

## 【0029】

本発明の第4の局面に従って、以下の工程を包含する、本発明に従うポリペプチドを産生する方法が提供される：

- i) 本発明に従う核酸分子で形質転換/トランスフェクトされた細胞を提供する工程；
- ii) このポリペプチドの製造につながる状態で、この細胞を増殖する工程；および
- iii) この細胞またはその増殖環境からこのポリペプチドを精製/単離する工程。

## 【0030】

本発明の好ましい実施形態において、この核酸分子は、本発明に従うベクターである。

20

## 【0031】

本発明の好ましい方法において、このベクターは、このポリペプチドの精製を容易にする分泌シグナルをコードし、従って、組換えポリペプチドがこの分泌シグナルとともに提供される。

## 【0032】

本発明のさらに好ましい実施形態において、このベクターが、細胞または細胞培地からの組換えポリペプチドの精製を容易にする付加アミノ酸配列をコードし、従って、この組換えポリペプチドが付加アミノ酸配列とともに提供される。例えば、組換えポリペプチドのニックルカラムへの結合を可能にするHisタグ配列、またはアビジンカラム上で精製されるビオチン化組換えポリペプチドの使用は、それぞれが当該分野で公知である。

30

## 【0033】

本発明の第5の局面に従って、本発明のポリペプチドの少なくとも一部に結合する抗体またはこれらの結合部分が提供される。

## 【0034】

本発明の好ましい実施形態において、この結合部分は、以下の群から選択される： $F(a b')_2$ 、Fab、FvおよびFdフラグメント；CDR3領域を含む抗体。

## 【0035】

本発明の好ましい実施形態において、この抗体は、モノクローナル抗体である。

## 【0036】

本発明のなおよびさらに好ましい実施形態において、この抗体は、ヒト化されている。

40

## 【0037】

あるいは、この抗体は、組換え方法により産生されるキメラ抗体であり、この抗体の可変領域を、ヒト抗体の非可変領域または定常領域とともに含む。

## 【0038】

キメラ抗体は、マウスまたはラット抗体の全てのV領域がヒト抗体のC領域と合わされている組換え抗体である。ヒト化抗体は、げっ歯類の抗体のV領域に由来する相補性決定領域と、ヒト抗体のV領域に由来するフレームワーク領域とを融合させた組換えハイブリッド抗体である。ヒト抗体由来のC領域もまた使用される。相補性決定領域(CDR)は、抗体の重鎖と軽鎖の両方のN末端ドメインにある領域であり、V領域の主な可変性はここ

50

で制限される。これらの領域は、抗体分子表面でループを形成する。これらのループは、抗体と抗原の間で結合表面を提供する。

【0039】

抗体の産生は、当該分野で周知である。いくつかの実験室向けの教本が、当業者に利用可能である。例えば、Antibodies、LaneおよびHarlow、Cold Spring Harbour Laboratories。

【0040】

本発明の第6の局面に従って、理想的には、本発明に従うベクターを用いて、本発明に従う核酸分子の少なくとも一部を含むために、この核酸配列によりコードされるポリペプチドの少なくとも一部または大部分（例えば、機能性フラグメント）を発現させるために、形質転換/トランスフェクトされた宿主細胞が提供される。

10

【0041】

理想的には、この宿主細胞は、真核生物細胞（例えば、バキュロウイルス発現系に使用するSpodoptera frugiperda種由来の細胞のような昆虫細胞）である。この発現系は、ポリペプチドの翻訳後修飾が必要とされる場合に好まれる。このような修飾が必要でない場合、原核生物の系が使用され得る。

【0042】

本発明の第7の局面に従って、本発明に従うmRNAおよび/またはポリペプチドの発現を決定する方法が提供される。

【0043】

本発明の第8の局面に従って、本発明のベクターを含むことにおいて特徴付けられる薬学的または獣医学的組成物が提供される。

20

【0044】

本発明の第9の局面に従って、本発明のポリペプチドを含むことにおいて特徴付けられる薬学的または獣医学的組成物が提供される。

【0045】

本発明の好ましい実施形態において、このベクターおよび/またはポリペプチドはまた、必要に応じて希釈剤、キャリアまたは賦形剤を含む。

【0046】

本発明の第10の局面に従って、以下の工程を包含する処置方法が提供される：

30

- i) 本発明に従う組成物の有効量を、動物に投与する工程；および
- ii) この治療組成物の効果をこの動物においてモニターする工程。

【0047】

本発明の好ましい方法において、この処置は、癌治療である。

【0048】

本発明のさらに好ましい実施形態において、この動物は、ヒトである。

【0049】

本発明のなおさらに好ましい実施形態において、この効果は、アポトーシスの誘導である。

【0050】

本発明のさらなる局面に従って、本発明に従うポリペプチドの活性を調節し得る薬剤についてスクリーニングする方法が提供され、この方法は、以下の工程を包含する：

40

- i) 本発明に従うポリペプチドを発現する細胞または細胞系統を提供する工程；
- ii) 少なくとも1つの試験されるべき薬剤に、この細胞を曝露する工程；および
- iii) このポリペプチドの活性に対するこの薬剤の影響をモニタリングする工程。

【0051】

本発明のなおさらなる局面に従って、本発明に従うポリペプチドの活性を調節し得る薬剤についてスクリーニングする方法が提供され、この方法は、以下の工程を包含する：

- i) 少なくとも本発明に従うポリペプチドを提供する工程；
- ii) 少なくとも1つの試験されるべき薬剤に、このポリペプチドを曝露する工程；およ

50

び

i i i) このポリペプチドによるこの薬剤の結合をモニタリングする工程。

【0052】

本発明のなおさらなる局面に従って、本発明に従うスクリーニング方法によって同定される薬剤が提供される。

【0053】

本発明の好ましい実施形態において、この薬剤は、本発明に従うポリペプチドの活性を促進するアゴニストである。

【0054】

本発明のさらに好ましい実施形態において、この薬剤は、本発明に従うポリペプチドの活性を阻害するアンタゴニストである。好ましくは、この薬剤は、ポリペプチドである。 10

【0055】

本発明のさらなる局面に従って、アンチセンス核酸分子が提供され、この分子は、本発明に従うセンス配列のアンチセンス配列を含む。好ましくは、このアンチセンス核酸分子は、図1bに示されるアンチセンス配列またはその一部を含む。好ましくは、このアンチセンス核酸分子は、ASP-2配列のヌクレオチド-253~839を含むセンス配列のアンチセンス配列である。

【0056】

本発明のさらなる局面に従って、以下を含む群から選択される単離された核酸分子が提供される： 20

i) 図10に示されるようなDNA配列；

i i) 図10に示される配列にハイブリダイズするDNA配列であり、本発明に従う腫瘍抑制ポリペプチドのインヒビターをコードする、DNA配列；および i i i) (i) および (i i) において定義されるDNA配列に対して、遺伝コードの結果としての縮重であるDNA配列。

【0057】

本発明の好ましい実施形態において、図10に示される配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でアニールする、単離された核酸分子が提供される。

【0058】

本発明のさらなる局面に従って、ポリペプチドまたはその一部が提供され、これらは、以下を含み： 30

i) 少なくとも1つのアンキリンリピート；

i i) SH3ドメイン；そして

このポリペプチドは、図1dに示されるポリペプチドのp53刺激活性を阻害し得る点で特徴付けられる。

【0059】

本発明の好ましい実施形態において、このポリペプチドはまた、プロリンリッチ領域を含む。

【0060】

本発明のなおさらなる局面に従って、図11のアミノ酸配列によって示されるようなポリペプチドが提供され、このポリペプチドは、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、付加、置換によってさらに改変される。好ましくは、このポリペプチドは、ヒト起源のものである。 40

【0061】

ASP-1またはASP-2に適用可能な局面および実施形態は、I-ASPに等しく適用可能である。例えば、I-ASP DNAを含む発現ベクターの作製；I-ASPをコードする核酸分子で形質転換またはトランスフェクトされた細胞株；I-ASPをコードする核酸分子によってコードされるポリペプチドまたはそのホモログに結合し得るモノクローナル抗体；I-ASPをコードする核酸分子を含む薬学的組成物；I-ASPポリペプチドまたはそのホモログを含む薬学的組成物；I-ASPまたはI-ASPポリペプチ 50

ドをコードする核酸分子を使用する処置方法；I - A S Pまたはそのホモログをコードする核酸を検出する方法；I - A S Pポリペプチドまたはそのホモログを検出する方法。

【0062】

本発明のさらなる局面に従って、アンチセンス核酸分子が提供され、この分子は、本発明に従うセンス配列のアンチセンス配列を含む。好ましくは、このアンチセンス核酸分子は、図10に示されるセンス配列またはその一部のアンチセンス配列である。より好ましくは、このアンチセンス核酸分子はなお、I - A S Pのヌクレオチド - 37 ~ 536を含むセンス配列のアンチセンス配列である。

【0063】

本発明のさらなる局面に従って、本発明に従うアンチセンス分子を含む薬学的組成物が提供される。 10

【0064】

本発明の好ましい実施形態において、このアンチセンス核酸は、少なくとも1つの化学療法剤と組み合わせられる。好ましくは、この薬剤は、以下からなる群より選択される抗癌剤である：シスプラチン；カルボプラチン；シクロホスファミド (cyclophosphamide)；メルファラン；カルムスリン (carmustin)；メトトレキサート；5 - フルオロウラシル；シタラビン；メルカプトプリン；ダウノルビシン；ドキソルビシン；エピルビシン；ピンブラスチン；ピンクリスチン；ダクチノマイシン；マイトマイシンC；タキソール；L - アスパラギナーゼ；G - C S F；エネジイン (enediyne) (例えば、カリケアミシン (calicheamicin) またはエスペラミシン (esperamicin)；クロラムブシル；ARA - C；ビンデシン；ブレオマイシン；およびエトポシド。先のもとの組み合わせられ得る他の薬剤としては、腫瘍血管新生 (neovascularity) に対して作用する薬剤または免疫調節剤が挙げられる。好ましくは、腫瘍血管新生に対して作用する薬剤は、コンプレスタチン (combrestatin) A4、アンジオスタチンおよびエンドスタチン (endostatin) からなる群より選択される。好ましくは、免疫調節剤は、 $\alpha$  - インターフェロン、 $\gamma$  - インターフェロンおよび腫瘍壊死因子 (TNF) からなる群より選択される。 20

【0065】

本発明の好ましい実施形態において、この薬剤は、シスプラチンである。

【0066】

本発明のさらなる局面に従って、図1dに示される配列のアミノ酸1 ~ 130に結合するモノクローナル抗体の調製のための方法が提供され、この方法は、以下の工程を包含する： 30

(a) 免疫原を用いて免疫応答性哺乳動物を免疫する工程であって、この免疫原は、図1dのアミノ酸1 ~ 130によって示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、工程；

(b) 免疫された免疫応答性の哺乳動物のリンパ球を骨髓腫細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成する工程；

(c) 工程(b)のハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体をスクリーニングする工程； 40

(d) モノクローナル活性を生じるハイブリドーマ細胞を培養して、このモノクローナル抗体を増殖させるおよび/または分泌する工程；ならびに

(e) 培養物上清からこのモノクローナル抗体を回収する工程。

【0067】

本発明の好ましい方法において、この免疫応答性の哺乳動物は、マウスである。

【0068】

代替の好ましい方法Aにおいて、この免疫応答性の哺乳動物は、ラットである。

【0069】

本発明のさらに好ましい方法において、この哺乳動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子またはヒト免疫グロブリン遺伝子を含む染色体核酸に関してトランスジェニックである。 50

## 【0070】

従って、本発明は、1つの局面において、単離されたASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドおよび/またはI-ASPポリペプチド、これらのポリペプチドをコードする遺伝子、これらの機能的改変および改変体、これらの有用なフラグメント、ならびにそれらに関する治療剤を含む。これらの遺伝子の発現は、p53および関連のポリペプチドに結合することによって、アポトーシスに影響する。

## 【0071】

核酸に関して本明細書中で使用される場合、用語「単離された」は、以下を意味する：(i)例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によってインビトロで増幅されたもの；(ii)クローニングによって、組換え的に生成されたもの；(iii)切断およびゲル分離などによって精製されたもの；または(iv)例えば、化学合成によって合成されたもの。単離された核酸は、当該分野で周知の組換えDNA技術によって容易に操作されるものである。

10

## 【0072】

従って、5'制限部位および3'制限部位が公知である、ベクターに含まれるヌクレオチド配列、またはこれについての開示されたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プライマー配列は、単離されたとみなされるが、そのネイティブな状態で天然の宿主中に存在する核酸配列は、単離されたとはみなされない。例えば、クローニングベクターまたは発現ベクター中に単離された核酸は、細胞内に存在する物質の僅かな割合のみを含み得る点で、純粋ではない。しかし、本明細書中でこの用語が使用される場合、このような核酸は、単離されている。なぜなら、これらは当業者に公知の標準的な技術によって容易に操作されるからである。本明細書中で使用される場合、単離された核酸は、天然に存在しない染色体ではない。

20

## 【0073】

ポリペプチドに関して本明細書中で使用される場合、「単離された」は、そのネイティブな環境から分離され、かつその同定または使用を可能にするに十分な量で存在するものを意味する。タンパク質またはポリペプチドをいう場合、単離されたは、例えば、以下を意味する：(i)発現クローニングによって選択的に生成されるもの、または(ii)クローマトグラフィーまたは電気泳動によって精製されるもの。単離されたタンパク質またはポリペプチドは、実質的に純粋であってもよいが、必ずしもその必要はない。用語「実質的に純粋」は、タンパク質またはポリペプチドが、その意図される使用のために実用的かつ適切な程度に、これらが天然の系またはインビボの系で見出され得る他の物質を実質的に含まないことを意味する。実質的に純粋なポリペプチドは、当該分野で周知の技術によって生成され得る。単離されたタンパク質は、薬学的調製物中に、薬学的に受容可能なキャリアと共に混合され得るので、このタンパク質は、調製物の重量の、小さい割合のみを含み得る。それにもかかわらず、このタンパク質は、それが生きた系において結合し得る物質から分離されている(すなわち、他のタンパク質から単離されている)点で、単離されている。

30

## 【0074】

本発明の1つの局面は、ASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドおよび/またはI-ASPポリペプチドをコードし、そしてストリンジェントな条件下で本明細書中に開示される核酸分子、好ましくは図1a、図1bまたは図10に示される分子のコード領域にハイブリダイズする核酸配列に関する。

40

## 【0075】

従って、本発明の1つの局面は、ASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドおよび/またはI-ASPポリペプチドをコードし、そしてストリンジェントな条件下で本明細書中に提供されるような核酸分子にハイブリダイズする核酸配列に関する。本明細書中で使用される場合、用語「ストリンジェントな条件」とは、当該分野で知られたパラメータをいう。核酸ハイブリダイゼーションパラメータは、このような方法をまとめた参考文献(例えば、Molecular Cloning: A Laboratory M

50

annual、J. Sambrookら、編、第二版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、1989またはCurrent Protocols in Molecular Biology、F. M. Ausubelら、編、John Wiley & Sons、Inc.、New York)において見出され得る。より具体的には、本明細書中で使用される場合、ストリンジェントな条件とは、例えば、ハイブリダイゼーション緩衝液(3.5xSSC、0.02% Ficoll、0.02% ポリビニルピロリドン、0.02% ウシ血清アルブミン、2.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH7)、0.5% SDS、2mM EDTA)中の65°Cでのハイブリダイゼーションをいう。SSCは、0.15M 塩化ナトリウム/0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7であり；SDSは、ドデシル硫酸ナトリウムであり；そしてEDTAは、エチレンジアミンテトラ酢酸である。ハイブリダイゼーション後、DNAが移される膜を、2xSSCで室温で洗浄し、次いで0.1~0.5xSSC/0.1xSDSで、68°Cまでの温度で洗浄する。

#### 【0076】

類似の程度のストリンジェンシーを生じる、使用され得る他の条件、試薬などが存在する。当業者は、このような条件を良く知っており、従って、それらは本明細書中には示されない。しかし、当業者が、本発明のASP-1核酸、ASP-2核酸またはI-ASP核酸のホモログまたは対立遺伝子の明らかな同定を可能にする様式で、この条件を操作し得ることが理解される。当業者はまた、細胞およびライブラリーを、このような分子の発現についてスクリーニングするための方法論を良く知っており、この分子は、次いで、慣用的に単離され、その後、適当な核酸分子の単離および配列決定が行われる。

#### 【0077】

一般的に、ホモログおよび対立遺伝子は、代表的に、開示されたヌクレオチド配列およびアミノ酸配列に対して、それぞれ、少なくとも90%のヌクレオチド同一性および/または少なくとも95%のアミノ酸同一性を共有し、いくつかの場合、少なくとも95%のヌクレオチド同一性および/または少なくとも97%のアミノ酸同一性を共有し、そしてなお他の例においては、少なくとも98%のヌクレオチド同一性および/または少なくとも99%のアミノ酸同一性を共有する。相同性は、NCBI(Bethesda、Maryland)によって開発された、インターネット([ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/](http://ncbi.nlm.nih.gov/pub/))によって獲得され得る種々の公に利用可能なソフトウェアツールを使用して算定され得る。

#### 【0078】

例示的なツールとしては、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>で入手可能な、好ましくはデフォルト設定を使用するBLASTシステムが挙げられる。PairwiseアルゴリズムおよびClustalWアルゴリズム(BLOSUM30マトリックス設定)ならびにKyle-Doolittleハイドロパシー分析は、MacVector配列分析ソフトウェア(Oxford Molecular Group)を使用して獲得され得る。先の核酸のワトソン-クリック相補体もまた、本発明によって包含される。

#### 【0079】

本明細書中に記載される核酸に対する配列同一性を有する、ASP-1タンパク質、ASP-2タンパク質および/またはI-ASPタンパク質をコードする核酸のスクリーニングにおいて、サザンプロットが、検出可能なプローブ(例えば、放射能、化学発光)と共に、先の条件を使用して、実施され得る。DNAが最終的に移される膜を洗浄した後、このプローブシグナルを、例えば、膜をX線フィルムまたは燐光画像(phosphorimager)板に対して配置して放射性シグナルを検出することによって、あるいは膜を処理して化学発光シグナルを検出することによって、検出し得る。

#### 【0080】

本発明はまた、ネイティブな物質中に存在する代替のコドンを含む、縮重核酸も含む。例

例えば、セリン残基は、コドン T C A、A G T、T C C、T C G、T C T および A G C によってコードされる。6つのコドンの各々は、セリン残基をコードする目的について等価である。従って、任意のセリンコードヌクレオチドのトリプレットが使用されて、タンパク質合成装置を指向して、インピトロまたはインピボで伸長ポリペプチド中にセリン残基を取り込み得ることが当業者に明らかである。同様に、他のアミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列トリプレットとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：C C A、C C C、C C G および C C T (プロリンコドン)；C G A、C G C、C G G、C G T、A G A および A G G (アルギニンコドン)；A C A、A C C、A C G および A C T (スレオニンコドン)；A A C および A A T (アスパラギンコドン)；ならびに A T A、A T C および A T T (イソロイシンコドン)。他のアミノ酸残基は、同様に、複数のヌクレオチド配列によってコードされ得る。従って、本発明は、遺伝子コドンの縮重に起因して、生物学的に単離された核酸とはコドン配列が異なる縮重核酸を包含する。 10

#### 【0081】

本発明はまた、1以上のヌクレオチドまたはアミノ酸の付加、置換および欠失を含む改変された核酸分子またはポリペプチドを提供する。本明細書中で使用される場合、「1以上」とは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30またはこれらの分子について分子の機能を実質的に変化させない数までを意味し、ここで、この機能は、元の核酸またはポリペプチドに実質的に類似していることが所望される。機能の実質的な変化は、例えば、ドミナントネガティブなタンパク質またはその機能の1以上を喪失したタンパク質である。 20

#### 【0082】

好ましい実施形態において、これらの改変核酸分子および/またはこれらがコードするポリペプチドは、非改変核酸および/またはポリペプチドの少なくとも1つの活性または機能(例えば、p53結合、抗原性、転写活性など)を保持する。特定の実施形態において、この改変核酸分子は、改変されたポリペプチド、好ましくは本明細書の他の場所に記載されるような保存的アミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする。この改変核酸分子は、非改変核酸分子に構造的に関連し、そして好ましい実施形態において、非改変核酸分子に十分に構造的に関連し、その結果、この改変核酸分子と非改変核酸分子とは、当業者に公知の高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする。 30

#### 【0083】

例えば、単一のアミノ酸変化を有するポリペプチドをコードする改変された核酸分子が調製され得る。これらの核酸分子の各々は、本明細書中で記載されるような遺伝コードの縮重に対応するヌクレオチド変化を除いて、1つ、2つまたは3つのヌクレオチド置換を有し得る。同様に、2つのアミノ酸変化を有するポリペプチドをコードする改変された核酸分子(これは、例えば、2~6個のヌクレオチド変化を有する)を調製し得る。このような多数の改変された核酸分子(例えば、アミノ酸2および3、アミノ酸2および4、アミノ酸2および5、アミノ酸2および6などをコードするコドンにおけるヌクレオチドの置換を含む)は、当業者により容易に想定される。前述の例において、2つのアミノ酸のそれぞれの組み合わせは、改変された核酸分子のセット、およびこのアミノ酸置換をコードする全てのヌクレオチド置換に含まれる。さらなる置換(すなわち、3つ以上)、付加または欠失を有する(例えば、終止コドンまたはスプライス部位の導入によって)ポリペプチドをコードするさらなる核酸分子はまた、当業者により容易に想定されるように、本発明により調製され、そして本発明に包含される。任意の前述の核酸またはポリペプチドは、本明細書中に開示される核酸および/またはポリペプチドに対する構造的な関係または活性の保持について、慣用的な実験によって試験され得る。 40

#### 【0084】

本発明はまた、ヒトゲノム内で固有の配列を提示するのに十分な長さの、A S P - 1、A S P - 2 および I - A S P またはそれらの相補体の単離されたフラグメントを提供し、そして A S P - 1、A S P - 2 および I - A S P ポリペプチドをコードする核酸を同定する 50

。これらのフラグメントは、固有のフラグメントがより大きな核酸の「サイン」であるフラグメントであるという点で、固有と考えられ得る。例えば、固有のフラグメントは、その正確な配列が、上で定義されたASP-1、ASP-2およびI-ASP核酸の外側の分子において見出されないこと、すなわちこの正確な配列が、ASP-1、ASP-2およびI-ASP配列を厳密に同定することを保証するのに十分な長さである。固有フラグメントは、本願の出願時に公的に利用可能なデータベース（例えば、GenBank）に存在する任意の配列と同一ではない連続したヌクレオチドの配列を含むが、特定のフラグメントは、フラグメントの一部としてGenBankに寄託されたいくつかの既知の配列を含み得る。同様に、公的に既知の配列の相補体、ならびに公的に既知の配列のフラグメントおよびその相補体は、ASP-1、ASP-2およびI-ASPの固有のフラグメントの一部であり得るが、全てではない。従って、固有のフラグメントは、定義によって、ESTのみからなる配列および/または本願に含まれる配列の最先の出願日の時点で公的に利用可能なデータベースに寄託されていた遺伝子配列を排除する。従って、固有のフラグメントは、GenBankのヌクレオチド配列またはそのフラグメントの正確な配列以外のヌクレオチド配列を含まなければならない。この差異は、GenBank配列に対する付加、欠失または置換であり得るか、またはこれは、GenBank配列とは全体的に異なる配列であり得る。

10

**【0085】**

ASP-1、ASP-2およびI-ASP核酸分子のフラグメント（固有のフラグメントを含む）は、ハイブリダイゼーションプロットアッセイにおいてこのような核酸を同定するために、ヌクレアーゼ保護アッセイにおいては、転写を測定するために、プローブとして使用され得るか、またはPCRを用いるアッセイのような増幅アッセイにおいて使用され得る。当業者に公知のように、大きなプローブ（例えば、200ヌクレオチド、250ヌクレオチド、300ヌクレオチド以上）は、サザンブロットおよびノーザンブロットのような特定の用途に好ましく、一方、より小さいフラグメントは、PCRのような用途に好ましい。フラグメントはまた、抗体を作製するため、もしくはポリペプチドフラグメントの結合を決定するため、または免疫アッセイ成分を作製するための融合タンパク質を生成するために使用され得る。同様に、フラグメントは、ASP-1、ASP-2および/もしくはI-ASPポリペプチドの非融合フラグメント（例えば、N末端フラグメントまたはC末端フラグメント）、または本明細書中で開示される種々のタンパク質ドメイン（例えば、抗体の調製において、免疫アッセイにおいて、ならびにASP-1、ASP-2およびI-ASPポリペプチド、および/またはp53またはrelポリペプチドに結合する他のポリペプチドの競合結合パートナー（例えば、治療用途において）として、有用である）を生成するために用いられ得る。フラグメントはさらに、本明細書中で記載されるように、ASP-1、ASP-2および/またはI-ASP核酸およびポリペプチドの発現を阻害するアンチセンス分子として、特に、本明細書中でより詳細に記載されるように、治療目的のために使用され得る。

20

30

**【0086】**

当業者によって認識されるように、固有のフラグメントのサイズは、遺伝コードにおけるその保存性に依存する。従って、ASP-1、ASP-2およびI-ASP核酸分子およびそれらの相補体のいくつかの領域は、より長いセグメントが固有であることを必要とするが、他の領域は、短いセグメント、代表的には、12ヌクレオチドと32ヌクレオチドとの間（例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31および32塩基長）のみを必要とする。本開示は、第1のヌクレオチド、第2のヌクレオチドなどから末端の8ヌクレオチド短縮までで始まり、そして各配列ごとにヌクレオチド数8、9、10などから最後のヌクレオチドまでのいずれかのヌクレオチドで終わる、各配列の各々全てのフラグメントを包含することを意図する（ただし、この配列は、上記のように固有である）。25ヌクレオチド長以上のASP-1、ASP-2およびI-ASP核酸の多数のセグメント、またはその相補体は、固有である。当業者は、代表的には、固有のフラグメントが、非AS

40

50

PおよびI-ASP核酸から目的の配列を選択的に区別する能力に基づいて、このような配列を選択するための方法に十分に精通している。このフラグメントの配列と既知のデータベースの配列との比較は、代表的に、必要な全てであるが、インビトロの確認的なハイブリダイゼーションおよび配列決定分析が、実施され得る。

【0087】

フラグメントは、機能的フラグメントであり得る。本発明の核酸分子の機能的フラグメントは、より大きな核酸分子のいくつかの機能的特性（例えば、機能的ポリペプチドをコードすること、タンパク質（例えば、p53）に結合すること、作動可能に連結された核酸の転写を調節すること、免疫学的に認識されるエピトープをコードすることなど）を保持するフラグメントである。当業者は、本明細書中に記載されるアッセイ、および当該分野で周知のアッセイを使用して、慣用的な実験のみを使用して、フラグメントが核酸分子の機能的フラグメントであるか否かを容易に決定し得る。

10

【0088】

上記のように、本発明は、ASP-1、ASP-2およびI-ASPポリペプチドをコードする核酸分子を選択的に結合し、例えば、p53の結合、転写活性またはアポトーシスを調節するアンチセンスオリゴヌクレオチドを包含する。このことは、p53活性の調節が所望される実質的に任意の医学的状態（例えば、癌および異常なアポトーシスに關与する状態）において望ましい。

【0089】

本明細書中で使用する場合、用語「アンチセンスオリゴヌクレオチド」または「アンチセンス」は、生理学的条件下で、特定の遺伝子を含むDNAまたはこの遺伝子のmRNA転写物にハイブリダイズし、それにより、この遺伝子の転写および/またはこのmRNAの翻訳を阻害する、オリゴリボヌクレオチド、オリゴデオキシリボヌクレオチド、改変されたオリゴリボヌクレオチド、または改変されたオリゴデオキシリボヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドを示す。アンチセンス分子は、標的遺伝子または転写物とハイブリダイズすると、この標的遺伝子の転写または翻訳を妨害するように設計される。当業者は、正確な長さのアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびその標的との相補性の程度は、この標的の配列およびこの配列を含む特定の塩基を含む、選択された特定の標的に依存することを認識する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、生理学的条件下で標的に選択的に結合するように、すなわち、生理学的条件下で、標的細胞中の任意の他の配列よりも実質的に多くこの標的配列にハイブリダイズするように、構築および配置されることが好ましい。本明細書中で提供されるASP-1、ASP-2またはI-ASP核酸配列に基づいて、または対立遺伝子または相同なゲノム配列および/またはcDNA配列に基づいて、当業者は、本発明に従う用途に適切な多数のアンチセンス分子のいずれかを、容易に選択および合成し得る。例えば、ASP-1、ASP-2またはI-ASP核酸の長さにわたる15~30ヌクレオチドの一連のオリゴヌクレオチドを含む「遺伝子ウォーク」を調製し、続いて、対応するASP-1、ASP-2またはI-ASPの発現の阻害について試験し得る。必要に応じて、合成および試験するオリゴヌクレオチドの数を減らすために、5~10ヌクレオチドのギャップを、このオリゴヌクレオチドの間に残し得る。

20

30

【0090】

阻害に対して十分に選択的かつ強力であるために、このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的に対して相補的な、少なくとも10個、より好ましくは少なくとも15個の連続した塩基を含むべきであるが、特定の場合において、7塩基長程の短い改変されたオリゴヌクレオチドが、アンチセンスオリゴヌクレオチドとして首尾良く使用されている（Wagnerら、Nature Biotechnol. 14: 840-844, 1996）。より好ましくは、このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、20~30塩基の相補配列を含む。遺伝子またはmRNA転写物の任意の領域に対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドが選択され得るが、好ましい実施形態において、このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、N末端部位または5'上流部位（例えば、翻訳開始部位、転写開始部位またはプロモーター部位）に対応する。さらに、3'非転写領域が、標的化され得る。

40

50

mRNA スプライシング部位に対する標的化はまた、当該分野において使用されているが、選択的 mRNA スプライシングが生じる場合には、それほど望まれ得ない。さらに、アンチセンスは、好ましくは、mRNA の二次構造が予測されない部位（例えば、Sainio ら、Cell Mol. Neurobiol. 14 (5) : 439 ~ 457, 1994 を参照のこと）、およびタンパク質が結合すると予測されない部位に標的化される。最後に、ASP-1、ASP-2 および I-ASP cDNA 配列は、本明細書中に開示されるが、当業者は、これらの cDNA に対応するゲノム DNA を容易に誘導し得る。従って、本発明はまた、ASP-1、ASP-2 または I-ASP ゲノム DNA に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。同様に、対立遺伝子 cDNA または相同な cDNA およびゲノム DNA に対するアンチセンスは、過度の実験を行うことなく、可能である。

10

## 【0091】

実施形態の1つのセットにおいて、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、「天然の」デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはそれらの任意の組み合わせからなり得る。すなわち、一方のネイティブなヌクレオチドの5'末端および他方のネイティブのヌクレオチドの3'末端は、天然の系におけるように、ホスホジエステルヌクレオチド間結合を介して、共有結合され得る。これらのオリゴヌクレオチドは、手動でまたは自動合成機によって行われ得る当該分野で認識された方法によって、調製され得る。これらはまた、ベクターによって組換え生成され得る。

## 【0092】

しかし、好ましい実施形態において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、「改変された」オリゴヌクレオチドを含み得る。すなわち、このオリゴヌクレオチドは、このオリゴヌクレオチドがそれらの標的にハイブリダイズするのを妨害せず、それらの安定性もしくは標的化を増大するか、またはそれらの治療的有効性を増大する多数の様式で改変され得る。

20

## 【0093】

本明細書中で使用する場合、用語「改変されたオリゴヌクレオチド」は、(1) そのヌクレオチドのうち少なくとも2つが、合成ヌクレオチド間結合（すなわち、一方のヌクレオチドの5'末端と他方のヌクレオチドの3'末端との間のホスホジエステル結合以外の結合）を介して作動可能に連結され、そして/または(2) 通常は核酸と会合していない化学基が、このオリゴヌクレオチドに共有結合された、オリゴヌクレオチドを示す。好ましい合成ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート、アルキルホスホネート、ホスホロジチオエート、ホスフェートエステル、アルキルホスホノチオエート、ホスホロアミデート、カルバメート、カルボネート、ホスフェートトリエステル、アセトアミデート、カルボキシメチルエステルおよびペプチドである。

30

## 【0094】

用語「改変されたオリゴヌクレオチド」はまた、共有結合的に改変された塩基および/または糖を有するオリゴヌクレオチドを包含する。例えば、改変されたオリゴヌクレオチドは、3'位のヒドロキシル基以外でありかつ5'位のホスフェート基以外である低分子量有機基に共有結合された糖骨格を有するオリゴヌクレオチドを含む。従って、改変されたオリゴヌクレオチドは、2'-O-アルキル化リボース基を含み得る。さらに、改変されたオリゴヌクレオチドは、リボースの代わりにアラビノースのような糖を含み得る。従って、本発明は、ASP-1、ASP-2 および/または I-ASP ポリペプチドをコードする核酸に相補的であり、かつこれに生理学的条件下でハイブリダイズする改変アンチセンス分子を、薬学的に受容可能なキャリアと共に含む薬学的調製物を企図する。

40

## 【0095】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、薬学的組成物の一部として投与され得る。このような薬学的組成物は、当該分野で公知の任意の標準的な生理学的および/または薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせて、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含み得る。この組成物は、無菌性であり、かつ患者への投与に適切な質量単位または体積単位中に治療的有

50

効量のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むべきである。このキャリアの特性は、投与経路に依存する。生理学および薬学的に受容可能なキャリアとしては、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、安定化剤、可溶化剤および当該分野で周知の他の材料が挙げられる。

**【0096】**

本明細書中で使用する場合、「ベクター」は、異なる遺伝環境の間の輸送または宿主細胞における発現のために、制限およびライゲーションによって所望の配列が挿入され得る多数の核酸のいずれかであり得る。ベクターは、代表的には、DNAからなるが、RNAベクターもまた、利用可能である。ベクターとしては、プラスミド、ファージミドおよびウイルスゲノムが挙げられるが、これらに限定されない。クローニングベクターは、宿主細胞において複製し得るベクターであり、代表的には、このベクターが決定可能な様式で切断され得、新たな組換えベクターが宿主細胞において複製する能力を保持するように所望のDNA配列がライゲーションされ得る1つ以上のエンドヌクレアーゼ制限部位によりさらに特徴付けられる。プラスミドの場合、所望の配列の複製は、プラスミドが宿主細菌内でコピー数を増加させる場合、何回も生じ得るか、または宿主が有糸分裂により再生する前に、宿主1つにつき一回のみ生じ得る。ファージの場合、複製は、溶解期の中に活発に生じ得るか、または溶原期の中に受動的に生じ得る。発現ベクターは、所望のDNA配列が調節配列に作動可能に連結されるように制限およびライゲーションによって挿入され得、そしてRNA転写物として発現され得るベクターである。ベクターは、このベクターで形質転換またはトランスフェクトされたかまたはされていない細胞の同定において使用するために適切な1つ以上のマーカー配列をさらに含み得る。マーカーとしては、例えば、抗体または他の化合物に対する耐性または感受性のいずれかを増加または減少させるタンパク質をコードする遺伝子、その活性が当該分野で公知の標準的なアッセイによって検出可能である酵素（例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼまたはアルカリホスファターゼ）をコードする遺伝子、および形質転換またはトランスフェクトされた細胞、宿主、コロニーまたはプラークの表現型に可視的に影響を与える遺伝子（例えば、緑色蛍光タンパク質、GFPのような種々の蛍光タンパク質）が挙げられる。好ましいベクターは、このベクターが作動可能に連結されているDNAセグメントに存在する構造的遺伝子産物の自己複製および発現を可能にするベクターである。

10

20

**【0097】**

本明細書中で使用する場合、コード配列の発現または転写を調節配列の影響下または制御下に置くような様式で、コード配列および調節配列が共有結合される場合、これらのコード配列および調節配列は、「作動可能に」連結されると言われる。コード配列が機能的タンパク質に翻訳されることが望まれる場合では、5'調節配列におけるプロモーターの誘導が、コード配列の転写を生じ、かつ2つのDNA配列の間の結合の性質が、(1)フレームシフト変異の誘発を生じることなく、(2)コード配列の転写を指向するプロモーター領域の能力を妨害することなく、(3)対応するRNA転写物がタンパク質に翻訳される能力を妨害することもない場合、2つのDNA配列は、作動可能に連結されると言われる。従って、プロモーター領域がDNA配列の転写に影響し得、その結果、得られる転写物が所望のタンパク質またはポリペプチドに翻訳され得る場合、このプロモーター領域は、コード配列に作動可能に連結される。

30

40

**【0098】**

遺伝子発現に必要な調節配列の正確な性質は、種間または細胞型間で変化し得るが、一般的には、必要に応じて、それぞれ、転写および翻訳の開始に関与する5'非転写配列および5'非翻訳配列（例えば、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列など）を含むべきである。特に、このような5'非転写調節配列は、作動可能に連結された遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含む。調節配列はまた、必要に応じて、エンハンサー配列または上流アクチベーター配列を含み得る。本発明のベクターは、必要に応じて、5'リーダー配列またはシグナル配列を含み得る。適切なベクターの選択および設計は、当業者の能力および判断に含まれる。

**【0099】**

50

発現に必要な全てのエレメントを含む発現ベクターは、市販されており、そして当業者に公知である。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照のこと。細胞は、ASP-1、ASP-2および/またはI-ASPポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体をコードする異種DNA(RNA)の、細胞への導入によって遺伝子操作される。この異種DNA(RNA)は、宿主細胞における異種DNAの発現を可能にする転写エレメントの操作可能な制御下に置かれる。

#### 【0100】

哺乳動物細胞におけるmRNAに好ましい系は、G418耐性(これは、安定にトランスフェクトされた細胞株の選択を容易にする)を与える遺伝子のような選択マーカーを含む、pcDNA3.1およびpRc/CMV(Invitrogen, Carlsbad, CAから入手可能)、ならびにヒトサイトメガロウイルス(CMV)エンハンサー-プロモーター配列などである。さらに、霊長類またはイヌの細胞株における発現に適切なのは、pCEP4ベクター(Invitrogen)であり、これは、エプスタイン-バーウイルス(EBV)複製起点を含み、多コピー染色体外エレメントとしてのプラスミドの維持を容易にする。別の発現ベクターは、ポリペプチド伸長因子1のプロモーターを含むpEF-BOSプラスミドであり、これはインピトロの転写を効果的に刺激する。このプラスミドは、MishizumaおよびNagata(Nuc. Acids Res. 18:5322, 1990)により記載され、そしてトランスフェクション実験におけるその使用は、例えば、Demoulin(Mol. Cell. Biol. 16:4710~4716, 1996)により開示されている。さらに別の好ましい発現ベクターは、Stratford-Perricaudetにより記載されるアデノウイルスであり、これはE1およびE3タンパク質を欠く(J. Clin. Invest. 90:626~630, 1992)。アデノウイルスのAdeno P1A組換え体としての使用は、Warnierら、P1Aに対する免疫のためのマウスにおける経皮注射(intradermal injection in mice for immunization against P1A)(Int. J. Cancer, 67:303~310, 1996)により開示される。

#### 【0101】

本発明はまた、いわゆる、発現キットを包含し、この発現キットにより、当業者は、所望の発現ベクターを調製し得る。このような発現キットは、前述のコード配列の各々の少なくとも別個の部分を含む。他の成分は、必要とされる前述の配列が含まれる限り、必要に応じて加えられ得る。

#### 【0102】

本発明はまた、細胞および動物中でのpcDNA3遺伝子「ノック-アウト」の構築を可能にし、p53活性、アポトーシス、および癌の特定の局面を研究するための材料を提供する。

#### 【0103】

本発明はまた、開示されるASP-1、ASP-2およびI-ASPポリペプチドならびにそれらのフラグメントを含む、単離されたポリペプチドを提供する。このようなポリペプチドは、例えば、単独または融合タンパク質として、p53結合を試験および調節するため、アポトーシスを調節するため、抗体を作製するために有用であり、そして免疫アッセイの成分として有用である。

#### 【0104】

一般的に、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドのフラグメントは、核酸に関して上記で議論したようなフラグメントの特性および特徴を有する。当業者によって認識されるように、特有のフラグメントのサイズは、そのフラグメントが保存されたタンパク質ドメインの一部を構成するか否かのような因子に依存する。従って、ASP-1、ASP-2および/またはI-ASPポリペプチドのいくつかの領域は、特有であるた

めにより長いセグメントを必要とし、一方、他の領域は、短いセグメントのみ（代表的に、5アミノ酸と12アミノ酸との間（例えば、5、6、7、8、9、10、11および12アミノ酸長））を必要とする。

【0105】

好ましくは、ASP-1、ASP-2および/またはI-ASPポリペプチドのフラグメントは、これらのポリペプチドの異なる機能的能力を維持するフラグメントである。ポリペプチドの特有のフラグメントにおいて維持され得る機能的能力としては、p53またはrelの結合、抗体との相互作用、および酵素活性が挙げられる。例えば、本明細書中に例示されるように、ASP-1、ASP-2および/またはI-ASPポリペプチドの特定のフラグメントは、本発明の方法において全長ASP-1、ASP-2および/またはI-ASPポリペプチドの機能的等価物（例えば、p53結合、アポトーシスの調節など）として使用され得る。ASP-1、ASP-2および/またはI-ASPポリペプチドの他のフラグメントは、それらの機能的特性に従って選択され得る。例えば、当業者は、ASP-1、ASP-2および/またはI-ASPフラグメントを組換え的に調製し得、そしてそれらのフラグメントを、以下に例示されるような方法（例えば、p53ポリペプチドへの結合）に従って試験し得る。当業者はまた、代表的に、ファミリーメンバーではないものから目的の配列を選択的に区別するための特有のフラグメントの能力に基づいて、特有のアミノ酸配列を選択する方法に十分に精通する。典型的に、当業者は、公知のデータベース上のフラグメント配列に対するフラグメント配列の比較をする必要がある。

10

【0106】

本発明は、上記のASP-1、ASP-2およびI-ASPポリペプチドの改変体を含む。本明細書中に使用される場合、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの「改変体」は、ポリペプチドの一次アミノ酸配列に1つ以上の改変を含むポリペプチドである。改変体を作製する改変は、ASP-1、ASP-2および/またはI-ASPポリペプチドに対して作製され得、1) ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの活性（例えば、別のポリペプチドへの結合）を減少または排除するか；2) ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの特性（例えば、発現系におけるタンパク質の安定性またはタンパク質-タンパク質結合の安定性）を増強するか；あるいは、3) ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドに対して新規の活性または特性を提供する（例えば、抗原性エピトープの付加または検出可能部分の付加）。ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの改変は、代表的にこれらのASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドをコードする核酸に対して作製され、そして改変としては、欠失、点変異、短縮、アミノ酸置換および1つ以上のアミノ酸または非アミノ酸部分の付加が挙げられ得る。改変体に関連して使用される場合、「1つ以上の」とは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれより多くの変化を意味する。あるいは、改変は、切断、リンカー分子の付加、検出部分（例えば、ビオチン）の付加、脂肪酸の付加などによって、ポリペプチドに対して直接作製され得る。改変はまた、ASP-1、ASP-2またはI-ASPアミノ酸配列の全体または一部を含む融合タンパク質を含む。

20

30

40

【0107】

一般的に、改変体は、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの生理学的活性に無関係のポリペプチドの特徴を特異的に変更するように改変された、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドを含む。例えば、システイン残基が置換または欠失されて、望ましくないジスルフィド連結を阻止し得る。同様に、特定のアミノ酸残基が変更されて、発現系中のプロテアーゼによるタンパク質分解を排除することによって（例えば、KEX2プロテアーゼ活性が存在する酵母発現系における、二塩基性アミノ酸残基）、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの発現を増強し得る。

【0108】

ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドをコードする核酸の変異は、好ま

50

しくは、コード配列のアミノ酸リーディングフレームを保存し、そして好ましくは、おそらくハイブリダイズして二次構造（例えば、ヘアピンまたはループ）（これは、改変体ポリペプチドの発現に有害であり得る）を形成する核酸中の領域を作製しない。

【0109】

変異は、アミノ酸置換を選択することによってか、またはポリペプチドをコードする核酸中の選択部位の無作為変異誘発によって、作製され得る。次いで、改変体ポリペプチドが発現され、所望の特性を有する改変体ポリペプチドを提供する変異を決定するために、1つ以上の活性について試験される。

【0110】

さらなる変異が、ポリペプチドのアミノ酸配列に関してはサイレントであるが、特定の宿主における翻訳に対して好ましいコドンを提供するような改変体（または非改変体ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチド）に対して作製され得る。例えば、E. coliにおける核酸の翻訳についての好ましいコドンは、当業者に周知である。さらに他の変異が、ASP-1、ASP-2またはI-ASPの遺伝子またはASP-1、ASP-2またはI-ASPのcDNAクローンの非コード配列に対して作製されて、そのポリペプチドの発現を増強する。ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの改変体の活性は、本明細書中に開示されるように、この改変体ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドをコードする核酸分子を細菌発現ベクターまたは哺乳動物発現ベクターにクローニングし、これらのベクターを適切な宿主細胞に導入し、これらのASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドを発現させ、そしてASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの機能的な能力を試験することによって、試験され得る。例えば、改変体ASPポリペプチドは、実施例に開示されるようなp53結合について試験され得る。他の改変体ポリペプチドの調製は、当業者に公知であるように、他の活性の試験に好都合であり得る。

【0111】

当業者はまた、保存的アミノ酸置換がASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチド中に作製されて、上述のポリペプチドの機能的に等価な改変体を提供し得ること（すなわち、これらの改変体は、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの機能的な能力を保持する）を認識する。本明細書中に使用される場合、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸置換が作製されたタンパク質の相対的な電荷特徴もサイズ特徴も変更しない、アミノ酸置換をいう。改変体は、当業者に公知のポリペプチド配列を変更するための方法を編集する以下の参考文献に見出されるような方法に従って、調製され得る：例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrookら編, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, またはCurrent Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubelら編, John Wiley & Sons, Inc., New York。ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの例示的な機能的に等価である改変体としては、本明細書中に開示されるアミノ酸配列の1つ以上の保存的アミノ酸置換が挙げられる。アミノ酸の保存的置換としては、以下(a) M、I、L、V；(b) F、Y、W；(c) K、R、H；(d) A、G；(e) S、T；(f) Q、N；および(g) E、Dからなる群内のアミノ酸間で作製される置換が挙げられる。

【0112】

ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの機能的に等価な改変体を生成するためのこれらのポリペプチドのアミノ酸配列における保存的アミノ酸置換は、代表的に、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドをコードする核酸の改変によって作製される。このような置換は、当業者に公知の種々の方法によって作製され得る。例えば、アミノ酸置換は、Kunkelの方法（Kunkel, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 82: 488-492, 1985）に従うPCR指向型変異、

部位指向型変異誘発によってか、あるいはASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドをコードする遺伝子の化学合成によって、作製され得る。アミノ酸置換が、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの小さい特有のフラグメント（例えば、p53結合部位ペプチド）に対して作製される場合、置換は、ペプチドを直接合成することによって作製され得る。ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの機能的に等価なフラグメントの活性は、本明細書中に開示されるように、変更されたASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドをコードする遺伝子を細菌発現ベクターまたは哺乳動物発現ベクターにクローニングし、このベクターを適切な宿主細胞に導入し、この変更されたASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドを発現させ、そしてASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの機能的な能力を試験することによって、試験され得る。化学的に合成されるペプチドは、機能について（例えば、p53への結合について）直接的に試験され得る。

#### 【0113】

本明細書中に開示される本発明は、多数の用途を有し、このうちのいくつかは、本明細書中のいずれかに記載される。最初に、本発明は、完全なASP-1、ASP-2またはI-ASPタンパク質分子の単離を可能にする。当業者に周知である種々の方法論が、単離されたASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチド分子を得るために使用され得る。ポリペプチドは、そのポリペプチドを天然に産生する細胞から、クロマトグラフィー手段または免疫学的認識によって精製され得る。あるいは、発現ベクターが細胞に導入されて、そのポリペプチドの産生をもたらし得る。別の方法において、mRNA転写物が、細胞に微量注入されるかまたは他の方法で導入されて、コードされるポリペプチドの産生をもたらし得る。

#### 【0114】

無細胞抽出物（例えば、網状赤血球溶解物系）におけるmRNAの翻訳もまた、ポリペプチドを産生するために使用され得る。当業者はまた、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドを単離するために、公知の方法に容易に従い得る。これらとしては、免疫クロマトグラフィー、HPLC、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーおよび免疫アフィニティークロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0115】

ASP-1、ASP-2またはI-ASP核酸分子の単離はまた、当業者が、これらの分子の発現（またはそれらの相対的な欠如）によって特徴付けられる障害を診断することを可能にする。これらの方法は、ASP-1、ASP-2またはI-ASP核酸および/あるいはそれから誘導されるASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの発現を決定する工程を包含する。上述の状況において、このような決定は、任意の標準的な核酸測定アッセイ（以下の実施例に例示されるようなポリメラーゼ連鎖反応、または標識されたハイブリダイゼーションプローブを用いたアッセイを含む）を介して実行され得る。

#### 【0116】

本発明はまた、タンパク質（例えば、p53およびrel）の単離を、このようなタンパク質の、本明細書中に開示されるようなASP-1、ASP-2またはI-ASPへの結合によって可能にする。ASP-1、ASP-2およびI-ASP結合活性の同定はまた、当業者がタンパク質結合および下流の機能（例えば、アポトーシス）を調節することを可能にする。さらなる用途が、本明細書中に開示される。

