

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 508031

(P2003 - 508031A)

(43)公表日 平成15年3月4日(2003.3.4)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		39/395	D 4 B 0 2 4
38/00			N 4 B 0 6 3
39/395		45/00	4 B 0 6 4
		48/00	4 B 0 6 5
審査請求 有 予備審査請求 (全260数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 515880(P2001 - 515880)

(86)(22)出願日 平成12年6月16日(2000.6.16)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月18日(2001.12.18)

(86)国際出願番号 PCT/US00/16591

(87)国際公開番号 W000/078971

(87)国際公開日 平成12年12月28日(2000.12.28)

(31)優先権主張番号 60/140,264

(32)優先日 平成11年6月18日(1999.6.18)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/153,872

(32)優先日 平成11年9月14日(1999.9.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 スイーヴィー セラピューティクス イン
コーポレイテッド
CV THERAPEUTICS, I
NC.
アメリカ合衆国 94304 カリフォルニア州
パロ アルト ポーター ドライブ 31
72

(71)出願人 ユニヴァースティ オブ ワシントン
アメリカ合衆国 ワシントン州 98195 シ
アトル スイート 200 エヌ.イー. スト
リート 1107 オフィース オブ テクノ
ロジー トランスファー

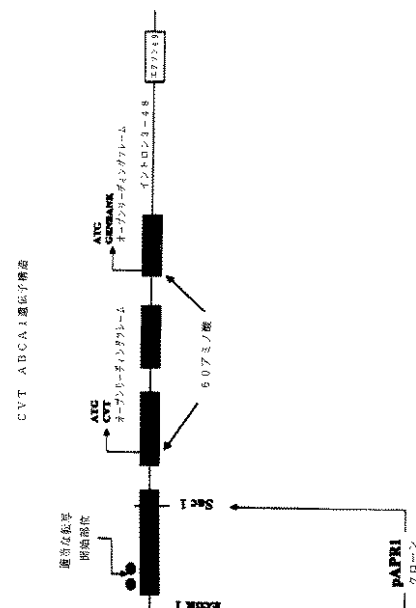
(74)代理人 弁理士 三好 秀和 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 A T P 結合カセット輸送体蛋白質 A B C 1 を用いるコレステロール流出を増加させ H D L を上昇させるための組成物および方法

(57)【要約】

本発明は新規な A B C 1 ポリペプチドおよびそれをコードする核酸分子に関する。また、本発明は、組換えベクター、宿主細胞、および A B C 1 ポリヌクレオチドを含む組成物、ならびに A B C 1 ポリペプチドを生産する方法に関する。また、本発明は、A B C 1 ポリペプチドに特異的に結合する抗体に関する。加えて、本発明は、コレステロール流出を増加させる方法ならびに A B C 1 の発現および活性を増加させる方法に関する。本発明は、さらに、A B C 1 の発現を変調する化合物を同定する方法ならびに哺乳動物対象において A B C 1 ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの比較レベルを検出する方法に関する。また、本発明は、化合物の A B C 1 発現変調活性を測定するために化合物をスクリーニングするのに適したキットおよび組成物、ならびに化合物が A B C 1 - 依存性コレステロール流出を変調するか否かを判断するのに適したキットおよび組成物に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：2 を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 2】 配列番号：2 のアミノ酸配列と少なくとも 98% 同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 3】 請求項 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、配列番号：1 を含むポリヌクレオチド、配列番号：1 のヌクレオチド 291 - 7074 を含むポリヌクレオチド、および請求項 2 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドよりなる群から選択される単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4】 請求項 3 に記載のポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 5】 配列番号：1 を含むポリヌクレオチドと少なくとも 90% 同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 6】 配列番号：1 を含むポリヌクレオチドと少なくとも 95% 同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 7】 請求項 5 に記載のポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 8】 請求項 3 に記載のポリヌクレオチドおよび適当な担体を含む組成物。

【請求項 9】 請求項 4 に記載のポリヌクレオチドおよび適当な担体を含む組成物。

【請求項 10】 請求項 5 に記載のポリヌクレオチドおよび適当な担体を含む組成物。

【請求項 11】 請求項 3 に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。
。

【請求項 12】 請求項 4 に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。
。

【請求項 13】 請求項 5 に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。
。

【請求項14】 さらに、異種プロモーターポリヌクレオチドを含む請求項11に記載の組換えベクター。

【請求項15】 さらに、異種プロモーターポリヌクレオチドを含む請求項12に記載の組換えベクター。

【請求項16】 さらに、異種プロモーターポリヌクレオチドを含む請求項13に記載の組換えベクター。

【請求項17】 該異種プロモーターがサイトメガロウイルスプロモーターである請求項14に記載の組換えベクター。

【請求項18】 該ベクターがpCEPhABC1である請求項17に記載の組換えベクター。

【請求項19】 請求項11に記載の組換えベクターを含む組成物。

【請求項20】 請求項13に記載の組換えベクターを含む組成物。

【請求項21】 請求項14に記載の組換えベクターを含む組成物。

【請求項22】 請求項11に記載の組換えベクターを含む宿主細胞。

【請求項23】 請求項13に記載の組換えベクターを含む宿主細胞。

【請求項24】 請求項14に記載の組換えベクターを含む宿主細胞。

【請求項25】 配列番号：8を含む単離されたポリペプチド。

【請求項26】 請求項25のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項27】 配列番号：7を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項28】 配列番号：10を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項29】 請求項28に記載のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項30】 配列番号：9を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項31】 請求項27に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

【請求項32】 請求項30に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

【請求項33】 (a) 検出可能なレベルのABC1蛋白質を生じさせるの

に十分な量のA B C 1をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターで哺乳動物宿主細胞をトランスフェクトし；次いで、

(b) 生じたA B C 1蛋白質を精製する；

工程を含むことを特徴とする哺乳動物宿主細胞においてA B C 1蛋白質を生産する方法。

【請求項34】 該組換え発現ベクターが請求項3に記載のポリヌクレオチドを含む請求項33に記載の方法。

【請求項35】 哺乳動物対象の細胞においてA B C 1を発現するのに十分な量のA B C 1をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを哺乳動物対象に投与する工程を含むことを特徴とする哺乳動物対象の細胞においてA B C 1を発現する方法。