#### 【0117】

特定の実施形態において、本発明はまた、ASP-1、ASP-2またはI-ASPから誘導される「ドミナントネガティブ」ポリペプチドを提供する。ドミナントネガティブポリペプチドは、タンパク質の不活性な改変体であり、これは、細胞機構と相互作用することによって、活性なタンパク質を細胞機構とのその相互作用から退けさせるか、または活性なタンパク質と競合し、それによって、活性なタンパク質の効果を減少させる。例えば

、リガンドに結合するが、リガンドの結合にตอบสนองしたシグナルは伝達しないドミナントネガティブのレセプターは、リガンドの発現の生物学的効果を低下させ得る。同様に、通常標的タンパク質と相互作用するが、標的タンパク質をリン酸化しないドミナントネガティブの触媒不活性キナーゼは、細胞シグナルにตอบสนองした標的タンパク質のリン酸化を低下させ得る。同様に、別の転写因子に結合するかまたは遺伝子の制御領域中のプロモーター部位に結合するが、遺伝子転写を増大させないドミナントネガティブの転写因子は、転写を増大させることなくプロモーター結合部位を占有することによって、正常な転写因子の効果を低下させ得る。

#### 【0118】

細胞中でのドミナントネガティブポリペプチドの発現の最終的な結果は、活性なタンパク質の機能低下である。当業者は、タンパク質のドミナントネガティブ改変体についての可能性を評価し、標準的な変異誘発技術を使用して、1つ以上のドミナントネガティブ改変体ポリペプチドを作製し得る。例えば、ASP-1、ASP-2およびI-ASPポリペプチドの本明細書に含まれる教示が与えられれば、当業者は、部位特異的変異誘発、スキニング変異誘発 (scanning mutagenesis)、部分的遺伝子欠失または短縮などによって、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドの配列を改変し得る。例えば、米国特許第5,580,723号およびSambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照のこと。次いで、当業者は、選択された活性(例えば、p53結合、アポトーシスの調節)における減少について、および/またはこのような活性の保持について、変異誘発されたポリペプチドの集団を試験し得る。タンパク質のドミナントネガティブ改変体を作製および試験する他の類似の方法が、当業者に明らかである。

#### 【0119】

本発明はまた、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドならびにASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドと結合パートナー(例えば、p53)との複合体に結合するポリペプチドのような因子を含む。このような結合因子は、例えば、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドならびにASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドとそれらの結合パートナーとの複合体の、存在または非存在を検出するためのスクリーニングアッセイにおいて、そして、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドならびにASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドとそれらの結合パートナーとの複合体を単離するための精製プロトコールにおいて、使用され得る。このような因子はまた、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドまたはそれらの結合パートナーのネイティブな活性を、例えば、このようなポリペプチドもしくはそれらの結合パートナーまたはこれらの両方に対して結合することによって、阻害するために使用され得る。

#### 【0120】

従って、本発明は、ペプチド結合因子を含み、これは、例えば、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドに選択的に結合する能力を有する抗体または抗体フラグメントであり得る。抗体は、従来の方法論に従って調製されるポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含む。

#### 【0121】

重要なことに、当該分野で周知のように、抗体分子の小さな部分(パラトープ)のみが、そのエピトープへの抗体の結合に関与する(一般的に、Clark, W. R. (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology Wiley & Sons, Inc., New York; Ritt, I. (1991) Essential Immunology, 第7版, Blackwell Scientific Publications, Oxfordを参照のこと)。例えば、pFc'領域およびFc領域は、補体カスケードのエフェクターであるが、抗原結合に関与しない。pFc'領域が酵素的に切断されるか、またはpFc'領

域無しで産生された抗体 ( $F(ab')_2$  フラグメントを称される) は、インタクトな抗体の両方の抗原結合部位を保持する。同様に、Fc領域が酵素的に切断されたか、またはFc領域無しで産生された抗体 (Fab フラグメントと称される) は、インタクトな抗体分子の抗原結合部位のうちの一つを保持する。さら進めると、Fab フラグメントは、共有結合した、抗体軽鎖およびFdと示される抗体重鎖の一部からなる。Fd フラグメントは、抗体特異性の主要な決定基であり (単一のFd フラグメントは、抗体特異性を変更することなく10個までの異なる軽鎖と会合し得る)、そしてFd フラグメントは、溶液中でエピトープ結合能力を保持する。

#### 【0122】

当業者に周知のように、抗体の抗原結合部分内において、抗原のエピトープと直接相互作用する相補性決定領域 (CDR) およびパラトープの三次構造を保持するフレームワーク領域 (FR) が存在する (一般的に、Clark, 1986; Roitt, 1991を参照のこと)。重鎖Fd フラグメントおよびIgG免疫グロブリンの軽鎖の両方において、それぞれ3つの相補性決定領域 (CDR1 ~ CDR3) によって分離される4つのフレームワーク領域 (FR1 ~ FR4) が存在する。CDR (特に、CDR3領域、より詳細には、重鎖CDR3) が、主として抗体特異性を担う。

#### 【0123】

哺乳動物抗体の非CDR領域が、本来の抗体のエピトープ特異性を維持しながら、同種抗体または異種抗体の類似する領域で置換され得ることは、現在当該分野で十分に確立されている。これは、非ヒトCDRが機能的抗体を産生するためにヒトFRおよび/またはFc/pFc'領域に共有結合的に連結される、「ヒト化」抗体の開発および使用において、最も明確に証明されている。例えば、米国特許第4,816,567号、同第5,225,539号、同第5,585,089号、同第5,693,762号および同第5,859,205号を参照のこと。

#### 【0124】

従って、例えば、PCT国際公開番号WO 92/04381は、マウスFR領域の少なくとも一部がヒト起源のFR領域によって置換されている、ヒト化マウスRSV抗体の産生および使用を教示する。このような抗体 (抗体結合能力を有するインタクトな抗体のフラグメントを含む) は、しばしば「キメラ」抗体と称される。

#### 【0125】

完全なヒトモノクローナル抗体もまた、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子についての非ヒトトランスジェニック動物の免疫によって、調製され得る。例えば、米国特許第5,814,318号、同第5,877,397号、同第6,091,001号、同第6,114,598号を参照のこと。

#### 【0126】

従って、当業者に明らかであるように、本発明はまた、 $F(ab')_2$ 、Fab、FvおよびFdフラグメント; キメラ抗体 (これは、Fcおよび/またはFRおよび/またはCDR1および/またはCDR2および/または軽鎖CDR3領域が、相同性ヒト配列または非ヒト配列によって置換されている); キメラ $F(ab')_2$  フラグメント抗体 (これは、FRおよび/またはCDR1および/またはCDR2および/または軽鎖CDR3領域が、相同性ヒト配列または非ヒト配列によって置換されている); キメラFabフラグメント抗体 (これは、FRおよび/またはCDR1および/またはCDR2および/または軽鎖CDR3領域が、相同性ヒト配列または非ヒト配列によって置換されている); ならびにキメラFdフラグメント抗体 (これは、FRおよび/またはCDR1および/またはCDR2領域が、相同性ヒト配列または非ヒト配列によって置換されている) を提供する。本発明はまた、いわゆる単鎖抗体を含む。

#### 【0127】

従って、本発明は、ASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチド、ならびにASP-1、ASP-2またはI-ASPポリペプチドとそれらの結合パートナーとの両方の複合体に特異的に結合する多数のサイズおよび型のポリペプチドを含む。これらのポリ

10

20

30

40

50

ペプチドはまた、抗体技術以外の供給源から誘導され得る。例えば、このようなポリペプチド結合因子は、固定形態またはファージディスプレイライブラリーとして溶液中で容易に調製され得る、縮重ペプチドライブラリーによって提供され得る。1つ以上のアミノ酸を含むペプチドのコンビナトリアルライブラリーもまた、合成され得る。ペプトイド (peptoid) および非ペプチド合成部分のライブラリーもさらに、合成され得る。

#### 【0128】

ファージディスプレイは、本発明に従って有用な結合ペプチドを同定する際に特に有効であり得る。手短には、従来の手順を用いて4~約80アミノ酸残基の挿入物を提示する、(例えば、m13、fdまたはラムダファージを用いて)ファージライブラリーを調製する。この挿入物は例えば、完全に縮重したアレイまたは偏りのあるアレイを提示し得る。次いで、ASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドまたはIASPポリペプチドに結合する挿入物を保有するファージを選択し得る。このプロセスは、ASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドまたはIASPポリペプチドに結合するファージの再選択数回のサイクルを通して繰り返され得る。何回か繰り返すことによって、特定の配列を保有するファージが富化される。DNA配列分析を行って、発現されたポリペプチドの配列を同定し得る。ASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドまたはIASPポリペプチドに結合する、最小直鎖状部分の配列が決定され得る。この手順を、最小直鎖状部分の一部または全て+その上流または下流の1以上のさらなる縮重残基を含む挿入物を含む偏りのあるライブラリーを用いて繰り返し得る。酵母ツーハイブリッドスクリーニング方法をまた用いて、ASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドまたはIASPポリペプチドに結合するポリペプチドを同定し得る。従って、本発明のASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドおよびIASPポリペプチドまたはそれらのフラグメントを用いて、ペプチドライブラリー(ファージディスプレイライブラリーを含む)をスクリーニングして、本発明のASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドまたはIASPポリペプチドのペプチド結合パートナーを同定および選択し得る。このような分子は、記載のように、スクリーニングアッセイのために、精製プロトコルのために、ASP-1、ASP-2またはIASPの機能を直接妨害するために、および当業者に明らかな他の目的のために、用いられ得る。

#### 【0129】

本発明が発現ベクターにおいて、ならびに宿主細胞および細胞株をトランスフェクトするためにASP-1、ASP-2またはIASPのcDNA配列を使用することを包含することもまた認識され、これらは、原核生物(例えば、E.coli)または真核生物(例えば、CHO細胞、COS細胞、酵母発現系および昆虫細胞における組換えバキュロウイルス発現)である。特に有用なのは、ヒト、マウス、ハムスター、ブタ、ヤギ、霊長類などのような哺乳動物細胞である。これらは、広範な種々の組織型の細胞であり得、そして初代細胞および細胞株を包含する。特定の例としては、ケラチノサイト、末梢血白血球、線維芽細胞、骨髄幹細胞および胚性幹細胞が挙げられる。発現ベクターは、適切な配列、すなわち、上記の核酸がプロモーターに作動可能に連結されることを必要とする。

#### 【0130】

本発明はまた、トランスジェニック非ヒト動物を包含する。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック非ヒト動物」は、1以上の外因性核酸分子が生殖系列の細胞および/または体細胞に組み込まれた非ヒト動物を包含する。従って、トランスジェニック動物としては、相同組換えによるホモ接合性もしくはヘテロ接合性の遺伝子破壊を有する「ノックアウト」動物、エピソーム性もしくは染色体に組み込まれた発現ベクターを有する動物などを包含する。ノックアウト動物は、当該分野で周知であるように、胚性幹細胞を用いて相同組換えによって調製され得る。組換えは、cre/lox系または当業者に公知の他のレコンビナーゼ系によって促進され得る。特定の実施形態では、レコンビナーゼ系自体は、例えば、特定の組織もしくは細胞型において、特定の胚発生段階もしくは胚発生後の段階(post-embryonic developmental stage)で、発現を増大もしくは減少させる化合物の付加によって誘導的になどで条件的に発現

される。一般に、このような系において用いられる条件的発現ベクターは、所望の遺伝子発現パターン（例えば、時間的または空間的）を付与する種々のプロモーターを用いる。条件的プロモーターはまた、ASP-1、ASP-2またはI-ASPの核酸分子に作動可能に連結されて、制御された様式で、または条件的な様式で、これらの核酸分子の発現を増大させ得る。ASP-1、ASP-2またはI-ASPの活性または発現のトランス作用性ネガティブ調節因子もまた、上記の通りの条件的プロモーターに作動可能に連結され得る。このようなトランス作用性調節因子としては、アンチセンス核酸分子、ドミナントネガティブ分子をコードする核酸分子、ASP-1、ASP-2またはI-ASPの核酸に特異的なリボザイム分子などが挙げられる。トランスジェニック非ヒト動物は、ASP-1、ASP-2またはI-ASPの発現の増大または減少によって特徴付けられる状態についての診断または治療の生化学的効果または生理学的効果を試験することに関する実験において有用である。他の用途は、当業者に明らかである。

10

#### 【0131】

本発明はまた、遺伝子治療を意図する。エキソビボで遺伝子治療を実施するための手順は、米国特許第5,399,346号およびこの特許の特許取得履歴において提出した添付物において概説されており、これらは全て、公に入手可能な文書である。一般に、これは、ある遺伝子の欠損コピーを含む被験体細胞へと、この遺伝子の機能的コピーをインビトロで導入すること、および遺伝子操作された細胞をこの被験体に戻すことを含む。この遺伝子の機能的コピーは、遺伝子操作された細胞におけるこの遺伝子の発現を可能にする調節エレメントの作動可能な制御下にある。多数のトランスフェクション技術および形質導入技術、ならびに適切な発現ベクターは、当業者に周知であり、これらのうちのいくつかは、PCT出願WO95/00654に記載される。アデノウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルスのようなベクターおよび標的化リボソームを用いるインビボでの遺伝子治療もまた、本発明に従って意図される。

20

#### 【0132】

本発明はさらに、ASP-1、ASP-2またはI-ASPを調節可能な細胞機能のレベルで活性な薬剤についての薬学的薬剤またはリード化合物を同定する効率的な方法を提供する。特に、このような機能としては、p53結合およびアポトーシスが挙げられる。一般に、スクリーニング方法は、ASP-1、ASP-2またはI-ASPの活性（例えば、p53結合など）を妨害する化合物についてアッセイすることを含むが、ASP-1、ASP-2またはI-ASPの活性を増強する化合物もまた、このスクリーニング方法を用いてアッセイされ得る。このような方法は、化合物の自動化された高処理能力スクリーニングに適応され得る。このスクリーニング方法によって検出される薬理的薬剤についての標的治療適応症は、標的細胞機能が、ASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドもしくはI-ASPポリペプチドまたはこれらのフラグメントおよび1以上の天然のASP-1、ASP-2またはI-ASPの細胞内結合標的（例えば、p53）を含む複合体の形成の変化によって調節を受けるという点でのみ制限される。標的適応症としては、アポトーシスが挙げられる。

30

#### 【0133】

標識されたインビトロタンパク質-タンパク質結合アッセイ、電気泳動移動度シフトアッセイ、イムノアッセイ、細胞ベースのアッセイ（例えば、ツーハイブリッドスクリーニングもしくはスリーハイブリッドスクリーニング）、発現アッセイなどを含め、薬理的薬剤についての広範な種々のアッセイが提供される。例えば、ハイブリッドスクリーニングを用いて、特定の細胞内標的へのASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドもしくはI-ASPポリペプチドまたはそれらのフラグメントの細胞内結合に対する、トランスフェクトされた核酸の効果が迅速に検査される。トランスフェクトされた核酸は、例えば、コンビナトリアルペプチドライブラリーまたはアンチセンス分子をコードし得る。このようなアッセイのための便利な試薬（例えば、GAL4融合タンパク質）は、当該分野で公知である。例示的な細胞ベースのアッセイは、GAL4 DNA結合ドメインに融合されたASPポリペプチドをコードする核酸および転写活性化ドメイン（例えば、VP1

40

50

6) に融合された A S P と相互作用する p 5 3 ドメインをコードする核酸で細胞をトランスフェクトすることを含む。細胞はまた、遺伝子発現調節領域(例えば、1 以上の G A L 4 結合部位)に作動可能に連結されたレポーター遺伝子を含む。レポーター遺伝子の転写活性化は、G A L 4 D N A 結合ドメインおよび V P 1 6 転写活性化ドメインが近位になってレポーター遺伝子の転写を可能にするように、A S P 融合ポリペプチドと p 5 3 融合ポリペプチドとが結合した場合に生じる。次いで、A S P ポリペプチド媒介細胞機能を調節する因子は、レポーター遺伝子の発現における変化を介して検出される。レポーター遺伝子の発現における変化を決定するための方法は当該分野で公知である。

#### 【0134】

この方法において用いられる A S P - 1 フラグメント、A S P - 2 フラグメントまたは I - A S P フラグメントは、トランスフェクトされた核酸によって産生されない場合、単離されたポリペプチドとしてアッセイ混合物に添加される。A S P - 1 ポリペプチド、A S P - 2 ポリペプチドまたは I - A S P ポリペプチドは好ましくは、組換え産生されるが、このようなポリペプチドは、生物学的抽出物から単離され得る。組換え産生された A S P - 1 ポリペプチド、A S P - 2 ポリペプチドまたは I - A S P ポリペプチドとしては、A S P - 1 タンパク質、A S P - 2 タンパク質または I - A S P タンパク質と別のポリペプチド(例えば、タンパク質-タンパク質結合、配列特異的核酸結合を提供もしくは増強し得るポリペプチド(例えば、G A L 4)、アッセイ条件下での A S P - 1 ポリペプチド、A S P - 2 ポリペプチドもしくは I - A S P ポリペプチドの安定性を増強し得るポリペプチド、または検出可能部分(例えば、グリーン蛍光タンパク質または F l a g エピトープ)を提供し得るポリペプチド)との融合物を含むキメラタンパク質が挙げられる。

#### 【0135】

アッセイ混合物は、天然の細胞内 A S P 結合標的(例えば、p 5 3 または A S P と相互作用し得るそのフラグメント)から構成される。天然の A S P 結合標的が用いられ得るとはいえ、A S P 結合標的の一部(例えば、ペプチドまたは核酸のフラグメント)またはアナログ(すなわち、このアッセイの目的のために天然の結合標的の A S P 結合特性を模倣する薬剤)が、このアッセイにおいて測定され得る、A S P フラグメントに対する結合親和性および結合アビディティを提供するかぎり、これらの部分またはアナログを用いることが頻繁に好ましい。

#### 【0136】

アッセイ混合物はまた、候補の薬理的薬剤を含む。代表的に、複数のアッセイ混合物は、種々の濃度に対する異なる応答を得るために異なる薬剤濃度を用いて並行に実施される。代表的に、これらの濃度のうちの1つは、ネガティブコントロール、すなわち、その薬剤の濃度0で、またはアッセイの検出限界未満のその薬剤の濃度で、役立てられる。候補薬剤は、多数の化学的クラスを包含するが、代表的に、これらは、有機化合物である。好ましくは、候補薬理的薬剤は、低分子有機化合物、すなわち、50より大きいが約2500未満の、好ましくは約1000未満の、そしてより好ましくは約500未満の分子量を有する化合物である。候補薬剤は、ポリペプチドおよび/または核酸との構造的相互作用に必要な官能的化学基を含み、そして代表的には、少なくともアミン基、カルボニル基、ヒドロキシル基またはカルボキシル基を、好ましくは官能性化学基のうちの少なくとも2つを、そしてより好ましくは官能的化学基のうちの少なくとも3つを含む。候補薬剤は、上記で同定された官能基のうちの1以上で置換された、環式炭素構造もしくは複素環式構造および/または芳香族構造もしくは多芳香族構造を含み得る。候補薬剤はまた、生体分子(例えば、ペプチド、サッカリド、脂肪酸、ステロール、イソプレノイド、プリン、ピリミジン、上記の誘導体もしくは構造アナログ、またはこれらの組み合わせなど)であり得る。薬剤が核酸である場合、薬剤は代表的に D N A 分子または R N A 分子であるが、本明細書中で定義されるような改変された核酸もまた、意図される。

#### 【0137】

候補薬剤は、合成化合物または天然化合物のライブラリーを含む広範な種々の供給源から入手される。例えば、ランダム化オリゴヌクレオチドの発現、合成有機コンビナトリアル

ライブラリー、ランダムペプチドのファージディスプレイライブラリーなどを含め、多数の手段が、広範な種々の有機化合物および生体分子のランダム合成および指向性合成のために利用可能である。あるいは、細菌抽出物、真菌抽出物、植物抽出物および動物抽出物の形態の天然化合物のライブラリーが入手可能であるかまたは容易に産生される。さらに、天然のライブラリーおよび化合物ならびに合成によって産生されるライブラリーおよび化合物は、従来 of 化学的手段、物理的手段および生化学的手段を通して容易に改変され得る。さらに、公知の薬理学的薬剤は、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化 (amidification) などのような指向性化学改変またはランダム化学改変に供されて、この薬剤の構造的アナログが産生され得る。

**【0138】**

種々の他の試薬もまた、この混合物中に含まれ得る。これらとしては、最適なタンパク質 - タンパク質結合および / またはタンパク質 - 核酸結合を促進するために用いられ得る、塩、緩衝剤、中性タンパク質 (例えば、アルブミン)、界面活性剤などのような試薬が挙げられる。このような試薬はまた、反応成分の非特異的相互作用またはバックグラウンド相互作用を減少させ得る。アッセイの効率を改善する他の試薬 (例えば、プロテアーゼ、インヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗微生物剤など) もまた用いられ得る。

10

**【0139】**

上記のアッセイ材料の混合物は、候補薬理学的薬剤の存在がなければ、それによってASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドまたはI-ASPポリペプチドが細胞結合標的、その一部またはそのアナログを特異的に結合する条件下でインキュベートされる。成分の添加の順番、インキュベーション温度、インキュベーション時間およびこのアッセイの他のパラメーターは、容易に決定され得る。このような実験は単に、アッセイの根本的組成ではなく、アッセイパラメーターの最適化を含む。インキュベーション温度は代表的に、4 と 40 との間である。インキュベーション時間は好ましくは、迅速な高処理能力スクリーニングを促進するために最短にされ、そして代表的には0.1時間と10時間との間である。

20

**【0140】**

インキュベーション後、ASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドまたはI-ASPポリペプチドと1以上の結合標的との間の特異的結合の存在または非存在は、使用者に利用可能な任意の便利な方法によって検出される。無細胞結合型アッセイについては、分離工程はしばしば、結合した成分を未結合の成分から分離するために用いられる。分離工程は、種々の方法において達成され得る。便利には、少なくとも1つの成分は固体基材に固定され、この固体基材から、未結合の成分が容易に分離され得る。固体基材は、広範な種々の材料から、広範な種々の形状 (例えば、マイクロタイタープレート、マイクロビーズ、ディップスティック、樹脂粒子など) で、作製され得る。基材は好ましくは、シグナル対ノイズ比を最大にするように、主に、バックグラウンド結合を最小にするように、ならびに分離の容易さおよび費用の面から選択される。

30

**【0141】**

分離は例えば、ビーズもしくはディップスティックをレザバから取り出すことによって、レザバ (例えば、マイクロタイタープレートウェル) を空けるかもしくは希釈することによって、ビーズ、粒子、クロマトグラフィーのカラムもしくはフィルターを洗浄溶液もしくは溶媒でリンスすることによって、もたらされ得る。分離工程は好ましくは、複数回のリンスまたは洗浄を含む。例えば、固体基材がマイクロタイタープレートである場合、ウェルは、洗浄溶液で数回洗浄され得、この洗浄溶液は代表的には、特異的結合に關与しないインキュベーション混合物成分 (例えば、塩、緩衝剤、界面活性剤、非特異的タンパク質など) を含む。固体基材が磁気ビーズである場合、このビーズは、洗浄溶液で1回以上洗浄され得、そして磁石を用いて単離され得る。

40

**【0142】**

検出は、細胞ベースのアッセイのための任意の便利な手段 (例えば、ツーハイブリッドスクリーニングまたはスリーハイブリッドスクリーニング) においてもたらされ得る。標的

50

分子と相互作用するASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドまたはI-ASPポリペプチドのレポーター遺伝子転写アッセイから得られる転写物は代表的に、直接的または間接的に検出可能な産物（例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性、ルシフェラーゼ活性など）をコードする。無細胞結合アッセイについては、成分の1つは通常、検出可能な標識を含むか、または検出可能な標識にカップリングされる。広範な種々の標識（例えば、直接的検出を提供する標識（例えば、放射能、ルミネセンス、光学密度または電子密度など）または間接的検出を提供する標識（例えば、FLAGエピトープのようなエピトープタグ、西洋ワサビペルオキシダーゼのような酵素タグなど））が用いられ得る。標識は、ASP-1、ASP-2もしくはI-ASPの結合パートナーに結合され得るか、またはこれらの結合パートナーの構造中に組み込まれ得る。

10

#### 【0143】

標識および他のアッセイ成分の性質に依存して種々の方法を用いて、標識を検出し得る。例えば、標識は、固体基材に結合したままで検出され得るか、または固体基材からの分離後に検出され得る。標識は、光学密度もしくは電子密度、放射能放射、非放射性エネルギー移動などを通して直接的に検出され得るか、または抗体結合体、ストレプトアビジン-ビオチン結合体などを用いて間接的に検出され得る。標識を検出するための方法は、当該分野で周知である。

#### 【0144】

本発明は、ASP-1、ASP-2もしくはI-ASPに特異的な結合因子、このような因子を同定および作製する方法、ならびに診断、治療および薬学的開発におけるそれらの使用を提供する。例えば、ASP-1、ASP-2またはI-ASPに特異的な薬理的因子は、種々の診断適用および治療適用において、特に、疾患または疾患予後が、ASPを含む経路の不適切な利用に関連する場合（例えば、アポトーシスなど）、有用である。ASP-1、ASP-2またはI-ASPに特異的な新規な結合因子としては、ASP-1、ASP-2またはI-ASPに特異的な抗体、およびツ-ハイブリッドスクリーニングのようなアッセイを用いて同定された他の天然の細胞内結合因子、ならびに化学的ライブラリーのスクリーニングにおいて同定された非天然の細胞内結合因子などが挙げられる。

20

#### 【0145】

一般に、結合因子に対するASP-1、ASP-2またはI-ASPの結合の特異性は、結合平衡定数によって示される。ASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドまたはI-ASPポリペプチドを選択的に結合し得る標的は好ましくは、少なくとも約 $10^7 M^{-1}$ 、より好ましくは少なくとも約 $10^8 M^{-1}$ 、そして最も好ましくは少なくとも約 $10^9 M^{-1}$ の結合平衡定数を有する。広範な種々の細胞ベースのアッセイおよび無細胞アッセイを用いて、ASP-1、ASP-2またはI-ASPに特異的な結合を実証し得る。細胞ベースのアッセイとしては、ワンハイブリッドスクリーニング、ツ-ハイブリッドスクリーニングおよびスリーハイブリッドスクリーニング、ASP-1、ASP-2またはI-ASPを媒介する転写が阻害されるかまたは増大するアッセイなどが挙げられる。無細胞アッセイとしては、ASP-1タンパク質結合アッセイ、ASP-2タンパク質結合アッセイまたはI-ASPタンパク質結合アッセイ、免疫アッセイなどが挙げられる。ASP-1ポリペプチド、ASP-2ポリペプチドまたはI-ASPポリペプチドを結合する因子をスクリーニングするために有用な他のアッセイとしては、蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）および電気泳動移動度シフト分析（EMSA）が挙げられる。

30

40

#### 【0146】

核酸が宿主においてインビトロで導入されるかまたはインビボで導入されるかに依存して、本発明の核酸を細胞へと導入するために種々の技術が用いられ得る。このような技術としては、核酸-CaPO<sub>4</sub>沈殿物のトランスフェクション、DEAEに関連した核酸のトランスフェクション、目的の核酸を含むレトロウイルスを用いたトランスフェクション、リボソーム媒介トランスフェクションなどが挙げられる。特定の使用のためには、核酸を特定の細胞へと標的化することが好ましい。このような例では、本発明の核酸を細胞へと

50

送達するために用いられるビヒクル（例えば、レトロウイルスまたは他のウイルス；リボソーム）は、そこに結合した標的化分子を有し得る。例えば、標的細胞上の表面膜タンパク質に特異的な抗体または標的細胞上のレセプターについてのリガンドのような分子は、核酸送達ビヒクルに結合され得るかまたは組み込まれ得る。例えば、リボソームを用いて本発明の核酸を送達する場合、エンドサイトーシスに関連した表面膜タンパク質に結合するタンパク質は、標的化のためおよび/または取り込みを促進するために、リボソーム処方物中に組み込まれ得る。このようなタンパク質としては、特定の細胞型について向性のキャプシドタンパク質またはそのフラグメント、細胞周期進行においてインターナリゼーションされるタンパク質についての抗体、細胞内局在を標的化しかつ細胞内半減期を増強するタンパク質などが挙げられる。ポリマー送達系はまた、当業者によって公知であるように、細胞に核酸を送達するために好首尾に用いられている。このような系はさらに、核酸の経口送達を可能にする。

10

**【0147】**

投与される場合、本発明の治療組成物は、薬学的に受容可能な調製物で投与される。このような調製物は、薬学的に受容可能な濃度の塩、緩衝剤、保存剤、適合性キャリア、補充免疫増強剤（例えば、アジュバントおよびサイトカイン）および必要に応じて他の治療剤（例えば、化学療法剤）を慣例的に含み得る。

**【0148】**

本発明の治療剤は、従来の経路（注射を含む）または長期間にわたる漸進的な注射のいずれかによって投与され得る。これらの投与は、例えば、経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、腔隙内（intracavity）、皮下、または経皮であり得る。抗体が、治療的に使用される場合、投与の好ましい経路は、肺性エアロゾルによる。抗体を含むエアロゾル送達系を調製するための技術は、当業者に周知である。一般に、このような系は、この抗体の生物学的特性（例えば、パラトープ結合能）を有意に損なうことがない成分を使用すべきである（例えば、Sciarrac and Cutie, 「Aerosols」, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, 1990, 1694-1712頁；これは、参考として援用される）。当業者は、過度な実験を行うことなく、抗体エアロゾルを生成するための種々のパラメータおよび条件を容易に決定し得る。本発明のアンチセンス調製物を使用する場合、緩やかな静脈内投与が好ましい。

20

30

**【0149】**

本発明の組成物は、有効量で投与される。「有効量」は、単独またはさらなる用量とともに、所望の応答を生成する組成物の量である。特定の疾患（例えば、癌）を処置する場合、この所望の応答は、この疾患の進行を阻害することである。これは、この疾患の進行を一過的に遅延することのみに関し得るが、より好ましくは、これは、この疾患の進行を永続的に停止することに関する。これは、慣例的な方法によって、モニターされ得るか、または本明細書中で議論される本発明の診断的方法に従って、モニターされ得る。

**【0150】**

このような量は、当然、処置される特定の状態、この状態の重篤度、個々の患者のパラメータ（年齢、身体状態、サイズおよび体重を含む）、処置の持続期間、（存在する場合）同時治療の性質、投与の特定の経路および開業医の知識および専門技術の範囲内の同様の因子に依存する。これらの要因は、当業者に周知であり、慣例的な実験以下で取り込まれ得る。個々の成分およびその組み合わせの最大用量、すなわち、健全な医学的判断に従った最も高い安全用量が使用されることが一般に好ましい。しかし、患者は、医学的理由、生理学的理由のために、または、実質上の他の理由によってのより低い用量または耐性用量を要求し得ることが当業者によって、理解される。

40

**【0151】**

前述した方法で使用される薬学的組成物は、好ましくは、無菌状態であり、そして、患者に対して投与されるために適切な質量または容量の単位で所望の応答を生じるための、有効量のASP-1、ASP-2、もしくはI-ASPまたはASP-1、ASP-2、も

50

しくはI - A S Pをコードする核酸を含む。この応答は、例えば、本発明に記載されるようなレポーター系を介し、A S P - 1、A S P - 2、またはI - A S Pの組成物による増大または阻害されたシグナル伝達を決定することによって、下流における効果（例えば、遺伝子発現）を測定することによって、または、A S P - 1、A S P - 2、もしくはI - A S Pの組成物の生理学的効果（例えば、腫瘍の後退、疾患症状の減少、アポトーシスの調節など）を決定することによって測定され得る。同様に、アンチセンスA S P - 1分子、アンチセンスA S P - 2分子、またはアンチセンスI - A S P分子の効果は、アンチセンス組成物が添加される細胞中での個々の遺伝子の発現を測定することによって容易に決定され得る。他のアッセイは、当業者に周知であり、そしてこの応答のレベルを測定するために使用され得る。

10

**【0152】**

被験体に投与されるA S P - 1、A S P - 2またはI - A S Pのポリペプチドまたは核酸の用量は、異なるパラメーターに従って、特に使用される投与様式および被験体の状態に従って選択され得る。他の要因としては、処置の所望の期間が挙げられる。被験体における応答が、適用された初期の用量において不十分である場合、より高用量の（または、異なった、より局在化した経路による有効的により高用量）が、患者の許容が可能となる程度まで使用され得る。

**【0153】**

一般に、A S P - 1、A S P - 2、またはI - A S Pの用量が、標準的な当該分野の手順に従って、1 n gと1 m gとの間の用量、そして好ましくは1 0 n gと1 0 0 μ gとの間の用量で処方され、そして投与され得る。

20

**【0154】**

A S P - 1、A S P - 2、またはI - A S Pをコードする核酸またはその改変体を使用して、1 n gと0 . 1 m gとの間の用量が、一般に、標準的な手順に従って、処方され、そして投与される。A S P - 1、A S P - 2、またはI - A S Pの組成物を投与するための他のプロトコルは、当業者に公知であり、ここで、この用量、注射のスケジュール、注射の部位、投与の様式（例えば、腫瘍内）などが前述のものから変化する。A S P - 1、A S P - 2、またはI - A S Pの組成物をヒト以外の哺乳動物に投与すること（例えば、試験目的または獣医学的治療目的）は、上記と実質的に同じ条件下で実行される。被験体は、本明細書中で使用される場合、哺乳動物、好ましくはヒトであり、そしてこれは、非ヒトの霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、またはげっ歯類を含む。

30

**【0155】**

投与される場合、本発明の薬学的組成物は、薬学的に受容可能な量で適用され、かつ薬学的に受容可能な組成物で適用される。この用語「薬学的に受容可能」とは、この活性成分の生物学的活性の効力を妨害しない非毒性の物質であることを意味する。このような調製物は、慣例的に、塩、緩衝剤、保存剤、適合性キャリア、おおび必要に応じた他の治療剤を含み得る。医薬品において使用される場合、この塩は、薬学的に受容可能であるべきであるが、非薬学的に受容可能な塩は、利便性のために使用され得、その薬学的に受容可能な塩を調製するために簡便に使用され得、そして本発明の範囲から排除されることはない。このような薬理学的および薬学的に受容可能な塩としては、以下の酸から調製される塩が挙げられるが、これらに限定されない：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸など。また、薬学的に受容可能な塩は、アルカリ金属またはアルカリ土類金属（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、またカルシウム塩）として調製され得る。

40

**【0156】**

A S P - 1、A S P - 2またはI - A S Pの組成物は、所望される場合、薬学的に受容可能なキャリアと併用され得る。この用語「薬学的に受容可能なキャリア」とは、本明細書中で使用される場合、ヒトの投与に適した1以上の適合性の固体または液体の充填剤、賦形剤またはカプセル化された物質を意味する。この用語「キャリア」は、それと共に活性成分が組み合わされて、適用を促進する、天然または合成の有機成分または無機成分を示

50

す。この薬学的組成物の成分はまた、所望の薬学的な効力を実質的に損なう相互作用が存在しない様式で本発明の分子およびお互いと共に混合され得る。

【0157】

薬学的組成物は、適切な緩衝剤を含み得、この緩衝剤としては、以下が挙げられる：塩としての酢酸；塩としてのクエン酸；塩としてのホウ酸；および塩としてのリン酸。

【0158】

薬学的組成物はまた、必要に応じて、適切な保存剤（例えば、塩化ベンザルコニウム；クロロブタノール；パラベン；およびチメロサル）を含み得る。

【0159】

薬学的組成物は、便宜的に単位投薬形態で提供され得、そして製剤学の当該分野で周知な方法のいずれかによって調製され得る。全ての方法が、活性薬剤を、1以上の付随的な成分を構成するキャリアと会合させる工程を包含する。一般に、この組成物は、活性化合物を液体キャリア、細かく分割した固体キャリア、またはそれらの両方と一様かつ完全に会合させ、その後必要な場合この生成物の形状を整えることによって調製される。

10

【0160】

経口投与のために適切な組成物は、別個の単位（例えば、カプセル、錠剤、舐剤）として調製され得、各々は予め決定された量の活性化合物を含み得る。他の組成物としては、水性液体または非水性液体の懸濁液（例えば、シロップ、エリキシル、またはエマルジョン）が挙げられる。

【0161】

非経口投与について適切な組成物は、都合よくは、ASP-1、ASP-2、またはI-ASPのポリペプチドまたは核酸の無菌である水性または非水性の調製物を含み、この調製物は、好ましくは、受容者の血液と等張性である。この調製物は、適切な分散剤または湿潤剤ならびに懸濁剤を使用する公知の方法に従って処方され得る。この無菌注射可能である調製物はまた、非毒性の非経口的に受容可能な希釈剤または溶媒中の無菌注射可能な溶液または懸濁液（例えば、1,3-ブタンジオール中の溶液）であり得る。使用され得る受容可能なビヒクルおよび溶媒には、水、リンゲル液、および等張性塩化ナトリウム溶液が含まれる。さらに、無菌の、固定油は、従来から、溶媒または懸濁媒体として使用される。この目的のために、任意の刺激の強くない固定油が使用され得、そして、これは、合成モノグリセリドまたはジグリセリドであり得る。さらに、オレイン酸のような脂肪酸が、注入可能な調製物として使用され得る。経口投与、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与などに適切なキャリア処方物は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PAに見出され得る。

20

30

【0162】

本発明の別の局面において、ASP-1、ASP-2またはI-ASPのポリペプチドまたは核酸は、アポトーシスを調節する医薬品の製造において使用される。この医薬品は、バイアル中に配置され得、そしてキットに組み込まれ得、被験体を処置するために使用される。特定の実施形態において、同じ応答を調節するか、有利にASP-1、ASP-2またはI-ASPの組成物を与える他の医薬品（例えば、化学療法剤）はまた、同じキット中に備えられる。このキットは、ASP-1、ASP-2またはI-ASPの組成物を投与する方法についての指示書または他の印刷物、ならびにこのキットの任意の他の構成要素を含み得る。

40

【0163】

本発明の実施形態は、例としてのみ本明細書中で記載され、そして以下の実施例および図および表を参照して記載される。

【0164】

（実施例1）

ASPファミリーがインビボでどのように機能するのかを理解するために、本発明者らはノーザンブロットハイブリダイゼーションを用いて、ASP-1およびASP-2の組織

50

分布を調査した。図 2 a および 2 b に示すように、ASP-1 mRNA および ASP-2 mRNA の両方は、それぞれ 5.5 kb ~ 5 kb のサイズの単一の転写物を用いて試験した、全てのヒト組織において発現した。しかし、ASP-1 および ASP-2 の発現レベルは変化する。ASP-1 および ASP-2 の最も高い発現レベルは心臓、骨格筋および腎臓において検出された。興味深いことに、ASP-1 と ASP-2 との間の発現パターンの間には、小さな差異が存在する。ASP-1 について、最も高い発現レベルは、心臓においてであり、腎臓および骨格筋で見られるよりも有意に高かった。対照的に、ASP-2 の発現レベルは、心臓、骨格筋および腎臓において同様である。さらに、ASP-1 の相対的に高い発現レベルがまた、ヒト肝臓組織において見られた。

#### 【0165】

10

##### (実施例 2)

ASP ファミリーメンバーの、ASP の mRNA レベルにおける特異的な組織分布パターンが存在することを知ったので、それらの発現がタンパク質レベルでどのように制御されるのかを調査することが重要であった。本発明者らは、ASP-2 に対する抗体を生成するために GST 融合タンパク質を用いた。ASP-2 のアミノ酸 698 ~ 1135 にわたるコード領域を、細菌発現プラスミド pGEX-2TK の EcoR1 部位にサブクローニングした。74 kDa の GST-ASP-2 (698 ~ 1135) タンパク質を、図 3 A に示すように生成した。GST-53BP2 タンパク質を、ウサギ (Eurogentec, Belgium) およびマウスを免疫するために用いた。ウサギおよびマウスに由来する免疫した血清を、ASP-2 フラグメント、pCMV Bamneo ASP-2 / 53BP2 (607 ~ 1135) の発現プラスミドでトランスフェクトした Saos-2 細胞の細胞溶解物を用いて試験した。プラスミドを、BamH1 制限部位で 9E10 のエピトープタグを含む ASP-2 の PCR フラグメントを挿入することによって構築した。ASP-2 発現プラスミド pCMV Bamneo ASP-2 / 53BP2 (607 ~ 1135) またはコントロールベクターでトランスフェクトした Saos-2 溶解物を用いて、ウサギポリクローナル抗体 pAb ASP-2 / 77 およびマウスモノクローナル抗体 DX54-10 および DZ54-7 の特異性を確認した。図 3 B に示すように、マウスモノクローナル抗体 DX54-10 は、Saos-2 細胞において GST タンパク質と交差反応せず、トランスフェクトした ASP-2 発現タンパク質を認識し得た。DX54-10 は、GST-p27 融合タンパク質ではなく、トランスフェクトした ASP-2 20

20

30

#### 【0166】

モノクローナル抗体は、トランスフェクトした Saos-2 細胞において、ASP-2 に非常に特異的であるので、本発明者らが、最初に内因性 ASP-2 の発現を調査することを可能にした。抗体への反応性バンドが、真の内因性 ASP-2 であることを確実にするために、抗 ASP-2 モノクローナル抗体 DX54-10 上清を、グルタチオンビーズに接着させた GST タンパク質またはグルタチオンビーズに接着させた GST-53BP2 (698 ~ 1135) タンパク質のいずれかを用いて処置した。このビーズを回転板上で 1 時間、上清とともにインキュベートした。その後、このビーズを回収し、そして廃棄した。ビーズを新しいビーズで計 3 回、置換した。図 3 C は、トランスフェクトした ASP-2 / 53BP2 フラグメント (607 ~ 1135) および特異的なタンパク質のバンドが、GST-ASP-2 ビーズとともにインキュベートしたビーズではなく、GST ビーズとともにインキュベートした上清に由来する抗体によって認識されたことを示す。これらの結果は、293 細胞および Tero 細胞に由来する全細胞溶解物において認識されたタンパク質が、真の内因性 ASP-2 であり、そしてモノクローナル抗体 DX54-10 がこのタンパク質に非常に特異的であることを証明した。

40

#### 【0167】

##### (実施例 3)

上記の抗 ASP-2 抗体を用いて、本発明者らは、p53 および ASP-2 との間の相互

50

作用がインビボで生じるか否かを、外因性に発現したタンパク質を用いて最初に試験した。発現プラスミドを Saos-2 細胞にトランスフェクトし、そして免疫沈降を、抗 ASP-2 抗体 DX54.10 またはコントロール抗体 pAb423 (SV40 ラージ T 抗原に対する抗体) を用いて実施した。p53 および ASP-2 の免疫複合体のウエスタンブロット分析は、これらのタンパク質がインビボで相互作用することを最初に示した (図 4 A)。コントロール抗体は、p53 も ASP-2 もどちらも引き降ろさなかったため、この相互作用は特異的であった。図 4 A に示すように、SDS-PAGE 上で、内因性 ASP-2 とトランスフェクトした ASP-2 (bBP2 (130~1135) としてまた知られている) タンパク質の移動のとの間は一貫しなかった。この 1 つの解釈は、bBP2 の元々の配列から見出され得る (Naumovskii および Cleary, 1996)。このヌクレオチド配列は、53BP2 / bBP2 cDNA ヌクレオチドの位置 571 および 757 に、2 つの潜在的な ATG コドンが存在することを示す。この 757 コドンは、インビボで転写・翻訳に連結する好ましい開始部位であることが示された。これは、1005 アミノ酸残基のサイズのタンパク質を予測する。それゆえ、53BP2 / bBP2 の発現プラスミドを、開始部位としてヌクレオチド 757 を用いて構築した (Naumovskii および Cleary, 1996)。しかし、図 4 a に示す結果に基づく、実際のタンパク質の翻訳開始部位が、インビボで 757 コドンではないことは明らかである。BLAST 探索を実施するために bBP2 配列の 5' 末端を用いて、本発明者らは、bBP2 の配列の 412~514 bp が、ベクター配列 (bBP2 / 53BP2 の EMBL 登録) に対して、非常に高い相同性を有することを発見した。本発明者らは、ASP-2 / bBP2 プラスミドのこの領域を再び配列決定し、そしてこの配列のこの領域が、図 4 B に示す配列内に存在しないことを証明した。このデータベースの bBP2 配列の 412~514 bp の領域内に終止コドンが存在するが、この部分の配列は存在しないので、本発明者らは、ASP-2 の開始部位は確かに 757 の上流であると予想した。本発明者らが (ヒト ASP-2 cDNA を用いて cDNA ライブラリーのスクリーニングを実施することにより) 得たマウス ASP-2 の一部分を比較することによって、本発明者らは、ASP-2 の開始部位が、新しい ASP-2 cDNA 配列の 246 bp であると考えた。これは、1135 アミノ酸長の ASP-2 タンパク質を生成し、予想外に大きな内因性タンパク質の説明となる。

10

20

30

40

50

#### 【0168】

これをさらに調査するために、ATG 開始部位 (241 および 757) の両方を含む 53BP2 / bBP2 cDNA を、哺乳動物発現プラスミド pcDNA3 中にサブクローニングした。生じたプラスミド (pcDNA3-ASP-2 / 53BP2 (1~1135)) を、Saos-2 細胞中にトランスフェクトし、そして内因性および外因性の ASP-2 の両方の発現を、抗 ASP-2 抗体 DX54.10 によって検出した。図 4 C に示すように、pcDNA3-ASP-2 (1~1135) から発現した ASP-2 は、内因性 ASP-2 の分子量と同様に低分子量で移動した。この結果から、本発明者らは、内因性 ASP-2 が第一の ATG を用い、そして全長の ASP-2 が 1135 アミノ酸からなることを結論付ける。これ以下に示す結果から、それら自体の実際の配列に対応する明快なクローン名が必要となった。従って、本発明者らは、1135 のアミノ酸を含む全長タンパク質を表すために ASP-2 の名称を使用した。本発明者らは、130~1135 アミノ酸 および 607~1135 アミノ酸を含むタンパク質のそれぞれを表すために、ASP-2 / bBP2 および ASP-2 / 53BP2 を用いた。

#### 【0169】

内因性 ASP-2 に加えて、ASP-2 / bBP2 はまた、インビボで p53 と相互作用し得た (図 4 A)。

#### 【0170】

(実施例 4)

p53 は、mdm-2、Bax およびサイクリン G を含むより多くの標的遺伝子をトランス活性化する転写因子である。他方、ASP-2 / 53BP2 は、p53 の中央 DNA 結

合領域に結合することによって、インビトロで p 5 3 の DNA 結合活性を阻害し得るので、元来、p 5 3 のインヒビターとして単離された ( I w a b u c h i ら、1993 )。つまり、p 5 3 に関して、A S P - 2 / 5 3 B P 2 は、S V 4 0 DNA 腫瘍ウイルスのラージ T 抗原の細胞内同等物であり得る。次いで、A S P - 2 がオンコジーン活性を有することを予測した。しかし、A S P - 2 / b B P 2 の動向は、活性を増強するよりもむしろ増殖抑制を与えることを証明した ( N a u m o v s k i および C l e a r y , 1996 )。この矛盾は、A S P - 2 / 5 3 B P 2 の元々のクローンが、このタンパク質の C 末端位置のみを含むという事実に起因し得る。全長の A S P - 2 タンパク質は、その C 末端フラグメント A S P - 2 / 5 3 B P 2 とは異なる p 5 3 に対する影響を有する可能性がある。本発明者らはまた、A S P - 1 が p 5 3 の活性に対してどんな影響を有するのか知らない。

10

## 【0171】

A S P ファミリーメンバーの有する p 5 3 の活性に対する影響を決定するために、本発明者らは最初に一過性レポーターアッセイにおいて p 5 3 依存性転写活性を研究した。p 5 3 を有さない細胞に、以下の 5 つの p 5 3 レポータープラスミドでトランスフェクトした：m d m - 2、B a x、サイクリン G および p 2 1 W a f - 1 ( 全て、p 5 3 標的遺伝子プロモーターに由来する ) ならびに P G ( ルシフェラーゼ遺伝子の発現に連結する合成プロモーター構築物である )。インビトロでの DNA 結合アッセイおよび変異体 p 5 3 転写活性機能の研究は、既知の p 5 3 結合部位のいくつかを 2 群に分けた ( L u d w i g ら、1996 )。B a x 様部位は通常、p 5 3 転写刺激について弱いですが、m d m 2 様部位は、p 5 3 によって非常に効果的に刺激され得る。興味深いことに、p 5 3 と一緒の A S P - 1 または A S P - 2 の同時発現は、B a x プロモーターの刺激を 10 ~ 50 倍にした。B a x プロモーターと対照的に、p 5 3 との A S P - 1 または A S P - 2 のいずれかの同時発現は、m d m 2 およびサイクリン G のプロモーター活性の非常に控えめな刺激を示すのみであった ( 図 5 A )。A S P - 2 / 5 3 B P 2 は、m d m 2 プロモーターおよびサイクリン G プロモーターを刺激することに失敗したが、p 2 1 w a f 1 プロモーターおよび P G 合成プロモーターに対するわずかな刺激が見られた。

20

## 【0172】

m d m 2 ではなく B a x のプロモーター活性を特異的に刺激する A S P - 2 / 5 3 B P 2 の能力は、p 5 3 のプロモーター特異性を細胞中で調節し得ることを、最初に示した。B a x は、アポトーシス促進性 ( p r o - a p o p t o t i c ) の p 5 3 標的遺伝子の 1 つであるので、それゆえ、本発明者らは、A S P ファミリーメンバーが他の p 5 3 標的遺伝子 ( アポトーシスを促進することに関わることがまた、公知である ) のトランス活性化を特異的に刺激し得るか否かを尋ねた。1 つのこのような遺伝子は P I G - 3 である。図 5 A に示す一過性トランスフェクションレポーターアッセイを用いて、本発明者らは、A S P - 1 および A S P - 2 の両方が、P I G - 3 のプロモーター活性を特異的に刺激し得ることを証明し得た。

30

## 【0173】

p 5 3 の転写活性機能が、一般的な転写コアクチベーター p 3 0 0 / C B P によって同時活性化され得ることが最近証明された。従って、A S P ファミリーメンバーが p 5 3 に特異的ではなく、そして多くの転写因子を刺激し得る p 3 0 0 / C B P 様タンパク質に似た作用をするのか否かを決定することが、本発明者らにとっての目的となった。本発明者が試験した転写因子の 1 つが E 2 F 1 であった。p 5 3 と同様に、E 2 F 1 のトランス活性化機能は、p 3 0 0 / C B P の同時発現によって刺激され得る。しかし、E 2 F 1 と A S P - 1 または A S P - 2 の同時発現は、いくつかの公知のレポータープロモーター ( サイクリン A、b - m y b および合成プロモーター 3 x w t が挙げられる ) に対するそのトランス活性化機能を刺激できなかった ( 図 5 B )。この結果は、A S P - 1 および A S P - 2 が、p 5 3 のトランス活性化機能を特異的に刺激することを強く示唆する。一般的な転写コアクチベーター p 3 0 0 / C B P は、p 5 3 および E 2 F 1 の両方に結合し、そして転写活性を刺激し得るので、この結果はまた、A S P - 1 および A S P - 2 の両方が p 3

40

50

00/CBPに独立してp53のトランス活性化機能を刺激し得ることを意味する。

【0174】

(実施例5)

ASPの同時発現が、p53のトランス活性化機能を特異的に刺激し得ることを知ったので、このような活性のために必要とされるASPの最小領域を同定することが、本発明者らにとって重要であった。それゆえ、本発明者らは、p53のトランス活性化機能に対するそれらの影響について、3つの異なるバージョンのASP-2を試験した。予想したように、全長のASP-2(1135aa)の同時発現は、さらにp53のトランス活性化機能を約7倍刺激し得た。興味深いことに、同様の条件下では、ASP-2/bBP2(1055aa)の同時発現のみが、p53のトランス活性化機能を約2倍刺激した。さらに、ASP-2/53BP2(607~1135)の同時発現は、約50%トランス活性化機能を減少させた(図6)。ASP-2/bBP2によるp53のトランス活性化機能を刺激できなかったことは、発現の欠損に起因しなかった(図6A、下のパネル)。従って、ASP-2の最初の130アミノ酸のみを欠損するASP-2/bBP2は、p53のトランス活性化機能を有意に刺激できなかった。これらのデータは、全長タンパク質(1~1135aa)が、p53のトランス活性化機能をASP-2が増強するために必要とされることを示唆する。ASP-2/53BP2により減少したp53のトランス活性化機能は、ASP-2/53BP2が、p53に対する内因性ASP-2の作用を阻害するために、ドミナントネガティブ変異体として作用し得ることを示唆する。

10

【0175】

(実施例6)

ASP-1およびASP-2が、BaxおよびPIG-3のプロモーターに関してp53のトランス活性化機能を特異的に刺激し得ることを知ったので、同時発現した場合にASP-1またはASP-2が、アポトーシスを誘導するためにp53と相乗作用を示し得ることを予期した。ASP-1およびASP-2のアポトーシス促進性機能が、p53のトランス活性化機能を刺激するそれらの能力を介する場合、Bax自体のアポトーシスの機能に関してほとんど影響を有さないという仮説をまた、立てた。これらの仮説を、p53を有さず、そしてまたASP-2を相対的に低レベルで発現する、Saos-2細胞で試験した。この実験において使用した(トランスフェクトした細胞の約17%にアポトーシスを実行させるほどの)p53の量を、滴定によって決定した。アポトーシスを、同時トランスフェクトした細胞表面マーカーCD20の発現によって同定した。興味深いことに、ASP-1またはASP-2単独の発現は、低レベルのアポトーシスを生じ、ASP-1またはASP-2のいずれか単独が、Baxプロモーター活性をわずかに増強し得る(おそらく、p73およびp63に対するASP-1およびASP-2の影響に起因する)という観察に矛盾しない。しかし、ASP-1またはASP-2とのp53の同時発現は、アポトーシスで死滅した多くの細胞で有意に増加させた。トランスフェクトした細胞のおよそ50%がすぐにアポトーシスで死滅した(図7A)。E2F1とのASP-1またはASP-2のいずれかの同時発現が、アポトーシスで死滅する細胞の割合におけるさらなる増加のみを生じるので、アポトーシスの増強におけるこの相乗的影響はp53に特異的であった(図7B)。

20

30

40

【0176】

本発明者らはまた、ASPがp53のトランス活性化機能を増強することにより、p53のアポトーシス機能を刺激し得るといふ仮説を試験するために、ASP-2変異体、ASP-2/53BP2を用いた。ASP-2/53BP2は、p53のBaxプロモーターに関するp53トランス活性化機能のためのASP-2刺激を阻害することを示した。それゆえ、ASP-2およびASP-2/53BP2の両方がp53と同時発現する場合に、p53のアポトーシス機能が増強されないことを予期した。これをこの場合に実際に証明した。ASP-2およびp53が同時発現した場合、細胞の50%はアポトーシスであった。しかし、p53、ASP-2およびASP-2/53BP2が全て同時発現した場合、細胞の30%のみがアポトーシスであった。従って、ASP-2は、そのトランス活

50

性化機能を増強することによって p 5 3 のアポトーシス機能のみを増強し得る ( 図 7 C )  
。

【 0 1 7 7 】

本発明者らはまた、 p 5 3 ファミリーメンバーである p 7 3 および p 6 3 のアポトーシス機能に関する A S P の影響を研究した。この結果を図 7 D に示す。 A S P - 1 または A S P - 2 のいずれかの同時発現は、 p 5 3 ファミリーの全メンバーのアポトーシス機能を増強する。これらの結果は、 A S P ファミリーが新規の腫瘍抑制ファミリーであり得ることを示す。

【 0 1 7 8 】

( 実施例 7 )

最近単離された配列の *re l A s s o c i a t e d I n h i b i t o r ( R A I )* を、 3 1 5 アミノ酸を含む p 6 5 *re l A* 結合タンパク質として同定した。これは、 A S P - 1 および A S P - 2 の C 末端の半分に配列相同性を有する ( 図 8 A )。これは以下の特性において、 A S P - 2 変異体、 5 3 B P 2 / A S P - 2 ( 6 0 0 ~ 1 1 2 8 ) に類似する。 R A I は、 A S P - 1 または A S P - 2 の - ヘリカルドメインを有さないが、プロリンリッチドメイン、アンキリンリピートおよび S H 3 ドメインを含む。 A S P - 2 の p 5 3 接触残基はまた、 R A I において保存される。本発明者らが I - A S P と名付けた R A I の活性を調査するために、本発明者らは、このコード配列を哺乳動物発現ベクター p c D N A 3 中にクローニングした。本発明者らはまた、 A S P - 1 および A S P - 2 に対して配列類似性を有さない I - A S P において見出した、ペプチド ( R L Q P A L P P E A Q S V P E L E E ) を合成した。この特異な I - A S P ペプチドに対して特異的なマウス抗体は、 A S P - 1 も A S P - 2 もどちらにも交差反応しなかった ( データは示していない )。このマウス抗 I - A S P 特異的抗体を、 S a o s - 2 細胞にトランスフェクトした I - A S P を免疫沈降するために用いることによって、本発明者らは、 I - A S P がまた p 5 3 と相互作用し得ることを証明することを可能にした ( 図 8 B )。 A S P - 2 変異体、 5 3 B P 2 / A S P - 2 ( 6 0 0 ~ 1 1 2 8 ) と同じく、 I - A S P の発現は、それ自体、アポトーシスを誘導しなかった。 I - A S P が p 5 3 と同時発現した場合、 p 5 3 のアポトーシス機能に対するわずかな阻害性の影響を有した。 p 5 3 のアポトーシス機能に対する I - A S P の最も重要な影響は、 A S P - 1 および A S P - 2 が同時発現した場合に観察された。本発明者らの予想に一致して、 I - A S P の同時発現は、 A S P - 1 および A S P - 2 により引き起こされる増強した p 5 3 のアポトーシス機能を阻害した ( 図 8 C )。同様に、 A S P - 1 または A S P - 2 と一緒に I - A S P の同時発現は、 B a x プロモーターに対する p 5 3 のトランス活性化機能を刺激する、 A S P - 1 および A S P - 2 の両方の能力を完全に廃止し得た ( 図 8 D )。 I - A S P の同時発現は、 p 5 3 も A S P もどちらの発現レベルも有意に変化させなかった ( 図 8 E )。これらの結果は、インビボでの A S P - 1 および A S P - 2 のアポトーシス促進性機能が、天然のインヒビター I - A S P により調節され得ることを示した。従って、 A S P - 1、 A S P - 2 と I - A S P との間の発現レベルのバランスは、細胞の運命を決定し得る ( すなわち、細胞が生存するかまたは死滅するか )。

【 0 1 7 9 】

( 実施例 8 )

最近の研究は、いくつかの p 5 3 のアポトーシス欠損変異体が、多くの p 5 3 標的遺伝子 ( B a x、 P I G - 3 および I G F - B P 3 のようなアポトーシス促進性遺伝子ではなく、 m d m 2 および p 2 1 w a f 1 が挙げられる ) のプロモーターを転写活性し得ることを証明している。全ての p 5 3 変異体の研究のうちで、それらのうちの 2 つ ( 1 8 1 L および 1 8 1 C ) は、特に興味深い。残基 1 8 1 での p 5 3 の変異は、胸部癌および子宮頸部癌を含む多くのヒト腫瘍型において報告されている。 p 5 3 および 5 3 B P 2 の結晶構造から、 p 5 3 の残基 1 8 1 を 5 3 B P 2 に対する p 5 3 内の接触部位の 1 つとして同定したが、これは D N A の接触部位ではなかった。この結晶構造の結果からの予想と一致して、以前の研究は、 1 8 1 L および 1 8 1 C の両方が D N A に結合し得、そして m d m 2 お

10

20

30

40

50

よび p 2 1 w a f 1 のような p 5 3 標的遺伝子の多くのプロモーターをトランス活性化し得ることを示している。しかし、興味深いことに、両方の変異体は、アポトーシスを誘導する能力または形質転換を抑制する能力が減少している。A S P および p 5 3 の相互作用が p 5 3 のアポトーシス機能の特異的に増強し得るので、本発明者らは、1 8 1 L および 1 8 1 C の減少したアポトーシス機能が、(アポトーシスを誘導する A S P との同時作動に対する) これら 2 つの p 5 3 変異体における何らかの種類の欠損に起因し得ることを仮定した。それゆえ、本発明者らは、2 つの p 5 3 腫瘍由来変異体 (1 8 1 L および 1 8 1 C) のアポトーシス機能に関する A S P の影響を試験した。図 9 A に示すように、A S P - 1 または A S P - 2 の同時発現が、いずれかの p 5 3 変異体のアポトーシス機能を増強できず、同じ実験にもかかわらず、A S P の同時発現は、野生型 p 5 3 のアポトーシス機能を有意に増強した。その後、本発明者らはまた、p 5 3 変異体のトランス活性化機能に関する A S P の影響を試験した。残基 1 8 1 の変異が p 5 3 のアポトーシス機能を活性化する A S P の能力を阻害し得るという観察と一致して、A S P - 1 または A S P - 2 の同時発現は、変異体 p 5 3 (B a x 遺伝子プロモーター上の 1 8 1 C) のトランス活性化機能を刺激し得なかった。p 5 3 変異体 1 8 1 L に対する A S P の影響はまた同様であった (図 9 B)。p 5 3 変異体の活性を刺激する A S P の無能力さは、タンパク質発現の欠損に起因しなかった (図 9 C)。これらの全ての結果は、A S P - 1 および A S P - 2 の、アポトーシス促進性遺伝子に関する 2 つの p 5 3 変異体のトランス活性化機能を刺激できないことが、これら 2 つの変異体 p 5 3 分子がアポトーシス誘導において欠損する分子メカニズムを提供し得ることを示す。これらはまた、p 5 3 のこの部位の変異がなぜヒト腫瘍のいくつかにおいて選択されるのかを説明し得る。本明細書中に示す結果はまた、p 5 3 の腫瘍抑制機能に関する A S P の同時活性化機能の重要性を証明する。

#### 【 0 1 8 0 】

(実施例 9)

p 5 3 上にある同定された 5 3 B P 2 接触残基の 4 つ全てが、ヒト腫瘍において変異していることを見出した。A S P - 1 および A S P - 2 の発現が、p 5 3 のアポトーシス機能を有意に増大させ得ることを知った上で、A S P - 1 および A S P - 2 の発現レベルは、野生型 p 5 3 を発現するヒト腫瘍においてダウンレギュレートされることが予想された。これと一致して、A S P - 2 発現のダウンレギュレーションは、遺伝子分析における高度に悪性のヒト乳癌の 1 つの場合において見出されている。さらなるインビボでの証拠を提供するために、本発明者らは、半定量的 R T - P C R 技術を使用して、4 0 人の乳癌患者に由来する対になった正常および腫瘍 R N A サンプルのパネルにおいて、A S P - 1 および A S P - 2 の両方の発現レベルを研究した。4 0 個全ての乳癌が野生型 p 5 3 を発現したことに注目することは重要である。A S P - 1 および A S P - 2 の発現レベルは、頻繁に、ヒト乳癌においてダウンレギュレートされた (表 I および図 9 D における代表的データ)。4 0 個の癌サンプルのなかで、2 4 個が A S P - 1 を発現し、そして 9 個が A S P - 2 を発現した。興味深いことに、8 / 9 の腫瘍であって A S P - 2 の発現が減少したものが、A S P - 1 の発現も減少していたことも注目された。この発現パターンは、A S P - 1 の発現のダウンレギュレーションの選択的圧力が A S P - 2 のそれよりも高いことを示唆した。これは、試験された 4 0 個の乳癌において、A S P - 1 の有意な減少 (シグナルの 7 5 % の減少よりも大きい) または発現欠如の頻度が、A S P - 2 について検出されたものより高かった (それぞれ 6 0 %、および 2 2 . 5 %) 事実と一致する。この結果は、同じ個体由来の正常組織および癌の間で A S P - 1 および A S P - 2 の発現レベルを比較することによって得られたので、腫瘍細胞が A S P - 1 および A S P - 2 の発現を損失することに選択的利点が存在することを実証した。これらの結果は、A S P - 結合損傷 p 5 3 変異体 1 8 1 L および 1 8 1 C が、A S P の存在下でさえ、効率的にアポトーシスを誘導し得ないという上記の観察と一致する。これは、タンパク質の A S P ファミリーが、ヒト乳癌において腫瘍抑制的役割を有するという考えと一致する。

#### 【 0 1 8 1 】

A S P - 1 および A S P - 2 とは対照的に、I - A S P の発現レベルは、試験された正常

サンプルおよびヒト乳癌組織サンプルにおいて、一般に低かった。しかし、I - A S P の過剰発現は、それらの正常対コントロールと比較して、腫瘍組織の 8 個において検出された (表 1 および図 9 D)。最も著しい現象は、A S P - 1 および A S P - 2 の正常発現の I - A S P の過剰発現との相関であった。I - A S P 過剰発現腫瘍の 7 個は、A S P - 1 および A S P - 2 発現のいかなるダウンレギュレーションをも有していなかった (表 1)。この結果は、A S P - 1 および A S P - 2 のインビボでの天然のインヒビターとしての、I - A S P の生物学的重要性についての議論を支持する。

#### 【 0 1 8 2 】

( 実施例 1 0 )

内因性 A S P ファミリーメンバーが内因性 p 5 3 によって誘導されるアポトーシスの調節において果たす役割を研究するために、本発明者らは、A S P - 1 または A S P - 2 を、野生型 p 5 3 を発現する細胞株 U 2 O S および M C F 7 中に導入した。これらの細胞において発現された場合、A S P - 1 および A S P - 2 は、アポトーシスを誘導した (図 1 2 A)。ヒトパピロマウイルスに由来し、そして p 5 3 に結合し、これを分解のために特異的に標的とし得る、ウイルスの腫瘍性タンパク質 E 6 は、A S P - 1 または A S P - 2 により誘導されたアポトーシスを阻害し、A S P - 1 および A S P - 2 が p 5 3 依存性アポトーシスを誘導し得ることを実証した。 10

#### 【 0 1 8 3 】

本発明者らはまた、D N A 損傷にตอบสนองして内因性 p 5 3 により誘導されるアポトーシスの阻害における 5 3 B P 2 および I - A S P の優勢の負の機能 ( d o m i n a n t n e g a t i v e f u n c t i o n ) を研究した。シスプラチンへの曝露の前に、U 2 O S および M C F 7 細胞を、H P V 1 6、E 6、I - A S P、または 5 3 B P 2 をコードするプラスミドでトランスフェクトした。次いで、シスプラチンでの処理にตอบสนองしてアポトーシスで死んでゆくトランスフェクトした細胞の百分率 (%) を、F A C S 分析により決定した (図 1 2 B)。シスプラチンでの処理により、2 0 % を超えるトランスフェクト細胞がアポトーシスで死滅した。E 6 の発現は、アポトーシス細胞の割合を 1 5 % 未満に減少させた。これは、シスプラチンが、U 2 O S 細胞において、p 5 3 依存性アポトーシスを誘導することを示唆する。これと一致して、I - A S P または 5 3 B P 2 の発現は、シスプラチン誘導アポトーシスを、E 6 と同様な程度まで阻害し得る。これらの結果は、内因性 p 5 3 のアポトーシス機能が、A S P ファミリーメンバーの発現により調節され得ることを示唆する。 20 30

#### 【 0 1 8 4 】

内因性 A S P ファミリーメンバーが、p 5 3 のアポトーシス機能を調節するにおいて有意な役割を果たすことをさらに実証するために、本発明者らは、アンチセンスアプローチを使用した。本発明者らは、A S P - 1、A S P - 2、および I - A S P c D N A の 5 ' 末端からのフラグメントを、哺乳動物発現ベクター中に、アンチセンス方向でクローニングし、そしてそのアンチセンス R N A が、A S P ファミリーメンバーのタンパク質合成を特異的に阻害する能力をインビトロで試験した (データ示さず)。アンチセンス A S P - 1 の発現は、A S P - 1 によって誘導されたアポトーシスを阻害したに過ぎず、A S P - 2 によって誘導されたアポトーシスは阻害しなかった。同様に、アンチセンス A S P - 2 の発現が、A S P - 2 によって誘導されたアポトーシスのみを阻害したが、A S P - 1 によって誘導されたものは阻害しなかった。アンチセンス A S P - 1 および A S P - 2 の特異的効果は、アンチセンス A S P - 1 または A S P - 2 の同時発現が、同じ条件下で B a x によって媒介されたアポトーシスに影響を与えなかったという観察によりさらに支持された (図 1 2 C)。それゆえ、D N A 損傷に対応する内因性 p 5 3 のアポトーシス機能を調節することにおける内因性 A S P - 1 および A S P - 2 の役割を研究することを可能にした。U 2 O S および M C F - 7 細胞を、シスプラチンでの処理の前に、種々の発現プラスミドでトランスフェクトした。F A C S 分析は、コントロールトランスフェクト細胞の約 2 0 ~ 3 0 % がアポトーシスを経ることを示した。E 6 の発現は、アポトーシス細胞の百分率 (%) を半分に減少させた。これは、シスプラチンが、アポトーシスを、これらの 40 50

細胞において p 5 3 依存性経路および p 5 3 非依存性経路の両方を介して誘導し得ることを示す。A S P - 1 または A S P - 2 のアンチセンス R N A の発現は、シスプラチン誘導アポトーシスを、E 6 と同じ程度まで阻害し ( 図 1 2 D )、これは、5 3 B P 2 と I - A S P で観察された効果と類似していた。これは、内因性 A S P - 1 および A S P - 2 が、D N A 損傷に応答して、p 5 3 のアポトーシス機能を調節するにおいて、重要な役割を果たすことを示唆する。

#### 【 0 1 8 5 】

本発明者らは、シスプラチンに反応しての内因性 A S P - 1 および A S P - 2 の p 5 3 誘導アポトーシスに対する刺激性効果が、これらの細胞において検出された高レベルの I - A S P ( データ示さず ( これは A S P - 1 および A S P - 2 が p 5 3 のアポトーシス機能を増強することを阻害し得る ) ) に起因して過小評価され得ると推測する。I - A S P の抗アポトーシス的役割を研究するために、U 2 O S および M C F - 7 細胞の両方を、アンチセンス I - A S P でトランスフェクトした。アンチセンス I - A S P は、E 6 の同時発現により排除した p 5 3 依存性アポトーシスを誘導した。アンチセンス I - A S P による I - A S P の抗アポトーシス機能の除去はまた、A S P - 1 および A S P - 2 のアポトーシス機能を増強した ( 図 1 2 E )。アンチセンス A S P - 1 および A S P - 2 とは異なり、アンチセンス I - A S P の発現は、シスプラチン誘導アポトーシスを阻害しなかった。アポトーシス細胞の少量の増加を、一貫して検出した ( 図 1 2 D )。これらの結果は、A S P - 1 および A S P - 2 が、p 5 3 のインビボでのアポトーシス機能を特異的に刺激することを実証した。内因性 I - A S P は、A S P のインヒビターとして機能し、そして内因性 p 5 3 によって誘導されるアポトーシスをブロックし得る。

10

20

#### 【 0 1 8 6 】

アンチセンス核酸分子は、A S P - 1、A S P - 2、および I - A S P の c D N A に由来し、これらをそれぞれのプラスミドクローン上で以下のヌクレオチド領域にわたるプライマーを使用して P C R によって増幅した ( 開始 A T G を基準に ) : A S P - 1、A S P - 2、および I - A S P について、それぞれ - 7 4 ~ 9 2 3 ; - 2 5 3 ~ 8 3 9 および - 3 7 ~ 5 3 6。その増幅したセグメントを、O I A クイック P C R 増幅キット ( Q I A G E N ) で精製し、そして製造業者の説明書に従って、p c D N A 3 . 1 / V 5 - H i s T O P O ベクター ( I n v i t r o g e n ) に連結した。A S P - 1、A S P - 2、および I - A S P のアンチセンス D N A を含有するプラスミドを、製造業者の説明書に従って、Q I A G E N プラスミド精製キットにより産生した。

30

#### 【 0 1 8 7 】

( 実施例 1 1 )

N F k a p p a B の p 5 3 および p 6 5 R e l A は、ストレスに反応するアポトーシスを調節するにおいて非常に重要な役割を果たす。しかし、これらの 2 つのアポトーシス経路が、どのようにインビボで協働し得るのかについてはほとんど知られていない。p 5 3 と N F - k a p p a B との間にクロストークが存在するか否かの理解する試みが進んでいる。第 1 の証拠は、p 5 3 が p 6 5 R e l A の D N A 結合活性を誘導し得るという最近の観察から生じた。最も重要なことに、I k b ( p 6 5 R e l A のインヒビター ) は、p 5 3 のアポトーシス性機能を阻害し得る。しかし、p 5 3 がいかにして p 6 5 の D N A 結合活性を誘導し得るか、および I k b が p 5 3 のアポトーシス機能をいかにして阻害し得るかについては明確ではなかった。

40

#### 【 0 1 8 8 】

興味深いことに、A S P - 2 と I - A S P の両方が、p 6 5 r e l A ( N F - k a p p a B の成分 ) と相互作用し得ることが、酵母ハイブリッドアッセイにおいて、非常に最近発見された。I - A S P もまた、I k b よりも非効率的ではあるが、p 6 5 のトランス活性化機能を阻害し得る。r e l A p 6 5 と相互作用するために A S P - 2 および I - A S P について必要とされる領域は、p 5 3 について要求されるものと、非常に類似している。したがって、p 5 3 と p 6 5 r e l A との間で、A S P - 2 および I - A S P と相互作用するために、いくらかの競合が存在し得ることが可能である。A S P ファミ

50

リーメンバーは、p53とp65との間でたまたま共通のパートナーであるため、本発明者らは、ASPファミリーメンバーは、p53およびNF- $\kappa$ Bのアポトーシス機能を連結し得ると予想した。この作用モデルにおいて(図13A)、p53は、p65のDNA結合活性を、核I-ASPと相互作用することによって誘導し得、そしてp65がDNAに結合することを可能にし得る。さらに、I $\kappa$ bは、p53-誘導アポトーシスをp65に結合することによりそしてI-ASPを放出することにより、阻害し得る。次いで、増大した核濃度のI-ASPは、p53と相互作用し得、そしてASP-2またはASP-1がp53のトランス活性化機能を刺激することを予防し得る。この仮説が正確であるならば、I $\kappa$ bの発現は、ASP-1またはASP-2の存在下で、p53誘導アポトーシスに対する顕著な効果を有するはずである。

10

## 【0189】

図13Bに示される結果は、この概念と一致する。I $\kappa$ b発現細胞において、7.2%の細胞がアポトーシスにより死滅するのに対して、ベクター単独でトランスフェクトした細胞でトランスフェクトした細胞の4.6%が死滅する。p53誘導アポトーシスに対するI $\kappa$ bの効果もまた、最小であった。なぜなら、p53対p53+I $\kappa$ b発現細胞において検出されたアポトーシス細胞の百分率(%)は、それぞれ12%および11%であったからである。これは、Saos-2細胞におけるASP-1およびASP-2発現の非常に低いレベルに起因し得る。以前に示された結果に一致して、ASP-2の同時発現は、p53誘導アポトーシスを有意に増強した。p53+ASP2トランスフェクト細胞におけるアポトーシス細胞の百分率(%)は、30%であった。興味深いことに、この設定の下で、I $\kappa$ bの同時発現は、最も顕著な効果を示した。I $\kappa$ bの同時発現は、p53およびASP-2によって誘導されるアポトーシス細胞の量を、30%から16%まで減少させ得る。この結果は、ASP-2を予防することによって、I $\kappa$ bがp53誘導アポトーシスを阻害し得、p53機能を刺激することを示唆した。同様の結果がまた、I $\kappa$ bをp53およびASP-1と同時発現した場合に得られた。

20

## 【0190】

本発明者らは、ASP-2は、p53のアポトーシス機能を、Baxのようなアポトーシス促進性(pro-apoptotic)遺伝子のプロモーター上のp53のトランス活性化機能を特異的に刺激することによって、増強し得ることを示した。したがって、本発明者らはまた、Baxおよびmdm2プロモーター上のp53のトランス活性化機能に対するI $\kappa$ bの効果を、ASP2の存在下または非存在下で調べた(図13CおよびDを参照のこと)。以前に示したように、ASP-2およびp53の同時発現は、p53のトランス活性化機能を約8倍刺激した。同じ条件下で、I $\kappa$ bの発現は、Baxプロモーターレポーター活性に対して任意の検出可能な阻害を示さなかった。これは、I $\kappa$ bが、Baxプロモーターの転写活性を、Saos-2細胞において非特異的に阻害しないことを示唆する。50ngのI $\kappa$ bのp53との同時発現は、p53のトランス活性化機能に対して非常にわずかな阻害を示したに過ぎなかった。しかし、I $\kappa$ b、ASP-2、およびp53を同時発現した場合、I $\kappa$ bは、p53トランス活性化機能のASP-2媒介刺激を、劇的に阻害し得た(図13D)。

30

## 【0191】

本発明者らは、ASP-1およびASP-2が、Baxプロモーター上の(ただし、mdm2プロモーター上ではない)p53のトランス活性化機能を特異的に刺激し得ることを示した。したがって、I $\kappa$ bが特異的にASP-2を介してp53のトランス活性化機能を実際に阻害する場合、mdm2のプロモーター活性に対する有意な阻害を示し得ない。同じ条件下で、本発明者らはまた、I $\kappa$ bが、mdm2プロモーター活性に対するp53のトランス活性化機能を阻害する能力を試験した。図13Dに示されるように、ASP-2の同時発現は、mdm2プロモーター上のp53のトランス活性化機能に対してほとんど効果を有さなかった。最も重要なことに、I $\kappa$ bは、mdm2プロモーター上のp53のトランス活性化機能を、ASP-2の存在下でさえ、ほとんど阻害しなかった。本明細書中で示す結果は、I $\kappa$ bがp53のアポトーシス機能を、ASP-1またはASP-2

40

50

が p 5 3 のトランス活性化機能を刺激しないようにすることによって、阻害し得ることを初めて示唆する。

【 0 1 9 2 】

p 5 3 および N F k b 経路と関連して A S P ファミリーの役割をさらに研究するために、本発明者らはまた、A S P - 2 および p 6 5 r e l A 相互作用の、p 5 3 のアポトーシス機能に対する効果を研究した。図 1 3 A におけるワーキングモデルに基づいて、p 6 5 / A S P 相互作用が、A S P タンパク質の核への侵入を容易にし得、したがって、p 5 3 / A S P 相互作用および核 I - A S P の放出を可能にして、核 I - A S P を核 p 6 5 へ結合させる。p 6 5 の残基 1 7 5 - 4 0 6 は、A S P - 2 および I - A S P に結合する。

【 0 1 9 3 】

転写因子として、p 6 5 は、多くの標的遺伝子をトランス活性化し得る。p 5 3 誘導アポトーシスが p 6 5 を必要とするため、そしてまた N F k B の D N A 結合活性の増大と関連しているため、p 6 5 の D N A 結合活性は、p 5 3 と協働してアポトーシスを誘導するのに必須であり得ることを示唆した。p 5 3 および p 6 5 の両方に結合し得ることから、タンパク質の A S P ファミリーは中心的役割を担う。1 つの可能性は、p 6 5 への A S P 結合が、p 6 5 の p 5 3 誘導性 D N A 結合活性のためのメディエータであり得ることである。しかし、p 5 3 の同時発現は、そのレポーター上で p 6 5 の転写活性を誘導しなかった。p 5 3 および A S P - 2 の同時発現はまた、p 6 5 のトランス活性化機能に対していかなる有意な効果も示さなかった。この結果は、A S P が p 5 3 から p 6 5 へシグナルを送達するメッセンジャーではないことを示唆した。それにもかかわらず、A S P は、p 6 5 が p 5 3 と協働してアポトーシスを誘導することを可能にする。本発明者らは、A S P の作用が、p 6 5 N F k B の D N A 結合活性を必要とするか否かを試験した。p 6 5 の 1 0 0 個のアミノ酸を、p 6 5 の D N A 結合領域を含有する N 末端から除去した。このようにして生成された p 6 5 構築物は、N F k b レポータープラスミド上で試験した場合、転写不活性であった。A S P - p 6 5 相互作用が p 5 3 および N F k b 経路のメディエータである場合、p 6 5 は、p 5 3 のアポトーシス機能に対して全長 p 6 5 と類似の効果を有する。そうでなければ、p 6 5 は、不活性である。なぜなら、その標的遺伝子のいずれをもトランス活性化することができないからである ( 図 1 4 A )。図 1 4 B に示す結果は、p 6 5 および p 6 5 の両方が、p 5 3 のアポトーシス機能を、A S P 2 の存在下で刺激したが、しかし p 6 5 は、p 5 3 のアポトーシス機能を増強するのに p 6 5 よりもさらにもっと活性であったことを示した。これは、p 6 5 が、p 6 5 よりも核であるという事実起因し得る。p 6 5 から得たデータは、p 6 5 が、p 5 3 のアポトーシス機能に、p 6 5 の D N A 結合活性とは独立して、影響を及ぼし得ることを強力に主張する。したがって、A S P - 2 - p 6 5 の相互作用は、作用機構であり得る。

【 0 1 9 4 】

( 実施例 1 2 )

B c l - 2 腫瘍性タンパク質の抗アポトーシス機能は、十分に確立されている。興味深いことに、p 5 3 誘導アポトーシスは、B c l - 2 によって阻害され得る。さらに、B c l - 2 はまた、A S P - 2 と相互作用し得る。しかし、この相互作用の生物学的な結果は、何も知られていない。B c l - 2 が p 5 3 誘導アポトーシスをどのように阻害するかもまた、知られていない。B c l - 2 が如何に p 5 3 誘導アポトーシスを阻害するかもまた知られていない。上記の実験システムを用いて、本発明者らは、A S P - 1 および A S P - 2 が p 5 3 を刺激しないようにすることによって、B c l - 2 が p 5 3 誘導アポトーシスを阻害するか否かを、調査した。

【 0 1 9 5 】

p 5 3 が、転写依存性経路および転写非依存性経路の両方を通して、アポトーシスを誘導するということを示唆する証拠が増加している。本発明者らは、A S P - 1 および A S P - 2 が、p 5 3 のアポトーシス機能を、アポトーシス遺伝子 ( 例えば、B a x および P I G 3 ) のプロモーター上の p 5 3 の D N A 結合およびトランス活性化機能を特異的に増強することによって、刺激することを示した。本発明者らはまた、A S P が、p 5 3 のアポ

10

20

30

40

50

トース機能、そのトランス活性化機能とは独立して増強し得るか否かを調査することに興味を抱いた。アポトーシスを、S a o s - 2細胞において、野生型 p 5 3、転写不活性な p 5 3、または p 5 3 H 1 7 5 - L (これは、リーダー配列によりミトコンドリアに標的化されそして p 5 3 のトランス活性化機能とは独立してアポトーシスを誘導することが知られている、変異体 p 5 3 である) の発現により、誘導した。以前の報告と一致して、野生型 p 5 3 のアポトーシス機能は、A S P - 1 および A S P - 2 の発現により刺激された。しかし、A S P - 1 および A S P - 2 の同時発現は、p 5 3 H 1 7 5 - L のアポトーシス機能を増強することができなかつた。最も重要なことに、野生型 p 5 3 誘導アポトーシスのみが、B c l - 2 の同時発現により阻害された。同じ条件下で、B c l - 2 の同時発現は、p 5 3 H 1 7 5 - L により誘導されたアポトーシスを阻害することができなかつた (図 1 5 A)。このような p 5 3 誘導アポトーシスの選択的阻害は、B c l - X L (B c l - 2 ファミリーにおけるアポトーシスの別のインヒビター) で観察されなかつた (図 1 5 B)。p 5 3 のアポトーシス機能を刺激する A S P の能力とそれを阻害する B c l - 2 の能力との間の密接な関連は、B c l - 2 が、A S P が p 5 3 を刺激するのを防止することによって、p 5 3 誘導アポトーシスを阻害することを示唆する。これは、図 3 C に示されるデータ (B c l - 2 が非常に効果的に A S P - 1 および A S P - 2 が p 5 3 のアポトーシス機能を増強することを防止する) によって確認された。

10

【 0 1 9 6 】

( 実施例 1 3 )

本発明者らは、ここまで、I - A S P が、種々の細胞株において p 5 3 誘導アポトーシスを阻害し得ること、およびその発現レベルが、乳癌細胞においてインビボでアップレギュレートされることを示した。これらのデータは全て、I - A S P が発癌遺伝子であり得ることを示唆する。p 5 3 の腫瘍抑制機能は、アポトーシスを誘導するその能力に最もよく連結しているので、p 5 3 誘導アポトーシスの阻害が、p 5 3 の腫瘍抑制機能を除去し得るようである。I - A S P の発癌性機能を試験するために、ラットの胚線維芽細胞 (R E F) を、I - A S P および発ガンタンパク質 E 7 を発現するプラスミドでトランスフェクトした。I - A S P の発現は、E 7 の形質転換機能を、有意に増強した (図 1 6 A)。このことは、I - A S P が実際に発癌遺伝子であることを実証した。

20

【 0 1 9 7 】

ほとんどの化学療法薬物が、D N A 損傷因子であり、そしてアポトーシスを p 5 3 依存性経路を介して誘導することから、本発明者らは、I - A S P の p 5 3 誘導アポトーシスを阻害する能力は、細胞を、化学療法剤 (例えば、シスプラチン) の細胞傷害性効果に対して、より抵抗性にし得ると考えた。M C F - 7 細胞 (ヒト乳癌細胞株) を、I - A S P 発現プラスミドでトランスフェクトした。シスプラチンの細胞傷害性効果に対する細胞の抵抗性を、I - A S P 発現細胞と非発現 I - A S P M C F - 7 細胞との間で比較した。図 1 6 B におけるこの結果は、I - A S P の発現が、細胞性抵抗性を、約 2 . 5 倍、増強し得ることを示す。シスプラチンに対する細胞抵抗性におけるこのような増大は、癌の処置に関して、生物学的に非常に有意である。したがって、I - A S P の高レベルの発現は、なぜ野生型 p 5 3 がいくつかのヒト腫瘍細胞において機能的ではないかを説明するのみではない。それはまた、処置に対する腫瘍応答を予測し得る。最後に、I - A S P 過剰発現細胞を使用して、より効率的な化学療法薬物の更なる同定が可能になり得る。

30

40

【 0 1 9 8 】

( 参考文献 )

【 0 1 9 9 】

【 数 1 】

Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., and Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8, 1693-1696.

Lane, D. P., and Crawford, L. V. (1979). T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.

Ludwig, R. T., Bates, S., and Vousden, K. H. (1996). Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4952-4960.

Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumour suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, p293-299.

10

Momand, J., Zambetti, G. P., Oslon, D. C., George, D., and Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237-1245.

Naumovski, L., and Cleary, M. L. (1996). The p53-binding protein 53BP2 also interacts with bcl2 and impedes cell cycle progression at G2/M. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3884-3892.

20

Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305.

表 1 . ヒト乳癌サンプル ( グレード I およびグレード II ) を発現する野生型 p 5 3 における A S P P の m R N A 発現

【 0 2 0 0 】

【 表 1 】

順号	ASP1	ASP2	I-ASP
1	↓	+	-
2	↓	+	-
3	↓	+	-
4	↓	+	-
5	↓	+	-
6	↓	+	-
7	↓	↓	-
8	+	+	↑
9	↓	↓	-
10	↓	↓	-
11	↓	+	-
12	↓	↓	-
13	↓	↓	-
14	↓	+	-
15	↓	↓	-
16	↓	↓	-
17	+	+	↑
18	↓	+	-
19	↓	+	-
20	+	+	↑
21	+	+	-
22	+	+	-
23	↓	+	-
24	+	+	-
25	+	+	↑
26	+	↓	-
27	↓	↓	-
28	+	+	↑
29	+	+	-
30	↓	+	-
31	+	+	-
32	+	+	↑
33	↓	+	-
34	↓	+	-
35	+	+	-
36	+	+	-
37	+	+	-
38	+	+	↑
39	↓	+	-
40	↓	+	↑

10

20

表 1 は、野生型 p 5 3 を発現するグレード I およびグレード II の胸部腫瘍由来の 4 0 対の正常および腫瘍に対応する RNA サンプルにおける ASP - 1、ASP - 2 および I - ASP の mRNA の発現の要約を表す。

【図面の簡単な説明】

【図 1 a】

図 1 a は、ASP - 1 の DNA 配列を表す。

【図 1 b】

図 1 b は、ASP - 2 の DNA 配列を表す。

【図 1 c】

図 1 c は、ASP - 1 のタンパク質配列を表す。

【図 1 d】

図 1 d は、ASP - 2 のタンパク質配列を表す。

【図 1 e】

図 1 e は、ASP 1 のゲノム地図である。

【図 2 a】

図 2 a は ASP - 1 mRNA のノーザンプロットを表す。

【図 2 b】

図 2 b は、ASP - 2 mRNA のノーザンプロットを表す。

【図 2 c】

図 2 c は、アクチン mRNA ローディングコントロールを含む、ASP - 1 および ASP - 2 の mRNA のノーザンプロットを表す。

40

50

## 【図 3 a】

図 3 a は、組換え GST - 53BP のクマシー染色 SDS ポリアクリルアミドゲルである。

## 【図 3 b】

図 3 b は、ASP - 2 に対するモノクローナル抗体 DX54.10 の特異性を示すウェスタンブロットを示す。

## 【図 3 c】

図 3 c は、内因性 ASP - 2 の検出を示すウェスタンブロットを示す。

## 【図 4 a】

図 4 a は、p53 との ASP - 2 の相互作用を示すウェスタンブロットを示す。

10

## 【図 4 b】

図 4 b は、APS - 2 / bBP2 プラスミドの DNA 配列の一部を表す。

## 【図 4 c】

図 4 c は、ASP - 2 と APS - 2 / bBP2 との間の分子量の差異を示す。

## 【図 5 a】

図 5 a は、p53、ASP - 1 および ASP - 2 の組み合わせの存在下の、p53 特異的プロモーターの刺激を示す。

## 【図 5 b】

図 5 b は、ASP - 1 および ASP - 2 による、p53 のトランス活性化の刺激を示す。

## 【図 6】

図 6 は、ASP - 1 および ASP - 2 による PIG - 3 プロモーターの刺激を示し、種々の短縮された ASP ポリペプチドの発現を示すウェスタンブロットを含む。

20

## 【図 7 a】

図 7 a は、p53 のアポトーシス機能に対する ASP - 1 および ASP - 2 の相乗効果を示す；

## 【図 7 b】

図 7 b は、p53 のアポトーシス機能に対する ASP - 2 の相乗効果を示す。

## 【図 7 c】

図 7 c は、p53 のアポトーシス機能に対する ASP - 2 の C 末端側のドミナントネガティブ効果を示す。

30

## 【図 7 d】

図 7 d は、p53、p73 および p63 のアポトーシス機能に対する ASP - 2 の相乗効果を示す。

## 【図 8 A】

図 8 A は、ASP - 1、ASP - 2 および I - ASP の相同性比較である。

## 【図 8 B】

Saos2 細胞を、ベクター、p53 (5 μg)、I - ASP (10 μg) または p53 + I - ASP のいずれかでトランスフェクトし、次いで、16 時間インキュベートした。この細胞を、NP40 溶解緩衝液中で溶解され、そして 1000 μg の溶解物を、プロテイン G ビーズに結合した I - ASP に対する、ポリクローナル抗体を用いて実行された免疫沈降に供した。p53 の存在を、ウサギポリクローナル p53 抗体 CM1 を使用するこの免疫複合体のウェスタンブロットによって検出した (図 8 B)。

40

## 【図 8 C】

図 8 C は、ASP - 1 および ASP - 2 による p53 誘導性アポトーシスの誘導および I - ASP によるこの p53 誘導性アポトーシスの阻害を示す。

## 【図 8 D】

図 8 D は、ASP - 1 および ASP - 2 による p53 応答性プロモーター、Bax の活性化および I - ASP によるトランス活性化の阻害を示す。

## 【図 8 E】

Saos2 細胞を、ASP - 1 (8 μg) または ASP - 2 (4 μg) のいずれか、I -

50

ASP (5  $\mu$ g) および p53 (50 ng) でトランスフェクトした。40  $\mu$ l の対応する溶解物を、10%ゲル上で泳動し、ASP-1を、V5抗体で検出し、ASP-2をDX.5410で検出し、I-ASPを、マウス抗I-ASP抗体で検出し、p53を、DO1で検出し、そしてPCNAを抗PCNA抗体で検出した(図8E)。

【図9A】

図9Aは、ASP-1 (10  $\mu$ g / 10 cm<sup>2</sup> ディッシュ) またはASP-2 (10  $\mu$ g / 10 cm<sup>2</sup> ディッシュ) いずれかの存在下または非存在下でのp53 (1  $\mu$ g / 10 cm<sup>2</sup> ディッシュ) またはp53 181C (1.6  $\mu$ g / 10 cm<sup>2</sup> ディッシュ) またはp53 181L (2  $\mu$ g / 10 cm<sup>2</sup> ディッシュ) を発現するトランスフェクトされたSaos-2細胞における、sub-G1 DNA含有量を有する細胞(アポトーシス細胞)の百分率を表す。 10

【図9B】

図9Bは、p53またはその2つの変異体のいずれかの転写活性およびSaos-2細胞におけるBax-1 lucレポーターのトランス活性化をするp53 (50-75 ng) またはp53 181C (50 ng) またはp53 181L (50 ng) の能力によって示されような、ASP-1またはASP-2 (それぞれ、8  $\mu$ g および4  $\mu$ g) のいずれかの影響を表すヒストグラムを示す。活性の倍は、ASP-1またはASP-2の存在下での種々のp53構築物の活性をこのプロモーターのp53構築物のみの存在下における活性で除算することによって得られる。 20

【図9C】

図9Cは、40  $\mu$ l のそれぞれのトランス活性化溶解物および抗p53 (DO1) ASP-2 (DX.5410)、および抗V5 ASP-1で検出されるタンパク質を使用するウェスタンブロットを示す。 30

【図9D】

図9Dは、ASP-1およびASP-2の発現レベルは、頻繁に、ヒト乳癌においてダウンレギュレートされたことを示す。 40

【図10】

図10は、I-ASPのDNA配列を表す。 50

【図11】

図11は、I-ASPのタンパク質配列を表す。 60

【図12A】

図12Aは、インビボにおいて、p53のアポトーシス機能がASPファミリーメンバーによって高度に調節されることを示す。野生型p53を発現する細胞株、U2OSおよびMCF-7を、指定されたように、細胞表面マーカーCD20 (A~E) と共にタンパク質を発現するプラスミドでトランスフェクトした。このトランスフェクトされた細胞を、ゲートしそしてFACSによって分析した。この棒グラフは、アポトーシスに特徴的なsub-G1 DNA含有量を有する、トランスフェクトされた細胞の百分率を示す。ASP-1、ASP-2およびI-ASPのアンチセンスRNAを発現するプラスミドはそれぞれ、-ASP-1、-ASP-2および-I-ASPで標識する。ヒトHPV16のウイルス性癌タンパク質(oncoprotein) E6は、E6として示される。 70

図12Bおよび図12Dにおいて、これらの細胞を、示されたようなプラスミドでトランスフェクトした。続いて、このトランスフェクトされたU2OS細胞およびMCF-7細胞を、それぞれ5  $\mu$ g/ml および3  $\mu$ g/ml の濃度でシスプラチンを含む培地と共にインキュベートした。30時間後、細胞を、収集し、そして上記のように分析した。FおよびGについて、U2OS細胞およびMCF-7細胞の両方は、上記のようなタンパク質を発現するプラスミドでトランスフェクトされる。このASPまたはp53と内因性のBaxまたはmdm2との同時発現は、図12Gにおいて示されるように二重の免疫標識によって細胞固定の後に視覚化した。図12Fについて、ベクターのみまたはASPプラスミドのいずれかによってトランスフェクトした、200 U2OS細胞またはMCF-7細胞を、内因性Baxタンパク質の過剰発現について調べた。この棒グラフは、少なく 80

10

20

30

40

50

とも3つの独立した実験の平均値を表す。

【図12B】

図12Bは、インビボにおいて、p53のアポトーシス機能がASPファミリーメンバーによって高度に調節されることを示す。野生型p53を発現する細胞株、U2OSおよびMCF-7を、指定されたように、細胞表面マーカーCD20(A~E)と共にタンパク質を発現するプラスミドでトランスフェクトした。このトランスフェクトされた細胞を、ゲートしそしてFACSによって分析した。この棒グラフは、アポトーシスに特徴的なsub-G1 DNA含有量を有する、トランスフェクトされた細胞の百分率を示す。ASP-1、ASP-2およびI-ASPのアンチセンスRNAを発現するプラスミドはそれぞれ、-ASP-1、-ASP-2および-I-ASPで標識する。ヒトHPV16のウイルス性癌タンパク質(oncoprotein)E6は、E6として示される。図12Bおよび図12Dにおいて、これらの細胞を、示されたようなプラスミドでトランスフェクトした。続いて、このトランスフェクトされたU2OS細胞およびMCF-7細胞を、それぞれ5μg/mlおよび3μg/mlの濃度でシスプラチンを含む培地と共にインキュベートした。30時間後、細胞を、収集し、そして上記のように分析した。FおよびGについて、U2OS細胞およびMCF-7細胞の両方は、上記のようなタンパク質を発現するプラスミドでトランスフェクトされる。このASPまたはp53と内因性のBaxまたはmdm2との同時発現は、図12Gにおいて示されるように二重の免疫標識によって細胞固定の後に視覚化した。図12Fについて、ベクターのみまたはASPPプラスミドのいずれかによってトランスフェクトした、200 U2OS細胞またはMCF-7細胞を、内因性Baxタンパク質の過剰発現について調べた。この棒グラフは、少なくとも3つの独立した実験の平均値を表す。

【図12C】

図12Cは、インビボにおいて、p53のアポトーシス機能がASPファミリーメンバーによって高度に調節されることを示す。野生型p53を発現する細胞株、U2OSおよびMCF-7を、指定されたように、細胞表面マーカーCD20(A~E)と共にタンパク質を発現するプラスミドでトランスフェクトした。このトランスフェクトされた細胞を、ゲートしそしてFACSによって分析した。この棒グラフは、アポトーシスに特徴的なsub-G1 DNA含有量を有する、トランスフェクトされた細胞の百分率を示す。ASP-1、ASP-2およびI-ASPのアンチセンスRNAを発現するプラスミドはそれぞれ、-ASP-1、-ASP-2および-I-ASPで標識する。ヒトHPV16のウイルス性癌タンパク質(oncoprotein)E6は、E6として示される。図12Bおよび図12Dにおいて、これらの細胞を、示されたようなプラスミドでトランスフェクトした。続いて、このトランスフェクトされたU2OS細胞およびMCF-7細胞を、それぞれ5μg/mlおよび3μg/mlの濃度でシスプラチンを含む培地と共にインキュベートした。30時間後、細胞を、収集し、そして上記のように分析した。FおよびGについて、U2OS細胞およびMCF-7細胞の両方は、上記のようなタンパク質を発現するプラスミドでトランスフェクトされる。このASPまたはp53と内因性のBaxまたはmdm2との同時発現は、図12Gにおいて示されるように二重の免疫標識によって細胞固定の後に視覚化した。図12Fについて、ベクターのみまたはASPPプラスミドのいずれかによってトランスフェクトした、200 U2OS細胞またはMCF-7細胞を、内因性Baxタンパク質の過剰発現について調べた。この棒グラフは、少なくとも3つの独立した実験の平均値を表す。