【請求項36】 該組換え発現ベクターが請求項3に記載のポリヌクレオチドを含む請求項35に記載の方法。

【請求項37】 哺乳動物対象の細胞からのコレステロール流出を増加させるのに十分な量のA B C 1をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを哺乳動物対象に投与することを特徴とする該細胞からのコレステロール流出を増加させるのに適した方法。

【請求項38】 該組換え発現ベクターが請求項3に記載のポリヌクレオチドを含む請求項37に記載の方法。

【請求項39】 該組換え発現ベクターがウイルス送達ベクターである請求項37に記載の方法。

【請求項40】 該ウイルス送達ベクターがアデノウイルスベクターである請求項39に記載の方法。

【請求項41】 該ウイルスベクターがレンチウイルスベクターである請求項39に記載の方法。

【請求項42】 該組換え発現ベクターが非 - ウイルス送達ベクターである請求項37に記載の方法。

【請求項43】 哺乳動物対象の細胞からのコレステロール流出を増加させるのに十分な量のA B C 1をコードするポリヌクレオチドを非 - ウイルス送達シ

システムを介して哺乳動物対象に投与することを特徴とする該細胞からのコレステロール流出を増加させるのに適した方法。

【請求項44】 ABC1をコードする該ポリヌクレオチドが請求項3に記載のポリヌクレオチドを含む請求項43に記載の方法。

【請求項45】 該非-ウイルス送達システムがDNA-リガンド複合体、アデノウイルス-リガンド-DNA複合体、アデノ-関連ウイルス-リガンド-DNA複合体、DNAの直接注入、CaPO₄沈殿、遺伝子銃技術、エレクトロポレーション、リポソームおよびリポフェクションよりなる群から選択される請求項43に記載の方法。

【請求項46】 哺乳動物対象の細胞においてABC1の発現を増加させる治療上有効量の化合物を哺乳動物対象に投与する工程を含むことを特徴とする該細胞からコレステロール流出を増加させるのに適した方法。

【請求項47】 該化合物がcAMPアナログである請求項46に記載の方法。

【請求項48】 該化合物が8-ブromo cAMP、N6-ベンゾイルcAMPおよび8-チオメチルcAMPよりなる群から選択される請求項47に記載の方法。

【請求項49】 該化合物がcAMPの合成を増加させる請求項46に記載の方法。

【請求項50】 該化合物がフォルスコリンである請求項49に記載の方法。

【請求項51】 該化合物がホスホジエステラーゼ阻害剤である請求項46に記載の方法。

【請求項52】 該化合物がロリプラム、テオフィリン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、R020-1724、ビンボセチン、ザプリナスト、ジピリダモール、ミルリノン、アムリノン、ピモベンダン、シロスタミド、エノキシモン、ペロキシモンおよびベスナリノンよりなる群から選択される請求項51に記載の方法。

【請求項53】 哺乳動物対象の細胞においてABC1の発現を増加させる

のに十分な量のcAMPアナログを哺乳動物対照に投与する工程を含むことを特徴とする該細胞においてABC1の遺伝子発現を増加させるのに適した方法。

【請求項54】 コレステロール流出を増加させるのに十分な量のABC1活性を増加させる化合物を哺乳動物対象に投与することによって哺乳動物対象の細胞のコレステロール流出を増加させるのに適した方法。

【請求項55】 培養に維持された哺乳動物細胞の試料中のコレステロール流出のレベルをアッセイして、コレステロール流出の対照レベルを決定し；

該細胞をスクリーニングすべきテスト化合物と接触させ；

テスト化合物との接触の後に細胞の試料においてコレステロール流出のレベルをアッセイし；次いで、

テスト化合物との接触の後に細胞の試料においてABC1-媒介コレステロール流出のレベルをアッセイし、それにより、テスト化合物が培養中の細胞からのABC1-媒介コレステロール流出を促進するか否かを判断する；

工程を含むことを特徴とする培養中の細胞からのABC1-媒介コレステロール流出をテスト化合物が促進するか否かを判断するためにテスト化合物をスクリーニングする方法。

【請求項56】 該培養された細胞が細胞系に由来する請求項55に記載の方法。

【請求項57】 該細胞系が繊維芽細胞、マクロファージ、肝、および腸細胞系よりなる群から選択される請求項56に記載の方法。

【請求項58】 該細胞系がRAW264.7である請求項57に記載の方法。

【請求項59】 結合に際してABC1の活性を阻害する抗-ABC1抗体を用い、ABC1-依存性コレステロール流出のレベルをアッセイする請求項55に記載の方法。

【請求項60】 アンチセンスABC1ポリヌクレオチドを用い、ABC1-依存性コレステロール流出のレベルをアッセイする請求項55に記載の方法。

【請求項61】 該ポリヌクレオチドが配列番号：57を含む請求項60に記載の方法。

【請求項62】 哺乳動物対象から細胞試料を得；

細胞試料におけるABC1 mRNA発現のレベルをアッセイし；次いで、

細胞試料におけるABC1 mRNA発現のレベルをABC1 mRNA発現のあらかじめ決定した標準レベルと比較し、それにより、哺乳動物対象の細胞においてABC1遺伝子発現の比較レベルを検出する；

工程を含むことを特徴とする哺乳動物対象の細胞においてABC1発現の比較レベルを検出する方法。

【請求項63】 哺乳動物対象の細胞におけるABC1発現の比較レベルの検出を用いて、哺乳動物対照の冠心臓病に対する罹患性を決定する請求項62に記載の方法。

【請求項64】 ABC1 mRNA発現のレベルを、逆転写ポリメラーゼ鎖反応、ノーザンブロットまたはRNAse保護アッセイによってアッセイする請求項62に記載の方法。