【図12D】

図12Dは、インビボにおいて、p53のアポトーシス機能がASPファミリーメンバーによって高度に調節されることを示す。野生型p53を発現する細胞株、U2OSおよびMCF-7を、指定されたように、細胞表面マーカーCD20(A~E)と共にタンパク質を発現するプラスミドでトランスフェクトした。このトランスフェクトされた細胞を、ゲートしそしてFACSによって分析した。この棒グラフは、アポトーシスに特徴的なsub-G1 DNA含有量を有する、トランスフェクトされた細胞の百分率を示す。AS

10

20

30

40

50

P - 1、ASP - 2 および I - ASP のアンチセンス RNA を発現するプラスミドはそれぞれ、 $\Delta$  - ASP - 1、 $\Delta$  - ASP - 2 および  $\Delta$  - I - ASP で標識する。ヒトHPV 16 のウイルス性癌タンパク質 (oncoprotein) E6 は、E6 として示される。図 12 B および 図 12 D において、これらの細胞を、示されたようなプラスミドでトランスフェクトした。続いて、このトランスフェクトされた U2OS 細胞および MCF - 7 細胞を、それぞれ 5  $\mu$ g / ml および 3  $\mu$ g / ml の濃度でシスプラチンを含む培地と共にインキュベートした。30 時間後、細胞を、収集し、そして上記のように分析した。F および G について、U2OS 細胞および MCF - 7 細胞の両方は、上記のようなタンパク質を発現するプラスミドでトランスフェクトされる。この ASP または p53 と内因性の Bax または mdm2 との同時発現は、図 12 G において示されるように二重の免疫標識によって細胞固定の後に視覚化した。図 12 F について、ベクターのみまたは ASP プラスミドのいずれかによってトランスフェクトした、200 U2OS 細胞または MCF - 7 細胞を、内因性 Bax タンパク質の過剰発現について調べた。この棒グラフは、少なくとも 3 つの独立した実験の平均値を表す。

10

#### 【図 12 E】

図 12 E は、インビボにおいて、p53 のアポトーシス機能が ASP ファミリーメンバーによって高度に調節されることを示す。野生型 p53 を発現する細胞株、U2OS および MCF - 7 を、指定されたように、細胞表面マーカー CD20 (A ~ E) と共にタンパク質を発現するプラスミドでトランスフェクトした。このトランスフェクトされた細胞を、ゲートしそして FACS によって分析した。この棒グラフは、アポトーシスに特徴的な sub - G1 DNA 含有量を有する、トランスフェクトされた細胞の百分率を示す。ASP - 1、ASP - 2 および I - ASP のアンチセンス RNA を発現するプラスミドはそれぞれ、 $\Delta$  - ASP - 1、 $\Delta$  - ASP - 2 および  $\Delta$  - I - ASP で標識する。ヒトHPV 16 のウイルス性癌タンパク質 (oncoprotein) E6 は、E6 として示される。図 12 B および 図 12 D において、これらの細胞を、示されたようなプラスミドでトランスフェクトした。続いて、このトランスフェクトされた U2OS 細胞および MCF - 7 細胞を、それぞれ 5  $\mu$ g / ml および 3  $\mu$ g / ml の濃度でシスプラチンを含む培地と共にインキュベートした。30 時間後、細胞を、収集し、そして上記のように分析した。F および G について、U2OS 細胞および MCF - 7 細胞の両方は、上記のようなタンパク質を発現するプラスミドでトランスフェクトされる。この ASP または p53 と内因性の Bax または mdm2 との同時発現は、図 12 G において示されるように二重の免疫標識によって細胞固定の後に視覚化した。図 12 F について、ベクターのみまたは ASP プラスミドのいずれかによってトランスフェクトした、200 U2OS 細胞または MCF - 7 細胞を、内因性 Bax タンパク質の過剰発現について調べた。この棒グラフは、少なくとも 3 つの独立した実験の平均値を表す。

20

30

#### 【図 12 F】

図 12 F は、インビボにおいて、p53 のアポトーシス機能が ASP ファミリーメンバーによって高度に調節されることを示す。野生型 p53 を発現する細胞株、U2OS および MCF - 7 を、指定されたように、細胞表面マーカー CD20 (A ~ E) と共にタンパク質を発現するプラスミドでトランスフェクトした。このトランスフェクトされた細胞を、ゲートしそして FACS によって分析した。この棒グラフは、アポトーシスに特徴的な sub - G1 DNA 含有量を有する、トランスフェクトされた細胞の百分率を示す。ASP - 1、ASP - 2 および I - ASP のアンチセンス RNA を発現するプラスミドはそれぞれ、 $\Delta$  - ASP - 1、 $\Delta$  - ASP - 2 および  $\Delta$  - I - ASP で標識する。ヒトHPV 16 のウイルス性癌タンパク質 (oncoprotein) E6 は、E6 として示される。図 12 B および 図 12 D において、これらの細胞を、示されたようなプラスミドでトランスフェクトした。続いて、このトランスフェクトされた U2OS 細胞および MCF - 7 細胞を、それぞれ 5  $\mu$ g / ml および 3  $\mu$ g / ml の濃度でシスプラチンを含む培地と共にインキュベートした。30 時間後、細胞を、収集し、そして上記のように分析した。F および G について、U2OS 細胞および MCF - 7 細胞の両方は、上記のようなタンパク質

40

50

を発現するプラスミドでトランスフェクトされる。このASPまたはp53と内因性のBaxまたはmdm2との同時発現は、図12Gにおいて示されるように二重の免疫標識によって細胞固定の後に視覚化した。図12Fについて、ベクターのみまたはASPPプラスミドのいずれかによってトランスフェクトした、200 U2OS細胞またはMCF-7細胞を、内因性Baxタンパク質の過剰発現について調べた。この棒グラフは、少なくとも3つの独立した実験の平均値を表す。

【図12G】

図12Gは、インビボにおいて、p53のアポトーシス機能がASPファミリーメンバーによって高度に調節されることを示す。野生型p53を発現する細胞株、U2OSおよびMCF-7を、指定されたように、細胞表面マーカーCD20(A~E)と共にタンパク質を発現するプラスミドでトランスフェクトした。このトランスフェクトされた細胞を、ゲートしそしてFACSによって分析した。この棒グラフは、アポトーシスに特徴的なsub-G1 DNA含有量を有する、トランスフェクトされた細胞の百分率を示す。ASP-1、ASP-2およびI-ASPのアンチセンスRNAを発現するプラスミドはそれぞれ、-ASP-1、-ASP-2および-I-ASPで標識する。ヒトHPV16のウイルス性癌タンパク質(oncoprotein)E6は、E6として示される。図12Bおよび図12Dにおいて、これらの細胞を、示されたようなプラスミドでトランスフェクトした。続いて、このトランスフェクトされたU2OS細胞およびMCF-7細胞を、それぞれ5 µg/mlおよび3 µg/mlの濃度でシスプラチンを含む培地と共にインキュベートした。30時間後、細胞を、収集し、そして上記のように分析した。FおよびGについて、U2OS細胞およびMCF-7細胞の両方は、上記のようなタンパク質を発現するプラスミドでトランスフェクトされる。このASPまたはp53と内因性のBaxまたはmdm2との同時発現は、図12Gにおいて示されるように二重の免疫標識によって細胞固定の後に視覚化した。図12Fについて、ベクターのみまたはASPPプラスミドのいずれかによってトランスフェクトした、200 U2OS細胞またはMCF-7細胞を、内因性Baxタンパク質の過剰発現について調べた。この棒グラフは、少なくとも3つの独立した実験の平均値を表す。

【図13A】

図13Aは、ASPファミリーメンバーとp65、IkBおよびp53との相互作用を説明するモデルを例示する。図13Bは、ベクターにコードされるASP2、IkBおよびp53の発現および同時発現による、Saos細胞でのアポトーシスの誘導性の図示である。

【図13C】

図13Cは、ASP-2の存在下または非存在下で、Baxにおけるp53およびmdm2プロモーターのトランス活性化機能を与えるIkBの能力のグラフ表示である。

【図13D】

図13Dは、ASP-2の存在下または非存在下で、Baxにおけるp53およびmdm2プロモーターのトランス活性化機能を与えるIkBの能力のグラフ表示である。

【図14A】

図14Aは、NF Bレポータープラスミドをトランス活性化する野生型p65および欠失変異体p65の能力のグラフ表示である。図14Bは、p53、ASP-2、p65およびp65を発現および同時発現する細胞におけるアポトーシスの誘導の視覚的表現である。

【図15A】

図15Aは、p53 H175-L誘導性アポトーシスに対するASP-1およびASP-2刺激の効果を阻害するBcl-2の能力の視覚的な例示である。

【図15B】

図15Bは、p53 H175-L誘導性アポトーシスに対するASP-1およびASP-2の刺激効果をBcl-XLが阻害できないことのグラフ表示である。

【図15C】

図 1 5 C は、A S P - 1 および A S P - 2 による p 5 3 誘導性アポトーシスを阻害する B c l - 2 の能力を例示する。

【 図 1 6 A 】

図 1 6 A は、E 7 のトランスフォーミング機能に対する I - A S P の増強効果を例示する。

【 図 1 6 B 】

図 1 6 B は、シスプラチンに対する細胞の耐性に対する I - A S P の増強効果を例示する。

【 図 2 a 】

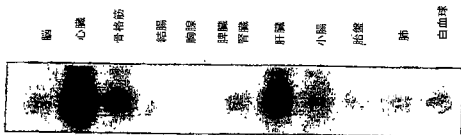


Figure 2A

【 図 2 b 】

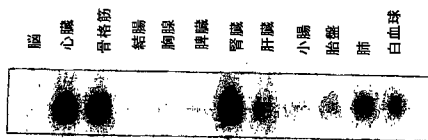
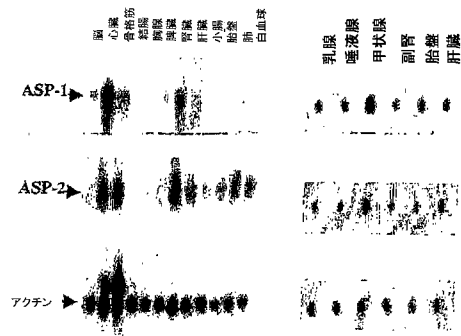


Figure 2B

【 図 2 c 】

Figure 2c



【 図 3 a 】

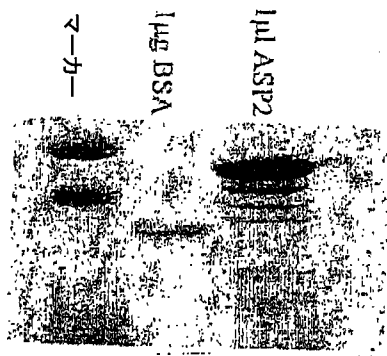


Figure 3A

【 図 3 b 】

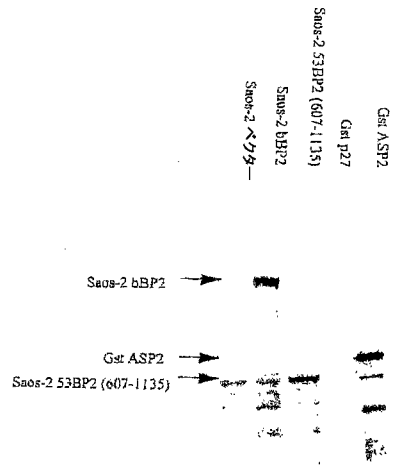


Figure 3B

【 図 3 c 】

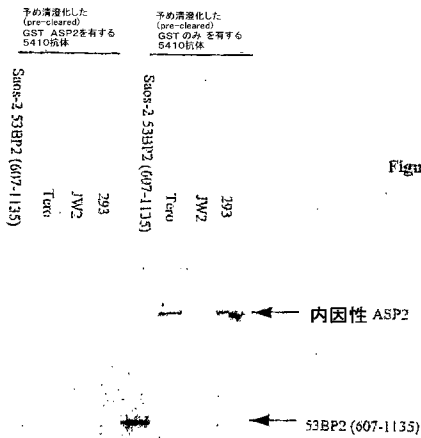


Figure 3C

【 図 4 a 】

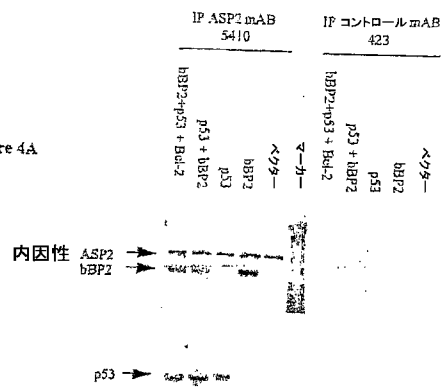
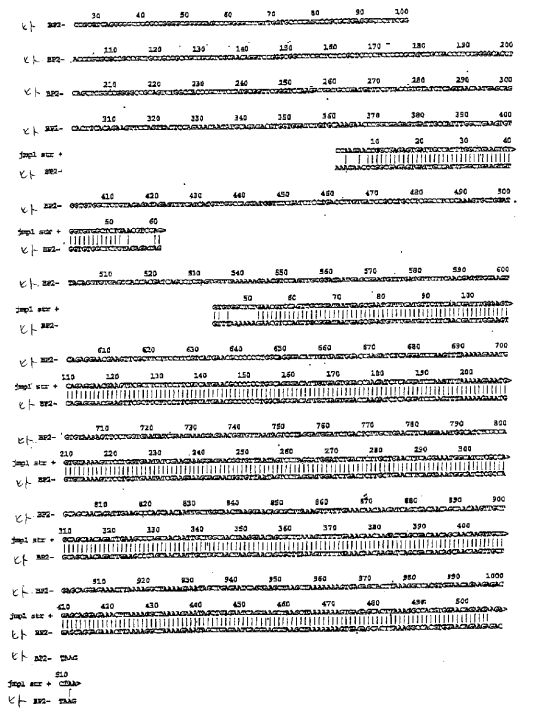
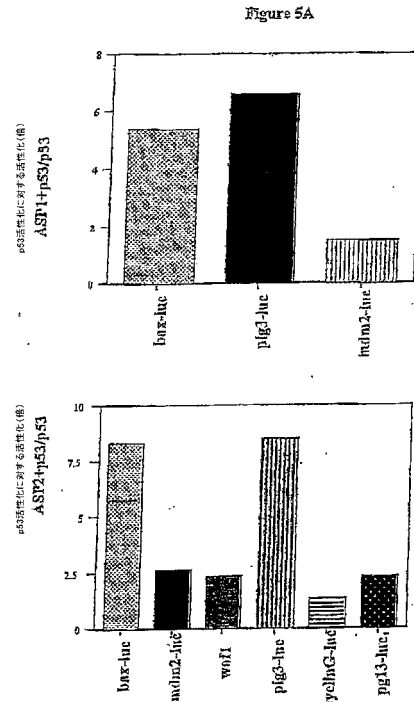


Figure 4A

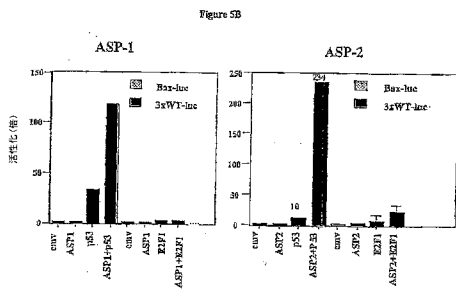
【 図 4 b 】



【 図 5 a 】



【 図 5 b 】



【 図 6 】

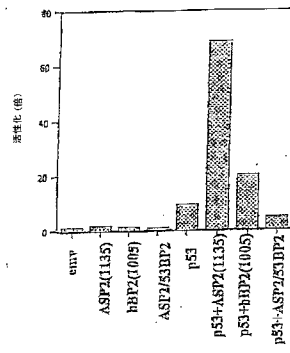
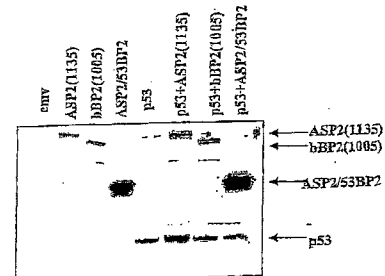


Figure 6



【 図 7 a 】

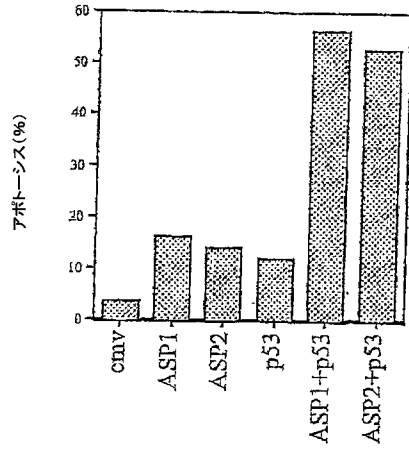


Figure 7A

【 図 7 b 】

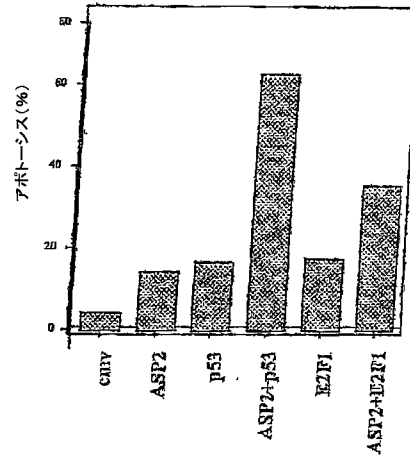


Figure 7B

【 図 7 c 】

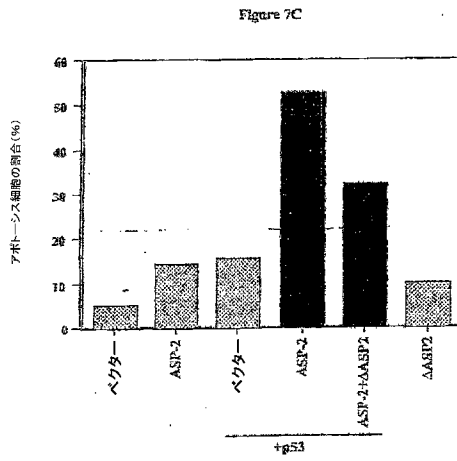


Figure 7C

【 図 7 d 】

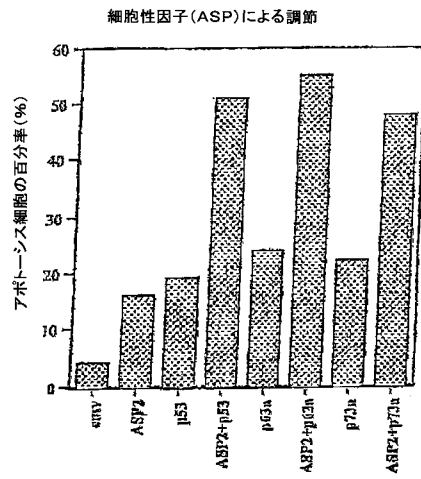
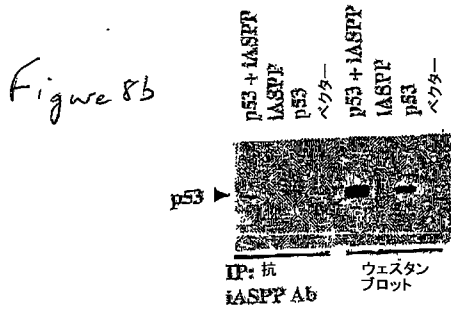
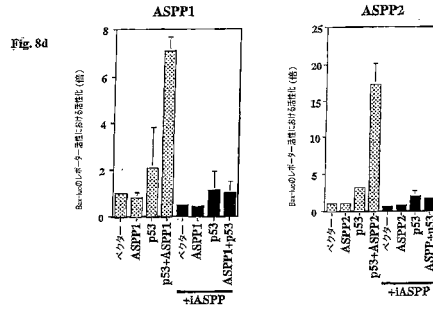


Figure 7D

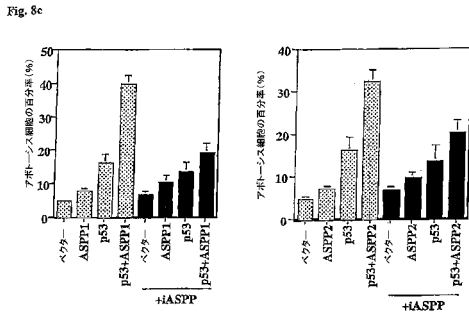
【 図 8 B 】



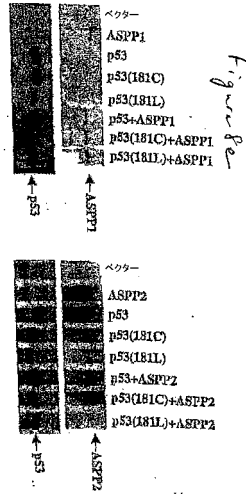
【 図 8 D 】



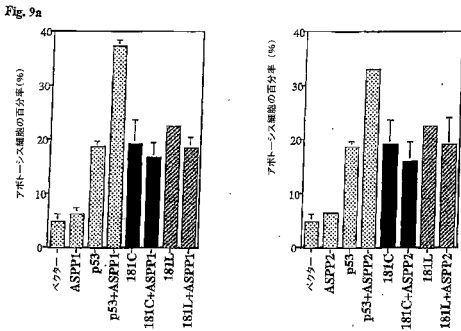
【 図 8 C 】



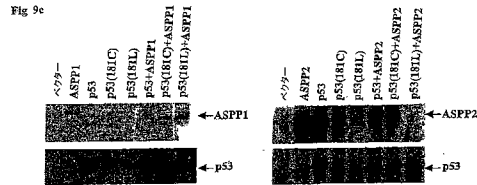
【 図 8 E 】



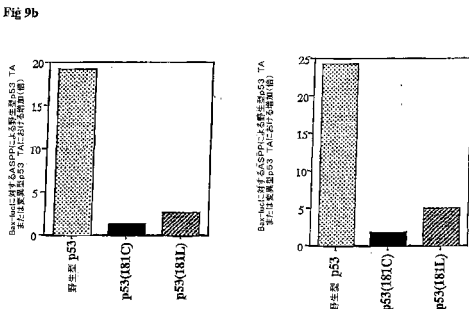
【 図 9 A 】



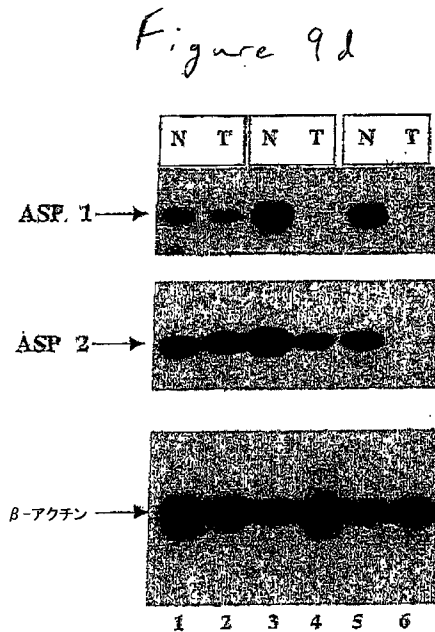
【 図 9 C 】



【 図 9 B 】

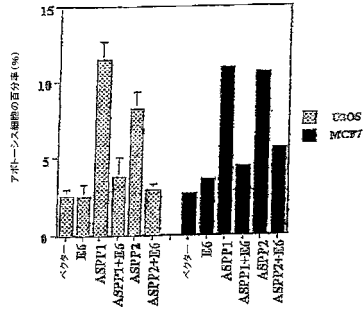


【 図 9 D 】



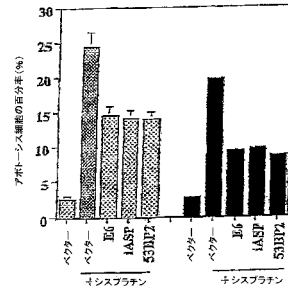
【 1 2 A 】

Fig. 12a



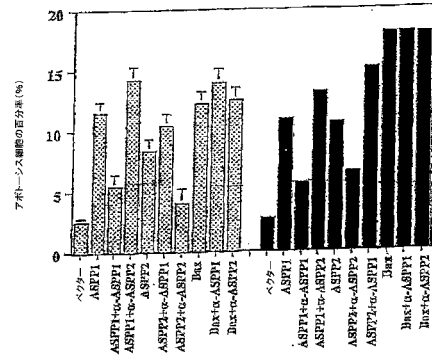
【 1 2 B 】

Fig. 12b



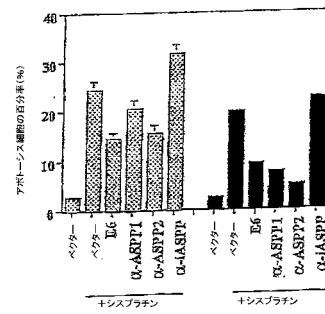
【 1 2 C 】

Fig. 12c



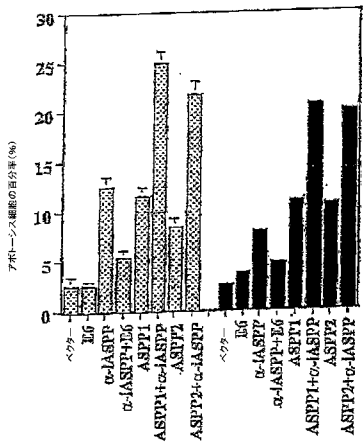
【 1 2 D 】

Fig. 12d



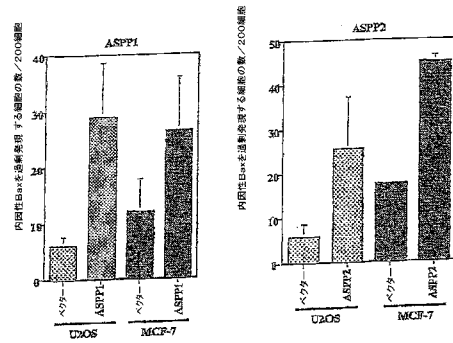
【 1 2 E 】

Fig. 12e



【 1 2 F 】

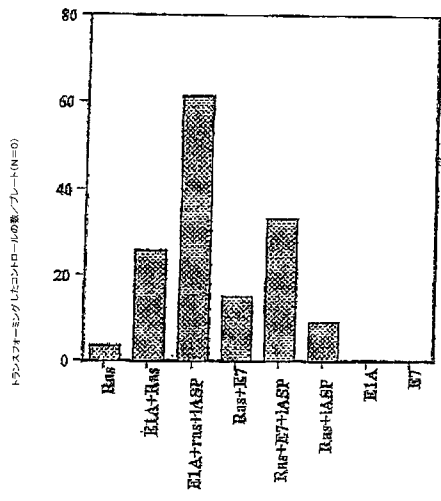
Fig. 12f





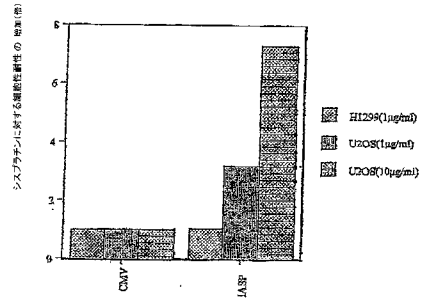
【 図 1 6 A 】

Figure 16a



【 図 1 6 B 】

Figure 16b



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/12325 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/47, 16/18, C12N 15/11, 15/12, 5/10, C12Q 1/68, A61K 38/17, 48/00, G01N 33/50, 33/53
- (52) International Application Number: PCT/GB01/03524
- (53) International Filing Date: 6 August 2001 (06.08.2001)
- (54) Filing Language: English
- (55) Publication Language: English
- (56) Priority Data:  
0019018.1 4 August 2000 (04.08.2000) GB  
0029996.6 8 December 2000 (08.12.2000) GB  
0112890.9 26 May 2001 (26.05.2001) GB
- (57) Applicant (for all designated States except US): LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH [CH/CH], Postfach, CH-8024 Zurich (CH).
- (58) Inventor; and  
(59) Inventor/Applicant (for US only): LU, Xin [CN/GB], Ludwig Institute for Cancer Research, Imperial College School of Medicine at St Mary's, Norfolk Place, London W2 1PG (GB).
- (74) Agent: HARRISON, Goddard, Foote; 31 St. Saviourgate, York YO1 8NQ (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/12325 A2

(54) Title: SUPPRESSOR GENE

(57) Abstract: The invention relates to the identification of a new member of a family of tumour suppressor genes (apoptosis stimulating proteins, ASP's) which encode polypeptides capable of modulating the activity of p53 and polypeptides capable of modulating the activity of said tumour suppressor polypeptide.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

### SUPPRESSOR GENE

The invention relates to members of a family of tumour suppressor genes, (Apoptosis Stimulating Proteins (ASP)), which encode polypeptides capable of modulating the activity of p53 and also polypeptides capable of modulating the activity of said ASP polypeptides.

Tumour suppressor genes encode proteins which function to inhibit cell growth or division and are therefore important with respect to maintaining proliferation, growth and differentiation of normal cells. Mutations in tumour suppressor genes result in abnormal cell-cycle progression whereby the normal cell-cycle check points which arrest the cell-cycle, when, for example, DNA is damaged, are ignored and damaged cells divide uncontrollably. The products of tumour suppressor genes function in all parts of the cell (eg cell surface, cytoplasm, nucleus) to prevent the passage of damaged cells through the cell- cycle (ie G1, S, G2, M and cytokinesis).

A number of tumour suppressor genes have been isolated and sequenced. These include, by example only, the Retinoblastoma gene (Rb), mutations in which are linked to cancers such as bone (osteocarcoma), bladder, small cell lung and breast cancer, as well as retinoblastoma, and the Wilms Tumour - 1 gene (WT-1), mutations in which are linked to nephroblastoma and neurofibromatosis.

The tumour suppressor gene family, MAD (Mothers against *dpp* (decapentaplegic gene) and MADR (MAD related genes) have been identified in a number of species. These genes encode proteins involved in signal transduction pathways required for serine/threonine receptor signalling. MADR1 is essential for signalling of *dpp* pathway. MADR2 is another MADR and mutations in this gene have been linked with colorectal cancer (6% of sporadic colorectal cancers). The sequence of the MADR2 gene, also known as Smad2, is disclosed in WO98/07849.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

Arguably the tumour suppressor gene which has been the subject of the most intense research is p53. p53 encodes a protein which functions as a transcription factor and is a key regulator of the cell division cycle. It was discovered in 1978 (Lane and Crawford, 1979) as a protein shown to bind with affinity to the SV40 large T antigen.

5 The p53 gene encodes a 393 amino acid polypeptide with a molecular weight of 53kDa.

Genes regulated by the transcriptional activity of p53 contain a p53 recognition sequence in their 5' regions. These genes are activated when the cellular levels of p53 are elevated due to, for example DNA damage. Examples of genes which respond to p53 include, mdm2 (Momand et al 1992), Bax (Miyashita and Reed, 1995) and PIG-3 (Polyak et al, 1997). Bax and PIG-3 are involved in one of the most important functions of p53, the induction of apoptosis. Apoptosis, or programmed cell death, is a natural process which removes damaged cells. It is of importance with respect to many cellular processes, including the removal of pre-cancerous cells, cell/tissue development and homeostasis.

As mentioned above, one of the most important tumour suppression functions of p53 is its ability to induce apoptosis. The ability to up-regulate the expression of some of the pro-apoptotic genes such as Bax provided some evidence of how p53 induces apoptosis. However, by comparing the Bax expression in p53(-/-) and p53(+/-) transgenic mice and wild-type it is clear that only in a limited number of tissues was the expression of Bax regulated by p53 in response to DNA damage. Thus it remains unclear why the expression of p53 could only induce the expression of Bax in a cell type specific manner. It was shown recently that mutation in p53 can change promoter specificity. Two of the tumour-derived mutant p53 genes were shown to be defective in transactivation of the Bax promoter but competent to transactivate other promoters of p53 target genes such as mdm2 and p21waf1. These observations suggested that to be able to transactivate genes like Bax is very important for the tumour suppression function of p53.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

It is known that p53 can induce apoptosis through transcriptional dependent and independent pathways. In addition, p53 induced-apoptosis can be blocked by the oncogene bcl-2. However, bcl-2 does not inhibit the transactivation function of p53. So far, very little is known about the molecular mechanisms of how bcl-2 inhibits p53- induced apoptosis.

53BP2 is a p53 binding protein initially discovered by Iwabuchi *et al* (1994). 53BP2 was isolated in a yeast 2-hybrid screen and was found to consist of 528 amino acids from the C-terminus of the protein. It contains a proline rich sequence, four ankryin repeats and an SH3 domain. Subsequently it was identified as a protein which interacted with Bcl-2 (Naumovski and Cleary, 1996). A longer version of this protein was isolated and named as bBP2/53BP2. Based on the *in vitro* translation data, the authors (Naumovski and Cleary, 1996) predicted that the bBP2/53BP2 protein consisted of 1005 amino acids.

In an attempt to understand how the apoptotic function of p53 can be regulated *in vivo*, we generated antibodies to 53BP2 and showed that in most of the cells tested, the expression level of 53BP2 is low. We also observed that the endogenous bBP2/53BP2 unexpectedly encodes a protein larger than the 1005 amino acids predicted by Naumovski and Cleary. This protein, ASP-2, consists of 1135 amino acids.

For the sake of clarity the following nomenclature will be used:

- i) the 528 amino acid polypeptide will be referred to as 53BP2 or ASP-2/53BP2 (607-1135)
- ii) the 1005 amino acid polypeptide will be referred to as bBP2/53BP or ASP-2/Bbp2 (130-1135)
- iii) the 1135 amino acid polypeptide will be referred to as ASP-2/53BP, or simply ASP-2 (1-1135).

The numbers in brackets indicate the equivalent amino acids of ASP-2.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

We have shown that the C-terminal half of bBP2/53BP does not have a significant effect on the activity of p53. However, ASP-2/53BP stimulated the transactivation function of p53. Most interestingly, ASP-2/53BP can specifically enhance the transactivation function of p53 on the promoters derived from pro-apoptosis related genes such as Bax and PIG-3.

Using the cDNA sequence of ASP-2, we did a BLAST search and identified a clone named as KIAA0771 with significant homology to the nucleic acid sequence encoding bBP2/BP53 suggesting that the newly identified sequence is a member of a family of genes which encode apoptosis stimulating proteins (ASP's). This member of the family is referred to as ASP-1. Using a PCR-RACE, a technique known in the art, we cloned 100bp of ASP-1 cDNA which is 5'-upstream to KIAA0771. The cloned 100bp sequence was used to carry out a BLAST search, which allowed us to identify another EST clone (EMBO entry AI625004) which overlaps with the 100bp sequence but contains a further 700bp 5'-sequence of ASP-1. We obtained the EST clones AI625004 and KIAA0771 and subcloned both together to generate the full length clone of ASP-1 cDNA as shown in figure 1B.

We have named the novel nucleic acid sequence ASP-1, (Apoptosis Stimulating Protein 1), which encodes a polypeptide which has sequence homology to 53BP2/bBP2. The sequence homologies between ASP-1 and ASP-2, at the level of protein sequence, is shown in Figure 8A. The highest homology between ASP-1 and ASP-2 is found in the N- and the C-terminal parts of the protein.

The chromosomal locations of these two genes were also identified. ASP-1 is encoded by a gene located on chromosome 14. The boundaries for 17 exons and introns are illustrated in figure 1C. Most of the exons and introns are within the genomic clone under the the EMBO entry AL049840. The promoter region and the 5'end exons and introns are located within the genomic clone EMBO entry CNS01DTD.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

Additionally we have identified a regulator of ASP-2 which inhibits the p53-stimulatory effect of ASP-2. We have called this regulator I-ASP. In tumours expressing ASP-1 and ASP-2, the expression of I-ASP is up-regulated compared to the matched normal controls. This suggests that the tumour suppression function of p53 may be positively and negatively regulated by ASP and I-ASP *in vivo*.

According to a first aspect of the invention there is provided a polypeptide, or part thereof, comprising:

- i) at least one ankyrin repeat
- ii) an  $\alpha$  helical domain;
- iii) a SH3 domain; and

characterised in that said polypeptide is capable of stimulating at least the apoptotic function of p53.

In a further preferred embodiment of the invention said polypeptide is characterised by being capable of binding to an antibody, preferably a monoclonal antibody, to at least one region of the polypeptide of sequence presented in Figure 1c or 1d.

In yet a further preferred embodiment of the invention said polypeptide comprises a binding site capable of binding, and thereby associating, with p53. Preferably said association is capable of inducing and/or enhancing apoptosis.

In a preferred embodiment of the invention said polypeptide is of mammalian origin, ideally human.

In a preferred embodiment of the invention said polypeptide is represented by the amino acid sequence of figure 1c or 1d, which is further modified by deletion, addition, substitution of at least one amino acid.

According to a second aspect of the invention there is provided a nucleic acid molecule comprising a DNA sequence selected from :

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

- 5
- i) the DNA sequence as represented in Figure 1a or 1b;
  - ii) DNA sequences which hybridise to the sequence presented in Figure 1a or 1b which encode a tumour suppressor polypeptide according to the invention;
- and
- iii) DNA sequences which are degenerate as a result of the genetic code to the DNA sequences defined in (i) and (ii).

10 In a preferred embodiment of the invention there is provided an isolated nucleic acid molecule which anneals under stringent hybridisation conditions to the sequence presented in Figure 1a or 1b.

15 In yet a still further preferred embodiment of the invention said nucleic acid molecule is cDNA.

In yet a still further preferred embodiment of the invention said nucleic acid molecule is genomic DNA.

20 In a further preferred embodiment of the invention there are provided isolated polypeptides encoded by the nucleic acid molecules according to the invention.

According to a third aspect of the invention there is provided a nucleic acid molecule characterised in that said nucleic acid molecule is part of a vector adapted to facilitate recombinant expression of the polypeptide encoded by said nucleic acid molecule.

25 In a further preferred embodiment of the invention said vector is an expression vector adapted for eukaryotic gene expression.

According to a fourth aspect of the invention there is provided a method for the production of the polypeptide according to the invention comprising:

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

- i) providing a cell transformed/transfected with a nucleic acid molecule according to the invention;
- ii) growing said cell in conditions conducive to the manufacture of said polypeptide; and
- 5 iii) purifying/isolating said polypeptide from said cell, or its growth environment

In a preferred embodiment of the invention said nucleic acid molecule is the vector according to the invention.

In a preferred method of the invention said vector encodes, and thus said recombinant polypeptide is provided with, a secretion signal to facilitate purification of said polypeptide.

In a further preferred embodiment of the invention said vector encodes, and thus recombinant polypeptide is provided with an additional amino acid sequence which facilitates its purification from a cell or cell culture medium. For example a His-tag sequence which allows the binding of the recombinant polypeptide to a nickel column, or the use of biotinylated recombinant polypeptides which are purified on avidin columns, each of which are known in the art.

According to a fifth aspect of the invention there is provided an antibody or binding part thereof, binds to at least a part of the polypeptide of the invention.

In a preferred embodiment of the invention said binding part is selected from the group consisting of: F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv and Fd fragments; antibodies comprising CDR3 regions.

In a preferred embodiment of the invention said antibody is a monoclonal antibody.

In yet a further preferred embodiment of the invention said antibody is humanised.

Alternatively, said antibody is a chimeric antibody produced by recombinant methods to contain the variable region of said antibody with an invariant or constant region of a human antibody.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

Chimeric antibodies are recombinant antibodies in which all of the V-regions of a mouse or rat antibody are combined with human antibody C-regions. Humanised antibodies are recombinant hybrid antibodies which fuse the complementarity determining regions from a rodent antibody V-region with the framework regions from the human antibody V-regions. The C-regions from the human antibody are also used. The complementarity determining regions (CDRs) are the regions within the N-terminal domain of both the heavy and light chain of the antibody to where the majority of the variation of the V-region is restricted. These regions form loops at the surface of the antibody molecule. These loops provide the binding surface between the antibody and antigen.

The production of antibodies is well known in the art. Several laboratory text books are available to the skilled artisan. For example, *Antibodies*, Lane & Harlow, Cold Spring Harbour Laboratories.

According to a sixth aspect of the invention there is provided host cells which have been transformed/transfected, ideally using the vector according to the invention, so as to include at least part of the nucleic acid molecule according to the invention, so as to permit expression of at least part, or a significant part, such as a functional fragment, of the polypeptide encoded by said nucleic acid sequence.

Ideally said host cells are eukaryotic cells, for example, insect cells such as cells from a species *Spodoptera frugiperda* using the baculovirus expression system. This expression system is favoured in the instance where post-translational modification of the polypeptide is required. If such modification is not required a prokaryotic system may be used.

According to a seventh aspect of the invention there is provided a method for determining the expression of mRNA and/or the polypeptide according to the invention.

According to an eighth aspect of the invention there is provided a pharmaceutical or veterinary composition characterised in that said composition comprises the vector according to the invention.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

According to a ninth aspect of the invention there is provided a pharmaceutical or veterinary composition characterised in that said composition comprises the polypeptide according to the invention.

In a preferred embodiment of the invention said vector and/or said polypeptide optionally also includes a diluent, carrier or excipient.

According to a tenth aspect of the invention there is provided a method of treatment comprising:

- i) administering to an animal an effective amount of a composition according to the invention; and
- 10 ii) monitoring the effect of said therapeutic composition on said animal.

In a preferred method of the invention said treatment is cancer therapy.

In a further preferred embodiment of the invention said animal is human.

In yet a further preferred embodiment of the invention said effect is the induction of apoptosis.

15

According to a further aspect of the invention there is provided method to screen for agents capable of modulating the activity of the polypeptide according to the invention comprising:

- i) providing a cell or cell-line which expresses the polypeptide according to the invention;
- 20 ii) exposing the cell to at least one agent to be tested; and
- iii) monitoring the effect of the agent(s) on the activity of the polypeptide.

According to yet a further aspect of the invention there is provided a method to screen for agents capable of modulating the activity of the polypeptide according to the invention comprising:

- 25 i) providing at least the polypeptide according to the invention;

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

- ii) exposing the polypeptide to at least one agent to be tested; and
- iii) monitoring the binding of said agent(s) by said polypeptide.

According to yet a further aspect of the invention there is provided an agent(s)  
5 identified by the screening methods according to the invention.

In a preferred embodiment of the invention said agent is an agonist which promotes the activity of the polypeptide according to the invention.

- 10 In a further preferred embodiment of the invention said agent is an antagonist which inhibits the activity of the polypeptide according to the invention. Preferably said agent is a polypeptide.

According to a further aspect of the invention there is provided an antisense nucleic acid molecule wherein said molecule comprises the antisense sequence of the sense sequence according to the invention. Preferably said antisense nucleic acid molecule comprises the antisense sequence represented in Figure 1b, or part thereof. Preferably said antisense nucleic acid molecule is the antisense sequence of the sense sequence comprising nucleotides -253 to 839 of the ASP-2 sequence.

20

According to a further aspect of the invention there is provided an isolated nucleic acid molecule selected from the group comprising:

- i) the DNA sequence as represented in Figure 10;
- ii) DNA sequences which hybridise to the sequence presented in Figure 10  
25 which encode an inhibitor of the tumour suppressor polypeptide according to the invention; and
- iii) DNA sequences which are degenerate as a result of the genetic code to the DNA sequences defined in (i) and (ii).

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

In a preferred embodiment of the invention there is provided an isolated nucleic acid molecule which anneals under stringent hybridisation conditions to the sequence presented in Figure 10.

- 5 According to a further aspect of the invention there is provided a polypeptide, or part thereof, comprising:
- i) at least one ankyrin repeat;
  - ii) a SH3 domain; and
- characterised in that said polypeptide is capable of inhibiting the p53-stimulatory  
10 activity of the polypeptide represented in Figure 1d.

In a preferred embodiment of the invention said polypeptide also comprises a proline - rich region.

- 15 According to a yet further aspect of the invention there is provided a polypeptide, as represented by the amino acid sequence of Figure 11, which is further modified by deletion, addition, substitution of at least one amino acid. Preferably said polypeptide is of human origin.

- 20 Aspects and embodiments applicable to ASP-1 or ASP-2 are equally applicable to I-ASP. For example, the creation of expression vectors including I-ASP DNA; cell-lines transformed or transfected with nucleic acid molecules encoding I-ASP; monoclonal antibodies capable of binding to polypeptides encoded by nucleic acid molecules encoding I-ASP, or homologues thereof; pharmaceutical compositions  
25 comprising nucleic acid molecules encoding I-ASP; pharmaceutical compositions comprising I-ASP polypeptides, or homologues thereof; methods of treatment employing nucleic acid molecules encoding I-ASP or I-ASP polypeptides; methods to detect the nucleic acid encoding I-ASP, or homologues thereof; methods to detect the I-ASP polypeptides, or homologues thereof.

30

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

According to a further aspect of the invention there is provided an antisense nucleic acid molecule wherein said molecule comprises the antisense sequence of the sense sequence according to the invention. Preferably said antisense nucleic acid molecule comprises the antisense sequence of the sense sequence represented in Figure 10, or  
5 part thereof. More preferably still said antisense nucleic acid molecule is the antisense sequence of the sense sequence comprising nucleotides -37-536 of I-ASP.

According to a further aspect of the invention there is provided a pharmaceutical composition comprising an antisense molecule according to the invention.

10

In a preferred embodiment of the invention said antisense nucleic acid is combined with at least one chemotherapeutic agent. Preferably said agent is an anti-cancer agent selected from the group consisting of: cisplatin; carboplatin; cyclophosphamide; melphalan; carmustine; methotrexate; 5-fluorouracil; cytarabine; mercaptopurine; daunorubicin; doxorubicin; epirubicin; vinblastine; vincristine; dactinomycin; mitomycin C; taxol; L-asparaginase; G-CSF; an enediyne such as chaliceamicin or esperamicin; chlorambucil; ARA-C; vindesine; bleomycin; and etoposide. Other agents that can be combined with the foregoing include agents that acts on the tumor neovasculature or immunomodulators. Preferably the agent that  
20 acts on the tumor neovasculature is selected from the group consisting of combrestatin A4, angiostatin and endostatin. Preferably the immunomodulator is selected from the group consisting of  $\alpha$ -interferon,  $\gamma$ -interferon, and tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ).

25 In a preferred embodiment of the invention said agent is cisplatin.

According to a yet further aspect of the invention there is provided a method for the preparation of monoclonal antibodies which bind amino acids 1-130 of the sequence presented in figure 1d comprising the steps of:

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

- 5
- (a) immunising an immunocompetent mammal with an immunogen wherein said immunogen comprises a polypeptide having the amino acid sequence as represented by amino acids 1-130 of figure 1d ;
- (b) fusing lymphocytes of the immunised immunocompetent mammal with myeloma cells to form hybridoma cells;
- 10 (c) screening monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells of step (b);
- (d) culturing the hybridoma cells producing monoclonal activity to proliferate and/or to secrete said monoclonal antibody; and
- 15 (e) recovering the monoclonal antibody from the culture supernatant.

In a preferred method of the invention said immunocompetent mammal is a mouse.

In an alternative preferred method A said immunocompetent mammal is a rat.

- 15 In a further preferred method of the invention said mammal is transgenic for human immunoglobulin genes or chromosomal nucleic acids containing human immunoglobulin genes.

20 The invention thus involves in one aspect isolated ASP-1, ASP-2 and/or I-ASP polypeptides, genes encoding those polypeptides, functional modifications and variants of the foregoing, useful fragments of the foregoing, as well as therapeutics relating thereto. The expression of these genes affects apoptosis by binding to p53 and related polypeptides.

- 25 As used herein with respect to nucleic acids, the term "isolated" means: (i) amplified *in vitro* by, for example, polymerase chain reaction (PCR); (ii) recombinantly produced by cloning; (iii) purified, as by cleavage and gel separation; or (iv) synthesized by, for example, chemical synthesis. An isolated nucleic acid is one which is readily manipulable by recombinant DNA techniques well known in the art.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

Thus, a nucleotide sequence contained in a vector in which 5' and 3' restriction sites are known or for which polymerase chain reaction (PCR) primer sequences have been disclosed is considered isolated but a nucleic acid sequence existing in its native state in its natural host is not. An isolated nucleic acid may be substantially purified, but need not be. For example, a nucleic acid that is isolated within a cloning or expression vector is not pure in that it may comprise only a tiny percentage of the material in the cell in which it resides. Such a nucleic acid is isolated, however, as the term is used herein because it is readily manipulable by standard techniques known to those of ordinary skill in the art. An isolated nucleic acid as used herein is not a naturally occurring chromosome.

As used herein with respect to polypeptides, "isolated" means separated from its native environment and present in sufficient quantity to permit its identification or use. Isolated, when referring to a protein or polypeptide, means, for example: (i) selectively produced by expression cloning or (ii) purified as by chromatography or electrophoresis. Isolated proteins or polypeptides may be, but need not be, substantially pure. The term "substantially pure" means that the proteins or polypeptides are essentially free of other substances with which they may be found in nature or *in vivo* systems to an extent practical and appropriate for their intended use. Substantially pure polypeptides may be produced by techniques well known in the art. Because an isolated protein may be admixed with a pharmaceutically acceptable carrier in a pharmaceutical preparation, the protein may comprise only a small percentage by weight of the preparation. The protein is nonetheless isolated in that it has been separated from the substances with which it may be associated in living systems, i.e. isolated from other proteins.

One aspect of the invention relates to those nucleic acid sequences which code for ASP-1, ASP-2 and/or I-ASP polypeptides and which hybridize to the nucleic acid molecules disclosed herein, preferably consisting of the coding region of the molecules depicted in Figures 1a, 1b or 10, under stringent conditions.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

Thus, an aspect of the invention is those nucleic acid sequences which code for ASP-1, ASP-2 and/or I-ASP polypeptides and which hybridize to a nucleic acid molecule as provided herein, under stringent conditions. The term "stringent conditions" as used herein refers to parameters with which the art is familiar.