【請求項65】 哺乳動物対象から細胞試料を得；

細胞試料中のABC1蛋白質の量をアッセイし；次いで、

細胞試料中のABC1蛋白質の量をABC1蛋白質のあらかじめ決定した標準量と比較し、それにより、哺乳動物対象の細胞においてABC1蛋白質の比較レベルを検出する；

工程を含むことを特徴とする哺乳動物対象の細胞においてABC1蛋白質の比較レベルを検出する方法。

【請求項66】 哺乳動物対象の細胞におけるABC1蛋白質の比較レベルの検出を用いて、哺乳動物対象の冠心臓病に対する罹患性を判断する請求項65に記載の方法。

【請求項67】 ABC1蛋白質の量を測定するアッセイがイムノアッセイを含む請求項65に記載の方法。

【請求項68】 (a)細胞試料を抗-ABC1抗体の集団と接触させ、次いで、(b)細胞試料と会合した特異的結合ABC1抗体を検出することによって、ABC1蛋白質の量を測定する請求項67に記載の方法。

【請求項69】 該ABC1抗体がウエスタンブロッティング、免疫沈殿ま

たはFACSによって検出される請求項68に記載の方法。

【請求項70】 請求項1または請求項2に記載の単離されたポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体。

【請求項71】 該抗体がモノクローナル抗体である請求項70に記載の抗体。

【請求項72】 該抗体がポリクローナル抗体である請求項70に記載の抗体。

【請求項73】 ABC1ポリペプチドへの結合に際し、該抗体がABC1ポリペプチドのコレステロール輸送活性を阻害する請求項70に記載の抗体。

【請求項74】 少なくとも1つのアッセイにおいて十分な量の不活化抗-ABC1抗体および使用のための指令書を含むことを特徴とする、当該化合物がABC1-依存性コレステロール流出を変調するか否かを判断するために化合物をスクリーニングするのに適したキット。

【請求項75】 少なくとも1つのアッセイにおいて十分な量のアンチセンスABC1オリゴヌクレオチドおよび使用のための指令書を含むことを特徴とする、当該化合物がABC1-依存性コレステロール流出を変調するか否かを判断するために化合物をスクリーニングするのに適したキット。

【請求項76】 該アンチセンスABC1オリゴヌクレオチドが配列番号：53を含む請求項75に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、1999年6月18日に出願された米国仮出願番号60/140、264；1999年9月14日に出願された米国仮出願番号60/153、872；および1999年11月19日に出願された米国仮出願番号60/166、573に対する優先権を主張する。

【0002】

(発明の技術分野)

本発明は、新規ABC1ポリペプチドおよびそれをコードする核酸分子に関する。また、本発明は組換えベクター、宿主細胞、およびABC1ポリヌクレオチドを含む組成物、ならびにABC1ポリペプチドを生産する方法に関する。また、本発明はABC1ポリペプチドに特異的に結合する抗体に関する。加えて、本発明は、コレステロール流出を増加させる方法ならびにABC1発現および活性を増加させる方法に関する。本発明は、さらに、ABC1の発現を変調する化合物を同定する方法および哺乳動物対象においてABC1ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの比較レベルを検出する方法に関する。また、本発明は、化合物のABC1発現変調活性を測定するために化合物をスクリーニングするのに適したキットおよび組成物、ならびに化合物がABC1-依存性コレステロール流出を変調するか否かを判断するのに適したキットおよび組成物を提供する。

【0003】

(発明の背景)

ヒトの血漿またはリンパ液中の循環脂質はコレステロール、コレステリルエステル、トリグリセリドおよびリン脂質よりなる。これらの脂質はリポ蛋白質と呼ばれる大きな分子複合体中で輸送され、これはコレステリルエステルおよび/またはトリグリセリドのコア、リン脂質および遊離コレステロールのエンベロープ、アポリポ蛋白質よりなる(Scriverら., Eds., The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 7th Ed., p.1841-1851 (McGraw-Hill, New York 1995))。アポリポ蛋白質は、リポ蛋白

質の組み立ておよび分泌、ならびにレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) のごときリポ蛋白質修飾酵素の活性化に關与する。加えて、アポリポ蛋白質は構造的・一体性を提供し、それは大きなスペクトルの受容体に対するリガンドおよび膜ドッキング蛋白質である。血漿リポ蛋白質はサイズに従って5つのタイプに分けられる：キロミクロン (サイズが最大であって密度は最低)、超低密度リポ蛋白質 (VLDL)、中密度リポ蛋白質 (IDL)、低密度リポ蛋白質 (LDL) および高密度リポ蛋白質 (HDL)。

キロミクロン、VLDL、IDLおよびLDLは外因性および内因性コレステロールおよびトリアシルグリセロールを末梢部位に輸送し、そこで、脂質は種々の代謝経路で役割を果たし、細胞膜の主要な構成要素として働く。キロミクロンは、ダイエツトコレステロールおよびトリアシルグリセロールを種々の組織に輸送する手段として腸粘膜で組み立てられる。VLDLは肝臓で形成されて、肝臓によって合成された内因性コレステロールおよびトリアシルグリセロールを筋肉および志望組織のごとき肝臓外組織に輸送する。VLDLは10 - 15%の合成血清コレステロールおよび殆どのトリグリセリドを含有する。循環においては、VLDLはリポ蛋白質リパーゼの作用を介してLDLに変換される。LDLはすべての組織への送達のためのコレステロールの主要な血漿キャリアであり、典型的には、60 - 70%の合計絶食血清コレステロールを含有する。

【0004】

対照的に、HDLは「逆コレステロール輸送」、過剰のコレステロールが末梢部位から肝臓に輸送されて戻され、そこでそれが胆汁塩の形態で分泌される経路に關与する (Glomset, J. A., J. Lipid Res., 9, 155 - 167 (1968))。生じたばかりのHDLは、コレステロールおよびコレステロールエステルを欠いた蛋白質が豊富なディスク・形状粒子として肝臓および小腸で *de novo* にて合成される。事実、HDLの主要な機能はアポリポ蛋白質、主としてアポC - I、アポC - IIおよびアポEの循環貯蔵として作用する。生じたばかりのまたは蛋白質が豊富なHDLは、細胞源から得られたコレステリルエステルの蓄積を通じて球状リポ蛋白質粒子に変換される。HDL