5 Nucleic acid hybridization parameters may be found in references which compile such methods, e.g. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, or *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. More specifically, stringent conditions,

10 as used herein, refers, for example, to hybridization at 65°C in hybridization buffer (3.5 x SSC, 0.02% Ficoll, 0.02% polyvinyl pyrrolidone, 0.02% Bovine Serum Albumin, 2.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH7), 0.5% SDS, 2mM EDTA). SSC is 0.15M sodium chloride/0.015M sodium citrate, pH7; SDS is sodium dodecyl sulphate; and EDTA is ethylenediaminetetraacetic acid. After hybridization, the membrane upon which the

15 DNA is transferred is washed at 2 x SSC at room temperature and then at 0.1 - 0.5 X SSC/0.1 x SDS at temperatures up to 68°C.

There are other conditions, reagents, and so forth which can be used, which result in a similar degree of stringency. The skilled artisan will be familiar with such

20 conditions, and thus they are not given here. It will be understood, however, that the skilled artisan will be able to manipulate the conditions in a manner to permit the clear identification of homologs and alleles of ASP-1, ASP-2 or I-ASP nucleic acids of the invention. The skilled artisan also is familiar with the methodology for screening cells and libraries for expression of such molecules which then are

25 routinely isolated, followed by isolation of the pertinent nucleic acid molecule and sequencing.

In general homologs and alleles typically will share at least 90% nucleotide identity and/or at least 95% amino acid identity to the disclosed nucleotide and amino acid

30 sequences respectively, in some instances will share at least 95% nucleotide identity and/or at least 97% amino acid identity and in still other instances will share at least

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

98% nucleotide identity and/or at least 99% amino acid identity. The homology can be calculated using various, publicly available software tools developed by NCBI (Bethesda, Maryland) that can be obtained through the Internet (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/>).

5

Exemplary tools include the BLAST system available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, preferably using default settings. Pairwise and ClustalW alignments (BLOSUM30 matrix setting) as well as Kyle-Doolittle hydrophobic analysis can be obtained using the MacVector sequence analysis software (Oxford Molecular Group). Watson-Crick complements of the foregoing nucleic acids also are embraced by the invention.

In screening for nucleic acids encoding ASP-1 ASP-2 and/or I-ASP proteins with sequence homology to the nucleic acids described herein, a Southern blot may be performed using the foregoing conditions, together with a detectable probe (e.g., radioactive, chemiluminescent). After washing the membrane to which the DNA is finally transferred, the probe signal can be detected, such as by placing the membrane against X-ray film or phosphorimager plates to detect the radioactive signal, or by processing the membrane to detect chemiluminescent signal.

20

The invention also includes degenerate nucleic acids which include alternative codons to those present in the native materials. For example, serine residues are encoded by the codons TCA, AGT, TCC, TCG, TCT and AGC. Each of the six codons is equivalent for the purposes of encoding a serine residue. Thus, it will be apparent to one of ordinary skill in the art that any of the serine-encoding nucleotide triplets may be employed to direct the protein synthesis apparatus, *in vitro* or *in vivo*, to incorporate a serine residue into an elongating polypeptide. Similarly, nucleotide sequence triplets which encode other amino acid residues include, but are not limited to: CCA, CCC, CCG and CCT (proline codons); CGA, CGC, CGG, CGT, AGA and AGG (arginine codons); ACA, ACC, ACG and ACT (threonine codons); AAC and AAT (asparagine codons); and ATA, ATC and ATT (isoleucine codons). Other

30

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

amino acid residues may be encoded similarly by multiple nucleotide sequences. Thus, the invention embraces degenerate nucleic acids that differ from the biologically isolated nucleic acids in codon sequence due to the degeneracy of the genetic code.

5

The invention also provides modified nucleic acid molecules or polypeptides which include additions, substitutions and deletions of one or more nucleotides or amino acids. As used herein, "one or more" means 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, or more up to a number that does not substantially change the function of the molecule for those molecules in which the function is desired to be substantially similar to the original nucleic acid or polypeptide. A substantial change of function would be, for example, a dominant negative protein, or a protein which has lost one or more of its functions.

15 In preferred embodiments, these modified nucleic acid molecules and/or the polypeptides they encode retain at least one activity or function of the unmodified nucleic acid molecule and/or the polypeptides, such as p53 binding, antigenicity, transcriptional activity, etc. In certain embodiments, the modified nucleic acid molecules encode modified polypeptides, preferably polypeptides having  
20 conservative amino acid substitutions as are described elsewhere herein. The modified nucleic acid molecules are structurally related to the unmodified nucleic acid molecules and in preferred embodiments are sufficiently structurally related to the unmodified nucleic acid molecules so that the modified and unmodified nucleic acid molecules hybridize under highly stringent conditions known to one of skill in  
25 the art.

For example, modified nucleic acid molecules which encode polypeptides having single amino acid changes can be prepared. Each of these nucleic acid molecules can have one, two or three nucleotide substitutions exclusive of nucleotide changes  
30 corresponding to the degeneracy of the genetic code as described herein. Likewise, modified nucleic acid molecules which encode polypeptides having two amino acid

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

changes can be prepared which have, e.g., 2-6 nucleotide changes. Numerous modified nucleic acid molecules like these will be readily envisioned by one of skill in the art, including for example, substitutions of nucleotides in codons encoding amino acids 2 and 3, 2 and 4, 2 and 5, 2 and 6, and so on. In the foregoing example, 5 each combination of two amino acids is included in the set of modified nucleic acid molecules, as well as all nucleotide substitutions which code for the amino acid substitutions. Additional nucleic acid molecules that encode polypeptides having additional substitutions (i.e., 3 or more), additions or deletions (e.g., by introduction of a stop codon or a splice site(s)) also can be prepared and are embraced by the 10 invention as readily envisioned by one of ordinary skill in the art. Any of the foregoing nucleic acids or polypeptides can be tested by routine experimentation for retention of structural relation or activity to the nucleic acids and/or polypeptides disclosed herein.

15 The invention also provides isolated fragments of ASP-1, ASP-2 and I-ASP or complements thereof of sufficient length to represent a sequence unique within the human genome, and identifying a nucleic acid encoding ASP-1, ASP-2 and I-ASP polypeptides. These fragments can be considered unique in that a unique fragment is one that is a 'signature' for the larger nucleic acid. A unique fragment, for example, 20 is long enough to assure that its precise sequence is not found in molecules outside of the ASP-1, ASP-2 and I-ASP nucleic acids defined above, i.e., that it specifically identifies the ASP-1, ASP-2 and I-ASP sequences. A unique fragment includes a sequence of contiguous nucleotides which is not identical to any sequence present in publicly available databases (e.g., GenBank) as of the filing date of this application, 25 although certain fragments may contain as a portion of the fragment some previously known sequence deposited in GenBank. Likewise, complements of publicly known sequences and fragments of the publicly known sequences and complements thereof can be a portion of, but not all of the unique fragments of ASP-1, ASP-2 and I-ASP. Thus a unique fragment excludes, by definition, sequences consisting solely of EST 30 and/or gene sequences deposited in publicly available databases as of the earliest filing date of the sequences contained in this application. Thus, a unique fragment

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

must contain a nucleotide sequence other than the exact sequence of those in GenBank or fragments thereof. The difference may be an addition, deletion or substitution with respect to the GenBank sequence or it may be a sequence wholly separate from the GenBank sequence.

5

Fragments of ASP-1, ASP-2 and I-ASP nucleic acid molecules, including unique fragments, can be used as probes in hybridization blot assays (e.g., Southern, Northern) to identify such nucleic acids, in nuclease protection assays to measure transcription, or can be used in amplification assays such as those employing PCR.

10 As known to those skilled in the art, large probes such as 200, 250, 300 or more nucleotides are preferred for certain uses such as Southern and Northern blots, while smaller fragments will be preferred for uses such as PCR. Fragments also can be used to produce fusion proteins for generating antibodies or determining binding of the polypeptide fragments, or for generating immunoassay components. Likewise,  
15 fragments can be employed to produce nonfused fragments of the ASP-1, ASP-2 and/or I-ASP polypeptides such as N-terminal or C-terminal fragments, or the various protein domains disclosed herein, useful, for example, in the preparation of antibodies, in immunoassays, and as a competitive binding partners of the ASP-1, ASP-2 and I-ASP polypeptides and/or other polypeptides which bind to p53 or rel  
20 polypeptides, for example, in therapeutic applications. Fragments further can be used as antisense molecules, as described herein, to inhibit the expression of ASP-1, ASP-2 and/or I-ASP nucleic acids and polypeptides, particularly for therapeutic purposes as described in greater detail herein.

25 As will be recognized by those skilled in the art, the size of the unique fragment will depend upon its conservancy in the genetic code. Thus, some regions of ASP-1, ASP-2 and I-ASP nucleic acid molecules and their complements will require longer segments to be unique while others will require only short segments, typically between 12 and 32 nucleotides (e.g. 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,  
30 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 and 32 bases long). This disclosure intends to embrace each and every fragment of each sequence, beginning at the first nucleotide, the

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

second nucleotide and so on, up to 8 nucleotides short of the end, and ending anywhere from nucleotide number 8, 9, 10 and so on for each sequence, up to the very last nucleotide (provided the sequence is unique as described above). Many segments of the ASP-1, ASP-2 and I-ASP nucleic acids, or complements thereof, that are 25 or more nucleotides in length will be unique. Those skilled in the art are well versed in methods for selecting such sequences, typically on the basis of the ability of the unique fragment to selectively distinguish the sequence of interest from non-ASP and I-ASP nucleic acids. A comparison of the sequence of the fragment to those on known databases typically is all that is necessary, although *in vitro* confirmatory hybridization and sequencing analysis may be performed.

A fragment can be a functional fragment. A functional fragment of a nucleic acid molecule of the invention is a fragment which retains some functional property of the larger nucleic acid molecule, such as coding for a functional polypeptide, binding to proteins (e.g., p53), regulating transcription of operably linked nucleic acids, coding for immunologically recognized epitopes and the like. One of ordinary skill in the art can readily determine using the assays described herein and those well known in the art to determine whether a fragment is a functional fragment of a nucleic acid molecule using no more than routine experimentation.

As mentioned above, the invention embraces antisense oligonucleotides that selectively bind to a nucleic acid molecule encoding a ASP-1, ASP-2 and I-ASP polypeptide, to modulate p53 binding, transcriptional activity or apoptosis, for example. This is desirable in virtually any medical condition wherein a modulation of p53 activity is desirable, such as cancer and conditions involving aberrant apoptosis.

As used herein, the term "antisense oligonucleotide" or "antisense" describes an oligonucleotide that is an oligoribonucleotide, oligodeoxyribonucleotide, modified oligoribonucleotide, or modified oligodeoxyribonucleotide which hybridizes under physiological conditions to DNA comprising a particular gene or to an mRNA

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

transcript of that gene and, thereby, inhibits the transcription of that gene and/or the translation of that mRNA. The antisense molecules are designed so as to interfere with transcription or translation of a target gene upon hybridization with the target gene or transcript. Those skilled in the art will recognize that the exact length of the antisense oligonucleotide and its degree of complementarity with its target will depend upon the specific target selected, including the sequence of the target and the particular bases which comprise that sequence. It is preferred that the antisense oligonucleotide be constructed and arranged so as to bind selectively with the target under physiological conditions, i.e., to hybridize substantially more to the target sequence than to any other sequence in the target cell under physiological conditions. Based upon the ASP-1, ASP-2 or I-ASP nucleic acid sequences provided herein, or upon allelic or homologous genomic and/or cDNA sequences, one of skill in the art can easily choose and synthesize any of a number of appropriate antisense molecules for use in accordance with the present invention. For example, a "gene walk" comprising a series of oligonucleotides of 15-30 nucleotides spanning the length of a ASP-1, ASP-2 or I-ASP nucleic acid can be prepared, followed by testing for inhibition of the corresponding ASP-1, ASP-2 or I-ASP expression. Optionally, gaps of 5-10 nucleotides can be left between the oligonucleotides to reduce the number of oligonucleotides synthesized and tested.

In order to be sufficiently selective and potent for inhibition, such antisense oligonucleotides should comprise at least 10 and, more preferably, at least 15 consecutive bases which are complementary to the target, although in certain cases modified oligonucleotides as short as 7 bases in length have been used successfully as antisense oligonucleotides (Wagner et al., *Nature Biotechnol.* 14:840-844, 1996). Most preferably, the antisense oligonucleotides comprise a complementary sequence of 20-30 bases. Although oligonucleotides may be chosen which are antisense to any region of the gene or mRNA transcripts, in preferred embodiments the antisense oligonucleotides correspond to N-terminal or 5' upstream sites such as translation initiation, transcription initiation or promoter sites. In addition, 3'-untranslated regions may be targeted. Targeting to mRNA splicing sites has also been used in the

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

art but may be less preferred if alternative mRNA splicing occurs. In addition, the antisense is targeted, preferably, to sites in which mRNA secondary structure is not expected (see, e.g., Sainio et al., *Cell Mol. Neurobiol.* 14(5):439-457, 1994) and at which proteins are not expected to bind. Finally, although the ASP-1, ASP-2 and I-ASP cDNA sequences are disclosed herein, one of ordinary skill in the art may easily derive the genomic DNA corresponding to these cDNAs. Thus, the present invention also provides for antisense oligonucleotides which are complementary to ASP-1, ASP-2 or I-ASP genomic DNA. Similarly, antisense to allelic or homologous cDNAs and genomic DNAs are enabled without undue experimentation.

10

In one set of embodiments, the antisense oligonucleotides of the invention may be composed of "natural" deoxyribonucleotides, ribonucleotides, or any combination thereof. That is, the 5' end of one native nucleotide and the 3' end of another native nucleotide may be covalently linked, as in natural systems, via a phosphodiester internucleoside linkage. These oligonucleotides may be prepared by art recognized methods which may be carried out manually or by an automated synthesizer. They also may be produced recombinantly by vectors.

In preferred embodiments, however, the antisense oligonucleotides of the invention also may include "modified" oligonucleotides. That is, the oligonucleotides may be modified in a number of ways which do not prevent them from hybridizing to their target but which enhance their stability or targeting or which otherwise enhance their therapeutic effectiveness.

The term "modified oligonucleotide" as used herein describes an oligonucleotide in which (1) at least two of its nucleotides are covalently linked via a synthetic internucleoside linkage (i.e., a linkage other than a phosphodiester linkage between the 5' end of one nucleotide and the 3' end of another nucleotide) and/or (2) a chemical group not normally associated with nucleic acids has been covalently attached to the oligonucleotide. Preferred synthetic internucleoside linkages are phosphorothioates, alkylphosphonates, phosphorodithioates, phosphate esters,

30

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

alkylphosphonothioates, phosphoramidates, carbamates, carbonates, phosphate triesters, acetamidates, carboxymethyl esters and peptides.

5 The term "modified oligonucleotide" also encompasses oligonucleotides with a covalently modified base and/or sugar. For example, modified oligonucleotides include oligonucleotides having backbone sugars which are covalently attached to low molecular weight organic groups other than a hydroxyl group at the 3' position and other than a phosphate group at the 5' position. Thus modified oligonucleotides may include a 2'-O-alkylated ribose group. In addition, modified oligonucleotides  
10 may include sugars such as arabinose instead of ribose. The present invention, thus, contemplates pharmaceutical preparations containing modified antisense molecules that are complementary to and hybridizable with, under physiological conditions, nucleic acids encoding ASP-1, ASP-2 and/or I-ASP polypeptides, together with pharmaceutically acceptable carriers.

15 Antisense oligonucleotides may be administered as part of a pharmaceutical composition. Such a pharmaceutical composition may include the antisense oligonucleotides in combination with any standard physiologically and/or pharmaceutically acceptable carriers which are known in the art. The compositions  
20 should be sterile and contain a therapeutically effective amount of the antisense oligonucleotides in a unit of weight or volume suitable for administration to a patient. The characteristics of the carrier will depend on the route of administration. Physiologically and pharmaceutically acceptable carriers include diluents, fillers, salts, buffers, stabilizers, solubilizers, and other materials which are well known in  
25 the art.

As used herein, a "vector" may be any of a number of nucleic acids into which a desired sequence may be inserted by restriction and ligation for transport between different genetic environments or for expression in a host cell. Vectors are typically  
30 composed of DNA although RNA vectors are also available. Vectors include, but are not limited to, plasmids, phagemids and virus genomes. A cloning vector is one

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

which is able to replicate in a host cell, and which typically is further characterized by one or more endonuclease restriction sites at which the vector may be cut in a determinable fashion and into which a desired DNA sequence may be ligated such that the new recombinant vector retains its ability to replicate in the host cell. In the case of plasmids, replication of the desired sequence may occur many times as the plasmid increases in copy number within the host bacterium or just a single time per host before the host reproduces by mitosis. In the case of phage, replication may occur actively during a lytic phase or passively during a lysogenic phase. An expression vector is one into which a desired DNA sequence may be inserted by restriction and ligation such that it is operably joined to regulatory sequences and may be expressed as an RNA transcript. Vectors may further contain one or more marker sequences suitable for use in the identification of cells which have or have not been transformed or transfected with the vector. Markers include, for example, genes encoding proteins which increase or decrease either resistance or sensitivity to antibiotics or other compounds, genes which encode enzymes whose activities are detectable by standard assays known in the art (e.g.,  $\beta$ -galactosidase, luciferase or alkaline phosphatase), and genes which visibly affect the phenotype of transformed or transfected cells, hosts, colonies or plaques (e.g., various fluorescent proteins such as green fluorescent protein, GFP). Preferred vectors are those capable of autonomous replication and expression of the structural gene products present in the DNA segments to which they are operably joined.

As used herein, a coding sequence and regulatory sequences are said to be "operably" joined when they are covalently linked in such a way as to place the expression or transcription of the coding sequence under the influence or control of the regulatory sequences. If it is desired that the coding sequences be translated into a functional protein, two DNA sequences are said to be operably joined if induction of a promoter in the 5' regulatory sequences results in the transcription of the coding sequence and if the nature of the linkage between the two DNA sequences does not (1) result in the introduction of a frame-shift mutation, (2) interfere with the ability of the promoter region to direct the transcription of the coding sequences, or (3) interfere with the

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

ability of the corresponding RNA transcript to be translated into a protein. Thus, a promoter region would be operably joined to a coding sequence if the promoter region were capable of effecting transcription of that DNA sequence such that the resulting transcript might be translated into the desired protein or polypeptide.

5

The precise nature of the regulatory sequences needed for gene expression may vary between species or cell types, but shall in general include, as necessary, 5' non-transcribed and 5' non-translated sequences involved with the initiation of transcription and translation respectively, such as a TATA box, capping sequence, CAAT sequence, and the like. In particular, such 5' non-transcribed regulatory sequences will include a promoter region which includes a promoter sequence for transcriptional control of the operably joined gene. Regulatory sequences may also include enhancer sequences or upstream activator sequences as desired. The vectors of the invention may optionally include 5' leader or signal sequences. The choice and design of an appropriate vector is within the ability and discretion of one of ordinary skill in the art.

Expression vectors containing all the necessary elements for expression are commercially available and known to those skilled in the art. See, e.g., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Cells are genetically engineered by the introduction into the cells of heterologous DNA (RNA) encoding a ASP-1, ASP-2 and/or I-ASP polypeptide or fragment or variant thereof. That heterologous DNA (RNA) is placed under operable control of transcriptional elements to permit the expression of the heterologous DNA in the host cell.

Preferred systems for mRNA expression in mammalian cells are those such as pcDNA3.1 and pRc/CMV (available from Invitrogen, Carlsbad, CA) that contain a selectable marker such as a gene that confers G418 resistance (which facilitates the selection of stably transfected cell lines) and the human cytomegalovirus (CMV) enhancer-promoter sequences. Additionally, suitable for expression in primate or

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

canine cell lines is the pCEP4 vector (Invitrogen), which contains an Epstein Barr virus (EBV) origin of replication, facilitating the maintenance of plasmid as a multicopy extrachromosomal element. Another expression vector is the pEF-BOS plasmid containing the promoter of polypeptide Elongation Factor  $1\alpha$ , which stimulates efficiently transcription *in vitro*. The plasmid is described by Mishizuma and Nagata (*Nuc. Acids Res.* 18:5322, 1990), and its use in transfection experiments is disclosed by, for example, Demoulin (*Mol. Cell. Biol.* 16:4710-4716, 1996). Still another preferred expression vector is an adenovirus, described by Stratford-Pericaudet, which is defective for E1 and E3 proteins (*J. Clin. Invest.* 90:626-630, 1992). The use of the adenovirus as an Adeno.P1A recombinant is disclosed by Warnier et al., in intradermal injection in mice for immunization against P1A (*Int. J. Cancer*, 67:303-310, 1996).

The invention also embraces so-called expression kits, which allow the artisan to prepare a desired expression vector or vectors. Such expression kits include at least separate portions of each of the previously discussed coding sequences. Other components may be added, as desired, as long as the previously mentioned sequences, which are required, are included.

The invention also permits the construction of pcDNA3gene "knock-outs" in cells and in animals, providing materials for studying certain aspects of p53 activity, apoptosis, and cancer.

The invention also provides isolated polypeptides, which include the disclosed ASP-1, ASP-2 and I-ASP polypeptides and fragments thereof. Such polypeptides are useful, for example, alone or as fusion proteins to test and modulate p53 binding, to modulate apoptosis, to generate antibodies, and as a components of an immunoassay.

A fragment of an ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide, in general, has the features and characteristics of fragments as discussed above in connection with nucleic acids. As will be recognized by those skilled in the art, the size of a unique fragment will

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

depend upon factors such as whether the fragment constitutes a portion of a conserved protein domain. Thus, some regions of ASP-1, ASP-2 and/or I-ASP polypeptides will require longer segments to be unique while others will require only short segments, typically between 5 and 12 amino acids (e.g. 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 and  
5 12 amino acids long).

Fragments of an ASP-1, ASP-2 and/or I-ASP polypeptide preferably are those fragments which retain a distinct functional capability of the polypeptide. Functional capabilities which can be retained in a unique fragment of a polypeptide include  
10 binding of p53 or rel, interaction with antibodies, and enzymatic activity. For example, as exemplified herein, certain fragments of ASP-1, ASP-2 and/or I-ASP polypeptides can be used as a functional equivalent of full length ASP-1, ASP-2 and/or I-ASP polypeptide in the methods of the invention, including e.g., binding p53, modulation of apoptosis, etc. Other ASP-1, ASP-2 and/or I-ASP polypeptide  
15 fragments can be selected according to their functional properties. For example, one of ordinary skill in the art can prepare ASP-1, ASP-2 and/or I-ASP fragments recombinantly and test those fragments according to the methods exemplified below, such as binding to a p53 polypeptide. Those skilled in the art also are well versed in  
20 methods for selecting unique amino acid sequences, typically on the basis of the ability of the unique fragment to selectively distinguish the sequence of interest from non-family members. A comparison of the sequence of the fragment to those on known data bases typically is all that is necessary.

The invention embraces variants of the ASP-1, ASP-2 and I-ASP polypeptides described above. As used herein, a "variant" of a ASP-1, ASP-2 or I-ASP  
25 polypeptide is a polypeptide which contains one or more modifications to the primary amino acid sequence of the polypeptide. Modifications which create a variant can be made to a ASP-1, ASP-2 and/or I-ASP polypeptide 1) to reduce or eliminate an activity of a ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide, such as binding to another  
30 polypeptide; 2) to enhance a property of a ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide, such as protein stability in an expression system or the stability of protein-protein binding;

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

or 3) to provide a novel activity or property to a ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide, such as addition of an antigenic epitope or addition of a detectable moiety. Modifications to an ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide are typically made to the nucleic acid which encodes the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide, and can include  
5 deletions, point mutations, truncations, amino acid substitutions and additions of one or more amino acids or non-amino acid moieties. As used in connection with variants, "one or more" means 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, or more changes. Alternatively, modifications can be made directly to the polypeptide, such as by cleavage, addition  
10 of a linker molecule, addition of a detectable moiety, such as biotin, addition of a fatty acid, and the like. Modifications also embrace fusion proteins comprising all or part of a ASP-1, ASP-2 or I-ASP amino acid sequence.

In general, variants include ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides which are modified  
15 specifically to alter a feature of the polypeptide unrelated to its physiological activity. For example, cysteine residues can be substituted or deleted to prevent unwanted disulfide linkages. Similarly, certain amino acids can be changed to enhance expression of a ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide by eliminating proteolysis by proteases in an expression system (e.g., dibasic amino acid residues in yeast  
20 expression systems in which KEX2 protease activity is present).

Mutations of a nucleic acid which encode a ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide preferably preserve the amino acid reading frame of the coding sequence, and preferably do not create regions in the nucleic acid which are likely to hybridize to  
25 form secondary structures, such as hairpins or loops, which can be deleterious to expression of the variant polypeptide.

Mutations can be made by selecting an amino acid substitution, or by random mutagenesis of a selected site in a nucleic acid which encodes the polypeptide.  
30 Variant polypeptides are then expressed and tested for one or more activities to determine which mutation provides a variant polypeptide with the desired properties.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

Further mutations can be made to variants (or to non-variant ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides) which are silent as to the amino acid sequence of the polypeptide, but which provide preferred codons for translation in a particular host. The preferred codons for translation of a nucleic acid in, e.g., *E. coli*, are well known to those of ordinary skill in the art. Still other mutations can be made to the noncoding sequences of an ASP-1, ASP-2 or I-ASP gene or cDNA clone to enhance expression of the polypeptide. The activity of variants of ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides can be tested by cloning the nucleic acid molecule encoding the variant ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide into a bacterial or mammalian expression vector, introducing the vector into an appropriate host cell, expressing the variant ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide, and testing for a functional capability of the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides as disclosed herein. For example, a variant ASP polypeptide can be tested for p53 binding as disclosed in the Examples. Preparation of other variant polypeptides may favor testing of other activities, as will be known to one of ordinary skill in the art.

The skilled artisan will also realize that conservative amino acid substitutions may be made in ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides to provide functionally equivalent variants of the foregoing polypeptides, i.e., the variants retain the functional capabilities of the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides. As used herein, a "conservative amino acid substitution" refers to an amino acid substitution which does not alter the relative charge or size characteristics of the protein in which the amino acid substitution is made. Variants can be prepared according to methods for altering polypeptide sequence known to one of ordinary skill in the art such as are found in references which compile such methods, e.g. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, or *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Exemplary functionally equivalent variants of the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides include one or more conservative amino acid substitutions of the amino acid sequences disclosed herein. Conservative substitutions of amino acids include

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

substitutions made amongst amino acids within the following groups: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; and (g) E, D.

Conservative amino-acid substitutions in the amino acid sequence of ASP-1, ASP-2  
5 or I-ASP polypeptides to produce functionally equivalent variants of these  
polypeptides typically are made by alteration of a nucleic acid encoding an ASP-1,  
ASP-2 or I-ASP polypeptide. Such substitutions can be made by a variety of  
methods known to one of ordinary skill in the art. For example, amino acid  
substitutions may be made by PCR-directed mutation, site-directed mutagenesis  
10 according to the method of Kunkel (Kunkel, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 488-  
492, 1985), or by chemical synthesis of a gene encoding an ASP-1, ASP-2 or I-ASP  
polypeptide. Where amino acid substitutions are made to a small unique fragment of  
an ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide, such as a p53 binding site peptide, the  
substitutions can be made by directly synthesizing the peptide. The activity of  
15 functionally equivalent fragments of ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides can be  
tested by cloning the gene encoding the altered ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide  
into a bacterial or mammalian expression vector, introducing the vector into an  
appropriate host cell, expressing the altered ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide, and  
testing for a functional capability of the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides as  
20 disclosed herein. Peptides which are chemically synthesized can be tested directly  
for function, e.g., for binding to p53.

The invention as described herein has a number of uses, some of which are described  
elsewhere herein. First, the invention permits isolation of the complete ASP-1, ASP-  
25 or I-ASP protein molecules. A variety of methodologies well-known to the skilled  
practitioner can be utilized to obtain isolated the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide  
molecules. The polypeptide may be purified from cells which naturally produce the  
polypeptide by chromatographic means or immunological recognition. Alternatively,  
an expression vector may be introduced into cells to cause production of the  
30 polypeptide. In another method, mRNA transcripts may be microinjected or  
otherwise introduced into cells to cause production of the encoded polypeptide.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

Translation of mRNA in cell-free extracts such as the reticulocyte lysate system also may be used to produce polypeptide. Those skilled in the art also can readily follow known methods for isolating ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides. These include, but are not limited to, immunochromatography, HPLC, size-exclusion chromatography, ion-exchange chromatography and immune-affinity chromatography.

The isolation of the ASP-1, ASP-2 and I-ASP nucleic acid molecules also makes it possible for the artisan to diagnose a disorder characterized by expression (or relative lack thereof) of these molecules. These methods involve determining expression of the ASP-1, ASP-2 or I-ASP nucleic acids, and/or polypeptides derived therefrom. In the former situation, such determinations can be carried out via any standard nucleic acid determination assay, including the polymerase chain reaction as exemplified in the examples below, or assaying with labeled hybridization probes.

The invention also makes it possible to isolate proteins such as p53 and rel by the binding of such proteins to ASP-1, ASP-2 or I-ASP as disclosed herein. The identification of the ASP-1, ASP-2 and I-ASP binding activity, also permits one of skill in the art to modulate protein binding and downstream functions, such as apoptosis. Additional uses are described herein.

The invention also provides, in certain embodiments, "dominant negative" polypeptides derived from ASP-1, ASP-2 or I-ASP. A dominant negative polypeptide is an inactive variant of a protein, which, by interacting with the cellular machinery, displaces an active protein from its interaction with the cellular machinery or competes with the active protein, thereby reducing the effect of the active protein. For example, a dominant negative receptor which binds a ligand but does not transmit a signal in response to binding of the ligand can reduce the biological effect of expression of the ligand. Likewise, a dominant negative catalytically-inactive kinase which interacts normally with target proteins but does not phosphorylate the target proteins can reduce phosphorylation of the target

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

proteins in response to a cellular signal. Similarly, a dominant negative transcription factor which binds to another transcription factor or to a promoter site in the control region of a gene but does not increase gene transcription can reduce the effect of a normal transcription factor by occupying promoter binding sites without increasing transcription.

The end result of the expression of a dominant negative polypeptide in a cell is a reduction in function of active proteins. One of ordinary skill in the art can assess the potential for a dominant negative variant of a protein, and using standard mutagenesis techniques to create one or more dominant negative variant polypeptides. For example, given the teachings contained herein of ASP-1, ASP-2 and I-ASP polypeptides, one of ordinary skill in the art can modify the sequence of the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides by site-specific mutagenesis, scanning mutagenesis, partial gene deletion or truncation, and the like. See, e.g., U.S. Patent No. 5,580,723 and Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. The skilled artisan then can test the population of mutagenized polypeptides for diminution in a selected activity (e.g., p53 binding, modulation of apoptosis) and/or for retention of such an activity. Other similar methods for creating and testing dominant negative variants of a protein will be apparent to one of ordinary skill in the art.

The invention also involves agents such as polypeptides which bind to ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides and to complexes of ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides and binding partners such as p53. Such binding agents can be used, for example, in screening assays to detect the presence or absence of ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides and complexes of ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides and their binding partners and in purification protocols to isolate ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides and complexes of ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides and their binding partners. Such agents also can be used to inhibit the native activity of the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides or their binding partners, for example, by binding to such polypeptides, or their binding partners or both.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

The invention, therefore, embraces peptide binding agents which, for example, can be antibodies or fragments of antibodies having the ability to selectively bind to ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides. Antibodies include polyclonal and monoclonal antibodies, prepared according to conventional methodology.

Significantly, as is well-known in the art, only a small portion of an antibody molecule, the paratope, is involved in the binding of the antibody to its epitope (see, in general, Clark, W.R. (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). The pFc' and Fc regions, for example, are effectors of the complement cascade but are not involved in antigen binding. An antibody from which the pFc' region has been enzymatically cleaved, or which has been produced without the pFc' region, designated an F(ab')<sub>2</sub> fragment, retains both of the antigen binding sites of an intact antibody. Similarly, an antibody from which the Fc region has been enzymatically cleaved, or which has been produced without the Fc region, designated a Fab fragment, retains one of the antigen binding sites of an intact antibody molecule. Proceeding further, Fab fragments consist of a covalently bound antibody light chain and a portion of the antibody heavy chain denoted Fd. The Fd fragments are the major determinant of antibody specificity (a single Fd fragment may be associated with up to ten different light chains without altering antibody specificity) and Fd fragments retain epitope-binding ability in isolation.

Within the antigen-binding portion of an antibody, as is well-known in the art, there are complementarity determining regions (CDRs), which directly interact with the epitope of the antigen, and framework regions (FRs), which maintain the tertiary structure of the paratope (see, in general, Clark, 1986; Roitt, 1991). In both the heavy chain Fd fragment and the light chain of IgG immunoglobulins, there are four framework regions (FR1 through FR4) separated respectively by three complementarity determining regions (CDR1 through CDR3). The CDRs, and in

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

particular the CDR3 regions, and more particularly the heavy chain CDR3, are largely responsible for antibody specificity.

5 It is now well-established in the art that the non-CDR regions of a mammalian antibody may be replaced with similar regions of conspecific or heterospecific antibodies while retaining the epitopic specificity of the original antibody. This is most clearly manifested in the development and use of "humanized" antibodies in which non-human CDRs are covalently joined to human FR and/or Fc/pFc' regions to produce a functional antibody. See, e.g., U.S. patents 4,816,567, 5,225,539,  
10 5,585,089, 5,693,762 and 5,859,205.

Thus, for example, PCT International Publication Number WO 92/04381 teaches the production and use of humanized murine RSV antibodies in which at least a portion of the murine FR regions have been replaced by FR regions of human origin. Such  
15 antibodies, including fragments of intact antibodies with antigen-binding ability, are often referred to as "chimeric" antibodies.

Fully human monoclonal antibodies also can be prepared, for example, by immunization of non-human animals transgenic for human immunoglobulin genes.  
20 See, for example, U.S. patents 5,814,318, 5,877,397, 6,091,001, 6,114,598.

Thus, as will be apparent to one of ordinary skill in the art, the present invention also provides for F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv and Fd fragments; chimeric antibodies in which the Fc and/or FR and/or CDR1 and/or CDR2 and/or light chain CDR3 regions have been  
25 replaced by homologous human or non-human sequences; chimeric F(ab')<sub>2</sub> fragment antibodies in which the FR and/or CDR1 and/or CDR2 and/or light chain CDR3 regions have been replaced by homologous human or non-human sequences; chimeric Fab fragment antibodies in which the FR and/or CDR1 and/or CDR2 and/or light chain CDR3 regions have been replaced by homologous human or non-human  
30 sequences; and chimeric Fd fragment antibodies in which the FR and/or CDR1

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

and/or CDR2 regions have been replaced by homologous human or non-human sequences. The present invention also includes so-called single chain antibodies.

Thus, the invention involves polypeptides of numerous size and type that bind specifically to ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides, and complexes of both ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides and their binding partners. These polypeptides may be derived also from sources other than antibody technology. For example, such polypeptide binding agents can be provided by degenerate peptide libraries which can be readily prepared in solution, in immobilized form or as phage display libraries. Combinatorial libraries also can be synthesized of peptides containing one or more amino acids. Libraries further can be synthesized of peptoids and non-peptide synthetic moieties.

Phage display can be particularly effective in identifying binding peptides useful according to the invention. Briefly, one prepares a phage library (using e.g. m13, fd, or lambda phage), displaying inserts from 4 to about 80 amino acid residues using conventional procedures. The inserts may represent, for example, a completely degenerate or biased array. One then can select phage-bearing inserts which bind to the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide. This process can be repeated through several cycles of reselection of phage that bind to the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide. Repeated rounds lead to enrichment of phage bearing particular sequences. DNA sequence analysis can be conducted to identify the sequences of the expressed polypeptides. The minimal linear portion of the sequence that binds to the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide can be determined. One can repeat the procedure using a biased library containing inserts containing part or all of the minimal linear portion plus one or more additional degenerate residues upstream or downstream thereof. Yeast two-hybrid screening methods also may be used to identify polypeptides that bind to the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides. Thus, the ASP-1, ASP-2 and I-ASP polypeptides of the invention, or fragments thereof, can be used to screen peptide libraries, including phage display libraries, to identify and select peptide binding partners of the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides of the

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

invention. Such molecules can be used, as described, for screening assays, for purification protocols, for interfering directly with the functioning of ASP-1, ASP-2 or I-ASP and for other purposes that will be apparent to those of ordinary skill in the art.

5

It will also be recognized that the invention embraces the use of ASP-1, ASP-2 or I-ASP cDNAs sequences in expression vectors, as well as to transfect host cells and cell lines, be these prokaryotic (e.g., *E. coli*), or eukaryotic (e.g., CHO cells, COS cells, yeast expression systems and recombinant baculovirus expression in insect cells). Especially useful are mammalian cells such as human, mouse, hamster, pig, 10 goat, primate, etc. They may be of a wide variety of tissue types, and include primary cells and cell lines. Specific examples include keratinocytes, peripheral blood leukocytes, fibroblasts, bone marrow stem cells and embryonic stem cells. The expression vectors require that the pertinent sequence, i.e., those nucleic acids 15 described above, be operably linked to a promoter.

The invention also includes transgenic non-human animals. As used herein, "transgenic non-human animals" includes non-human animals having one or more exogenous nucleic acid molecules incorporated in germ line cells and/or somatic 20 cells. Thus the transgenic animal include "knockout" animals having a homozygous or heterozygous gene disruption by homologous recombination, animals having episomal or chromosomally incorporated expression vectors, etc. Knockout animals can be prepared by homologous recombination using embryonic stem cells as is well known in the art. The recombination can be facilitated by the cre/lox system or other 25 recombinase systems known to one of ordinary skill in the art. In certain embodiments, the recombinase system itself is expressed conditionally, for example, in certain tissues or cell types, at certain embryonic or post-embryonic developmental stages, inducibly by the addition of a compound which increases or decreases expression, and the like. In general, the conditional expression vectors used in such 30 systems use a variety of promoters which confer the desired gene expression pattern (e.g., temporal or spatial). Conditional promoters also can be operably linked to

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

ASP-1, ASP-2 or I-ASP nucleic acid molecules to increase expression of these nucleic acid molecules in a regulated or conditional manner. *Trans*-acting negative regulators of ASP-1, ASP-2 or I-ASP activity or expression also can be operably linked to a conditional promoter as described above. Such *trans*-acting regulators

5 include antisense nucleic acids molecules, nucleic acid molecules which encode dominant negative molecules, ribozyme molecules specific for ASP-1, ASP-2 or I-ASP nucleic acids, and the like. The transgenic non-human animals are useful in experiments directed toward testing biochemical or physiological effects of

10 ASP-1, ASP-2 or I-ASP expression. Other uses will be apparent to one of ordinary skill in the art.

The invention also contemplates gene therapy. The procedure for performing *ex vivo* gene therapy is outlined in U.S. Patent 5,399,346 and in exhibits submitted in the file

15 history of that patent, all of which are publicly available documents. In general, it involves introduction *in vitro* of a functional copy of a gene into a cell(s) of a subject which contains a defective copy of the gene, and returning the genetically engineered cell(s) to the subject. The functional copy of the gene is under operable control of regulatory elements which permit expression of the gene in the genetically

20 engineered cell(s). Numerous transfection and transduction techniques as well as appropriate expression vectors are well known to those of ordinary skill in the art, some of which are described in PCT application WO95/00654. *In vivo* gene therapy using vectors such as adenovirus, retroviruses, herpes virus, and targeted liposomes also is contemplated according to the invention.

25 The invention further provides efficient methods of identifying pharmacological agents or lead compounds for agents active at the level of a ASP-1, ASP-2 or I-ASP modulatable cellular function. In particular, such functions include p53 binding, and apoptosis. Generally, the screening methods involve assaying for compounds which

30 interfere with a ASP-1, ASP-2 or I-ASP activity such as p53 binding, etc, although compounds which enhance ASP-1, ASP-2 or I-ASP activity also can be assayed

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

using the screening methods. Such methods are adaptable to automated, high throughput screening of compounds. The target therapeutic indications for pharmacological agents detected by the screening methods are limited only in that the target cellular function be subject to modulation by alteration of the formation of a complex comprising a ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide or fragment thereof and one or more natural ASP-1, ASP-2 or I-ASP intracellular binding targets, such as p53. Target indications include apoptosis.

A wide variety of assays for pharmacological agents are provided, including, labeled *in vitro* protein-protein binding assays, electrophoretic mobility shift assays, immunoassays, cell-based assays such as two- or three-hybrid screens, expression assays, etc. For example, hybrid screens are used to rapidly examine the effect of transfected nucleic acids on the intracellular binding of ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides or fragments thereof to specific intracellular targets. The transfected nucleic acids can encode, for example, combinatorial peptide libraries or antisense molecules. Convenient reagents for such assays, e.g., GAL4 fusion proteins, are known in the art. An exemplary cell-based assay involves transfecting a cell with a nucleic acid encoding a ASP polypeptide fused to a GAL4 DNA binding domain and a nucleic acid encoding a p53 domain which interacts with ASP fused to a transcription activation domain such as VP16. The cell also contains a reporter gene operably linked to a gene expression regulatory region, such as one or more GAL4 binding sites. Activation of reporter gene transcription occurs when the ASP and p53 fusion polypeptides bind such that the GAL4 DNA binding domain and the VP16 transcriptional activation domain are brought into proximity to enable transcription of the reporter gene. Agents which modulate a ASP polypeptide mediated cell function are then detected through a change in the expression of reporter gene. Methods for determining changes in the expression of a reporter gene are known in the art.

ASP-1, ASP-2 or I-ASP fragments used in the methods, when not produced by a transfected nucleic acid are added to an assay mixture as an isolated polypeptide.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

- ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides preferably are produced recombinantly, although such polypeptides may be isolated from biological extracts. Recombinantly produced ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides include chimeric proteins comprising a fusion of a ASP-1, ASP-2 or I-ASP protein with another polypeptide, e.g., a
- 5 polypeptide capable of providing or enhancing protein-protein binding, sequence specific nucleic acid binding (such as GAL4), enhancing stability of the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide under assay conditions, or providing a detectable moiety, such as green fluorescent protein or Flag epitope.
- 10 The assay mixture is comprised of a natural intracellular ASP binding target such as p53 or a fragment thereof capable of interacting with ASP. While natural ASP binding targets may be used, it is frequently preferred to use portions (e.g., peptides or nucleic acid fragments) or analogs (i.e., agents which mimic the ASP binding properties of the natural binding target for purposes of the assay) of the ASP binding
- 15 target so long as the portion or analog provides binding affinity and avidity to the ASP fragment measurable in the assay.

- The assay mixture also comprises a candidate pharmacological agent. Typically, a plurality of assay mixtures are run in parallel with different agent concentrations to
- 20 obtain a different response to the various concentrations. Typically, one of these concentrations serves as a negative control, i.e., at zero concentration of agent or at a concentration of agent below the limits of assay detection. Candidate agents encompass numerous chemical classes, although typically they are organic compounds. Preferably, the candidate pharmacological agents are small organic
- 25 compounds, i.e., those having a molecular weight of more than 50 yet less than about 2500, preferably less than about 1000 and, more preferably, less than about 500. Candidate agents comprise functional chemical groups necessary for structural interactions with polypeptides and/or nucleic acids, and typically include at least an
- 30 amine, carbonyl, hydroxyl or carboxyl group, preferably at least two of the functional chemical groups and more preferably at least three of the functional chemical groups. The candidate agents can comprise cyclic carbon or heterocyclic structure and/or

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

aromatic or polyaromatic structures substituted with one or more of the above-identified functional groups. Candidate agents also can be biomolecules such as peptides, saccharides, fatty acids, sterols, isoprenoids, purines, pyrimidines, derivatives or structural analogs of the above, or combinations thereof and the like.

- 5 Where the agent is a nucleic acid, the agent typically is a DNA or RNA molecule, although modified nucleic acids as defined herein are also contemplated.

Candidate agents are obtained from a wide variety of sources including libraries of synthetic or natural compounds. For example, numerous means are available for  
10 random and directed synthesis of a wide variety of organic compounds and biomolecules, including expression of randomized oligonucleotides, synthetic organic combinatorial libraries, phage display libraries of random peptides, and the like. Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant and animal extracts are available or readily produced. Additionally, natural and  
15 synthetically produced libraries and compounds can be readily be modified through conventional chemical, physical, and biochemical means. Further, known pharmacological agents may be subjected to directed or random chemical modifications such as acylation, alkylation, esterification, amidification, etc. to produce structural analogs of the agents.

20

A variety of other reagents also can be included in the mixture. These include reagents such as salts, buffers, neutral proteins (e.g., albumin), detergents, etc. which may be used to facilitate optimal protein-protein and/or protein-nucleic acid binding. Such a reagent may also reduce non-specific or background interactions of the  
25 reaction components. Other reagents that improve the efficiency of the assay such as protease, inhibitors, nuclease inhibitors, antimicrobial agents, and the like may also be used.

The mixture of the foregoing assay materials is incubated under conditions whereby,  
30 but for the presence of the candidate pharmacological agent, the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide specifically binds the cellular binding target, a portion thereof or

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

analog thereof. The order of addition of components, incubation temperature, time of incubation, and other perimeters of the assay may be readily determined. Such experimentation merely involves optimization of the assay parameters, not the fundamental composition of the assay. Incubation temperatures typically are between  
5 4°C and 40°C. Incubation times preferably are minimized to facilitate rapid, high throughput screening, and typically are between 0.1 and 10 hours.

After incubation, the presence or absence of specific binding between the ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide and one or more binding targets is detected by any  
10 convenient method available to the user. For cell free binding type assays, a separation step is often used to separate bound from unbound components. The separation step may be accomplished in a variety of ways. Conveniently, at least one of the components is immobilized on a solid substrate, from which the unbound components may be easily separated. The solid substrate can be made of a wide  
15 variety of materials and in a wide variety of shapes, e.g., microtiter plate, microbead, dipstick, resin particle, etc. The substrate preferably is chosen to maximum signal to noise ratios, primarily to minimize background binding, as well as for ease of separation and cost.

20 Separation may be effected for example, by removing a bead or dipstick from a reservoir, emptying or diluting a reservoir such as a microtiter plate well, rinsing a bead, particle, chromatographic column or filter with a wash solution or solvent. The separation step preferably includes multiple rinses or washes. For example, when the solid substrate is a microtiter plate, the wells may be washed several times with a  
25 washing solution, which typically includes those components of the incubation mixture that do not participate in specific bindings such as salts, buffer, detergent, non-specific protein, etc. Where the solid substrate is a magnetic bead, the beads may be washed one or more times with a washing solution and isolated using a magnet.

30

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

Detection may be effected in any convenient way for cell-based assays such as two- or three-hybrid screens. The transcript resulting from a reporter gene transcription assay of ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide interacting with a target molecule typically encodes a directly or indirectly detectable product, e.g.,  $\beta$ -galactosidase activity, luciferase activity, and the like. For cell free binding assays, one of the components usually comprises, or is coupled to, a detectable label. A wide variety of labels can be used, such as those that provide direct detection (e.g., radioactivity, luminescence, optical or electron density, etc.) or indirect detection (e.g., epitope tag such as the FLAG epitope, enzyme tag such as horseradish peroxidase, etc.). The label may be bound to a ASP-1, ASP-2 or I-ASP binding partner, or incorporated into the structure of the binding partner.

A variety of methods may be used to detect the label, depending on the nature of the label and other assay components. For example, the label may be detected while bound to the solid substrate or subsequent to separation from the solid substrate. Labels may be directly detected through optical or electron density, radioactive emissions, nonradiative energy transfers, etc. or indirectly detected with antibody conjugates, streptavidin-biotin conjugates, etc. Methods for detecting the labels are well known in the art.

The invention provides ASP-1, ASP-2 or I-ASP-specific binding agents, methods of identifying and making such agents, and their use in diagnosis, therapy and pharmaceutical development. For example, ASP-1, ASP-2 or I-ASP-specific pharmacological agents are useful in a variety of diagnostic and therapeutic applications, especially where disease or disease prognosis is associated with improper utilization of a pathway involving ASP, e.g., apoptosis, etc. Novel ASP-1, ASP-2 or I-ASP-specific binding agents include ASP-1, ASP-2 or I-ASP-specific antibodies and other natural intracellular binding agents identified with assays such as two hybrid screens, and non-natural intracellular binding agents identified in screens of chemical libraries and the like.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

In general, the specificity of ASP-1, ASP-2 or I-ASP binding to a binding agent is shown by binding equilibrium constants. Targets which are capable of selectively binding an ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide preferably have binding equilibrium constants of at least about  $10^7 M^{-1}$ , more preferably at least about  $10^8 M^{-1}$ , and most preferably at least about  $10^9 M^{-1}$ . The wide variety of cell based and cell free assays may be used to demonstrate ASP-1, ASP-2 or I-ASP-specific binding. Cell based assays include one, two and three hybrid screens, assays in which ASP-1, ASP-2 or I-ASP-mediated transcription is inhibited or increased, etc. Cell free assays include ASP-1, ASP-2 or I-ASP-protein binding assays, immunoassays, etc. Other assays useful for screening agents which bind ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides include fluorescence resonance energy transfer (FRET), and electrophoretic mobility shift analysis (EMSA).