は、通常、20 - 30 %の合計絶食血清コレステロールを含有する。

【0005】

現在の理論によると、細胞コレステロールのHDLへの逆流出は2つのメカニズムによって媒介される：水性拡散経路およびアポリポ蛋白質媒介経路を通じて媒介される。これらの区別できるメカニズムの相対的重要性は細胞型および代謝状態に依存する (Oramら., J. Lipid Res., 37:2743 - 2491 (1996); Rothblatら., J. Lipid Res., 40:781 - 796 (1999); Steinら., Atherosclerosis, 144:285 - 301 (1999))。多くの細胞では、水性拡散経路は、それを通してコレステロール流出が起こる主要な経路である (Johnsonら., Biochim. Biophys. Acta, 1085:293 - 298 (1991))。この経路は、受動輸送のプロセスを通じる細胞外スペースにおいて、細胞膜およびリポ蛋白質受容体の間のコレステロールの二方向性交換を含む (Remaleyら., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 17:1813 - 1821 (1997); Rothblatら., J. Lip. Res., 40:781 - 796 (1999))。該交換は小胞として知られた表面マイクロドメインとして主として起こり得る。(Fieldingら., Biochemistry, 34:14292 - 91995))。LCATの作用による細胞外区画におけるコレステロールのコレステリエステルの変換によって正味の流出は駆動できる。

【0006】

あるいは、マクロファージおよび繊維芽細胞において、コレステロールおよびリン脂質流出は、主として、アポA - I、アポA - IIおよびアポEのごときアポリポ蛋白質を通じて媒介される (Remaley, supra (1997); Francisら., J. Clin. Invest., 96:78 - 87 (1995); Vegaら., J. Intern. Med., 226:5 - 15 (1989); Sakarら., Biochim. Biophys. Acta, 1438:85 - 98 (1999); Haraら., J. Biol. Chem., 266:3080 - 3086 (1991); Fieldingら., J. Lipi

d Res. , 38 , 1503 - 1521 (1997) ; Oramら , J . L i p i d Res . , 37 , 2743 - 2491 (1996)) 。アポリポ蛋白質 - 媒介脂質流出のプロセスは、それがコレステロールが負荷されたおよび / または成長が阻止された場合にマクロファージおよび他のスカベンジャー細胞において特に支配的である。アポリポ蛋白質 - 媒介流出は、アポリポ蛋白質と細胞表面との直接的相互作用、アポリポ蛋白質の脂質化、および細胞からの脂質 - アポリポ蛋白質粒子の引き続いての解離を必要とする活性な輸送プロセスである (O r a m , s u p r a (1996) ; M e n d e z , A . J . , J . L i p i d Res . , 38 , 1807 - 1821 (1997) ; R e m a l e y , s u p r a (1998) ; M e n d e z , A . J . , J . L i p i d Res . , 37 , 2510 - 2524 (1996)) 。一旦細胞から除去されると、コレステロールがリッチはHDL粒子が肝臓に輸送され、記載されたごとく身体から除去される。

【0007】

遺伝的欠陥に由来するまたはもう1つの障害の二次的効果としての異常リポ蛋白質機能および / または代謝は深刻な生物学的結果を有しかねない。ダイエット影響に加えて、糖尿病、甲状腺機能低下および肝臓病のごとき障害の結果、上昇した血漿レベルのLDL - コレステロールおよびトリグリセリドが得られる。上昇したレベルのLDL - コレステロールおよびトリグリセリドは、米国および他の産業化国家において死亡の主な原因である冠心臓病の発生率と関連する主要な危険因子として同定されてきた (H o k a n s o n ら , J . C a r d i o v a s c . R i s k . , 3 : 213 - 219 (1996) ; T h e E x p e r t P a n e l , J A M A , 269 : 3015 - 3023 (1993)) 。動脈壁への過剰LDL - コレステロールの蓄積はアテローム性動脈硬化症プラークの形成に至りかねず、これは心臓病の発生で主な役割を果たす。プラークは、動脈壁から放出されたフリーラジカルがLDLを酸化する場合に形成されると信じられている。理論によると、LDLの酸化された形態は炎症反応をトリガーし、循環する細胞を、脂質プラークの形成に寄与する部位に引き寄せる。これらの中には、マクロファージおよびコレステロールを調節されない様式で蓄積するスカベ

ンジャー受容体を含有する他の細胞がある (Brownら, Ann. Rev. Biochem., 52:223-261 (1983))。内部コレステロールの膨大な貯蔵の結果、フォーム細胞表現型への変換が起こり、これは血管病巣の発生に対する主要な寄与者であると考えられる。プラークが形成されるに従い、動脈壁は収縮し、心臓への血流を低下させる。

【0008】

しかしながら、興味深いことには、推定60%の心臓発作が、上昇した血中レベルのLDL-コレステロールを有しない人で起こる。これらの内、推定45%が平均血中レベル未満のHDL-コレステロールに関連しており、これは、低HDL-コレステロールレベルが冠心臓病についての有意な危険因子であることを示す。事実、最近の研究は、低下したHDL-コレステロールレベルが、未成熟冠動脈病を持つ患者で観察された最も普通のリポ蛋白質異常性であることを示している (Genest J., Circulation, 85:2025-2033 (1992); Genestら., Arterioscler. Thromb., 13:1728-1737 (1993))。HDL-コレステロールおよび冠心臓病の間の逆関連についての基礎はよく理解されていないが、HDLの心臓保護役割は、アテローム性動脈硬化病病巣におけるマクロファージフォーム細胞からのコレステロール流出の促進に関連するその活性に由来し得ることを示唆した。

【0009】

低HDLと関連する心血管病の1つの例はタンジール病(TD)であり、これは、循環HDLの殆どまたは完全な不存在によって特徴付けられるまれな遺伝障害である。ほとんどゼロの血漿レベルのHDLに加え、TDを持つ患者は扁桃、リンパ節、肝臓、脾臓、胸腺、腸および手腕細胞を含めたいくつかの組織においてコレステリルエステルの大量の沈積および蓄積を有する (Fredrickson, D.S., J. Clin. Invest., 43:228-236 (1964); Assmannら., The Metabolic Basis of Inherited Disease, (McGraw-Hill, New York, 1995))。細胞メカニズムは従前に同定されていないが