Various techniques may be employed for introducing nucleic acids of the invention into cells, depending on whether the nucleic acids are introduced *in vitro* or *in vivo* in a host. Such techniques include transfection of nucleic acid- $CaPO_4$  precipitates, transfection of nucleic acids associated with DEAE, transfection with a retrovirus including the nucleic acid of interest, liposome mediated transfection, and the like. For certain uses, it is preferred to target the nucleic acid to particular cells. In such instances, a vehicle used for delivering a nucleic acid of the invention into a cell (e.g., a retrovirus, or other virus; a liposome) can have a targeting molecule attached thereto. For example, a molecule such as an antibody specific for a surface membrane protein on the target cell or a ligand for a receptor on the target cell can be bound to or incorporated within the nucleic acid delivery vehicle. For example, where liposomes are employed to deliver the nucleic acids of the invention, proteins which bind to a surface membrane protein associated with endocytosis may be incorporated into the liposome formulation for targeting and/or to facilitate uptake. Such proteins include capsid proteins or fragments thereof tropic for a particular cell type, antibodies for proteins which undergo internalization in cycling, proteins that target intracellular localization and enhance intracellular half life, and the like. Polymeric delivery systems also have been used successfully to deliver nucleic acids

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

into cells, as is known by those skilled in the art. Such systems even permit oral delivery of nucleic acids.

5 When administered, the therapeutic compositions of the present invention are administered in pharmaceutically acceptable preparations. Such preparations may routinely contain pharmaceutically acceptable concentrations of salt, buffering agents, preservatives, compatible carriers, supplementary immune potentiating agents such as adjuvants and cytokines and optionally other therapeutic agents, such as chemotherapeutic agents.

10

The therapeutics of the invention can be administered by any conventional route, including injection or by gradual infusion over time. The administration may, for example, be oral, intravenous, intraperitoneal, intramuscular, intracavity, subcutaneous, or transdermal. When antibodies are used therapeutically, a preferred route of administration is by pulmonary aerosol. Techniques for preparing aerosol delivery systems containing antibodies are well known to those of skill in the art. Generally, such systems should utilize components which will not significantly impair the biological properties of the antibodies, such as the paratope binding capacity (see, for example, Sciarra and Cutie, "Aerosols," in Remington's  
20 Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990, pp 1694-1712; incorporated by reference). Those of skill in the art can readily determine the various parameters and conditions for producing antibody aerosols without resort to undue experimentation. When using antisense preparations of the invention, slow intravenous administration is preferred.

25

The compositions of the invention are administered in effective amounts. An "effective amount" is that amount of a composition that alone, or together with further doses, produces the desired response. In the case of treating a particular disease, such as cancer, the desired response is inhibiting the progression of the  
30 disease. This may involve only slowing the progression of the disease temporarily, although more preferably, it involves halting the progression of the disease

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

permanently. This can be monitored by routine methods or can be monitored according to diagnostic methods of the invention discussed herein.

Such amounts will depend, of course, on the particular condition being treated, the severity of the condition, the individual patient parameters including age, physical condition, size and weight, the duration of the treatment, the nature of concurrent therapy (if any), the specific route of administration and like factors within the knowledge and expertise of the health practitioner. These factors are well known to those of ordinary skill in the art and can be addressed with no more than routine experimentation. It is generally preferred that a maximum dose of the individual components or combinations thereof be used, that is, the highest safe dose according to sound medical judgment. It will be understood by those of ordinary skill in the art, however, that a patient may insist upon a lower dose or tolerable dose for medical reasons, psychological reasons or for virtually any other reasons.

The pharmaceutical compositions used in the foregoing methods preferably are sterile and contain an effective amount of ASP-1, ASP-2 or I-ASP or nucleic acid encoding ASP-1, ASP-2 or I-ASP for producing the desired response in a unit of weight or volume suitable for administration to a patient. The response can, for example, be measured by determining the signal transduction enhanced or inhibited by the ASP-1, ASP-2 or I-ASP composition via a reporter system as described herein, by measuring downstream effects such as gene expression, or by measuring the physiological effects of the ASP-1, ASP-2 or I-ASP composition, such as regression of a tumor, decrease of disease symptoms, modulation of apoptosis, etc. Likewise, the effects of antisense ASP-1, ASP-2 or I-ASP molecules can be readily determined by measuring expression of the individual genes in cells to which an antisense composition is added. Other assays will be known to one of ordinary skill in the art and can be employed for measuring the level of the response.

The doses of ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptide or nucleic acid administered to a subject can be chosen in accordance with different parameters, in particular in

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

accordance with the mode of administration used and the state of the subject. Other factors include the desired period of treatment. In the event that a response in a subject is insufficient at the initial doses applied, higher doses (or effectively higher doses by a different, more localized delivery route) may be employed to the extent  
5 that patient tolerance permits.

In general, doses of ASP-1, ASP-2 or I-ASP are formulated and administered in doses between 1 ng and 1 mg, and preferably between 10 ng and 100  $\mu$ g, according to any standard procedure in the art. Where nucleic acids encoding ASP-1, ASP-2 or I-ASP or variants thereof are employed, doses of between 1 ng and 0.1 mg generally  
10 will be formulated and administered according to standard procedures. Other protocols for the administration of ASP-1, ASP-2 or I-ASP compositions will be known to one of ordinary skill in the art, in which the dose amount, schedule of injections, sites of injections, mode of administration (e.g., intra-tumoral) and the like  
15 vary from the foregoing. Administration of ASP-1, ASP-2 or I-ASP compositions to mammals other than humans, e.g. for testing purposes or veterinary therapeutic purposes, is carried out under substantially the same conditions as described above. A subject, as used herein, is a mammal, preferably a human, and including a non-human primate, cow, horse, pig, sheep, goat, dog, cat or rodent.

20 When administered, the pharmaceutical preparations of the invention are applied in pharmaceutically-acceptable amounts and in pharmaceutically-acceptable compositions. The term "pharmaceutically acceptable" means a non-toxic material that does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active  
25 ingredients. Such preparations may routinely contain salts, buffering agents, preservatives, compatible carriers, and optionally other therapeutic agents. When used in medicine, the salts should be pharmaceutically acceptable, but non-pharmaceutically acceptable salts may conveniently be used to prepare pharmaceutically-acceptable salts thereof and are not excluded from the scope of the  
30 invention. Such pharmacologically and pharmaceutically-acceptable salts include, but are not limited to, those prepared from the following acids: hydrochloric,

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

hydrobromic, sulfuric, nitric, phosphoric, maleic, acetic, salicylic, citric, formic, malonic, succinic, and the like. Also, pharmaceutically-acceptable salts can be prepared as alkaline metal or alkaline earth salts, such as sodium, potassium or calcium salts.

5

ASP-1, ASP-2 or I-ASP compositions may be combined, if desired, with a pharmaceutically-acceptable carrier. The term "pharmaceutically-acceptable carrier" as used herein means one or more compatible solid or liquid fillers, diluents or encapsulating substances which are suitable for administration into a human. The term "carrier" denotes an organic or inorganic ingredient, natural or synthetic, with which the active ingredient is combined to facilitate the application. The components of the pharmaceutical compositions also are capable of being co-mingled with the molecules of the present invention, and with each other, in a manner such that there is no interaction which would substantially impair the desired pharmaceutical efficacy.

10  
15

The pharmaceutical compositions may contain suitable buffering agents, including: acetic acid in a salt; citric acid in a salt; boric acid in a salt; and phosphoric acid in a salt.

20

The pharmaceutical compositions also may contain, optionally, suitable preservatives, such as: benzalkonium chloride; chlorobutanol; parabens and thimerosal.

25

The pharmaceutical compositions may conveniently be presented in unit dosage form and may be prepared by any of the methods well-known in the art of pharmacy. All methods include the step of bringing the active agent into association with a carrier which constitutes one or more accessory ingredients. In general, the compositions are prepared by uniformly and intimately bringing the active compound into association with a liquid carrier, a finely divided solid carrier, or both, and then, if necessary, shaping the product.

30

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

Compositions suitable for oral administration may be presented as discrete units, such as capsules, tablets, lozenges, each containing a predetermined amount of the active compound. Other compositions include suspensions in aqueous liquids or  
5 non-aqueous liquids such as a syrup, elixir or an emulsion.

Compositions suitable for parenteral administration conveniently comprise a sterile aqueous or non-aqueous preparation of ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides or nucleic acids, which is preferably isotonic with the blood of the recipient. This  
10 preparation may be formulated according to known methods using suitable dispersing or wetting agents and suspending agents. The sterile injectable preparation also may be a sterile injectable solution or suspension in a non-toxic parenterally-acceptable diluent or solvent, for example, as a solution in 1,3-butane diol. Among the acceptable vehicles and solvents that may be employed are water, Ringer's solution,  
15 and isotonic sodium chloride solution. In addition, sterile, fixed oils are conventionally employed as a solvent or suspending medium. For this purpose any bland fixed oil may be employed including synthetic mono-or di-glycerides. In addition, fatty acids such as oleic acid may be used in the preparation of injectables. Carrier formulation suitable for oral, subcutaneous, intravenous, intramuscular, etc.  
20 administrations can be found in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

In another aspect of the invention, ASP-1, ASP-2 or I-ASP polypeptides or nucleic acids are used in the manufacture of a medicament for modulating apoptosis. The  
25 medicament can be placed in a vial and be incorporated into a kit to be used for treating a subject. In certain embodiments, other medicaments which modulate the same responses or which favorably affect the ASP-1, ASP-2 or I-ASP compositions can also be included in the same kit, such as chemotherapeutic agents. The kits can include instructions or other printed material on how to administer the ASP-1, ASP-2  
30 or I-ASP compositions and any other components of the kit.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

An embodiment of the invention will now be described, by example only, and with reference to the following examples and figures and table;

Figure 1a represents the DNA sequence of ASP-1; Figure 1b represents the DNA sequence of ASP-2; Figure 1c represents the protein sequence of ASP-1; and Figure  
5 1d represents the protein sequence of ASP-2; Figure 1e is a genomic map of ASP-1;

Figure 2a represents a northern blot of ASP-1 mRNA; Figure 2b represents a northern blot of ASP-2 mRNA; Figure 2c represents a northern blot of ASP-1 and ASP-2 mRNA including an actin mRNA loading control;

Figure 3a represents a Coomassie stained SDS polyacrylamide gel of recombinant  
10 GST-53BP; Figure 3b represents a western blot showing the specificity of monoclonal antibody DX54.10 for ASP-2; Figure 3c represents a western blot showing the detection of endogenous ASP-2;

Figure 4a represents a western blot showing the interaction of ASP-2 with p53; Figure 4b represents part of the DNA sequence of the ASP-2/bBP2 plasmid; Figure  
15 4c shows the difference in molecular weight between ASP-2 and ASP-2/bBP2;

Figure 5a represents the stimulation of various p53 specific promoters in the presence of combinations of p53, ASP-1 and ASP-2; Figure 5b represents the stimulation of p53 transactivation by ASP-1 and ASP-2;

Figure 6 represents the stimulation of the PIG-3 promoter by ASP-1 and ASP-2  
20 including a western blot showing expression of various truncated ASP polypeptides;

Figure 7a represents the synergistic effect of ASP-1 and ASP-2 on the apoptotic function of p53; Figure 7b shows the synergistic effect of ASP-2 on the apoptotic function of p53; Figure 7c represents the dominant negative effect of the C-terminal half of ASP-2 on the apoptotic function of p53; Figure 7d represents the synergistic  
25 effect of ASP-2 on the apoptotic function of p53, p73 and p63;

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

Figure 8A is a homology comparison of ASP-1, ASP-2 and I-ASP. Saos2 cells were transfected with either vector, p53 (5 $\mu$ g), I-ASP (10 $\mu$ g) or p53+ I-ASP and then incubated for 16hrs. The cells were lysed in NP40 lysis buffer and 1000  $\mu$ g of lysate subject to an immunoprecipitation performed with polyclonal antibodies to I-ASP  
5 bound to Protein G beads. The presence of p53 was detected by western blotting of the immunocomplexes using rabbit polyclonal p53 antibody CM1, Figure 8B. Saos2 cells were transfected with either ASP-1 (8 $\mu$ g) or ASP-2 (4 $\mu$ g), I-ASP (5 $\mu$ g) and p53 (50ng). 40  $\mu$ l of the corresponding lysates were run on a 10% gel, ASP-1 was detected with V5 antibody, ASP-2 with DX.5410, I-ASP with mouse anti I-ASP  
10 antibody, p53 with DO1 and PCNA with anti-PCNA antibody, Figure 8E.; Figure 8C shows the induction of p53 induced apoptosis by ASP-1 and ASP-2 and the inhibition of p53-induced apoptosis by I-ASP; Figure 8D shows the activation of p53 responsive promoter, Bax by ASP-1 and ASP-2 and inhibition of transactivation by I-ASP.

15

Figure 9A represents the percentage of cells with sub-G1 DNA content (apoptotic cells) in transfected Saos-2 cells expressing p53 (1 $\mu$ g/10 cm dish) or p53181C(1.6 $\mu$ g/10 cm dish) or p53181L (2 $\mu$ g/10 cm dish) in the presence or absence of either ASP-1( 10 $\mu$ g/10 cm dish ) or ASP-2(10 $\mu$ g/10 cm dish). Figure 9B  
20 shows histograms representing the transcriptional activity of either p53 or two of its mutants and the influence of either ASP-1 or ASP-2 (8 and 4  $\mu$ g, respectively) as indicated, by the ability of p53(50-75 ng) ) or p53181C (50ng) or p53181L (50ng) to transactivate the Bax-luc reporter in Saos-2 cells. The fold activation is obtained by the activity of the various p53 constructs in the presence of ASP-1 or ASP-2 over the  
25 activity of the promoter in the presence of the various p53 constructs alone. Figure 9C shows western blots using 40 $\mu$ l of the respective transactivation lysates and the proteins detected with anti p53 (DO1), anti ASP-2 (DX.5410), and anti V5 ASP-1.

Figure 10 represents the DNA sequence of I-ASP;

Figure 11 represents the protein sequence of I-ASP;

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

Figure 12 shows that the apoptotic function of p53 is highly regulated by ASP family members *in vivo*. Wild type p53 expressing cell lines U2OS and MCF-7 were transfected with plasmids expressing proteins as indicated together with a cell surface marker CD20 (A-E). The transfected cells were gated and analysed by FACS. The bar graphs represent the percentage of transfected cells with sub-G1 DNA content, characteristic of apoptosis. The plasmids expressing antisense RNA of ASP-1, ASP-2 and I-ASP are labelled as  $\alpha$ -ASP-1,  $\alpha$ -ASP-2 and  $\alpha$ -I-ASP respectively. The viral oncoprotein E6 of human HPV16 is indicated as E6. In figures 12B and 12D, the cells were transfected with the plasmids as indicated. Subsequently, the transfected U2OS and MCF-7 cells were incubated with medium containing cisplatin at concentrations of 5 and 3  $\mu$ g/ml respectively. 30 hours later, cells were harvested and analysed as above. For F and G, both U2OS and MCF-7 cells were transfected with plasmids expressing proteins as indicated. The co-expression of ASP or p53 and endogenous Bax or mdm2 were visualised after cell fixation, by double immunofluorescence labelling as indicated in figure 12G. For figure 12F, 200 U2OS or MCF-7 cells transfected either with vector alone or ASPP plasmids were examined for the overexpression of endogenous Bax protein. The bar graphs represent the mean value of at least three independent experiments;

Figure 13A illustrates a model describing the interaction of ASP family members with p65, I $\kappa$ B and p53; figure 13B is a graphical representation of the induction of apoptosis in Saos cells by the expression and co-expression of vector encoded ASP-2, I $\kappa$ B, and p53; figure 13C and 13D is a graphical representation of the ability of I $\kappa$ B affect the transactivation function of p53 on Bax and mdm2 promoters in the presence and absence of ASP-2;

Figure 14A is a graphical representation of the ability of wild-type p65 and deletion mutant  $\Delta$ p65 to transactivate a NF $\kappa$ B reporter plasmid; Figure 14B is a graphical representation of the induction of apoptosis in cells expressing and co-expressing p53, ASP-2, p65 and  $\Delta$ p65

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

Figure 15A is a graphical illustration of the ability of Bcl-2 to inhibit the stimulating effect of ASP-1 and ASP-2 on p53H175-L-induced apoptosis; Figure 15B is a graphical illustration of the inability of Bcl-XL to inhibit the stimulating effect of ASP-1 and ASP-2 on p53 H175-L -induced apoptosis; and Figure 15C illustrates the ability of Bcl-2 to inhibit p53-induced apoptosis by ASP-1 and ASP-2;

Figure 16 A illustrates the enhancing effect of I-ASP on the transforming function of E7; Figure 16B illustrates the enhancing effect of I-ASP on cell resistance to cisplatin; and

Table 1 represents a summary of mRNA expression of ASP-1, ASP-2 and I-ASP in 40 pairs of normal and tumour matched RNA samples derived from Grade I and II breast tumours expressing wild-type p53.

#### Example 1

To understand how the ASP family functions *in vivo*, we investigated the tissue distribution of ASP-1 and ASP-2 using northern blot hybridization. As shown in figure 2a and 2b, both ASP-1 and ASP-2 mRNA were expressed in all the human tissues tested with a single transcript at the size of 5.5 to 5kb respectively. However the expression level of ASP-1 and ASP-2 varies. The highest expression levels of ASP-1 and ASP2 were detected in heart, skeletal muscle and kidney. Interestingly, there is a small difference between the expression pattern between ASP-1 and ASP-2. For ASP-1, the highest expression level is in heart, significantly higher than that seen in the kidney and the skeletal muscles. In contrast the expression level of ASP-2 in heart, skeletal muscle and kidney is similar. In addition a relatively high level expression of ASP-1 was also seen in human liver tissues.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

**Example 2**

Knowing that there is a specific tissue distribution pattern of ASP family members at their mRNA levels, it was important to investigate how their expression is controlled at the protein level. We used a GST-fusion protein to generate antibodies to ASP-2.

5 The coding region spanning amino acids 698-1135 of ASP-2 was subcloned into the EcoR1 site of the bacterial expression plasmid pGEX 2TK. The 74 KDa GST-ASP-2 (698-1135) protein was produced as shown in figure 3A. The GST-53BP2 protein was used to immunise rabbits (Eurogentec, Belgium) and mice. The immunised serum derived from the rabbits and the mice were tested using the cell lysates of

10 Saos-2 cells transfected with a expression plasmid of ASP-2 fragment, pCMV Bam neo ASP-2/53BP2 (607-1135). The plasmid was constructed by inserting a PCR fragment of ASP-2 containing the epitope tag of 9E10 at the BamHI restriction site. Using the Saos-2 lysate transfected with ASP-2 expression plasmid pCMV Bam neo

15 ASP-2/53BP2 (607-1135) or the control vector, the specificity of the rabbit polyclonal antibody pAbASP-2/77 and the mouse monoclonal antibodies DX54-10 and DX54-7 was confirmed. As shown in figure 3B, the mouse monoclonal antibody DX54.10 did not cross react with GST protein and could recognise transfected ASP-2

20 expression proteins in Saos-2 cells. DX54.10 only recognised transfected ASP-2 proteins and GST-ASP-2 protein and not GST-p27 fusion protein and is therefore specific to ASP-2.

Since the monoclonal antibody is very specific to ASP-2 in the transfected Saos-2 cells, it allowed us to investigate the expression of the endogenous ASP-2 for the first time. To be sure that the reactive band to the antibody is indeed the endogenous ASP-2, the anti-ASP-2 monoclonal antibody DX54.10 supernatant was treated with either

25 GST protein attached to glutathione beads or GST-53BP2 (698-1135) protein attached to glutathione beads. The beads were incubated with the supernatant for one hour on a rotating wheel. After such time the beads were recovered and discarded. Beads were replaced with fresh beads a total of three times. Figure 3C shows that

30 transfected ASP-2/53BP2 fragment (607-1135) and a specific protein band were recognised by the antibody derived from the supernatant incubated with the GST

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

beads but not the ones incubated with GST-ASP-2 beads. These results demonstrated that the recognised protein in the total cell lysates derived from 293 cells and Tero cells were indeed the endogenous ASP-2 and the monoclonal antibody DX54-10 was very specific to this protein.

5

**Example 3**

Using the anti-ASP-2 antibodies described above, we initially tested whether the interaction between p53 and ASP-2 occurred *in vivo* using exogenously expressed proteins. Expression plasmids were transfected into Saos-2 cells and an immunoprecipitation was performed using the anti-ASP-2 antibody DX54.10 or a control antibody pAb423 (an antibody to SV40 large T-antigen). Western blot analysis of the immunocomplexes of p53 and ASP-2 showed for the first time that these proteins interact *in vivo* (Figure 4A). This interaction was specific because the control antibody did not pull down either p53 or ASP-2. As shown in figure 4A, there was a discrepancy between the migration of endogenous ASP-2 and the transfected ASP-2 (also known as bBP2(130-1135)) proteins on SDS PAGE. One explanation for this could be found from the original sequence of bBP2 (Naumovski and Cleary, 1996). The nucleotide sequence shows that there are two potential ATG codons in 53BP2/bBP2 cDNA at nucleotide position 571 and 757. The 757 codon was shown to be the preferred start site by *in vitro* coupled transcription-translation. This predicts a protein of 1005 amino acid residues in size. Therefore an expression plasmid of 53BP2/bBP2 was constructed using the nucleotide 757 as start site (Naumovski and Cleary, 1996). However based on the result shown in figure 4a, it is clear that the actual protein translation start site is not 757 codon *in vivo*. Using the 5'end of bBP2 sequence to carry out the BLAST search, we discovered that the sequence of bBP2 at the 412 to 514bp has very high homology to vector sequence (EMBO entry of bBP2/53BP2). We re-sequenced this region of ASP-2/bBP2 plasmid and we have demonstrated that this region of sequence does not exist in the sequence which is shown in figure 4B. Since there was a stop codon within the region of 412-514bp of bBP2 sequence in the data base but this part of the sequence does not exist,

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

it allowed us to predict that the start site of ASP-2 is definitely upstream of 757. By comparing with the part of the mouse ASP-2 we obtained (which we carried out by screening the cDNA library with the human ASP-2 cDNA), we believe that the start site for ASP-2 is at the 246bp of the new ASP-2 cDNA sequence. This would make  
5 the ASP-2 protein 1135 amino acids long which would account for the unexpectedly large endogenous protein.

To investigate this further, 53BP2/bBP2 cDNA which contains both ATG start sites (241 and 757) was subcloned into a mammalian expression plasmid pcDNA3. The  
10 resulting plasmid, pcDNA3-ASP-2/53BP2(1-1135) was transfected into Saos-2 cells and the expression of both endogenous and exogenous ASP-2 was detected by anti-ASP-2 antibody DX54-10. As shown in figure 4C, the ASP-2 expressed from the pcDNA3-ASP-2(1-1135) migrated to the same molecular weight as that of endogenous ASP-2. From this result, we conclude that the endogenous ASP-2 uses  
15 the first ATG and the full length ASP-2 should consist of 1135 amino acids. From the results shown here and below, it became necessary to clarify the clone names which correspond to the actual sequences themselves. We thus used the name of ASP-2 to represent the full length protein which contains 1135 amino acids. We used ASP-2/bBP2 and ASP-2/53BP2 to represent the proteins which contains 130-1135  
20 and 607-1135 amino acids respectively.

In addition to the endogenous ASP-2, the ASP-2/bBP2 could also interact with p53 in vivo (figure 4A).

#### 25 **Example 4**

p53 is a transcription factor which transactivates a growing number of target genes including mdm-2, Bax and cyclin G. ASP-2/53BP2 on the other hand was originally  
isolated as an inhibitor of p53 because it can inhibit the DNA binding activity of p53  
30 *in vitro* by binding to the central DNA binding region of p53 (Iwabuchi et al., 1993). So, with respect to p53, ASP-2/53BP2 could be the cellular equivalent of the large T-

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

antigen of SV40 DNA tumour virus. One would then predict that ASP-2 should have oncogenic activity. However, the behaviour of ASP-2/bBP2 demonstrated that it confers growth suppression rather than promoting activity (Naumovski and Cleary, 1996). This discrepancy could be due to the fact that the original clone of ASP-2/53BP2 only contains the C-terminal portion of the protein. It is possible that full length ASP-2 protein would have a different effect on p53 from its C-terminal fragment ASP-2/53BP2. We also do not know what effect ASP-1 would have on the activities of p53.

10 To determine the effect of ASP family members would have on the activities of p53, we first studied p53-dependent transcriptional activity in transient reporter assays. Cells null for p53 were transfected with five p53 reporter plasmids: mdm-2, Bax, cyclin G and p21Waf-1 all derived from the promoters of p53 target genes and PG, a synthetic promoter construct linked to the expression of the luciferase gene. *In vitro* DNA binding assays and the study of mutant p53 transactivation functions have divided some of the known p53 binding sites into two groups (Ludwig et al., 1996). Bax-like sites are usually weak for p53 transcription stimulation while the mdm2-like sites can be stimulated by p53 very effectively. Interestingly, co-expression of ASP-1 or ASP-2 together with p53 resulted in a 10-50 fold stimulation of the Bax promoter. In contrast to the Bax promoter, co-expression of either ASP-1 or ASP-2 with p53 only showed a very modest stimulation of the promoter activity of mdm2 and cyclin G (figure 5A). ASP-2/53BP2 failed to stimulate mdm2 and cyclin G promoters while a slight stimulation on p21waf1 and PG synthetic promoters was seen.

25 The ability of ASP-2/53BP2 to specifically stimulate the promoter activity of Bax but not mdm2 showed for the first time that the promoter specificity of p53 can be regulated in cells. Since Bax is one of the p53 target genes which is pro-apoptotic, we therefore asked whether the ASP family members can specifically stimulate the transactivation of other p53 target genes also known to be involved in promoting apoptosis. One such gene is FIG-3. Using the transient transfection reporter assays

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

shown in figure 5a, we were able to show that both ASP-1 and ASP-2 can specifically stimulate the promoter activity of PIG-3.

5 It was shown recently that the transactivation function of p53 can be co-activated by a general transcription co-activator p300/CBP. Thus it was of interest to us to determine whether the ASP family members act like the p300/CBP-like protein which is not specific to p53 and can stimulate a large number of transcription factors. One of the transcription factors we tested was E2F1. Like p53, the transactivation function of E2F1 can be stimulated by the co-expression of p300/CBP. However, the  
10 co-expression of ASP-1 or ASP-2 with E2F1 failed to stimulate its transactivation function on a few known reporter promoters, including cyclin A, b-myb and the synthetic promoter 3xwt (figure 5B). This result strongly suggests that ASP-1 and ASP-2 stimulate the transactivation function of p53 specifically. Since the general transcription co-activators p300/CBP can bind to and stimulate the transcriptional  
15 activity of both p53 and E2F1, this result also implies that both ASP-1 and ASP-2 can stimulate the transactivation function of p53 independently of p300/CBP.

#### Example 5

20 Knowing that the co-expression of the ASP can specifically stimulate the transactivation function of p53, it was important for us to identify the minimal region of ASP required for such activity. We therefore tested the three different versions of ASP-2 for their effects on the transactivation function of p53. As expected, the co-expression of full length ASP-2 (1135aa) was able to further stimulate the  
25 transactivation function of p53 about 7 fold. Interestingly under the same conditions, the co-expression of ASP-2/bBP2 (1005aa) only stimulated the transactivation function of p53 about 2-fold. In addition, the co-expression of ASP-2/53BP2(607-1135) reduced the transactivation function by about 50%, (Figure 6). Failure to stimulate the transactivation function of p53 by ASP-2/bBP2 was not due to the lack  
30 of expression (figure 6A, lower panel). Thus, ASP-2/bBP2 which lacks only the first 130 amino acids of ASP-2 failed to stimulate the transactivation function of p53

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

significantly. These data suggested that full-length protein (1-1135aa) was required for ASP-2 to enhance the transactivation function of p53. The reduced transactivation function of p53 by ASP-2/53BP2 suggest that ASP-2/53BP2 can act as a dominant negative mutant to inhibit the action of endogenous ASP-2 on p53.

5

**Example 6**

Knowing that ASP-1 and ASP-2 can specifically stimulate the transactivation function of p53 on the promoters of Bax and PIG-3, it was anticipated that when co-expressed ASP-1 or ASP-2 would be able to synergize with p53 to induce apoptosis. It was also hypothesised that if the pro-apoptotic function of ASP-1 and ASP-2 was via their abilities to stimulate the transactivation function of p53, it would have very little effect on the apoptotic function of Bax itself. These hypotheses were tested in Saos-2 cells which are null for p53 and also express a relatively low level of ASP-2. The amount of p53 used in the experiments was determined by titration so that it caused about 17% of transfected cells to undergo apoptosis. Apoptosis was identified by the expression of the co-transfected cell surface marker CD20. Interestingly, the expression of ASP-1 or ASP-2 alone resulted in a lower level of apoptosis, consistent with the observation that either ASP-1 or ASP-2 alone could enhance Bax promoter activity slightly, possibly due to the effect of ASP-1 and ASP-2 on p73 and p63. Co-expression of p53 with ASP-1 or ASP-2 however resulted in a significant increase in the number of cells that die of apoptosis. Approximately 50% of the transfected cells now die of apoptosis (Figure 7A). This synergistic effect in enhancing apoptosis was specific to p53 since co-expression of either ASP-1 or ASP-2 with E2F1 resulted in only an additive increase in the percentage of cells that die of apoptosis (figure 7B).

We also used the ASP-2 mutant, ASP-2/53BP2 to test the hypothesis that ASP can stimulate the apoptotic function of p53 by enhancing the transactivation function of p53. ASP-2/53BP2 was shown to inhibit ASP-2 stimulation of p53 transactivation function of p53 of the Bax promoter. Therefore it was anticipated that the apoptotic function of p53 would not be enhanced if both ASP-2 and ASP-2/53BP2 were co-

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

expressed with p53. This indeed proved to be the case. When ASP-2 and p53 were co-expressed 50% of the cells were apoptotic. However when p53, ASP-2 and ASP-2/53BP2 were all co-expressed, only 30% of cells were apoptotic. Thus, ASP-2 can only enhance the apoptotic function of p53 by increasing its transactivation function (figure 7C).

We also studied the effect of ASP on the apoptotic function of p53 family members, p73 and p63. The results are shown in figure 7D. The co-expression of either ASP-1 or ASP-2 enhances the apoptotic function of all the members of p53 family. These results indicate that the ASP family could be a novel tumour suppressor family.

#### Example 7

A recently isolated sequence, reL Associated Inhibitor (RAI) was identified as a p65 rel A binding protein which contains 315 amino acids. It has a sequence homology to the C-terminal half of ASP-1 and ASP-2 (figure 8A). It is like the ASP-2 mutant, 53BP2/ASP-2(600-1128) in the following characteristics. RAI does not have the  $\alpha$ -helical domain of ASP-1 or ASP-2 but it does contain the proline rich region, the ankyrin repeats and the SH3 domain. The p53 contact residues of ASP-2 are also conserved in RAI. To investigate the activity of RAI which we have named I-ASP, we cloned the coding sequence into a mammalian expression vector pcDNA3. We also synthesised a peptide (RLQPALPPEAQSVPELEE) found in I-ASP which does not have sequence similarity to ASP-1 and ASP-2. A mouse antibody specific to this unique I-ASP peptide did not cross react with either ASP-1 or ASP-2 (data not shown). Using this mouse anti-I-ASP specific antibody to immunoprecipitate the transfected I-ASP in Saos-2 cells, we were able to demonstrate that I-ASP can also interact with p53 (figure 8B). Like the ASP-2 mutant, 53BP2/ASP-2 (600-1128), the expression of I-ASP did not induce apoptosis on its own. When I-ASP was co-expressed with p53, it had a small inhibitory effect on the apoptotic function of p53. The most significant effect of I-ASP on the apoptotic function of p53 was observed when ASP-1 or ASP-2 were co-expressed. In agreement with our prediction, the co-

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

expression of I-ASP inhibited the enhanced apoptotic function of p53 effected by ASP-1 and ASP-2 (figure 8C). Similarly, co-expression of I-ASP together with ASP-1 or ASP-2 was able to completely abolish the ability of both ASP-1 and ASP-2 to stimulate the transactivation function of p53 on the Bax promoter (figure 8D). The co-expression of I-ASP did not significantly alter the expression levels of either p53 or ASP (figure 8E). These results indicated that *in vivo* the pro-apoptotic function of ASP-1 and ASP-2 may be regulated by the natural inhibitor I-ASP. Thus the balance between the expression levels of ASP-1, ASP-2 and I-ASP may determine cell fate, ie whether a cell lives or dies.

10

**Example 8**

Recent studies have demonstrated that some apoptotic-defective mutants of p53 can transactivate the promoters of many p53 target genes including mdm2 and p21waf1 but not the pro-apoptotic genes such as Bax, PIG-3 and IGF-BP3. Among all the p53 mutants studied, two of them, 181L and 181C were of particular interest. The mutation of p53 at residue 181 has been reported in many human tumour types including breast carcinoma and cervical cancer. From the crystal structures of p53 and 53BP2, the residue 181 of p53 was identified as one of the contact sites within p53 for 53BP2 but this residue was not a contact site for DNA. In agreement with the prediction from the crystal structure results, previous studies have shown that both 181L and 181C can bind to DNA and transactivate many promoters of p53 target genes such as mdm2 and p21waf1. Interestingly, however, both mutants have reduced ability to induce apoptosis or suppress transformation. Since the interaction of ASP and p53 can specifically enhance the apoptotic function of p53, we postulated that the reduced apoptotic function of 181L and 181C may be due to some kind of defect in these two p53 mutants to co-operate with ASP to induce apoptosis. Therefore we examined the effect of ASP on the apoptotic function of the two p53 tumour-derived mutants, 181L and 181C. As shown in figure 9A, the co-expression of ASP-1 or ASP-2 failed to enhance the apoptotic function of either of the p53 mutants, even though within the same experiments, the co-expression of ASP

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

enhanced the apoptotic function of wild type p53 significantly. Subsequently, we also examined the effects of ASP on the transactivation function of the p53 mutants. Consistent with the observation that mutation of residue 181 can impair the ability of ASP to activate the apoptotic function of p53, the co-expression of ASP-1 or ASP-2 was unable to stimulate the transactivation function of the mutant p53, 181C on the Bax gene promoter. The effect of ASP on the p53 mutant 181L was also similar (figure 9B). The inability of ASP to stimulate the activities of p53 mutants, was not due to the lack of protein expression (figure 9C). All these results indicate that the failure of ASP-1 and ASP-2 to stimulate the transactivation function of the two p53 mutants on pro-apoptotic genes may provide the molecular mechanism by which these two mutant p53 molecules were defective in inducing apoptosis. This may also explain why the mutation of this site of p53 was selected for in some of the human tumours. The results shown here also demonstrates the importance of the co-activation function of ASP on the tumour suppression function of p53.

15

**Example 9**

All four of the identified 53BP2 contact residues on p53 were found to be mutated in human tumours. Knowing that the expression of ASP-1 and ASP-2 can increase the apoptotic function of p53 significantly, it was predicted that the expression levels of ASP-1 and ASP-2 would be down-regulated in human tumours expressing wild type p53. Consistent with this, the down-regulation of ASP-2 expression has been found in one case of highly malignant human breast carcinoma in a gene array analysis. To provide further *in vivo* evidence, we used a semi-quantitative RT-PCR technique to study the expression levels of both ASP-1 and ASP-2 in a panel of paired normal and tumour RNA samples derived from 40 breast cancer patients. It is important to note that all 40 of the breast carcinomas express wild type p53. The expression levels of ASP-1 and ASP-2 were frequently down regulated in human breast carcinomas (Table 1 and representative data in figure 9D). Among the 40 carcinoma samples, 24 expressed ASP-1 and 9 expressed ASP-2. Interestingly, it was also noted that 8/9 tumours with reduced expression of ASP-2 also had a reduced expression of ASP-1. This expression pattern suggested that the selective pressure of down regulating the

30

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

expression of ASP-1 is higher than that of ASP-2. This is consistent with the fact that in the 40 breast carcinomas tested, the frequency of significantly reduced (greater than 75% reduction in the signal) or lack of expression of ASP-1 was higher than that detected for ASP-2, 60% and 22.5% respectively. Since the results were obtained by  
5 comparing the expression levels of ASP-1 and ASP-2 between normal tissue and carcinomas derived from the same individuals, it demonstrated that there is a selective advantage for the tumour cells to lose the expression of ASP-1 and ASP-2. These results agree with the above observation that the ASP-binding-impaired-p53 mutants, 181L and 181C, can not induce apoptosis efficiently even in the presence of  
10 ASP. This is consistent with the notion that the ASP family of proteins would have a tumour suppressing role in human breast carcinomas.

In contrast to ASP-1 and ASP-2, the expression level of I-ASP was generally low in the normal and human breast tumour tissue samples tested. However, overexpression  
15 of I-ASP was detected in 8 of the tumour tissues compared to their normal paired controls (Table 1 and figure 9D). The most striking phenomenon was the correlation of the normal expression of ASP-1 and ASP-2 with the overexpression of I-ASP. 7 of the I-ASP overexpressing tumours did not have any down regulation of ASP-1 and ASP-2 expression (Table 1). This result supports the argument for the biological  
20 importance of I-ASP as the natural inhibitor of ASP-1 and ASP-2 *in vivo*.

#### Example 10

To study the roles that endogenous ASP family members play in regulating  
25 apoptosis induced by endogenous p53, we introduced ASP-1 or ASP-2 into the cell lines U2OS and MCF7 which express wild-type p53. When expressed in these cells ASP-1 and ASP-2 induced apoptosis (figure 12A). The viral oncoprotein E6, which is derived from human papilloma virus and which can bind and specifically target p53 for degradation, inhibited the apoptosis induced by ASP-1 or ASP-2,  
30 demonstrating that ASP-1 and ASP-2 can induce p53-dependent apoptosis.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

We also studied the dominant negative function of 53BP2 and I-ASP in inhibiting apoptosis induced by endogenous p53 in response to DNA damage. Before exposure to cisplatin, U2OS and MCF7 cells were transfected with plasmids encoding HPV16 E6, I-ASP, or 53BP2. The percentage of transfected cells dying of apoptosis in response to the treatment with cisplatin was then determined by FACS analysis (figure 12B). Treatment with cisplatin induced over 20% of the transfected cells to die of apoptosis. The expression of E6 reduced the percentage of apoptotic cells to below 15% suggesting that cisplatin induces p53-dependent apoptosis in U2OS cells. In agreement with this, expression of I-ASP or 53BP2 was able to inhibit cisplatin-induced apoptosis to a similar extent as E6. These results suggest that the apoptotic function of endogenous p53 can be regulated by the expression of ASP family members.

To demonstrate further that endogenous ASP family members do play significant roles in regulating the apoptotic function of p53, we used an antisense approach. We cloned fragments from the 5' ends of the ASP-1, ASP-2 and I-ASP cDNAs into a mammalian expression vector in an antisense orientation and tested the ability of the antisense RNA to specifically inhibit the protein synthesis of ASP family members *in vitro* (data not shown). Expression of antisense ASP-1 only inhibited apoptosis induced by ASP-1 but not by ASP-2. Similarly, expression of antisense ASP-2 only inhibited apoptosis induced by ASP-2 but not ASP-1. The specific effect of antisense ASP-1 and ASP-2 was further supported by the observation that co-expression of antisense ASP-1 or ASP-2 did not influence apoptosis mediated by Bax under the same conditions (figure 12C). Hence it allowed us to investigate the role of endogenous ASP-1 and ASP-2 in regulating the apoptotic function of endogenous p53 in response to DNA damage. U2OS and MCF-7 cells were transfected with the various expression plasmids prior to the treatment with cisplatin. FACS analysis showed that around 20-30% of control transfected cells undergo apoptosis. Expression of E6 reduced the percentage of apoptotic cells to half, indicating that cisplatin can induce apoptosis through both p53 dependent and independent pathways in these cells. Expression of antisense RNA of ASP-1 or ASP-2 inhibited cisplatin-

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

induced apoptosis to the same extent as E6 (figure 12D), similar to the effects seen with 53BP2 and I-ASP. This suggests that endogenous ASP-1 and ASP-2 play important roles in regulating the apoptotic function of p53 in response to DNA damage.

5

We suspect that the stimulatory effect of the endogenous ASP-1 and ASP-2 on p53 induced apoptosis in response to cisplatin may be under-estimated due to high levels of I-ASP detected in these cells (data not shown) which could prevent ASP-1 and ASP-2 from enhancing the apoptotic function of p53. To study the anti-apoptotic role of I-ASP, both U2OS and MCF-7 cells were transfected with antisense I-ASP. Antisense I-ASP induced p53-dependent apoptosis that was abrogated by the co-expression of E6. Removal of the anti-apoptotic function of I-ASP by antisense I-ASP also enhanced the apoptotic function of ASP-1 and ASP-2 (figure 12E). Unlike antisense ASP-1 and ASP-2, the expression of antisense I-ASP did not inhibit cisplatin-induced apoptosis. A small increase in apoptotic cells was consistently detected (figure 12D). Those results demonstrated that ASP-1 and ASP-2 specifically stimulate the apoptotic function of p53 *in vivo*. Endogenous I-ASP functions as an inhibitor of ASP and can block apoptosis induced by endogenous p53.

20 The antisense nucleic acid molecules were derived from the cDNAs of ASP-1, ASP-2 and I-ASP and were amplified by PCR on the respective plasmid clones using primers spanning the following nucleotide regions (relative to the initial ATG): -74 to 923; -253 to 839 and -37 to 536 for ASP-1, ASP-2 and I-ASP respectively. The amplified segments were purified with the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) and ligated in the pcDNA3.1/V5-His TOPO vector (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The plasmids containing antisense DNA of ASP-1, ASP-2 and I-ASP were produced by means of the QIAGEN plasmid purification kit according to manufacturers instructions.

30

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

**Example 11**

It has been well documented that p53 and p65RelA of NF kappaB play very important roles in regulating apoptosis in response to stress. However, very little is known about how these two apoptotic pathways can work together *in vivo*. Attempts had been made towards the understanding of whether there is a cross-talk between p53 and NF-kappaB. The first evidence came from the recent observation that p53 can induce the DNA binding activity of p65 Rel A. Most importantly Ikb, the inhibitor of p65 Rel A, can inhibit the apoptotic function of p53. However it was not clear how p53 can induce the DNA binding activity of p65 and how Ikb can inhibit the apoptotic function of p53.

Interestingly, it was discovered very recently that both ASP-2 and I-ASP can interact with p65 rel A, a component of NF-kappaB, in a yeast hybrid assay. I-ASP can also inhibit the transactivation function of p65, although less effectively than Ikb. The region required for ASP-2 and I-ASP to interact with rel A p65 is very similar as that required for p53. Therefore it is possible that there might be some competition between p53 and p65 rel A to interact with ASP-2 and I-ASP. Since ASP family members happen to be the common partner between p53 and p65, we speculated that ASP family members may connect the apoptotic function of p53 and NF-kappaB. In this working model (figure 13A), p53 may induce the DNA binding activity of p65 by interacting with the nuclear I-ASP and allow p65 to bind DNA. In addition, Ikb could inhibit p53-induced apoptosis by binding to p65 and releasing I-ASP. The increased nuclear concentration of I-ASP can then interact with p53 and prevent ASP-2 or ASP-1 to stimulate the transactivation function of p53. If this hypothesis is correct, one would expect that the expression of Ikb should have a profound effect on p53 - induced apoptosis in the presence of ASP-1 or ASP-2.

The results shown in figure 13B are consistent with this notion. In the Ikb-expressing cells, 7.2% of the cells die of apoptosis compared to 4.6% of cells transfected with in vector alone transfected cells. The effect of Ikb on p53-induced apoptosis was also

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

minimal since the percentage of apoptotic cells detected in p53 versus p53+Ikb expressing cells were 12% and 11% respectively. This could be due to the very low level of ASP-1 and ASP-2 expression in Saos-2 cells. In agreement with the results shown before, the co-expression of ASP-2 produced a significant enhancement of p53 induced apoptosis. The percentage of apoptotic cells in p53+ASP2 transfected cells was 30%. Interestingly, it is under this setting, the co-expression of Ikb showed the most profound effect. The co-expression of Ikb was able to reduce the amount of apoptotic cells induced by p53 and ASP-2 from 30% to 16%. This result suggested that Ikb could inhibit p53-induced apoptosis by preventing ASP-2 to stimulate p53 function. Similar results were also obtained when Ikb was co-expressed with p53 and ASP-1.

We have shown that ASP-2 can enhance the apoptotic function of p53 by specifically stimulating the transactivation function of p53 on the promoters of pro-apoptotic genes such as Bax. Thus we also investigated the effect of Ikb on the transactivation function of p53 on the Bax and mdm2 promoters in the presence or absence of ASP2, see Figures 13C and D. As shown previously, co-expression of ASP-2 and p53 stimulated the transactivation function of p53 by about 8-fold. Under the same conditions, the expression of Ikb did not show any detectable inhibition on the Bax promoter reporter activity suggesting that Ikb does not inhibit the transcriptional activity of Bax promoter non-specifically in Saos-2 cells. The co-expression of 50ng of Ikb with p53 only showed a very little inhibition on the transactivation function of p53. However, when Ikb, ASP-2 and p53 were co-expressed, Ikb was able to inhibit the ASP-2 mediated stimulation of p53 transactivation function dramatically (figure 13D).

We have shown that ASP-1 and ASP-2 can specifically stimulate the transactivation function of p53 on the Bax promoter but not the mdm2 promoter. Hence, if Ikb was indeed inhibiting the transactivation function of p53 via ASP-2 specifically, it would not be able to show a significant inhibition on the promoter activity of mdm2. Under the same conditions, we also tested the ability of Ikb to inhibit the transactivation

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

function of p53 on the mdm2 promoter activity. As shown in figure 13D, the co-expression of ASP-2 had very little effect on the transactivation function of p53 on the mdm2 promoter. Most importantly, Ikb hardly inhibited the transactivation function of p53 on the mdm2 promoter even in the presence of ASP-2. The results shown here suggest for the first time that Ikb may inhibit the apoptotic function of p53 by preventing ASP-1 or ASP-2 from stimulating the transactivation function of p53.

To further investigate the role of the ASP family in connecting with the p53 and the NFkb pathway, we also studied the effect of the ASP-2 and p65 relA interaction on the apoptotic function of p53. Based on the working model in figure 13A, the p65/ASP interaction may facilitate the nuclear entry of ASP protein, thus allowing the p53/ASP interaction and the release of nuclear I-ASP to bind to the nuclear p65. The residues 176-406 of p65 binds to ASP-2 and I-ASP.

As a transcription factor, p65 can transactivate many target genes. Since p53-induced apoptosis requires p65 and is also correlated with the increased DNA-binding activity of NFkB, it suggested that the DNA-binding activity of p65 may be essential to cooperate with p53 to induce apoptosis. Being able to bind both p53 and p65 places the ASP family of proteins in a central role. One possibility is that ASP binding to p65 may be the mediator for the p53 induced DNA binding activity of p65. However, the co-expression of p53 failed to induce the transcriptional activity of p65 on its reporter. The co-expression of p53 and ASP-2 also failed to show any significant effect on the transactivation function of p65. This result suggested that ASP was not the messenger which delivers the signals from p53 to p65. Nevertheless, ASP could enable p65 to co-operate with p53 to induce apoptosis. We tested whether the action of ASP needed the DNA-binding activity of p65 NFkB. One hundred amino acids of p65 were removed from the N-terminus which contains the DNA binding region of p65. The  $\Delta$ p65 construct thus generated was transcriptionally inactive when tested on the NFkb reporter plasmid. If the ASP-p65 interaction is the mediator of p53 and NFkB pathways,  $\Delta$ p65 would have similar effect on the apoptotic function of p53 as

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

the full-length p65. Otherwise,  $\Delta p65$  would be inactive since it is defective to transactivate any of its target genes (figure 14A). The result shown in figure 14B showed that not only both p65 and  $\Delta p65$  stimulated the apoptotic function of p53 in the presence of ASP2, but that  $\Delta p65$  was even more active than p65 in enhancing the apoptotic function of p53. This may be due to the fact that  $\Delta p65$  is more nuclear than p65. The data obtained from  $\Delta p65$  argue strongly that p65 can influence the apoptotic function of p53 independent of the DNA-binding activity of p65. Hence, the interaction of ASP-2-p65 could be the mechanism of action.

#### 10 Example 12

The anti-apoptotic function of the Bcl-2 oncoprotein has been well established. Interestingly, p53-induced apoptosis can be inhibited by Bcl-2. Furthermore, Bcl-2 can also interact with ASP-2. However, nothing is known about the biological consequences of this interaction. How Bcl-2 inhibits p53-induced apoptosis is also not known. Using the experimental systems mentioned above, we investigated whether Bcl-2 inhibits p53-induced apoptosis by preventing ASP-1 and ASP-2 from stimulating p53.

20 There is increasing evidence to suggest that p53 induces apoptosis through both transcriptional dependent and independent pathways. We have shown that ASP-1 and ASP-2 stimulate the apoptotic function of p53 by specifically enhancing the DNA binding and transactivation function of p53 on promoters of apoptotic genes such as Bax and PIG3. We were also interested in investigating whether ASP can enhance the apoptotic function of p53 independently of its transactivation function. Apoptosis was induced in Saos-2 cells by the expression of wild type p53 or a transcriptionally inactive p53, p53H175-L, a mutant p53 which is targeted to mitochondria by a leader sequence and which is known to induce apoptosis independent of the transactivation function of p53. In agreement with previous reports, the apoptotic function of wild type p53 was stimulated by the expression of ASP-1 and ASP-2. However, the co-expression of ASP-1 and ASP-2 failed to enhance the apoptotic function of

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

p53H175-L. Most importantly, only wild type p53-induced apoptosis was inhibited by the co-expression of Bcl-2. Under the same conditions, co-expression of Bcl-2 failed to inhibit apoptosis induced by p53H175-L (figure 15A). Such selective inhibition of p53-induced apoptosis was not seen with Bcl-XL, another inhibitor of apoptosis in the Bcl-2 family (figure 15B). The close association between the ability of ASP to stimulate and the ability of Bcl-2 to inhibit the apoptotic function of p53 suggests that Bcl-2 inhibits p53-induced apoptosis by preventing ASP from stimulating p53. This was confirmed by the data shown in figure 3C that Bcl-2 very effectively prevented ASP-1 and ASP-2 from enhancing the apoptotic function of p53.