、最近の実験は、TDを持つ対象からの細胞が、コレステロールおよびリン脂質のアポリポ蛋白質 - 媒介除去のプロセスで欠けていることを示した (Remaleyら., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17, 1813 - 1821 (1997); Francisら., *J. Clin. Invest.*, 96, 78 - 87 (1995); Roglerら., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 15, 683 - 690 (1995))。これらの結果は、TD患者におけるひどいHDL欠乏が生じたばかりのアポA - Iが脂質を獲得できないことに由来する。彼らは脂質リッチな粒子に成熟しないので、TD患者における生じたばかりのHDLは迅速に異化され、血漿から除去され、殆どゼロレベルの循環HDLが得られる (Remaley *supra* (1997); Francis, *supra* (1995); Horowitzら., *J. Clin. Invest.*, 91, 1743 - 1752 (1993); Schaeferら., *J. Lip. Res.*, 22: 217 - 228 (1981))。

【0010】

減少したHDL - コレステロールレベルに由来する冠心臓病に対する未成熟アテローム性動脈硬化症および高い危険に関連する他の障害は低アルファリポ蛋白質血症および家族性HDL不足症候群 (FHA) である。これらの障害を持つ人々は、しばしば、正常なLDLコレステロールおよびトリグリセリドレベルを有する。加えて、糖尿病、アルコール依存症、甲状腺機能低下症、肝臓病および上昇した血圧のごとき障害の結果、減少したHDL - コレステロールの血症レベルがもたらされるが、これらの障害の多くは上昇したLDL - コレステロールおよびトリグリセリドレベルが伴う。

【0011】

冠心臓病についての現在の治療は、主として、LDL分泌または促進LDLターンオーバーを阻害することによってLDL - コレステロールの血症レベルを低下させる目的でダイエット操作および/または薬物治療剤に焦点を合わせてきた。クロフィブレート、ゲムフィルロジルおよびフェノフィブレートのごときフィブリン酸の誘導体はリポ蛋白質リパーゼを活性化することによって迅速なVLD

L ターンオーバーを促進する。ニコチン酸は、肝臓VLDL分泌を阻害することによってVLDLおよびLDLの血症レベルを低下させる。加えて、メフィノリン、メバスタチン、プラバスタチン、シムバスタチン、フルバチンおよびロバスタチンのごときHMG-CoAレダクターゼ阻害剤は、LDLの細胞摂取の増加を引き起こすコレステロールの細胞内構成を阻害することによって血漿LDLレベルを低下させる。加えて、コレスチリン、コレスチポールおよびプロブコールのごとき胆汁酸-結合樹脂は、肝臓中のLDL-コレステロールの異化を増加させることによってLDL-コレステロールのレベルを減少させる。

【0012】

しかしながら、これらの療法の多くは長期使用を妨げかねない低い効率および/または副作用を伴う。例えば、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤は毒性のかなりの危険性を担う。なぜならば、それらは、コレステロールに加えて他の重要なイソプレノイド化合物の合成に必要なメバロネートの合成を阻害するからである。また、ゲムフィブロジルおよびニコチン酸は、腎臓損傷、筋肉障害、筋肉グロビリン血症および許容されない皮膚の潮紅および掻痒を含めたひどい有害効果を伴う。加えて、冠心臓病を持つ患者を治療するにおけるプロブコールの役割は確かではない。なぜならば、その投与の結果、LDL-コレステロールを低下させる副作用としてより低いHDL-コレステロールレベルがもたらされるからである。

【0013】

さらに、単離された低いHDL-コレステロールレベルを有する患者の治療は特に困難な治療挑戦を提供する。例えば、タンジール病を持つ患者は、たとえそのLDLレベルがすでに約50%だけ低下したにもかかわらず心血管病の4ないし6倍増加を呈する。ゲムフィブロジルおよびニコチン酸が同時にLDLレベルを上昇させるという幾つかの証拠があるが、一般に血漿LDL-コレステロールレベルを低下させることを狙った療法は、減少したHDLレベルの結果として冠心臓病に悩むタンジール患者で効果的ではない。同様に、低いアルファリポ蛋白質血症、家族性HDL欠乏症候群、または低いレベルのHDLに由来する他の心血管病は、血漿LDLのレベルを低下させることを狙った療法から利益は受け

ない。

【0014】

心血管病のための現在の療法に伴う問題は、部分的には、細胞内および細胞外でのコレステロールの移動に関与する生物学は十分には理解されていないという事実由来する。さらに、コレステロール移動において役割を演じる蛋白質は十分には知られていない。従って、コレステロール細胞生物学、ならびに心血管病および高コレステロール血症を伴う他の障害に悩むヒトを治療する方法に対する要求が依然としてある。加えて、心血管病を診断する新しい方法および心血管病を発生する高い危険性があるものを同定するための患者をスクリーニングする新しい方法に対する要望が依然としてある。

【0015】

コレステロール輸送に関与する遺伝子および蛋白質の同定は、心臓病および高コレステロール血症およびアテローム性動脈硬化症に関連する他の障害の治療用医薬剤の開発で有用であろう。加えて、そのような遺伝子の同定は、コレステロール輸送に関連する遺伝子の発現を調節する化合物につきスクリーニングするスクリーニングアッセイの開発で有用であろう。そのような調節化合物の同定はさらなる治療剤の開発で有用であろう。さらに、コレステロール輸送に関与する遺伝子および蛋白質の同定は、心血管病および高コレステロール血症を伴う他の障害の診断インジケートとして有用であろう。

【0016】

(発明の要約)

本発明は、コレステロール流出に関与する新規なポリペプチドおよびポリヌクレオチドを提供する。具体的には、本発明は、新規なATP-結合カセット(ABC1)ポリペプチドおよびABC1ポリペプチドをコードする新規なポリヌクレオチドを提供する。用語「ABC1」および「ABCA1」は、同一ATP-結合カセット蛋白質および遺伝子に対する別の名称である。本発明はABC1ポリペプチド、ポリペプチド断片およびポリペプチド変種を提供する。1つの好ましい実施形態において、本発明は配列番号：2を含む単離されたポリペプチドを提供する。もう1つの好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：2に対