### Example 13

So far we have shown that I-ASP can inhibit p53-induced apoptosis in various cell lines and that its expression level is up-regulated in breast carcinoma cells *in vivo*. All these data suggest that I-ASP could be an oncogene. Since the tumour suppression function of p53 is best linked to its ability to induce apoptosis, it is likely that inhibition of p53-induced apoptosis can remove the tumour suppression function of p53. To test the oncogenic function of I-ASP, rat embryo fibroblasts (REFs) were transfected with plasmids expressing I-ASP and the oncoprotein, E7. The expression of I-ASP enhanced the transforming function of E7 significantly (figure 16A). This demonstrated that I-ASP is indeed an oncogene.

As most of the chemotherapy drugs are DNA-damage agents and induce apoptosis via p53-dependent pathways, we reasoned that the ability of I-ASP to inhibit p53-induced apoptosis may make cells more resistant to the cytotoxic effect of chemotherapy drugs such as cisplatin. MCF-7 cells (a human breast cancer cell line) were transfected with an I-ASP-expressing plasmid. The cellular resistance to the cytotoxic effect of cisplatin were compared between I-ASP-expressing and non-expressing I-ASP MCF-7 cells. The results in figure 16B shows that the expression of I-ASP can enhance the cellular resistance by about 2.5 fold. Such an increase in

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

cellular resistance to cisplatin is biologically very significant with respect to cancer treatment. Hence, the high level of expression of I-ASP not only explains why wild type p53 is not functional in some of the human tumour cells. It may also predict the tumour response to treatments. Finally, using I-ASP overexpressing cells may allow the future identification of a more effective chemotherapy drugs.

#### References

- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., and Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8, 1693-1696.
- 10 Lane, D. P., and Crawford, L. V. (1979). T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.
- Ludwig, R. T., Bates, S., and Vousden, K. H. (1996). Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4952-4960.
- 15 Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumour suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, p293-299.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Oslon, D. C., George, D., and Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237-1245.
- 20 Naumovski, L., and Cleary, M. L. (1996). The p53-binding protein 53BP2 also interacts with bcl2 and impedes cell cycle progression at G2/M. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3884-3892.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305.

25

30

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

Table 1. mRNA expression of ASPP in wild type p53 expressing human breast tumour samples (grade I and II)

Tumour	ASP1	ASP2	I-ASP
1	↓	+	-
2	↓	+	-
3	↓	+	-
4	↓	+	-
5	↓	+	-
6	↓	+	-
7	↓	↓	-
8	+	+	↑
9	↓	↓	-
10	↓	↓	-
11	↓	+	-
12	↓	↓	-
13	↓	↓	-
14	↓	+	-
15	↓	↓	-
16	↓	↓	-
17	+	+	↑
18	↓	+	-
19	↓	+	-
20	+	+	↑
21	+	+	-
22	+	+	-
23	↓	+	-
24	+	+	-
25	+	+	↑
26	+	↓	-
27	↓	↓	-
28	+	+	↑
29	+	+	-
30	↓	+	-
31	+	+	-
32	+	+	↑
33	↓	+	-
34	↓	+	-
35	+	+	-
36	+	+	-
37	+	+	-
38	+	+	↑
39	↓	+	-
40	↓	+	↑

45

50

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

**CLAIMS**

1. An isolated polypeptide comprising:
  - i) at least one ankyrin repeat;
  - 5 ii) an  $\alpha$  helical domain; and
  - iii) a SH3 domain;characterised in that said polypeptide is capable of inducing at least the apoptotic function of p53.
- 10 2. An isolated polypeptide according to claim 1 wherein said polypeptide is characterised by being capable of binding to an antibody to the intact native protein.
3. An isolated polypeptide according to claim 1 or 2 which comprises a sequence contained in amino acid sequence 1-130 of figure 1d.
- 15 4. An isolated polypeptide according to any of claims 1-3 wherein said polypeptide is of mammalian in origin, ideally human.
5. An isolated polypeptide according to any of claims 1-4 wherein said amino  
20 acid sequence represented in Figure 1d is further modified by deletion, addition, substitution of at least one amino acid.
6. An isolated nucleic acid molecule comprising a DNA sequence selected from:
  - (i) the DNA sequence as represented in Figure 1a or 1b;
  - 25 (ii) DNA sequences which hybridise to the sequence presented in Figure 1a or 1b and which encode a polypeptide according to any of Claims 1-5; and
  - (iii) DNA sequences which are degenerate as a result of the genetic code to the DNA sequences defined in (i) and (ii).
- 30 7. An isolated nucleic acid molecule according to Claim 6 which anneals under stringent hybridisation conditions to the sequence presented in Figure 1a or 1b.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

9. An isolated nucleic acid sequence according to Claim 6 or 7 wherein said nucleic acid molecule is cDNA.
- 5 10. An isolated nucleic acid molecule according to Claim 6 or 7 wherein said nucleic acid molecule is genomic DNA.
11. A vector comprising the nucleic acid molecule according to any of Claims 6-10.
- 10 12. A vector according to Claim 11 wherein said vector is adapted to facilitate recombinant expression of the polypeptide according to any of Claims 1-5.
13. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule according to any of Claims 6-10.
- 15 14. A cell which has been transformed/transfected with the nucleic acid according to any of claims 6-10 or the vector according to Claim 11 or 12.
- 20 15. A method for the production of the polypeptide according to any of Claims 1-5 comprising:
- (i) providing a cell transformed/transfected with the nucleic acid molecule according to any of claims 6-10;
  - 25 (ii) growing said cell in conditions conducive to the manufacture of said polypeptide; and
  - (iii) purifying said polypeptide from said cell, or its growth environment.
16. A method according to claim 15 wherein said nucleic acid molecule is the vector according to claims 11 or 12.
- 30

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

17. A method according to Claim 16 wherein said vector encodes a secretion signal to facilitate purification of the polypeptide according to any of claims 1-5.
18. An antibody, or binding part thereof, directed to at least part of the polypeptide according to any of Claims 1-5.
19. An antibody according to Claim 18 wherein said antibody is a monoclonal antibody.
20. An antibody according to Claim 19 wherein said antibody is a humanised, non-human antibody.
21. A pharmaceutical composition characterised in that said composition comprises the vector according to Claim 11 or 12.
22. A pharmaceutical composition characterised in that said composition comprises the polypeptide according to Claims 1-5.
23. A pharmaceutical composition according to Claim 21 or 22 which also includes a diluent, carrier or excipient.
24. A method of treating cancer comprising administering to an animal an effective amount of the polypeptide according to any of Claims 1-5 or the vector of Claim 11 or 12.
25. A method according to Claim 24 wherein said animal is human.
26. A method according to Claim 24 or 25 wherein said method induces apoptosis.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

27. The polypeptide according to any of claims 1-5 or the vector according to claim 11 or 12 for use as a pharmaceutical.
28. Use of the vector according to Claim 11 or 12 for the manufacture of a medicament for use in the treatment of cancer.
29. Use of the polypeptide according to any of Claims 1-5 for the manufacture of a medicament for the treatment of cancer.
- 10 30. A method to screen for agents capable of modulating the activity of the polypeptide according to claims 1- 5 comprising:
- 15 i) providing a cell which expresses the polypeptide according any of Claims 1-5;
- ii) exposing the cell to at least one agent to be tested; and
- 15 iii) monitoring the effect of the agent(s) on the activity of the polypeptide.
31. A method to screen for agents capable of modulating the activity of the polypeptide according to any of claims 1 – 5 comprising:
- 20 i) providing the polypeptide according any of claims 1-5;
- ii) exposing the polypeptide to at least one agent to be tested; and
- iii) monitoring the binding of said agent(s) by said polypeptide.
32. Agent(s) identified by the methods of claims 30 or 31.
- 25 33. Agent(s) according to claim 32 wherein said agent is an agonist which promotes the activity of the polypeptide according to claims 1- 5.
34. Agent(s) according to claim 32 wherein said agent is an antagonist which inhibits the activity of the polypeptide according to claims 1-5.
- 30 35. Agent(s) according to any of claims 32-34 wherein the agent is a polypeptide.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

36. An isolated nucleic acid molecule selected from the group comprising:
- i) the DNA sequence as represented in Figure 10;
  - ii) DNA sequences which hybridise to the sequence presented in Figure 10
- 5 which encode an inhibitor of the tumour suppressor polypeptide according to claims 1-5; and
- iii) DNA sequences which are degenerate as a result of the genetic code to the DNA sequences defined in (i) and (ii).
- 10 37. An isolated nucleic acid molecule which anneals under stringent hybridisation conditions to the sequence presented in Figure 10.
38. An isolated polypeptide comprising:
- iv) at least one ankyrin repeat;
  - 15 v) a SH3 domain; and
- characterised in that said polypeptide is capable of inhibiting the p53 stimulatory activity of the polypeptide according to any of claims 1-5.
39. An isolated polypeptide according to claim 38 wherein the polypeptide
- 20 further comprises a proline rich region.
40. An isolated polypeptide, as represented by the amino acid sequence of Figure 11, which is further modified by deletion, addition, substitution of at least one amino acid.
- 25 41. An isolated polypeptide according to any of claims 38-40 wherein the polypeptide is of human origin.
42. An assay to detect the presence of the polypeptide according to any of claims
- 30 1-5 or any of claims 38-41 comprising:
- i) providing a sample to be tested;

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

- ii) providing conditions suitable for the detection of the polypeptide by an agent;  
and
  - iii) detecting the presence of the polypeptide by the agent.
- 5 43. An assay according to claim 42 wherein the sample is a tissue sample.
44. An assay according to claim 43 wherein the tissue sample is breast tissue.
45. An assay according to any of claims 42-44 wherein the agent is an antibody.
- 10 46. An assay according to claim 45 wherein the assay is an immunoassay.
47. An assay to detect the presence of the nucleic acid according to any of claims 6-10, or claims 36 or 37 comprising:
- 15 i) providing a sample to be tested;
  - ii) providing conditions suitable for the detection of the nucleic acid by an agent;
  - iii) detecting the presence of the nucleic acid by the agent.
- 20 48. An assay according to claim 47 wherein the sample is a tissue.
49. An assay according to claim 48 wherein the tissue sample is breast tissue.
50. An assay according to any of claims 47-49 wherein the agent is a nucleic acid
- 25 capable of hybridising to said nucleic acid.
51. An assay according to claim 50 wherein the nucleic acid is at least one oligonucleotide.
- 30 52. An assay according to claim 51 wherein the assay is a polymerase chain reaction assay.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

53. A pharmaceutical composition comprising an antibody capable of binding to the polypeptide according to any of claims 38-41.
- 5 54. A pharmaceutical composition according to claim 53 wherein the antibody is a monoclonal antibody.
55. Use of an antibody capable of binding to the polypeptide as represented in Figure 11, or homologue thereof, for the manufacture of a medicament for the treatment  
10 of cancer.
56. Use of an antibody according to claim 55 wherein the cancer is breast cancer.
57. An antisense nucleic acid molecule comprising an antisense sequence(s) of a sense sequence(s) according to any of Claims 6-10.  
15
58. An antisense nucleic acid molecule according to claim 57 comprising an antisense sequence of a sense sequence represented in Figure 1a or 1b, or part thereof.  
20
59. An antisense nucleic acid molecule according to Claim 57 or 58 wherein said antisense sequence comprises nucleotides -253-839 of a sequence represented in Fig 1b, or part thereof.
- 25 60. An antisense nucleic acid molecule comprising an antisense sequence(s) of a sense sequence(s) according to Claim 36 or 37.
61. An antisense nucleic acid molecule according to Claim 60 comprising an antisense sequence of a sense sequence represented in Figure 10, or part thereof.  
30

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

62. An antisense nucleic acid molecule according to Claim 60 or 61 wherein said antisense sequence comprises nucleotides -37-536 of the sequence represented in Figure 10, or part thereof.
- 5 63. A pharmaceutical composition comprising an antisense molecule according to any of Claims 57-62.
64. A vector comprising a nucleic acid molecule according to Claim 36 or 37.
- 10 65. A screening method for the identification of agents with cell-growth inhibitory activity comprising:
- i) providing a polypeptide encoded by the nucleic acid selected from the following group;
    - a) a nucleic acid according to Claim 36 or 37
    - 15 b) nucleic acids which hybridise to the sequences of (a) above which encode an inhibitor of the tumour suppressor polypeptide according claims 1-5
    - c) nucleic acid sequences which are degenerate as a result of the genetic code to the sequences defined in (a) and (b) above;
  - 20 ii) providing at least one candidate agent;
  - iii) providing a preparation forming a combination of (i) and (ii);
  - iv) detecting or measuring the cell growth inhibitory activity of the agent; and optionally
  - v) testing the effect of the agent on the growth and/or cell division of a selected
  - 25 cell type.
66. A method according to claim 65 wherein said polypeptide is encoded by the nucleic acid sequence represented in Figure 10.
- 30 67. A method according to claim 65 or 66 wherein said polypeptide is expressed by a cell.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

68. A method according to claim 67 wherein said cell is a cancer cell.
69. A method according to any of claims 65-68 wherein said polypeptide is over-  
5 expressed.
70. A method according any of claims 65-69 wherein said cell is transformed/transfected with the nucleic acid according to claim 36 or 37 or the vector according to Claim 64.
- 10 71. A combined pharmaceutical preparation comprising at least one antisense nucleic acid molecule according to any of Claims 60-62 and a chemotherapeutic agent.
- 15 72. A preparation according to Claim 71 wherein said chemotherapeutic agent is an anti-cancer agent selected from the group consisting of: cisplatin; carboplatin; cyclophosphamide; melphalan; carmusline; methotrexate; 5-fluorouracil; cytarabine; mercaptopurine; daunorubicin; doxorubicin; epirubicin; vinblastine; vincristine; dactinomycin; mitomycin C; taxol; L-asparaginase; G-CSF; an enediyne such as  
20 chaliceamicin or esperamicin; chlorambucil; ARA-C; vindesine; bleomycin; and etoposide
73. A preparation according to Claim 72 wherein said agent is cisplatin.
- 25 74. A combined pharmaceutical preparation comprising the composition according to Claim 53 or 54 and a chemotherapeutic agent.
75. A preparation according to Claim 74 wherein said chemotherapeutic agent is  
30 an anti-cancer agent selected from the group consisting of: cisplatin; carboplatin; cyclophosphamide; melphalan; carmusline; methotrexate; 5-fluorouracil; cytarabine; mercaptopurine; daunorubicin; doxorubicin; epirubicin; vinblastine; vincristine;

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

dactinomycin; mitomycin C; taxol; L-asparaginase; G-CSF; an enediyne such as chalicheimicin or esperamicin; chlorambucil; ARA-C; vindesine; bleomycin; and etoposide.

5

76. A method for the preparation of monoclonal antibodies which bind amino acids 1-130 of the sequence presented in figure 1d comprising the steps of:
- a) immunising an immunocompetent mammal with an immunogen wherein said immunogen comprises a polypeptide having the amino acid sequence as represented by amino acids 1-130 of figure 1d ;
  - b) fusing lymphocytes of the immunised immunocompetent mammal with myeloma cells to form hybridoma cells;
  - c) screening monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells of step (b);
  - d) culturing the hybridoma cells producing monoclonal activity to proliferate and/or to secrete said monoclonal antibody; and
  - e) recovering the monoclonal antibody from the culture supernatant.

77. A method according to claim 76, wherein said immunocompetent mammal is a mouse.

78. A method according to claim 76, wherein said immunocompetent mammal is a rat.

79. A method according to any of claims 76-78, wherein said mouse is transgenic for human immunoglobulin genes or chromosomal nucleic acids containing human immunoglobulin genes.

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

Figure 1a

1/48

GAGCCCGCATCCCGCCAGCTGCGGCTCGCCGGCCGGCCGGGAGG  
 ACGCCGGGGAGCCCGGCTTAGGAGCGCCCGGAGCGGTGGCCACAGCT  
 CGCCCGGAGCTCTGTGAGCGCCCGCCGAGGGCGTCCCGGACTCTCCCC  
 GCGATGATCCGATGATATTAACGTFTTCTTGAACAAATGAACAGATTT  
 AACAGAGTTCCTATAACCCGGAAACACCTGTCCAGATGTTGAGAAAT  
 TGCAGGACCTGGAGAGGAGGAGTGCATTTAGCTGAAGTGTGGAGGGA  
 AATGAACCTCCATCCCTTTGATCATATGATGTACGACATCTTCAGATATG  
 GGGTCCACGGAGGAGGAAAGTGAATTTTCTTCGACAGAGACTCCCA  
 ACTGAGAACAGTGAACAGGTGGCCCTCAGACCCAGGACACGAACTCAG  
 AGAAATGTATAAATGTACCTGGAGATAAACCTACTGAATATGGGGTGGGT  
 ATCCACGTGTAGAACTTACCTCTCAGAGCTCCAGATATGAGGAGTGGCA  
 ACAGCAGCAGATGAAATCAGCAGCAGATGTTGGTTCGACAGGAAACGGT  
 TTACATTTCTAAGAACAGGAGCCCGTACAGCAGCTATTTCTGAAA  
 ATGAAAAGCTTCAGAAATGAAAGAACGATTTGAGCCAGGAAACAGC  
 TGAGAAATTCGTGCAATGAGAGGACAGTCCACTACAGAAATCATGA  
 ACGCAATCTGTCTGCGTAAATAGAAAGTTCAGTGCATGTTCCAGGAAA  
 GAAGCAGGAGTACAGACTGCAATTTAAGGGTGTACAGTGTAGTCAGCAA  
 TTGGAGATTTAAAGAAAGGAAACTGAATGGGTTCAGTCTTAAATGGCA  
 AATGACGGGACAGCGGCGGTGGAGTTAAAGACTGTACCAAGACTAC  
 AGATTCGTAAACAACTAACAGGAAACAAATTCAAAATTCAGCAGCAGAA  
 GGAATCTTAAATAAGCGCAACATGGAGTGGCCATGATGGCAAGCGAATC  
 AGTGAATCGCTGACCTCTATGGGAAAAAATTCAGCTGAACCGGTGA  
 ATGGCAGCTCATCCACAGTCCCTCTGAGCACATCGGGCAGGCTCGTGC  
 TGTGGGGCTTATATCCAGGTTCCCACTGCCGAGCTTTCTGTGTGGGG  
 ACCCTAATAAGCCCGAGTCTCTAGTATTTGCTCAATGTCTCATGGAAGA  
 TCCAAATCCSCTAATGATGGAACTGGCCACATTAACAGAAATCTAGCT  
 CTTCCTGAACAGTGCAGGTGGCCGTCAGACTGGAGGATCCGAGCGT  
 GGAGGGTCTGTCAAGCAGGCACTGTCTCCAGCCAGCTGTGCCCTTCTCA  
 GCATGGGACCCAGGAAAGCGGCACTCCAGATTTGGTAAAGTGCACCTC  
 CCATCCGGGTGTAGGCAAGCGCTGCCCAAGTATGGGACATAACCAAG  
 TCTTACACCTCTGGTCTGGTGCACAGCTCCCTGGAAAGGAGGAGAA  
 GGCAGCTTGGCCAGGCCAGTGCAGGCTGCCAAGTGCACAGGGCCACCC  
 TGTCGCCCGCCAGGACAGCCCGCCAGCCAGGCTCCCTCAGAACAGATCA  
 GCAGAGGATTTCCGTACCGCCAGTCCCACTGACCGCCAGGGGACCACT  
 GCATTTCCAGCTGGGACAGCAAGCTGAACTCCACTGACAGTGCACATTA  
 GGCTTTCTGTGGTGAATAAAGGTCAGGCCACAGTCTCCAGGAAAGGACC  
 CCAGCAGTGAATCAAGTCCATATATCCATGTACCTCCAGCAAGCCACA  
 CCACCTAAGAAATCCAGCCGGCAGCACAGCCCTTAATAAGTCAATTA  
 AAGCAGTGTATGTAAGCCGTTTACCTTCSGGTCAAGCTCTCCATCGCGG  
 CTGCGTFTTCTCACGGTCACTGTCCAGGGCACACAGGCTCGGCCBCC  
 TTAGAAAGTACTTAGAAGAGCTTACAGCGGATGSCCCCGCCCGCCGCA  
 GATCCAGCACCTGGAGAGCTTGCACGGCCACTCAGCCCAACCAAGCTCA  
 CCCCCATCTCATTCGCACTGCTACTACAGAGTGTGCGACTTGGAGGC  
 CCTCCGACAGCTGGCCAGCGCCCGCCCGCCCTGAAAGGCTCAGCTCC  
 ATCACAGACCCGAGGCCCCCGCGGCCCAACATCCAGAGCTGCTGTACC  
 AGCGCTCACACCTTGGCCGTTGACATGGAGGCAACCCCTTCTACAGCC  
 CAGCCCTCCAGGACTTCTAGGCACTTGGCCGATGTGACATGAAAC  
 ACCAATGCCAATGAACCTGGAAGACTCCCCCTGCCCAGCCACAGCC  
 CACTCCCGCTGAGCTGCCCGTCTACAGATGCCAATGATATGAGTTACCT  
 TCCCGCAACAGGAGGACTCATCTGTCCCAACCCCGCCCAACTGCGG  
 AGCCCGCAGAGGACATACACACAGTGGCCCGGTCGCCACCCAGGAGC  
 AGATCCCGAGTCTGTGGTGGGCCCTCTCCAGGGAGGAGAGTCCCG  
 TCCAGCACCTTTCCTCCCTGCCAGCCACCTCTCCACCTCCACGAACAAC  
 GGACCAACTTGAAGAGCCCACTCGAGCGGAGCGGGCAGCGGCTGAGG  
 TCCGTTTACCCCTGGCCTGCTCCTAGACGCTCTCTGGAAGGAGGATC  
 GATCTGGTCAAGGATCATATGAGTGGAGATCCAGCAAGCCACAG  
 ATGAGGGATCACCCACTGCACACCGCTGTGCGCCGGCCACCATCAT

Figure 1a continued

2/48

CCTGAAGTTCCTGCTGGATTFTGGTGTCAAGTGAATGCTGCTGATGATG  
 GATGGAGGCCCTGCACTGGCTGGCTCTTTGTAACAGGCTTCACTCTGCNAA  
 CAGCTGGTGGAGAGTGTGGCGCCATTTTGGCTCAGCCATPARGCGAGATG  
 AACTGCTGCAGACAACTGTGAGGAGATGGAGGAGGCTACATCCAGTGTG  
 CAGTTTCTATATGGGTGCAGGAAAGCTGGGTGTATGACAAAGTGTG  
 GCATATGCTCTGTGGGACTACGAGGCCAGACAGTACAGTGTCTCTTCC  
 ACGAGGGGACGCCCTCAACCTCTGAGGSCAAGGACGAAAGGCGACTG  
 AGTGTGGTGGGCTGGCTTGGAGCCGGGAGGGCTATGTCGCCAAAACCT  
 GCTGGGGCTGTCTCCAGGATCAACCCCGACAGCAGCTGGCTGACT  
 CCTTTGGAGCACCGCATGGTCTTGCAGCTACAGGAGCCACTTAAGAGAT  
 TATTTGCTGTTTTCCAGGAAAGCTGCAGTAGAAAATGTTAATGTTGCT  
 CACTTTAGCAGACAGCGTCCAAATGTGAATCTTACAGTTTCCAGGTGAGGC  
 CCTTTCCAGTTTCCCATTAACCTGGGAGGACTTTCCGCTCCAGGACT  
 GAATTTGGCAATTACTATAAATCCAAATAAATACCACCTTCAAAAACCCCA  
 CCCCTCTGGCAATTAAGAACTCCATAAACCCTGGTGGTTGCCATGAAGAC  
 AGAGCTCTTACTGACTTGGCCCCGAGGCCATCACCCCTCCAGCAGTGAAC  
 ACTGTCGGCTGTGAGGCTCTCCCTGCGACCCGCTGCCCCCGTCAAC  
 CGAATCGGACACTCATCTTCTCAGACTTCCACACATGATCTTCTCCCTT  
 CATCACCAAGGAGCCTCTGTATGGAACATGCCAGTGTGCTGCCAGTG  
 TGTATGCTCCAGTACCCACTCTGTGGCCGCTTGGGGTTCCGCTTCCCT  
 GTTCCAGTTACCTAAAGCTGATTTGTAGGCCAGCAGCTGGCTGGACT  
 GCCGGCCACGGGACCCAGGACCCCTAAGACCAAGTACAACTGGGAGAGC  
 CTCAGCATATPACTTCTCCGCCATCACAGCCTGTCTGCTGCTCAGTGT  
 GGTCTCACCCCTGCAAGCTCAAAATCAGTTCCCTGAATGGAGTCAAGTGTG  
 GAGGCCGTGGCAGCGAGGTTGGTGGGGTGGGGCTGGGGTGGACTGGT  
 GTGAGGGCAGACCGGCCAGGTAGACGGGGCTGTGGTGGCTGAGGAT  
 GGCAGGCGCTGGTGTGAGGAGGGGCCACCAAGSAGCAGCAGTGGGG  
 CAGAGAGCTGGGGTCAGGGGCCCCCTCTCTCCGATCTCCCTGCTGGG  
 CTGGCTGTAGGCCACTTTGTCCAGGCCAGCTCAAGGCAAGGAGGGCG  
 CTTCACTGAGGTGAATGTACTACAGGCTTTTATATACCAAAAGTATTT  
 TTGACTAGACCATCAAGTACCCCAACTATGTTGAAATTTTTTTTTTTCT  
 CATTAAAATACAGGCCCTTAGGCTCATTTTTCATGATGAGTCTGTGTAAT  
 TTATGTAATAATGTGTACAGACTCACTGATGACAGCTGTAGCCCATCACC  
 TTGGAGCACTGACTGTACATAGTGGTGAAGAAAAGTGAACGCCCTGTAG  
 AGCAGCCCGACACAGGAGCATGGCCGCTGCCAGCCAGACGCTGTGACGC  
 TGCTAAAATGTGCACATAAACCCGTTCAACCCG

WO 02/12325

PCT/GB01/03524

Figure 1b

3/48

GTCACGAGCGTGGARAGACAAGCCGCGTCAGGGGGCCCGGCGGGGGCGG  
 GGGAGCCCGGGCTTGTGTGTGCCCGCCGCGCGCGGGGGCCCTTCGGACC  
 CGCGCGCCCGCGCTGCGCGCCCGCCGCGCTCGACACAGCTCCGGCGGGCTC  
 GCTCTCCGCTCCCTCCCGCGCATCCGCGACCTCCGGGGCACTCAGCTCGE  
 CCGGGCCCGAGCTGGCCACCGCTTCCATGCGGTTCGGGTCCAGATGAT  
 GCCGATCTTCTTACCGTGTATCTCAGTRACAATGAGCAGCACTTCACAGAG  
 TTCAGTTTCTCCAGAACAAATATGACAGAGCGTGGTGGATCTGTGCAAGA  
 :ACCCGGGAGAGTGAATGCCATTGGCTGAAGTGTGGTGTGGCTCTGAACGT  
 CCAGTTGCGGATATGAGCGAATGTTGTATGTTCTCAACGATTTGGAACTCA  
 GAGGAACGAGTTCGCTCTCTCTCGTCATGACCGCCCGCTGGCAGGGAC  
 ATTTGTGAGTGGACCAAGATCTCAGGATCCAGTTTAAAGAAATGGTGTAA  
 AAGTTCTGTTGATATCGAAGAAAGGAGACGGTGTAAATAGTCTAGGAT  
 GGATCTGACTTCTGCTGAACTCAGGAAATGGCATCTCGCCAGCAGCAAG  
 ATTTGAAGCCCGCAACAAATGCTGGCACTAGGAAACAGCGCTTAAAGTTT  
 TGAACAACAAGATCAGCGACACAGCAAGTTGCTGAGCAGGAGAAAC  
 TTRAAAGGCTAAAGAAATAGCTGAGAAATCAGGAGCTAAGCTAAAAAAG  
 TGAAGGACTTAAAGGCCACCTGGAAACAGAAAGACTAAGCAATGGGAAC  
 TTGTGGAGGAAATGACAGAPGAATAATTTGTTCCAGCAAAAACAGAGGA  
 GCTCTGCTCGCTGTGTCAAAGTAGAAGACTGACAGGCGAGCTAGAGATG  
 CTCAAGAACGGCAGGATCGACAGCCCGCTGACAAATCAGTCTGAGTGGCTG  
 AGCTTGAATCGCTCTATAGGAGCTGACGCTAAGAAACAATTTGAATCAAG  
 GCAGAAATGCCAGCTACAACAACAGAGGGAGTGTGAATAAGCTAATCA  
 GAAGTGGCAGTCAATGATPAGCGTGTATGAGCTGAGGGACCGGCTGTGA  
 AGAAAGGCGAGCTCTACAGCAAAAAGAAATCTACCAGTTTCACTGATGG  
 AAATCTTCCCGAGCAAGCCGCTCAGCCCAAGCCGTTGGCTGCAATAGT  
 CCTATATCCAGTCACTACTATGCTCGGATGCCCTCAAGGCTGAAATGCT  
 GGTGAAGCCAGCCCTGCCGATGTTCTTGTGCTCAATGAGGCTTCAGAGGG  
 CCGATGAAATAACAGCACTGCCCAACATGAGATCTGGGGCTGCTTCAAAA  
 CTAAGGCTTAAATCCATCCAGTTGGCCCTGATTTGGAGTCTTCAATGCA  
 GATCTTTCCCAAGCCAGGCTCTGCTTCTGTACTCAAGCACTGGGAATGC  
 TCTGGATCAAGTTGATGATGGAGGTTCCGCTGAGGGAGAGAGAGAA  
 AGTGGCTCCGTTCTCAATGTTGATGAGTAGACAGTCCCAATGCCCACTT  
 CCTTTGGTACTCTGAGGAGAACACAGAGCAGTGAAGATATCTTGGGGATGC  
 TCAGTTGCAAAATAAAATGTGGCTAAAGTACCACCTCTGTCTTCAAAA  
 CCAAAACAGATTAATTTGCCCTAATTTGGAACAACATCAAGCACTTCAGA  
 CATTAAGCCAGACGGAAGTTCTCAGCAGTTGTCAACAGTTGTTCCGTTCCATGG  
 GAATAAACAACAGCAGGCGCAGCGCGAGAGTGTCTATCTCCCA  
 ECATACCTTCGGTTGGCCAGACCAAGCCCTTCTCCAGGTTTAAAGCAGA  
 AAGTCCACCTGCTGCTGCCGTCGGCCCTTACTTCCAGGCTTCCAAAGACA  
 CCTTACTTCCACCTTTCAGAAAACCCAGACCGTGGCAGCAAGTTCAATATAT  
 TCCATGTATACGCAACAGCGCCCGCCAGAAABAATCTCCAGCAGGCTGTGC  
 AGAGCGGTTGACCAAGACTCATACAGAGGGCCACTTTTCAAGTGTATA  
 TGGTAAGCCTGAAATGCTGCTGCCAGAAATCABCAGCAGCACCAGAGAAC  
 ATTTATTCCAATAGCCAGGGCAAGCCTGGCAGTCCAGAACCTGAAACAGAGC  
 CTGTTTCTCAGTTGAGGAAACATGAAAACGAAAGAAATCTCGGCCACT  
 CAGCCCACTAAATTAAGCTTCTTCTTATCTAATCTTACCAGAACAGAGTG  
 ATGCTGACCTAGAACCTTACGAAAGAAATGCTAACGCAACAGGCTCT  
 AANGAAACSTAGTTCTATTACAGAGCCAGAGGTTCTAATGGCCAAATATT  
 CAGAGCTTTATATCAGAGGACCCATAGCGCCATGGAGACCATCTCTG  
 TCCATCATCCCAATCCAAAGTCAAGCTTCTGTGACTCCAGCTCAGAAAGCCCA  
 GTAGAAATCCGAAATCCATATTACATGTGGAGCCCGAAAGGAGGTTGCT  
 CTCGTTCTCTGAAATCATTTGCCCGAGGATTTGGGAAATGCCAGTACAGA  
 GAACAGTCAATGCGACTCTTCTCCAGGCTTGAATATGAGCCTGAGGGA  
 GTCCCGACACAGCCCAATCTCCAGATACCCAGAAAGAACCAATCCA  
 GAGCTCCACATCTGCTTCAATGTCTGCTGGAGAGTACCTTCCATACCCAC  
 CCCCACATACCTTGGGAGCCTGAAAGGCGCCGAGAGACTCGGTGAG  
 CATGCGCCCGCTGAAATCACCGGCGAGTCTCTGCTTCTGTTAAAGG

Figure 2b

4/48

ACAAACTTGGCTAAACTGGCTCAGAGCGTATCGCTCATGGAATGAGGGTGA  
AATTC AACCCCTTGCCTTACTGTAGATTGGTCTTTGGAGGGAGAAATTGAC  
CTTGTACAGAGAAITTTATGAGGTTGATGACCCAAAGCCTGCCAATGATG  
AAGGCATCAGGCCTTCCACAATGCTGTGTGTCAGGCCACACAGAAATCGT  
TAAGTCCCTGGTACAGTTGGTAAATGTAATGCTGCTGATAGTATGGAT  
GGACTCCATTACATGTGCTGCTCATGTAAACACCTCCAACTGTGTAAGTTT  
TTGGTGGAGTCAGAGCCGCTGTGTTGCCATGACCTACACTGACATGCAGA  
CTGCTGCAGATAGTGCAGGAAATGGAGGAGGCTACACTGAGTGCCTCCA  
ATTTCTTTATGGAGTTCAGGAGAGATGGGCATTAATGAATAAAGGAGTCAAT  
TATGCGCTTTGGGATTAAGACCTCAGAATGATGATGAGCTGCCCATGAAG  
AAGGAGCTGCATGACAATCATCCACAGGAGAGCAGAGATGAATCGAAT  
GGTGTGGGGCCCTTAATGATAAGGAGGATATGTTCCACGTAACCTTGCT  
GGGACTGTACCCAGCAATTAACCAAGACAAAGGAGCTTGGCCTGAACCTC  
CACACAGAAITTTAGTCAATGAAGAATTAATCTCTGTAGAAAGAGTAATA  
CGATTATTTTGGCAAAAATTCACAAGACTTATTTAATGACATGTAGCTT  
GAAAGGATGAAGATGTCCTAGAAGAGAAATGAGGATGAGAAATTCAC  
CATTAGAGGACATTTAGCGTATGAAAATAAGCATCTACCTCAGCAGGCCAT  
ACTGTGTGGGCAAGGTTGCCGTGTCAGACTCAGATAAGTATACAGCGA  
CAATCCTGTTTCTACAAGATCTGCTAGTAAATAGGATCAITTTATGGGC  
AGTTGGAAATCAGCTCTCTGCTGTTGAGTGTTCAGCAGCTGCTCTAA  
ACCACTCCTCCTGCCGAAAGGACCAAGTCCCGTCACTCCGCTGCTCTGATTG  
TCCCGGCACCAAGCCCTTGGGCTCACTGAAGGCTCGAAGGCACTGCAC  
ACCTTGTATATTGTCAGTGAAGAAGCTTAGTGGTTGTCAGTGAACAATAACT  
TTAATATAGTTTTTTGAGCATCTTAAGAAATTAACATATGTTGAAATATT  
GAAACTAAGCTACAGTACCAGTAATTAGATGTAGAACTTGTGTTGAGGCTG  
AATTTAATCTGATTTATGCTTTTGTATCTCAGAAATTAGAAACTTGCATC  
AGACTTACCGTAATATTTGCAAGATCATAGCTGACTTTAAAAACAGTTGTA  
ATAAACTTTTGTATGCT

Figure 1c

5/48

APHPAAAAASPRPGRARRRRERGLRRRPERWAQLGAERPVRRRFRASRTLPAAMPMILT  
 VFLSNNEQLTEVPITPETCRDVEFCKEPGEGSCHLAEVWRGNERPFPFDHMMYEHLLQI  
 WGPRRREVKFFLRHEDSPTENSEQGGRRQTQEQRTRQNVINVPDKRTEYGVGYPRVELT  
 LSELDQMAAARQQQIENQQQMLVAKEQRLHFLKQQRERQQQSISENEKLLQKLERVEA  
 QENLKKIRAMRGQVDYSKIMNGNLSAEIERFSAMFQEKKEQVQTAILRVDQLSQQLED  
 LKKGKLNQFQSYNGKLTGPAAVELKRLYQELQIRNQLNQEONSKLQQQKELLNKRNME  
 VAMMDKRSELRERLYGKKIQLNRVNGTSSPQSPSTSGRVAAVGPHYQVPSAGSFPVLG  
 DPKPOSLSIASNAAHGRSKSANDGNWPTLKNSSSSVKPVQVAGADWKDPSVEGSVKQ  
 GTVSSQPVPSALGPTKPGIEIGKVPPIPGVGKQLPPSYGTYPSPTPLGPGSTSLERRKE  
 GSLPRPSAGLPSRQRPTLLPATGSTPQPGSSQQQRISVPPSPTYPPAGPPAFAPAGDSKPEL  
 PLTVAIRPFLADKGRSPQSPRKGPQTVNSSSIYSMYLQQAATPPKNYQAAHSAALNKSVKKA  
 VYKPVLPSSGTSPLPFLHGLSLGTGPQPPSESTEKEPEQDGAAPADGSTVESLPRP  
 LSPKLTPIVHSPLRYQSDADLEALRRKLANAPRPLKRRSSITEPEGPGGGPNIQKLLYQRF  
 NTLAGGMEGTFPHYQSPSQDFMGTLADVDNGNTNANGNLEELPFAQFTAPLPAEPAPSS  
 DANDNELPSPPEELICPQTTHTQAEPAEDNNNNVATVPTTEQIPSPVAEAPSPGEEQVPP  
 APLPASHPPATSTNKRNLKKNSEKRTGHGLRVRFNPLALLDASLEGEFDLVQRITYEV  
 EDPSKPNDEGITPLHNAVCAHHHIVKFLDFGVNVNAADSDGWTPLHCAASCNSVHLC  
 KQLVESGAEIFASTISDIETAADKCEEMEEGYIQCSQFLYGVQEKLGVMNKGVAAYALWD  
 YEAQNSDELSEFGDALTLRRKDESETEWWARLGDREGYVPKNLLGLYPRIKPRQRT  
 LA\*TSFWS\*AWSCQLPGAT\*EIIVLF\*SRKAAARKWS\*WCSL\*QTASTM\*ILQFPGEALSPV  
 CPLTGRGTFASKD\*ILPITDNPKNYPLSKHPPLPLRSPITPGWLPVKTEALDLPAPRPSPPP  
 AVNTVRRCEACSPATALPPVTESDTHPFSHPHMLLPFITKGASVWKHVQCCPVCMP  
 STHSARPPWGFRLPQFT\*RLIVQAQHCGWTAAPRAPGLRPSDNWESLSIYSSPPISQPV  
 MLLSVVLT\*PASSNSVP\*MESGAGGRGSGGWLGLGLGVDWCEGRPGPGRRGCLVPEGW  
 QTPGVRRGRHQGAAAGAEELGSGATPLCRSPCLGWL\*GHLCPRPSLKARRALH\*GVNCT  
 YRLFYQKYFLTRPFKATRIMLEIFFFLIKIQLRLYFSCMSRV\*FM\*KCVYRLTDAAL\*P  
 TLEH\*LYIVW\*RKVNALVEQPDHRSMAAASPDAAADV\*MCTINPSHP

Figure 1d

6/48

VTSVEETKPRQGARFGRGSPGLVGPAPARAEGPSDPRAAAAAAASQVRAASLSAPLPR  
IRDPPGHLSSAGAAVWPFASMRFGSKMMFMLTVYLSNNEQHFEVPTPETICRDVVD  
LCKEPGESDCHLAEVWCGSERPVADNERMFDVLQRFQSQRNEVRFLLRHERPPGRDIVS  
GPRSQDPSLKRNGVKVPGEYRRKENGVNSPRMDLTLAELQEMASRQQQIEAQQQLLA  
TKEQRLKFLKQQDQRRQQQVAEQEKLKRLKEIAENQEAKLKKVRALKGHVEQKRLSNG  
KLVEEIEQMNNLQKQRELVLAQSKVEELTRQLEMLKNGRIDSHHDNQSAAVIELDRL  
YKELQLRNKLNQEQNAKLQQQRECLNKRNSEVAVMDKRVNELDRLLWKKKAAALQKQ  
ENLPSVSSDGNLPQQAASAPSRVAAVGPPYQSSTMPRMPSPPELLVKPALPDGSLVIQASE  
GPMKJQTLNMRSGAASQTKGSKJHPVGPDWSPSNADLFPSQGSASVPQSTGNALDQVD  
DGEVPLREKEKKVRPFMSFDAVDQSNAPPSFGTLRKNQSSIEDILRDAQVANKNVAKVPP  
PVFTKPKQINLPYFGQTNQPPSDIKPDGSSQQLSTVVPMTGPKPKPAGQQPRVLLSPSIPSY  
GQDQTLSPGSKQESPPAAAVRPFQPSKDTLLPPFRKPTVAASSIYSMTQQQAPGKN  
FQQAVQSALTKTHTRGPHFSSVYGKPVIAAAQNOQQHPENIYNSQKPGSPETEPVS  
SVQENHENERIPRPLSPTKLLPFLSNPYRNQSDADLEALRKKLSNAPRLLKRRSSITEPEGP  
NGPNQKLLYQRTTIAAMETISVPSYPSKASVTASSESPVEIQNPYLHVEPEKEVVSIVPE  
SLSPEDVGNASTENSMDPAPSPGLDYEPGVDPNSPNLQNNPEEPNPEAPHVLDVYLEEY  
PPYPPPPYPSGEPGEGEDSVSMRPEITGQVSLPPGKRTNLRKTGSERIAHGMRVKFNPL  
ALLDSSLEGEFDLVQRHIEVDPPSLPNDEGITALHNAVCAHTEIVKFLVQFGVNVNA  
ADSDGWTPLHCAASCNNVQVCKFLVESGAAVFAMTYSDMQTAADKCEEMEEGYTQCS  
QFLYGVQEKMGIMNKGVYIALWDYEPQNDDELPMKEGDCMTIHREDEDEIEWWAR  
LNDKEGYVPRNLLGLYPRKPRQSLA\*NFHTEP\*SMKN\*SLLRRSNTIFGKNFTRLLJMT  
M\*LESDEECL\*KRMKD\*RIHH\*RTFSVMK\*SIYVSRPYCVGAKVSRVALR\*VYSDNPVY  
KNPV\*\*IGSFIGQLGNQLSVLLSVFSSCS\*TSPPARKDQCRHIAVSDCPRHQALGLTEGSK  
ALHTLYIVSEER\*LVVSEQ\*LYYMSFCSILRIHMFELKLSYSTSN\*M\*NLVCRLLNFNLYLL  
SFVSKLETCYRLTRNICQDHS\*L\*KQL\*\*TF\*C

Figure 1e-1

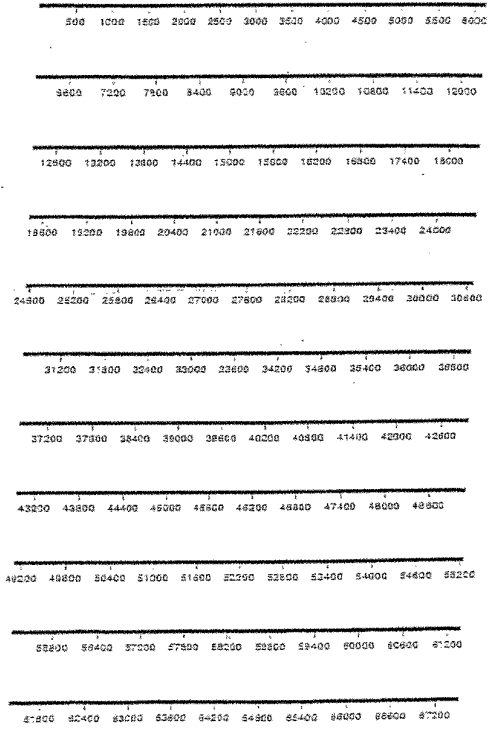


Figure 1e-2

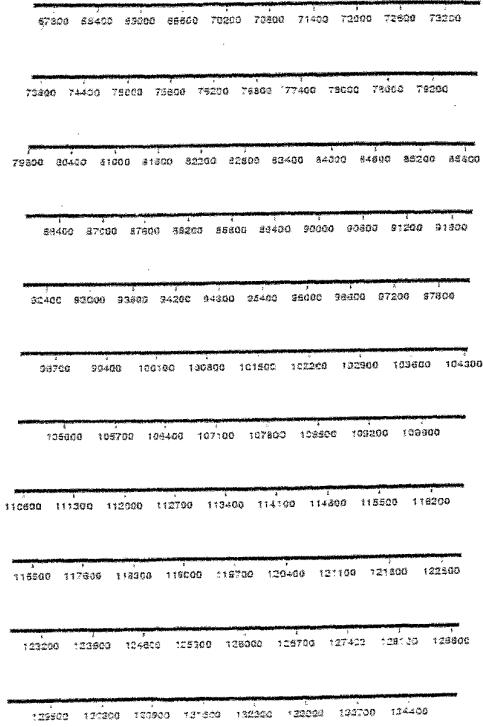


Figure 1e-3

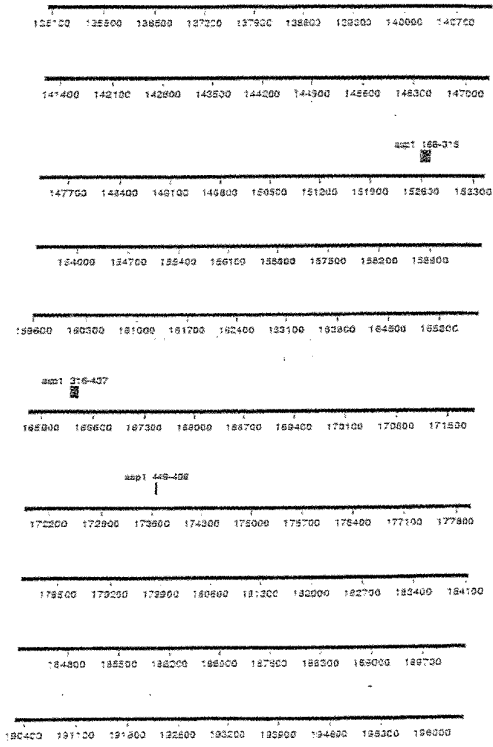


Figure 4

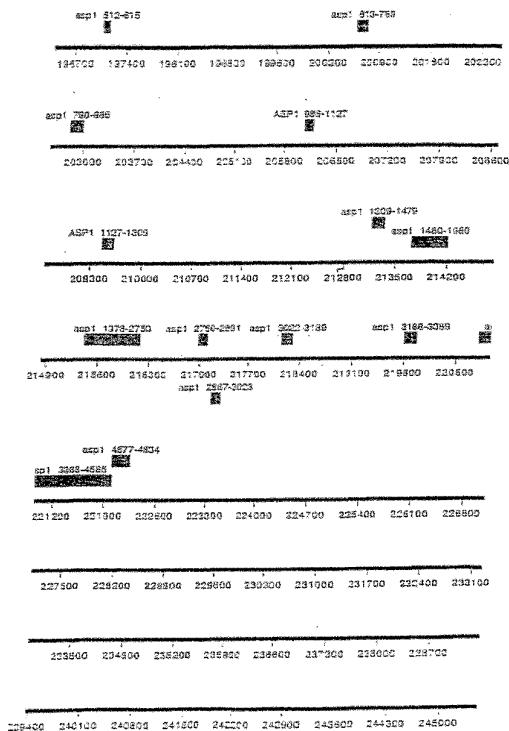
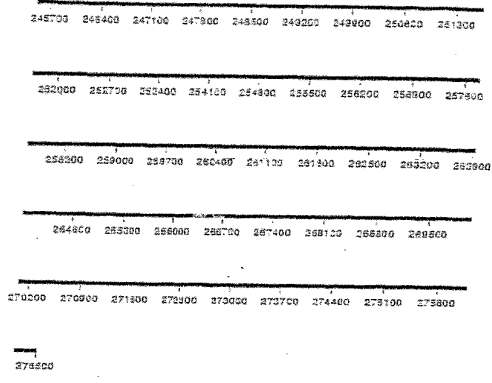


Figure 1e-5



WO 02/12325

12/48

PCT/GB01/03524

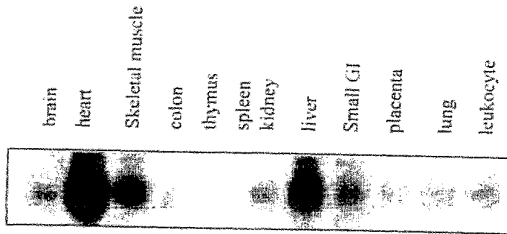


Figure 2A

WO 02/12325

13/48

PCT/GB01/03524

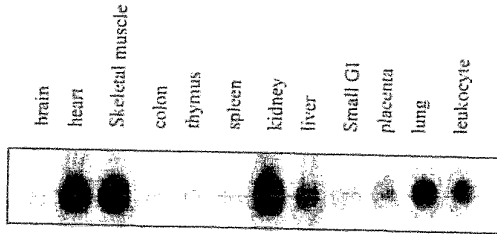
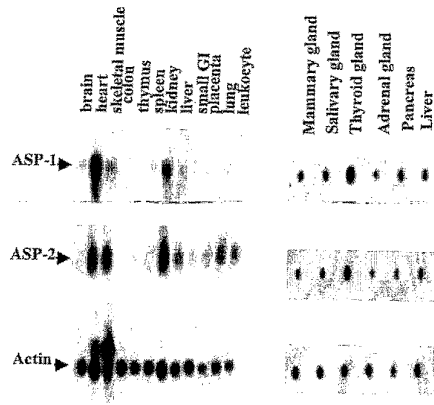