して少なくとも98%同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。また、本発明はタンジール病患者からのABC1ポリペプチドを提供する。1つの好ましい実施形態において、本発明は配列番号：8を含む単離されたポリペプチドを提供する。もう1つの好ましい実施形態において、本発明は配列番号：10を含む単離されたポリペプチドを提供する。

【0017】

加えて、本発明はABC1ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド断片およびポリヌクレオチド変種を提供する。1つの好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：2を含むポリヌクレオチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。もう1つの好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：2に対して少なくとも98%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。また、他の好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：2を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドまたは配列番号：2に対して少なくとも98%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0018】

もう1つの好ましい実施形態において、本発明は配列番号：1を含む単離されたABC1ポリヌクレオチドを提供する。さらなる好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：1のヌクレオチド291-7074を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。さらにもう1つの好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：1と少なくとも90%同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。より好ましくは、ポリヌクレオチドは、配列番号：1に対して少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一性を有するヌクレオチド配列を含む。また、他の好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：1を含むポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド、配列番号：1のヌクレオチド291-7074を含むポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチ

ド、および配列番号：1と少なくとも90%同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに相補的な単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0019】

また、本発明は、ABC1遺伝子の5'フランキング領域に対応するABC1ポリヌクレオチドを提供する。1つの好ましい実施形態において、本発明は配列番号：3を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。他の好ましい実施形態において、本発明は、ヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643、または1394-1532を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。好ましくは、単離されたポリヌクレオチドは配列番号：3のヌクレオチド1394-1532を含む。もう1つの好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：3を含むポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離されたポリヌクレオチドを提供する。また、他の好ましい実施形態において、本発明は、ヌクレオチド1-1532、1080-1043、1181-1643、1292-1643、または1394-1532を含むポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離されたポリヌクレオチドを提供する。本発明のさらにもう1つの好ましい実施形態において、配列番号：3を含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%同一性を有する単離されたポリヌクレオチドが提供される。より好ましくは、該ポリヌクレオチドは、配列番号：3を含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%同一性を有する。さらにより好ましくは、該ポリヌクレオチドは配列番号：3を含むポリヌクレオチドに対して少なくとも95%同一性を有する。また、好ましい実施形態において、ヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643、または1394-1532を含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%同一性を有する単離されたポリヌクレオチドが提供される。より好ましくは、ポリヌクレオチドは、配列番号：3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643、または1934-1532を含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%同一性、なおより好ましくは95%同一性を有する。加えて、本発明は、前記した5'フランキングABC1ポリヌクレオチドに相補的なヌ

クレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。1つの好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：3を含むポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。もう1つの好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643または1394-1532を含むポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0020】

また、本発明はABC1遺伝子の3'フランキング領域に対応するABC1ポリヌクレオチドを提供する。好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6を含む単離されたポリヌクレオチド、およびその相補的配列を提供する。他の好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6を含むポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズする単離されたポリヌクレオチド、およびその相補的配列を提供する。さらに他の好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6を含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%同一性を有する単離されたポリヌクレオチドを提供する。より好ましくは、ポリヌクレオチドを、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6を含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%同一性を有する。なおより好ましくは、ポリヌクレオチドは配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6を含むポリヌクレオチドに対して少なくとも95%同一性を有する。

【0021】

加えて、本発明はタンジール病患者からのABC1ポリヌクレオチドを提供する。1つの好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：8を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する、もう1つの好ましい実施形態において、本発明は配列番号：7を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。さらにもう1つの実施形態において、本発明は配列番号：10を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。さらにもう1つの好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：9を含む単離されたポ

リヌクレオチドを提供する。本発明は、さらに、記載されたポリヌクレオチドに対する相補性を有するヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0022】

もう1つの態様において、本発明は、前記したポリヌクレオチドのいずれかおよび適当な担体を含む組成物を提供する。1つの好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：2を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、配列番号：1を含むポリヌクレオチド、配列番号：1のヌクレオチド291-7074を含むポリヌクレオチド、配列番号：2に対して少なくとも98%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチド、および適当な担体を含む組成物を提供する。もう1つの好ましい実施形態において、組成物は、配列番号：1を含むポリヌクレオチドと少なくとも90%同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドおよび適当な担体を含む。他の好ましい実施形態において、組成物は、配列番号：3を含む単離されたポリヌクレオチドまたは配列番号：3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643または1394-1532を含む単離されたポリヌクレオチドおよび適当な担体を含む。さらに他の好ましい実施形態において、本発明は配列番号：3のポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、または配列番号：3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643、1394-1532を含むポリヌクレオチドを含む組成物、ならびに配列番号：3を含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%同一性を有するポリヌクレオチド、または配列番号：3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643または1394-1532を含むポリヌクレオチド、および適当な担体を含む組成物を提供する。また、本発明によって提供されるのは、前記したポリヌクレオチドのいずれかに相補的なヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドおよび適当な担体を含む組成物である。

【0023】

加えて、本発明は前記したA B C 1ポリヌクレオチド配列のいずれかを含む組換えベクターおよび宿主細胞を提供する。1つの好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：2を含むポリヌクレオチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、配列番号：1を含む単離されたポリヌクレオチド、配列番号：1のヌクレオチド291-7074を含む単離されたポリヌクレオチド、または配列番号：2に対して少なくとも98%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを含む組換えベクターを提供する。もう1つの好ましい実施形態において、組換えベクターは、配列番号：1を含むポリヌクレオチドに少なくとも90%同一性、より好ましくは95%同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを含む。さらにもう1つの好ましい実施形態において、組換えベクターは配列番号：7または配列番号：9を含む単離されたポリヌクレオチドを含む。本発明は、さらに、前記したポリヌクレオチドのいずれかに相補的なヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチドを含む組換えベクターを提供する。さらにもう1つの好ましい実施形態において、組換えベクターは、前記したポリヌクレオチドのいずれかを含み、さらに、異種プロモーターポリヌクレオチドを含む。1つの適当な異種プロモーターはサイトメガロウイルスプロモーターである。特に好ましい実施形態において、組換えベクターはp C E P h A B C 1である。

【0024】

また、本発明は、A B C 1の5'フランキング配列を含む単離されたポリヌクレオチドを含む組換えベクターを提供する。1つの好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：3を含む単離されたポリヌクレオチドまたは配列番号：3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643、または1394-1532を含む単離されたポリヌクレオチドを含む組換えベクターを提供する。さらに、他の好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：3のポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、または配列番号：3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643、または1394-1532を含むポリヌクレオチドを含む組換えベクター、ならびにこれ

らのポリヌクレオチドにたいして少なくとも80%同一性を有するポリヌクレオチドを含む組換えベクターを提供する。本発明は、さらに、前記したポリヌクレオチドのいずれかに相補的なヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを含む組換えベクターを提供する。さらにもう1つの好ましい実施形態において、組換えベクターは記載されたポリヌクレオチドのいずれかを含み、さらに、異種ポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む。適当な異種ポリペプチドは、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼアセチルトランスフェラーゼトランスフェラーゼ、および緑色蛍光蛋白質を含む。好ましくは異種ポリペプチドはルシフェラーゼ蛋白質である。特に好ましい実施形態において、組換えベクターはpAPR1である。

【0025】

加えて、本発明は前記した組換えベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。本発明は、さらに、前記した組換えベクターおよび適当な担体を含む組成物を提供する。

【0026】

また、本発明は哺乳動物宿主細胞においてABC1蛋白質を生産する方法ならびに哺乳動物対象においてABC1蛋白質を発現する方法を提供する。哺乳動物宿主細胞においてABC1蛋白質を生産する方法は、(a)検出可能なレベルのABC1蛋白質を生産するのに十分な量のABC1をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターで哺乳動物宿主細胞をトランスフェクトし、次いで、(b)生成したABC1蛋白質を精製する工程を含む。哺乳動物対象においてABC1蛋白質を発現する方法は、哺乳動物対象においてABC1蛋白質を発現するのに十分な量のABC1をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを哺乳動物対象に投与する工程を含む。

【0027】

加えて、本発明は、哺乳動物対象の細胞からのコレステロール流出を増加させるのに適した組成物および方法を提供する。1つの好ましい実施形態においては、該方法は、細胞からのコレステロール流出を増加させるのに十分な量のABC

1をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを哺乳動物対象に投与することを含む。適当は組換え発現ベクターは、配列番号：2を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、配列番号：1を含む単離されたポリヌクレオチド、配列番号：1のヌクレオチド291-7074を含む単離されたポリヌクレオチド、および配列番号：2に対して少なくとも98%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを含むベクターを含む。好ましい発現ベクターは、ウイルスベクター、特にアデノウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを含む。他の実施形態において、本発明は、DNA-リガンド複合体、アデノウイルス-リガンド-DNA複合体、DNAの直接注入、CaPO₄沈殿、遺伝子銃技術、エレクトロポレーション、リポソームおよびリポフェクションを含めた非-ウイルス送達システムを提供する。

【0028】

もう1つの好ましい実施形態において、哺乳動物対象の細胞からのコレステロール流出を増加させる方法は、細胞においてABC1の発現を増加させる治療量の化合物を哺乳動物対象に投与することを含む。1つの適当な方法は、cAMPアナログを哺乳動物対象に投与することを含む。適当なcAMPアナログは8-ブロモcAMP、N6-ベンゾイルcAMP、および8-チオメチルcAMPを含む。もう1つの適当な方法は、cAMPの合成を増加させる化合物、例えば、フォルスコリンを哺乳動物対象に投与することを含む。さらにもう1つの適当な方法は、ホスホジエステラーゼ阻害剤のごときcAMPの分解を阻害する化合物を哺乳動物対象に投与することを含む。適当なホスホジエステラーゼ阻害剤はロリプラム、テオフィリン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、R020-1724、ビンボセチン、ザプリナスト、ジピリダモール、ミルリノン、アムリノン、ピモベンダン、シロスタミド、エノキシモン、ペルオキシモンおよびベスナリノンを含む。

【0029】

加えて、哺乳動物対象の細胞からのコレステロール流出を増加させるもう1つの適当な方法は、コレステロール流出を増加させるのに十分な量の核受容体に対

する少なくとも1つのリガンドを哺乳動物対象に投与することを含む。適当なりガンドはLXR、RXR、FXR、SXRおよびPPARリガンドを含む。1つの好ましい実施形態において、該方法はLXR核受容体に対するリガンドを哺乳動物対象に投与することを含む。適当なLXRリガンドは20(S)ヒドロキシコレステロール、22(R)ヒドロキシコレステロール、24(S)ヒドロキシコレステロール、25-ヒドロキシコレステロール、および24(S), 25エポキシコレステロールを含む。好ましくは、LXRリガンドは20(S)ヒドロキシコレステロールである。もう1つの好ましい実施形態において、該方法は、RXR核受容体に対するリガンドを哺乳動物対象に投与することを含む。適当なRXRリガンドは9-シスレチノイン酸、レチノール、レチナール、全ての-トランスレチノイン酸、13-シスレチノイン酸、アシトレチン、フェンレチニド、エトレチネート、CD495、CD564、TTNN、TTNNPB、TTAB、およびLGD1069を含む。好ましくは、RXRリガンドは9-シスレチノイン酸である。もう1つの好ましい実施形態において、該方法は、PPAR核受容体に対するリガンドを哺乳動物対象に投与することを含む。1つの適当なりガンドはチアゾリジンジオンのクラスから選択されるリガンドである。さらにもう1つの好ましい実施形態において、該方法は、核受容体に対する少なくとも2つのリガンドを投与することを含む。特に好ましい実施形態において、リガンドは20(S)ヒドロキシコレステロールおよび9-シスレチノイン酸である。