Figure 2B

Figure 2c 14/48



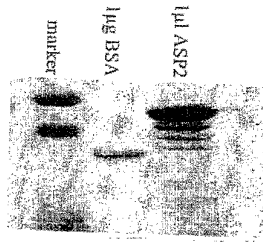


Figure 3A

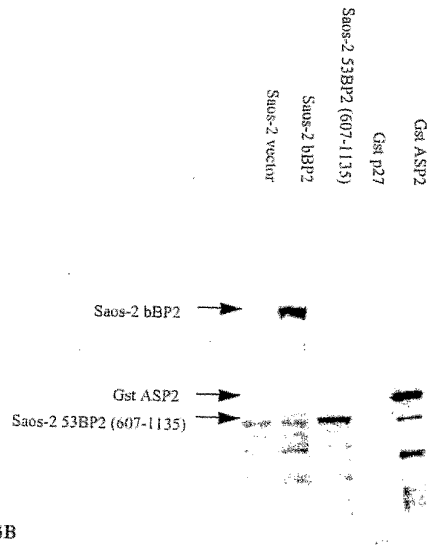


Figure 3B

WO 02/12325

17/48

PCT/GB01/03524

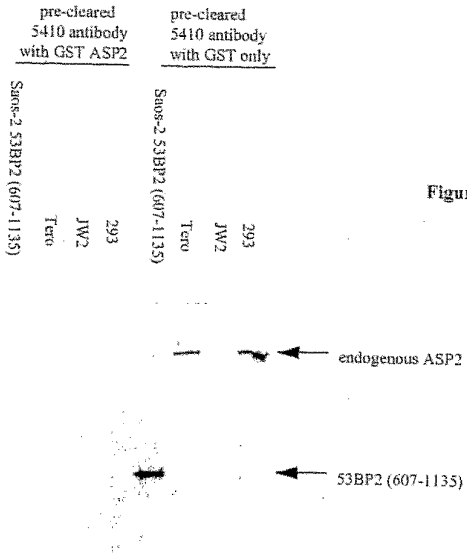


Figure 3C

WO 02/12325

18/48

PCT/GB01/03524

Figure 4A

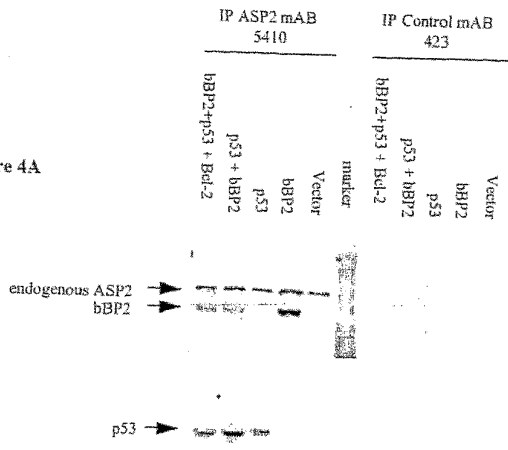
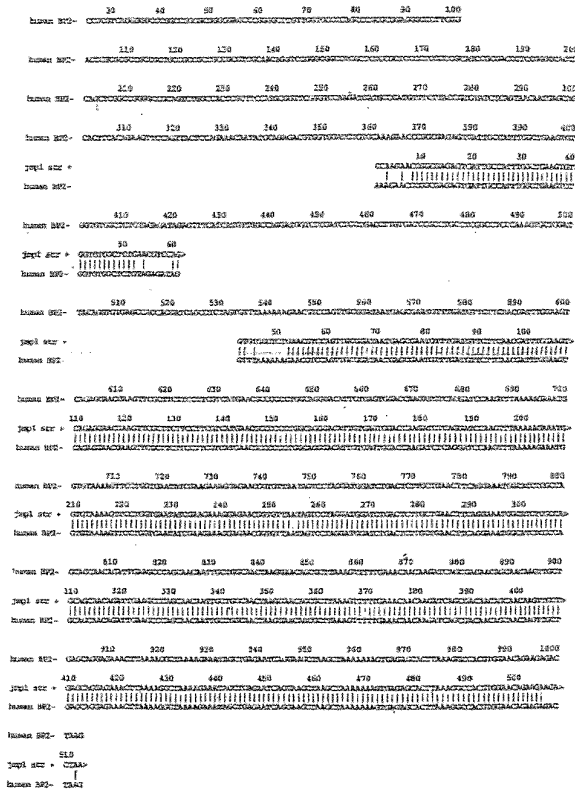


Figure 4b



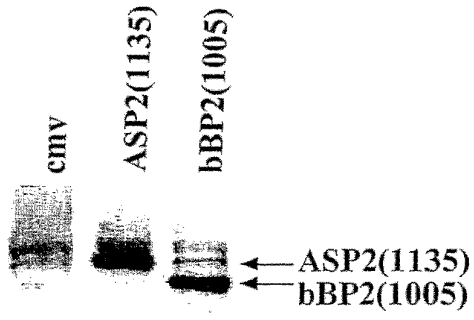


Figure 4C

Figure 5A

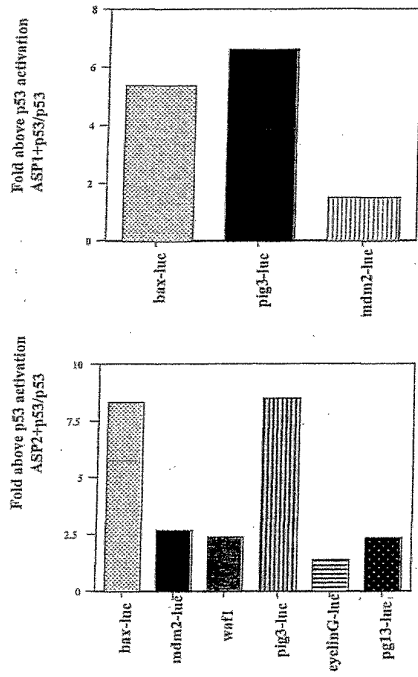
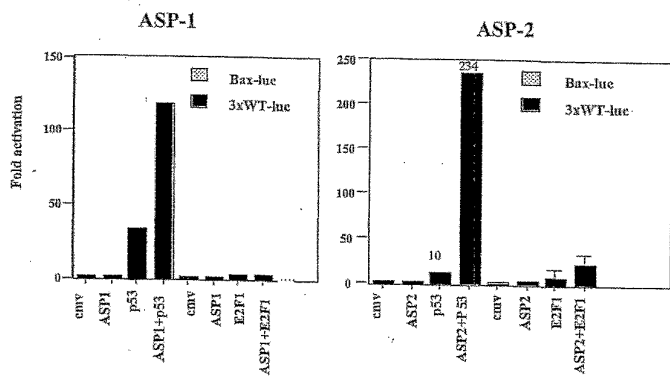


Figure 5B



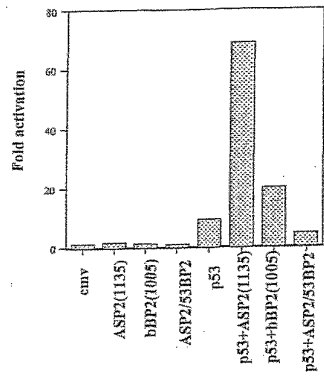
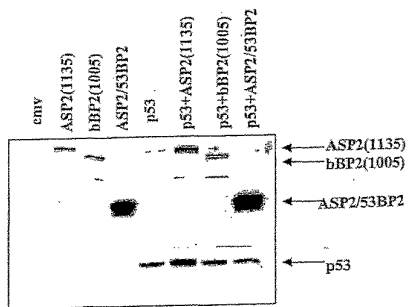


Figure 6



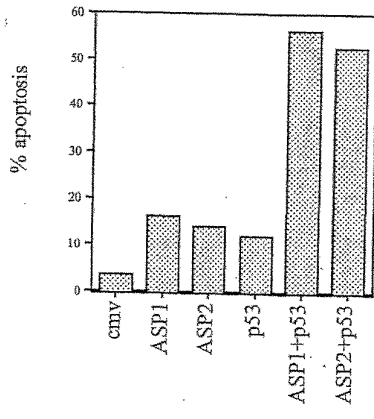


Figure 7A

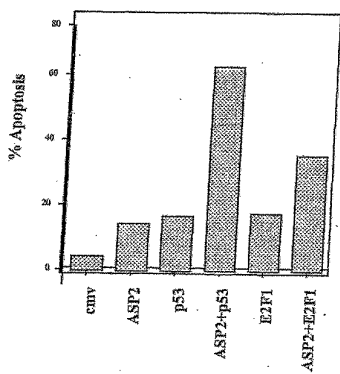
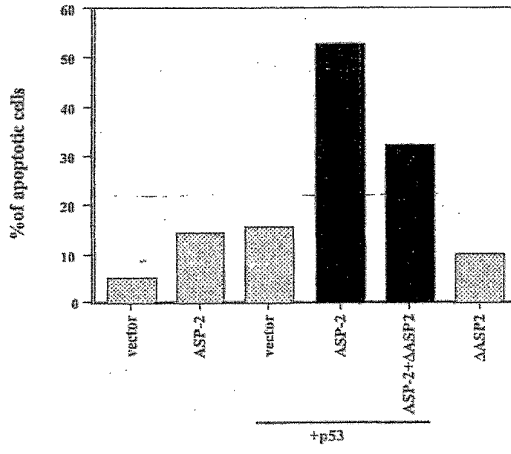


Figure 7B

Figure 7C



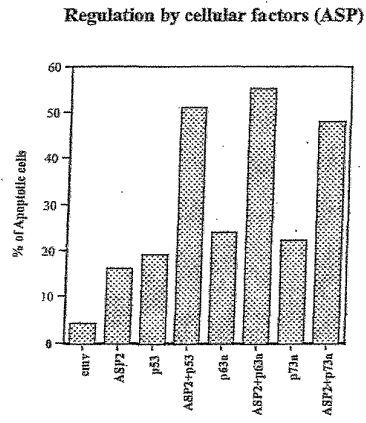


Figure 7D



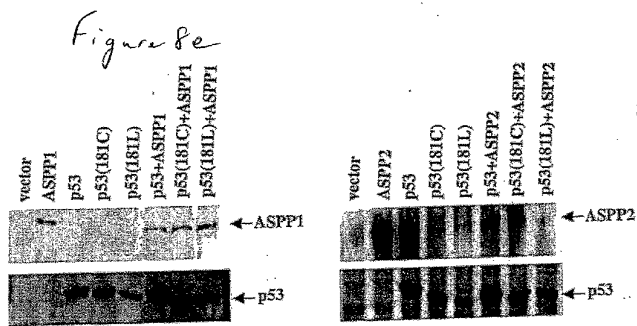
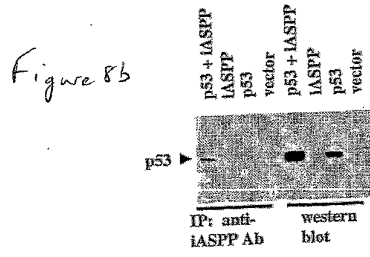


Fig. 8c

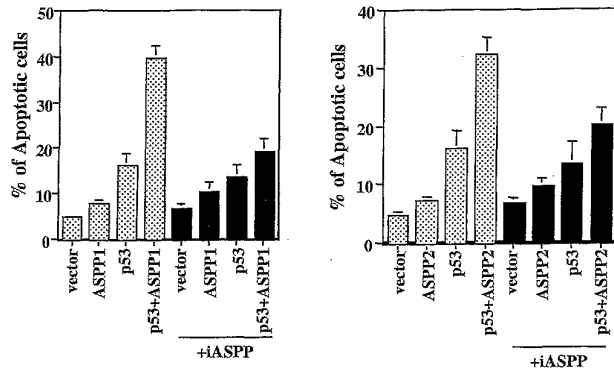


Fig. 8d

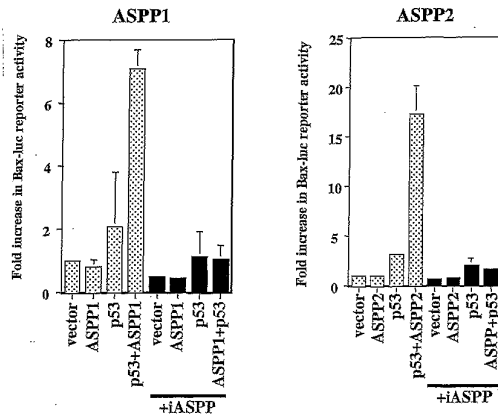


Fig. 9a

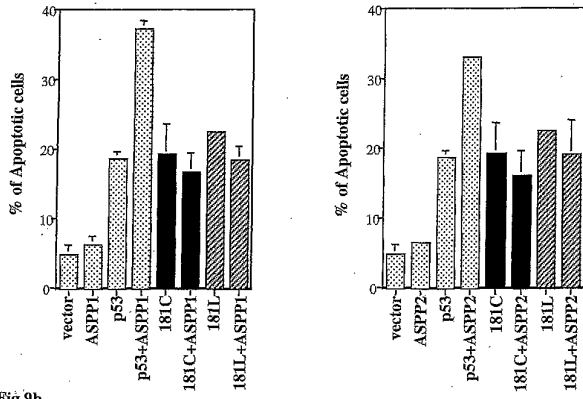


Fig 9b

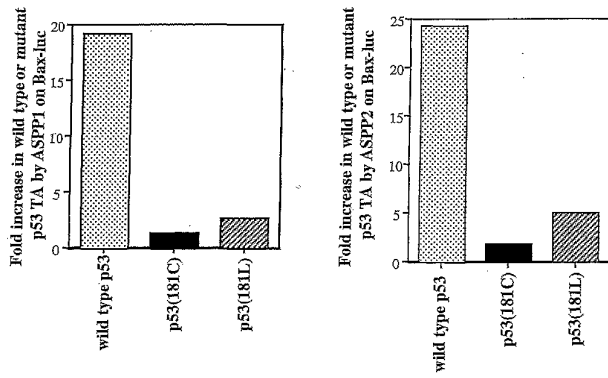


Fig. 9c

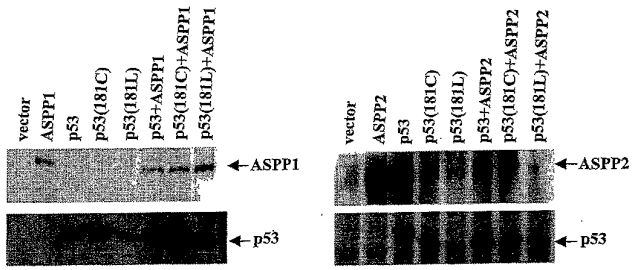




Figure 10

34/48

```

1  GCGGCCCGGT CGACCCGGGG TTGAGACGGG GGCAGCTACC GCGCTGGCT GGGCTCGGG
61  GGCGCTCGGG GCACCTTGGCC TGGCAGCTGG CAGCCCGTCA GCGCATCCG CATGCCCGCC
121  TCAGACCCCC AGCCCGCGGG GGCCCGGGG CAGCGTCCA TCCCCCTCAG CATGATCTTC
181  AAGCTGCAGA ACGCCTTCTG GAGGACGGG GCCAGCCGGG CCAITGCTCC TGGGTCCCCC
241  CTCTTACACC GAGCAACCCC GCTAAGCTG CAGCCCCAAC CACAACGCA GCCCCAGCCA
301  CAATTCACAC CACAGCCCCA GTTDDCCAA CAGTCCGAGA CCAAGCCCA AACCCCTACC
361  CCAGCCTCCG ACATCCCGAT CCCCAACAGA CATGGCCCC TGTGAACGAA GAGCCCCCCA
421  AACCCCCAC CGAGCTGGAG CCGTAGCCGG AGATAGAGGG GCTGTGACA CCAAGTGTGG
481  AGGCTGGCGA TGTGGATGAA GGACCTGTA GCAAGGCCCT TCAGCCCCAC GAGGCTGCAG
541  CCAGCACTGC CACCGBAGGC ACAGTCCGTG CCGAGCTGG AGGAGGTGGC ACGGGTGTGG
601  GCGGAAATTC CCCGGCCCT CAACCCAGG GCGTCCATGG AGCAGGCCCC TGTGTGGCC
661  CTGGCCCGTA CCCACAGAA ACAGTACCAG CAGATCATCA GCGCCCTTT CCATCGTCAT
721  GGGGGGCCAG GCCCGGGGG GCGGAGCCAG AGCTGTCCC CATCACTGAG GGATCTGAGG
781  CCAAGGCAGG GCCCCCTCCT CCTGCCCCAC CAGCTCCAT TCCACCGCC GGCCCGCTCC
841  CAGAGCAGCC CACCAGAGCA GCCCGAGGC ATGGAGATGC GCTCTGTCT CCGGAAAGCC
901  GCGTCCCGCG GCAAGGCCCG CCGCGCGCG CTCACCCCTC TGGTGTCTT CCTGGAACGG
961  GCGTGCACC GGGAGCTGGA GGTGGTGCAG CAGCGGTGA AGGAGATGAA CGACCCGAGC
1021  CAGCCCAACG AGGAGGGCAT CACTGCTTG CACAACGCCA TCTGGGGCC CAACTACTCT
1081  ATGTGGATT TCCTCATCAC GCGGGTCCC AATGTAACT CCDCGACAG CCACGGCTGG
1141  ACACCTTGG ACTGGCGGC GTCGTGAAC GACACAGTCA TCTGCATGGC GCTGGTGAAG
1201  CAGCGGCTG CAATCTTCC CACCAOCTC AGCGAGCGGG CCAACCCCTT CCGAAGTGC
1261  GACCCTLACC GCGAGGTTA TGCTGACTGC GCCACCTACC TGGCAGCGT CGAGCAGAGT
1321  ATGGGGTGA TGAACAGCGG GGCAGTGTAC GCTCTCTGG ACTACAGGC CGAGTTCGGG
1381  GACGAGCTGT CCTTCCGCA GGGCAGTGC GTACCCGTG TGGGAGGGA CCGGCCGAG
1441  GAGACCGACT GGTGTGGCC CCGCTCAC GGCACAGGG GCTAGTCCC CCGAACTAC
1501  TTGGGCTGT TCCDCAGGT GAAGCCTCA AGGAGTAAAG TCTAGCAGGA TAGAAGGAG
1561  TTTCTGAGGC TGACAGAAA AAGCATTCT GCTTCCCTC CAGACCTC CCGTGTCTT
1621  TTGCTGCCCT TATCTGCACC CCTACCCTG CTGGTGGTG TCCITGCCAC CCGTCTCTT
1681  TTCTCTGGA AGTCCAGGA AGAAGGAGG CCCCAGCCTT AAATTTAGTA ATCTGCCTTA
1741  GCTTTGGAG GTCTGGAA GGTGGAAT CACTGGGAC AGGAACCAAC TTCTTTTGC
1801  CAAATCAGAT CCGTCCAAA GTGCTCCCA TGCTAACCA CATCATACA TCCCCAGCA
1861  AGCCACCCAC CTGCCAGCC GGGCTGGGA TGGCCACCA CACCATGGA TATTCCTGG
1921  AGTCACTGCT GACACCATCT CTCCAGCA CTTGGGGTC TGGTGGGAA ACATTTGCT
1981  CTACAGGAT CCTGCCCA CCTCTCCCA ATTAAGTGC TTCACAGCC ACTGTTTAA
2041  TGTATATAA CAAATAGAG AAAGTGTT ATGTTTATA AACAAATAG AGAACTTTC
2101  GCTTATAAT AAAAGTAGT TGACAGAAA TGAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAA

```

Figure 11 35/48

MWMKDPVARPLSPTRLQPALPPEAQSVPLEEVARVLAIEPRPL  
KRRGSMEQAPAVALPPTHKKYQQIISRLFHRHGGPGGGRSQSCPPLRDLRPGQGP  
LLPHQLPFHRPAPSQSSPPEQPQSMEMRSVLRKAGSPRKARRARLNPLVLLDAALT  
GELEVQQAQVKEMNDFSQPNEEGITALHNAICGANYSIVDFLITAGANVNSPD SHGWT  
PLHCAASCNDTVICMALVQHGAIFATLSDGATAFEKCDPYREGYADCATYLADVEQ  
SMGLMNSGAVYALWDYSAEFGDELSFREGESVTVLRRDGPEETDWWAALHGQEGYVP  
RNYFGLFPRVKPQRSK

Fig. 12a

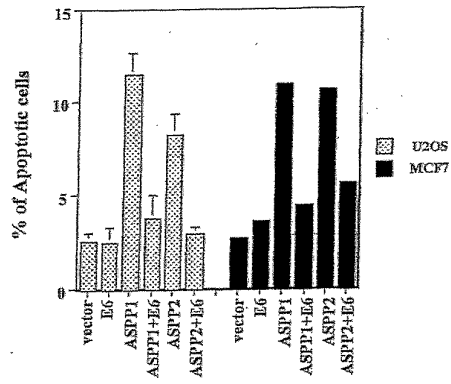


Fig.12b

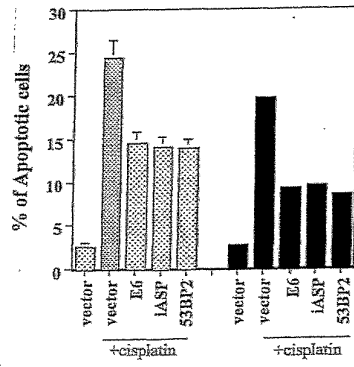


Fig. 12c

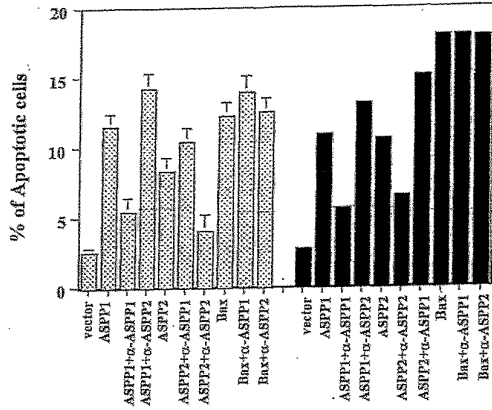


Fig. 12d

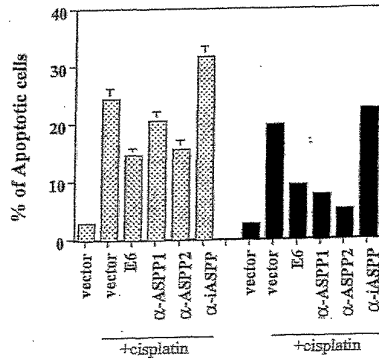


Fig. 12e

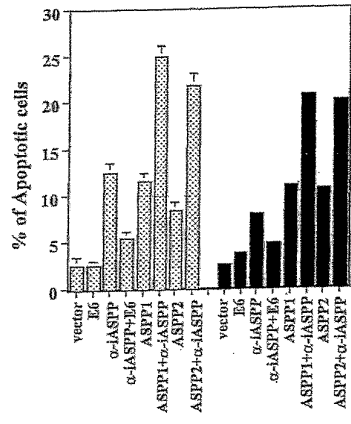


Fig. 12f

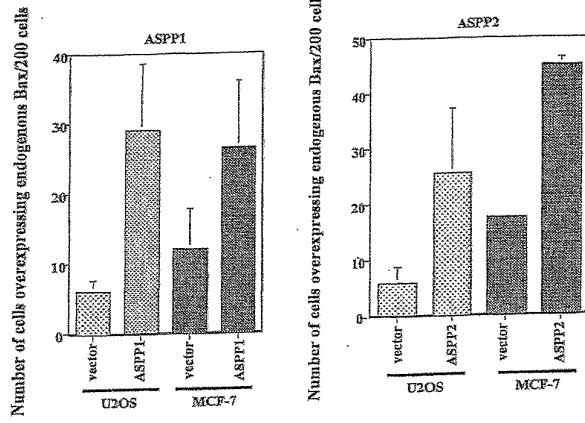


Figure 12g

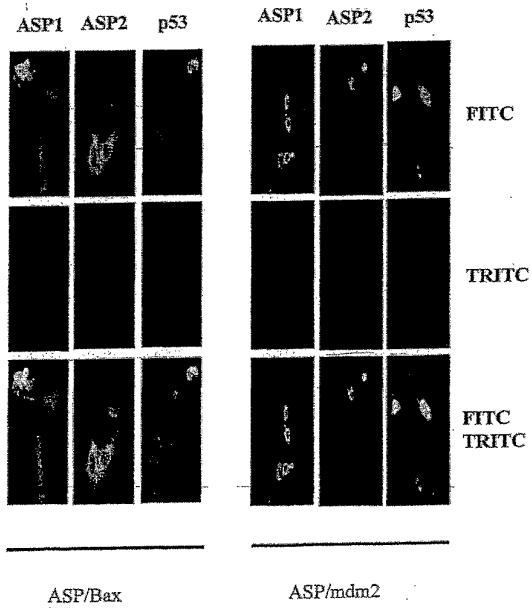
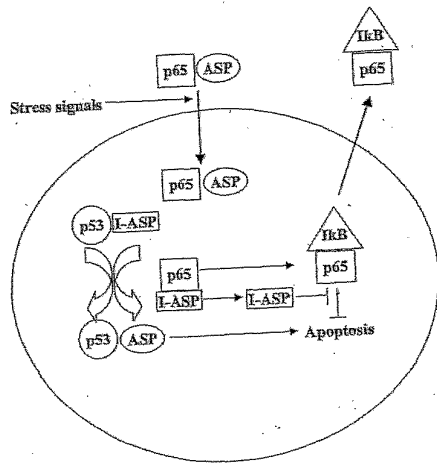


Figure 13a



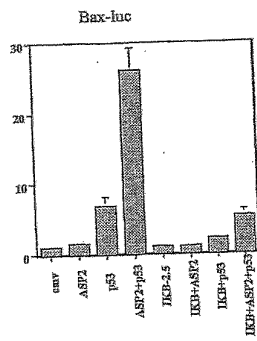


Figure 13C

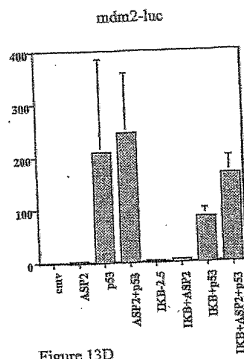


Figure 13D

Figure 14a

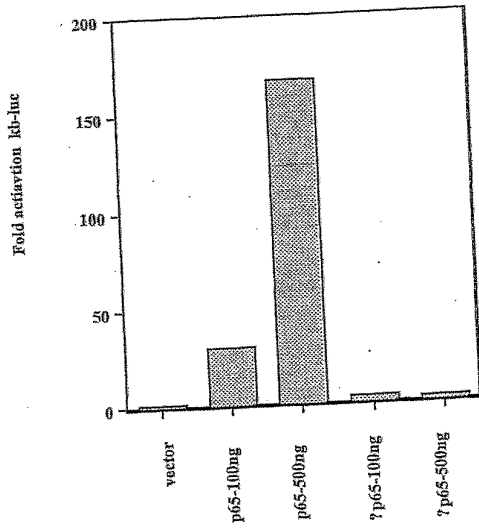


Figure 15a

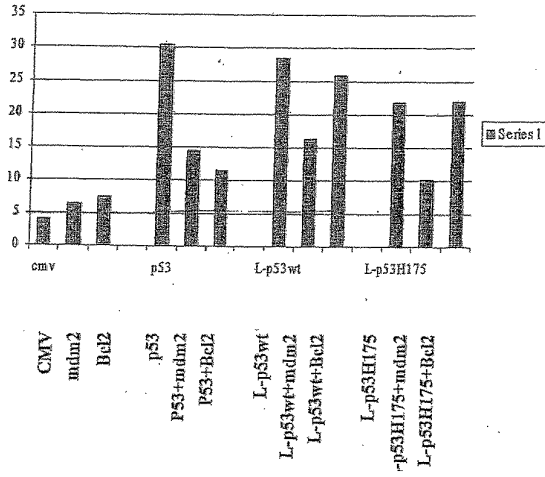
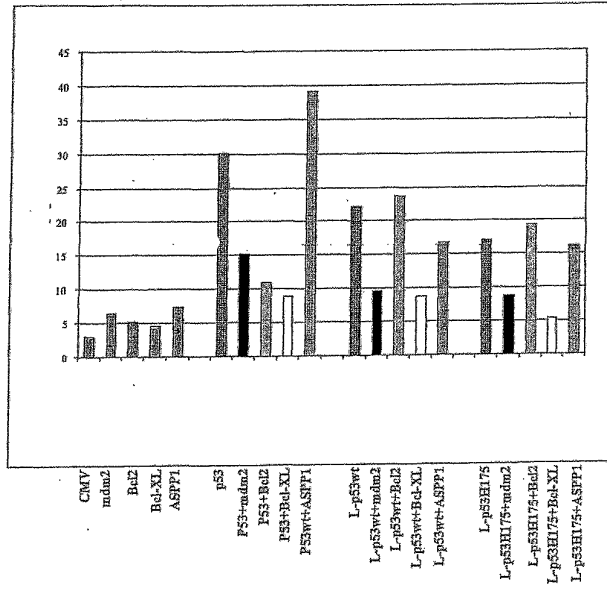


Figure 15b



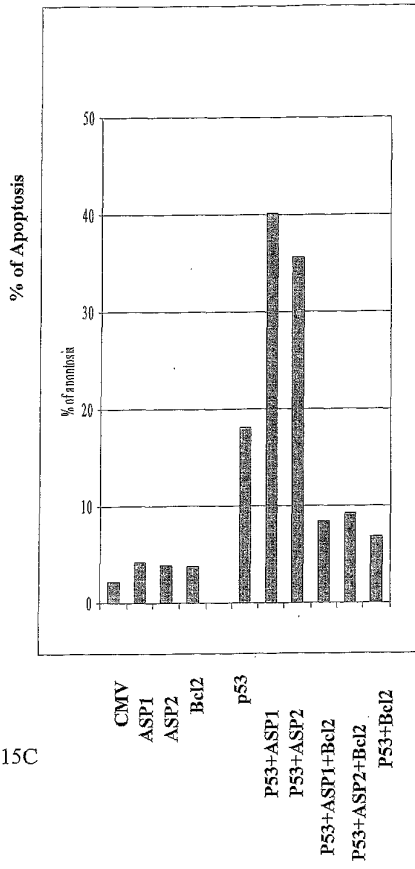


Figure 15C

Figure 16a

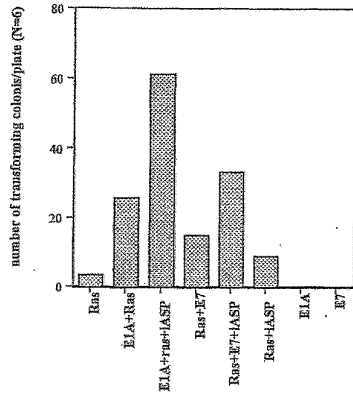
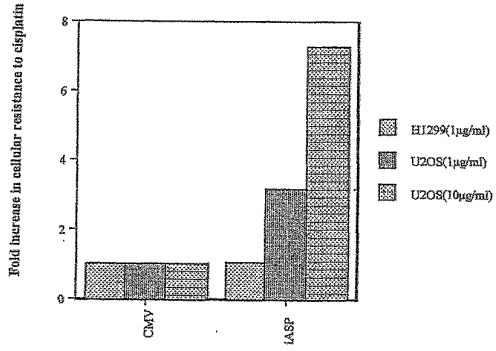


Figure 16b



## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/012325 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/47, 16/18, C12N 15/11, 15/12, 5/10, C12Q 1/68, A61K 38/17, 48/00, G01N 33/50, 33/53
- (74) Agent: HARRISON, Goddard, Foote; 31 St. Saviour-gate, York YO1 8NQ (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (21) International Application Number: PCT/GB01/03524
- (22) International Filing Date: 6 August 2001 (06.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
- |           |                              |    |
|-----------|------------------------------|----|
| 0019018.1 | 4 August 2000 (04.08.2000)   | GB |
| 0029996.6 | 8 December 2000 (08.12.2000) | GB |
| 0112890.9 | 26 May 2001 (26.05.2001)     | GB |
- (71) Applicant (for all designated States except US): LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH [CH/CH]; Postfach, CH-8024 Zurich (CH).
- (72) Inventor: and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): LU, Xin [CN/GB]; Ludwig Institute for Cancer Research, Imperial College School of Medicine at St Mary's, Norfolk Place, London W2 1PG (GB).
- (88) Date of publication of the international search report: 6 March 2003
- Published: with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/012325 A3

(54) Title: SUPPRESSOR GENE

(57) Abstract: The invention relates to the identification of a new member of a family of tumour suppressor genes (apoptosis stimulating proteins, ASP's) which encode polypeptides capable of modulating the activity of p53 and polypeptides capable of modulating the activity of said tumour suppressor polypeptide.

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 01/03524
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/11 C12N15/12 C12N5/10 C12Q1/68 A61K38/17 A61K48/00 G01N33/50 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) SEQUENCE SEARCH, EMBL, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document with annotations, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YANG JIAN-PING ET AL: "NF-kappaB subunit p65 binds to 53BP2 and inhibits cell death induced by 53BP2." ONCOGENE, vol. 18, no. 37, pages 5177-5186, XP001027267 ISSN: 0950-9232 entire document, in particular cited passages page 5182, left-hand column, line 9 -page 5183, left-hand column, line 8; figures 1A, 5A, 6 page 5184, right-hand column, line 12 - line 18 page 5185, paragraphs 2-4 figures 1A, 4, 5A --- -/--	1, 2, 4-7, 9-17, 30, 31, 47-52, 57, 58
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone ** 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. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 June 2002		Date of mailing of the international search report 16/08/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5018 Patentkanal 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Brenz Verca, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 01/03524
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IWABUCHI KUNIYOSHI ET AL: "Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53-binding proteins, 53BP1 and 53BP2." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 40, 2 October 1998 (1998-10-02), pages 26061-26068, XP002189291 ISSN: 0021-9258 entire document, in particular cited passages page 26065, right-hand column, line 1 -page 26066, left-hand column, line 26; figure 4B ---	1,2,4,5, 13
X	NAUMOVSKI L & CLEARY M L: "The p53-binding protein 53BP2 also interacts with Bcl2 and impedes cell cycle progression at G2/M" MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, BETHESDA, MD, US, vol. 16, no. 7, 1 July 1996 (1996-07-01), pages 3884-3892, XP002095578 ISSN: 1059-1524 cited in the application page 3887, right-hand column, last paragraph -page 3888, left-hand column, paragraph 1; figure 6 page 3886, right-hand column, paragraphs 2,3 page 3888, left-hand column, paragraph 2; figure 7 ---	1,2,4-7, 9-20,30, 31, 42-52, 57,58
X	WO 99 15657 A (NANDABALAN KRISHNAN ;CURAGEN CORP (US); YANG MEIJA (US); SCHULZ VI) 1 April 1999 (1999-04-01)  SEQ ID No: 1 and 2 page 47, line 18 - line 19; claims 14-17,19,20,36-41,84; figure 1 ---	1,2,4-7, 9-20, 22-25, 27,29, 42-52, 57,58,63
X	WO 00 20587 A (LUDWIG INST CANCER RES) 13 April 2000 (2000-04-13) see SEQ ID No:25 page 95 -page 96; claims 57,61,64,68; example 1 --- -/--	1,2,4-7, 9-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 01/03524
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAGASE T ET AL: "PREDICTION OF THE CODING SEQUENCES OF UNIDENTIFIED HUMAN GENES. XI. THE COMPLETE SEQUENCES OF 100 NEW CDNA CLONES FROM BRAIN WHICH CODE FOR LARGE PROTEINS IN VITRO" DNA RESEARCH, UNIVERSAL ACADEMY PRESS, JP, vol. 5, 1998, pages 277-286, XP002940462 ISSN: 1340-2838 coding sequence KIAA0771 figures 1,3; tables 1,2 -& DATABASE EMBL 'Online! 17 November 1998 (1998-11-17) NAGASE ET AL: "PREDICTION OF THE CODING SEQUENCES OF UNIDENTIFIED HUMAN GENES. XI. THE COMPLETE SEQUENCES OF 100 NEW CDNA CLONES FROM BRAIN WHICH CODE FOR LARGE PROTEINS IN VITRO" retrieved from EBI Database accession no. AB018314 XP002189294 the whole document	1,2,4-7, 9-13
Y	DATABASE EMBL 'Online! 26 April 1999 (1999-04-26) STRAUSBERG R.: "NCI_CGAP_GC6 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2236894 3' similar to SW:P532_Human Q13625 p53-binding protein 53BP2" retrieved from EBI Database accession no. AI625004 XP002189295 the whole document	1,2,4-7, 9-13
P,X	LOPEZ CHARLES D ET AL: "Proapoptotic p53-interacting protein 53BP2 is induced by UV irradiation but suppressed by p53." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 20, no. 21, November 2000 (2000-11), pages 8018-8025, XP002189292 ISSN: 0270-7306 Materials & Methods section paragraphs 2, 3 and 6 page 8022, right-hand column, line 23 page 8023, right-hand column, line 5; figures 1,2	1,2,4,5, 13, 18-20, 42-46, 57,58
P,X	WO 01 53312 A (CHEN RUI HONG ;GOODRICH RYLE (US); HYSEQ INC (US); WANG DUNRUI (US) 26 July 2001 (2001-07-26)  SEQ ID No: 651, 4223 claims 1,3,6-9,14,15 SEQ ID No: 2437 claims 10,12,13,19,20; example 4	1,2,4-7, 9-15, 18-20, 47-52
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/GB 01/03524

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	<p>WO 01 57190 A (CAO YICHENG ;CHEN RUI HONG (US); GOODRICH RYLE (US); HYSEQ INC (US)) 9 August 2001 (2001-08-09) SEQ ID No: 483 claims 1,6-9 SEQ ID No: 2451 claims 1,6-9 SEQ ID NO: 1467 claim 20 SEQ ID No: 3435 claim 20</p>	1,2,4-7, 9-14, 18-20
A	<p>--- DATABASE EMBL 'OnLine! 27 April 1999 (1999-04-27) YANG J.P. ET AL: "IDENTIFICATION OF A NOVEL INHIBITOR OF NUCLEAR FACTOR-KAPPA B, RELA-ASSOCIATED INHIBITOR" retrieved from EBI Database accession no. AF078036 XP002202190 the whole document</p>	36-52, 60-62,64
A	<p>-&amp; YANG J P ET AL: "IDENTIFICATION OF A NOVEL INHIBITOR OF NUCLEAR FACTOR-KAPPA B, RELA-ASSOCIATED INHIBITOR" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 274, no. 22, May 1999 (1999-05), pages 15662-15670, XP002927619 ISSN: 0021-9258 see entire document, in particular cited passages figure 2A</p>	38-41
A	<p>--- WO 00 32628 A (ONO PHARMACEUTICAL CO ;OKAMOTO TAKASHI (JP)) 8 June 2000 (2000-06-08) -&amp; EP 1 146 054 A 17 October 2001 (2001-10-17) paragraph '0014! - paragraph '0016!; claims 1,3,4</p>	36-56, 60-62, 64-75
A	<p>--- MORI T ET AL: "Aberrant overexpression of 53BP2 mRNA in lung cancer cell lines" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 465, no. 2-3, 14 January 2000 (2000-01-14), pages 124-128, XP004260774 ISSN: 0014-5793 the whole document</p>	
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/GB 01/03524

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>SAMUELS-LEV YARDENA ET AL: "ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53." MOLECULAR CELL, vol. 8, no. 4, October 2001 (2001-10), pages 781-794, XP002202189 ISSN: 1097-2765 the whole document -----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/GB 01/03524
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
	Although claims 24-26 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.
2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	3, 32-35 59 76-79
	because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
	see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB 01/03524

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 3, 32-35 59 76-79

The claim numbering is deficient: claim number 8 is missing in the set of claims on file. Concerning the other claims, the numbering used by the Applicant is applied in the search report.

With regard to the sequence listing in electronic form, the Search Authority found that SEQ IDs No: 6 and 7 do not comply with WIPO standard ST.25, Annex C of the Administrative Instructions under the PCT, paragraphs 17, 22 and 37. Said sequence identifiers correspond to polypeptides not disclosed in the originally filed application and consequently are excluded from search under A17(2) PCT. A meaningful search with regard to polypeptides ASP-1 and ASP-2 was carried out on the basis of the written sequences originally disclosed in figures 1c and 1d, respectively.

Claim 3 lacks clarity within the meaning of Article 6 PCT because it refers to a sequence contained in amino acid sequence 1-130 of figure 1d of the application. However, there is no numbering in figure 1d and it is not clear where the start codon of ASP-2 is located in said figure, since the depicted sequence appears to be generated by the translation of the entire polynucleotide of figure 1b (SEQ ID No:2), including regions around the ORF encoding the ASP-2 polypeptide. Indeed, according to the description (p. 3 line 20; p.55, lines 17-18) ASP-2 should be a protein of 1135 aa, thus considerably shorter than the sequence depicted in figure 1d. Since the position of the sequence window of 130 amino acids mentioned in the claim cannot be clearly identified, the claim is not searchable.

The same applies to claim 59: the "region comprising nucleotides -253-839 of a sequence represented in fig. 1b or part thereof" cannot be identified, therefore the claim was excluded from search.

Similarly, claims 76 -79 refer to amino acids 1-130 of figure 1d and cannot be searched for the reasons mentioned above.

Claims 32-35 relate to not nearly characterized agents/agonists/antagonists identified by the screening methods of claims 30-31 and thus to an extremely large number of possible compounds for which support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT is not to be found, except for the inhibitor polypeptide I-ASP mentioned in the application, which is the subject matter of other claims. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure within the meaning of Articles 5 and 6 PCT, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is not possible, the search was restricted to polypeptide I-ASP (SEQ ID No: 4, figure 11).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an

International Application No. PCT/GB 01 03524

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 01/03524

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date				
WO 9915657	A	01-04-1999	US 5977311 A	02-11-1999			
			AU 9321898 A	12-04-1999			
			CA 2303405 A1	01-04-1999			
			EP 1017808 A2	12-07-2000			
			JP 2001517439 T	09-10-2001			
			WO 9915657 A2	01-04-1999			
WO 0020587	A	13-04-2000	AU 6505599 A	26-04-2000			
			EP 1117791 A2	25-07-2001			
			WO 0020587 A2	13-04-2000			
WO 0153312	A	26-07-2001	AU 2292401 A	31-07-2001			
			AU 2591801 A	31-07-2001			
			AU 2593601 A	31-07-2001			
			AU 2595501 A	31-07-2001			
			AU 2596501 A	31-07-2001			
			AU 2598301 A	31-07-2001			
			AU 2728401 A	31-07-2001			
			AU 2734401 A	31-07-2001			
			AU 2734801 A	31-07-2001			
			AU 2738501 A	31-07-2001			
			AU 3265701 A	31-07-2001			
			WO 0153312 A1	26-07-2001			
			WO 0153453 A2	26-07-2001			
			WO 0153326 A1	26-07-2001			
			WO 0153454 A2	26-07-2001			
			WO 0153455 A2	26-07-2001			
			WO 0153456 A2	26-07-2001			
			WO 0153466 A1	26-07-2001			
			WO 0152616 A2	26-07-2001			
			WO 0153500 A1	26-07-2001			
			WO 0153515 A1	26-07-2001			
			WO 0153485 A1	26-07-2001			
			AU 5362001 A	30-10-2001			
			WO 0179446 A2	25-10-2001			
			WO 0157190	A	09-08-2001	AU 2591801 A	31-07-2001
						AU 3128801 A	14-08-2001
						AU 3297101 A	07-08-2001
AU 3300301 A	07-08-2001						
AU 3329301 A	14-08-2001						
AU 3484701 A	14-08-2001						
AU 3484801 A	14-08-2001						
AU 3486501 A	14-08-2001						
AU 3494401 A	14-08-2001						
AU 3665801 A	14-08-2001						
AU 3666001 A	14-08-2001						
AU 3666301 A	14-08-2001						
AU 3672101 A	14-08-2001						
AU 4314201 A	14-08-2001						
WO 0153326 A1	26-07-2001						
WO 0155334 A2	02-08-2001						
WO 0155335 A2	02-08-2001						
WO 0157255 A1	09-08-2001						
WO 0157260 A1	09-08-2001						
WO 0157175 A2	09-08-2001						
WO 0157261 A1	09-08-2001						
WO 0157262 A1	09-08-2001						

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No.  
PCT/GB 01/03524

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0157190	A	WO 0157187 A2	09-08-2001
		WO 0157265 A1	09-08-2001
		WO 0157188 A2	09-08-2001
		WO 0157266 A1	09-08-2001
		WO 0157267 A1	09-08-2001
		WO 0157190 A2	09-08-2001
WO 0032628	A 08-06-2000	EP 1146054 A1	17-10-2001
		WO 0032628 A1	08-06-2000
		JP 2000224993 A	15-08-2000

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1999)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1 4 C 0 8 7
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 2 1 4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/67	C 0 7 K 14/67	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

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

(74) 代理人 100118072

弁理士 醍醐 美知子

(72) 発明者 ル, シン

イギリス国 ダブリュー 2 1 ピー ジー ロンドン, ノーフォルク プレイス, インペリアル カレッジ スクール オブ メディシン アット エステイ マリーズ, ルードヴィヒ インスティテュート フォー キャンサー リサーチ

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB01 CB02 DA12 DA13 DA14 DA36 DA78 FB02  
FB03  
4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 CA04 CA12 DA01 DA02 DA05 DA11  
GA01 GA11 HA08 HA12  
4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QQ61 QR32 QR42 QR48  
QR54 QR62 QR77 QS25 QS28 QS32 QS33 QS34 QS36  
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 AB02 CA24 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA07 AA13 AA16 BA01 BA02 BA08 BA22 CA18 DC50  
MA13 MA17 MA22 MA23 MA35 MA37 MA52 MA55 MA56 MA63  
MA66 NA05 NA14 ZB262 ZC412 ZC752  
4C085 AA14 AA16 BB11 CC23 EE01 GG01 GG02  
4C086 AA01 EA16 HA12 HA28 MA01 MA02 MA13 MA17 MA22 MA23  
MA35 MA37 MA52 MA55 MA56 MA63 MA66 NA05 NA14 ZB26  
ZC41 ZC75  
4C087 BC83 MA02 MA13 MA17 MA22 MA23 MA35 MA37 MA52 MA55  
MA56 MA63 MA66 NA05 NA14 ZB26 ZC41 ZC75

4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 CA40 DA75 EA20 EA51 FA74

专利名称(译)	抑制基因		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004525605A</a>	公开(公告)日	2004-08-26
申请号	JP2002518296	申请日	2001-08-06
[标]申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究所		
[标]发明人	ルシン		
发明人	ル, シン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K33/24 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/67 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61K2039/505 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/4747 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/136 G01N33/57415 G01N2500/02		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K33/24 A61K35/76 A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P43/00.111 A61P43/00.121 C07K14/67 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR54 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA16 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/DC50 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C084/ZC412 4C084/ZC752 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG02 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/HA12 4C086/HA28 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA13 4C086/MA17 4C086/MA22 4C086/MA23 4C086/MA35 4C086/MA37 4C086/MA52 4C086/MA55 4C086/MA56 4C086/MA63 4C086/MA66 4C086/NA05 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZC41 4C086/ZC75 4C087/BC83 4C087/MA02 4C087/MA13 4C087/MA17 4C087/MA22 4C087/MA23 4C087/MA35 4C087/MA37 4C087/MA52 4C087/MA55 4C087/MA56 4C087/MA63 4C087/MA66 4C087/NA05 4C087/NA14 4C087/ZB26 4C087/ZC41 4C087/ZC75 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	英年古河 Kajinami秩序		
优先权	2000019018 2000-08-04 GB 2000029996 2000-12-08 GB 2001012890 2001-05-26 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

本发明涉及肿瘤抑制基因家族（凋亡刺激蛋白，ASP）的新成员的鉴定，该家族包含能够调节p53活性的多肽和能够调节所述肿瘤抑制多肽活性的多肽。编码。根据本发明的第一方面，提供了多肽或其部分，其包含：i) 至少一个锚蛋白重复序列；ii)  $\alpha$ 螺旋结构域；iii) SH3结构域；并且这些多肽是p53。哪个能刺激至少凋亡功能。

(51) Int. Cl. 7	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 12 N 15/09</b>	C 12 N 15/00	Z N A A 2 G 0 4 5
<b>A 6 1 K 31/7088</b>	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 K 33/24</b>	A 6 1 K 33/24	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 K 35/76</b>	A 6 1 K 35/76	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 38/385	N 4 C 0 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 202 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-518296 (P2002-518296)	(71) 出願人	503048305
(86) (22) 出願日	平成13年8月6日 (2001.8.6)		ルードヴィヒ インスティテュート フォー
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月4日 (2003.2.4)		キャンサー リサーチ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/003524		スイス国 セーアッシュー-8024 チュー
(87) 国際公開番号	W02002/012325		ーリッヒ, ポストファッハ
(87) 国際公開日	平成14年2月14日 (2002.2.14)	(74) 代理人	100057874
(31) 優先権主張番号	0019018.1		弁理士 曾我 暹照
(32) 優先日	平成12年8月4日 (2000.8.4)	(74) 代理人	100110423
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 曾我 暹治
(31) 優先権主張番号	0029996.6	(74) 代理人	100084010
(32) 優先日	平成12年12月8日 (2000.12.8)		弁理士 古川 秀利
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100094695
(31) 優先権主張番号	0112890.9		弁理士 鈴木 豊七
(32) 優先日	平成13年5月26日 (2001.5.26)	(74) 代理人	100111648
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 梶並 順

最終頁に続く