【0030】

加えて、哺乳動物対象の細胞からのコレステロール流出を増加させるもう1つの適当な方法は、コレステロール流出を増加させるのに十分な量のエイコサノイドを哺乳動物対象に投与することを含む。適当なエイコサノイドはプロスタグランジンE₂、プロスタグランジンJ₂、およびプロスタサイクリン(プロスタグランジンI₂)を含む。

【0031】

もう1つの実施形態において、本発明は、哺乳動物対象の細胞からのコレステロール流出を増加させるのに十分な量のABC1活性を増加させる化合物を哺乳動物対象に投与することを特徴とする該細胞からのコレステロール流出を増加さ

せる方法を提供する。

【0032】

また、本発明は、哺乳動物対象においてA B C 1の遺伝子発現を増加させるのに適した方法を提供する。1つの好ましい実施形態において、該方法は、A B C 1の遺伝子発現を増加させるのに十分な量の核受容体に対する少なくとも1つのリガンドを哺乳動物対象に投与することを含む。適当なリガンドはL X R、R X R、F X R、S X RおよびD P A R核受容体に対するリガンドを含む。もう1つの好ましい実施形態において、該方法は、A B C 1の遺伝子発現を増加させるのに十分な量のc A M P アナログを哺乳動物対象に投与することを含む。さらにもう1つの好ましい実施形態において、該方法は、A B C 1の遺伝子発現を増加させるのに十分な量のc A M P の合成を増加させる化合物を哺乳動物対象に投与することを含む。

【0033】

加えて、本発明は、(a) レポーター c D N A を、哺乳動物 a b c 1 遺伝子の発現変調部分で作動可能に連結して、組換えレポーター構築体を生じさせ；(b) 該組換えレポーター構築体を宿主細胞の集団にトランスフェクトし；(c) 宿主細胞の試料中にてレポーター遺伝子発現のレベルをアッセイし；(d) スクリーニングすべきテスト化合物と宿主細胞を接触させ；(e) テスト化合物との接触の後に宿主細胞の試料中にてレポーター遺伝子発現のレベルをアッセイし；ついで、(f) テスト化合物への暴露によって引き起こされたレポーター遺伝子発現のレベルの相対的变化を比較し、それにより、A B C 1 発現変調活性を測定する工程を含むことを特徴とする、A B C 1 発現変調活性につきテスト化合物をスクリーニングする方法を提供する。該組換えレポーター構築体は、本発明によって提供されるA B C 1 の5 ' フランキング領域配列のいずれかのごとき、哺乳動物A B C 1 遺伝子の発現変調部分に作動可能に連結したレポーター遺伝子を含む。1つの好ましい実施形態において、A B C 1 遺伝子の発現変調部分は配列番号：3を含む。もう1つの好ましい実施形態において、A B C 1 遺伝子の発現変調部分は配列番号：3のヌクレオチド1 - 1 5 3 2、1 0 8 0 - 1 6 4 3、1 1 8 1 - 1 6 4 3、1 2 9 2 - 1 6 4 3、1 3 9 4 - 1 6 4 3、または1 3 9 4 - 1

532を含む。適当なレポーターcDNAはリシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコール。および緑色蛍光蛋白質cDNAを含む。好ましくは、宿主細胞は哺乳動物細胞である。該方法の特に好ましい実施形態において、組換えレポーター構築体はpAPR1である。

【0034】

また、本発明において提供されるのは、(a)培養中に維持された哺乳動物細胞の試料においてコレステロール流出のレベルをアッセイして、コレステロール流出の対照レベルを決定し；(b)該細胞をスクリーニングすべきテスト化合物と接触させ；(c)テスト化合物との接触の後に細胞の試料においてコレステロール流出のレベルをアッセイし；(d)テスト化合物との接触の後に細胞の試料においてABC1-媒介コレステロール流出のレベルをアッセイし、それにより、テスト化合物が培養中の細胞からのABC1-培養コレステロール流出を促進するか否かを判断する工程を含むことを特徴とする、テスト化合物が培養中の細胞からのABC1-培養コレステロール流出を促進するか否かを判断するためにテスト化合物をスクリーニングする方法である。該細胞は一次培養または細胞系に由来することができる。テスト化合物をスクリーニングするための適当な細胞は繊維芽細胞、マクロファージ、肝、および腸細胞系を含む。好ましくは、該細胞系はRAW264.7である。1つの好ましい実施形態において、結合に際してABC1の活性を阻害する抗-ABC1抗体を用い、ABC1-媒介コレステロール流出を測定する。もう1つの好ましい実施形態において、ABC1-媒介コレステロール流出は、アンチセンスABC1ポリヌクレオチドを用いて測定する。特に好ましい実施形態において、アンチセンスポリヌクレオチドは配列番号：57を含む。

【0035】

加えて、本発明は、哺乳動物対象の細胞においてABC1発現の比較レベルを検出する方法を提供する。かかる方法を用いて、冠心臓病に対する対象の罹患性を測定することができる。哺乳動物対象の細胞においてABC1発現の比較レベルを検出する方法が提供され、これは、(a)哺乳動物対象からの細胞試料を得、(b)細胞試料においてABC1 mRNA発現のレベルをアッセイし；つい

で、(c)細胞試料におけるABC1 mRNA発現のレベルとABC1 mRNA発現のあらかじめ決定した標準レベルと比較し、それにより、哺乳動物対象の細胞においてABC1遺伝子発現の比較レベルを検出することを含む。ABC1 mRNA発現のレベルを測定する適当な方法は、例えば、RT-PCR、ノーザンブロット、およびRNAse保護アッセイを含む。

【0036】

また、本発明は、哺乳動物対象の細胞においてABC1蛋白質の比較レベルを検出する方法を提供する。そのような方法を用いて、冠心臓病に対する対象の罹患性を測定することができる。哺乳動物対象の細胞においてABC1蛋白質の比較レベルを検出する方法が提供され、これは、(a)哺乳動物対象からの細胞試料を得、(b)細胞試料においてABC1蛋白質の量をアッセイし、ついで、(c)細胞試料におけるABC1蛋白質の量とABC1蛋白質のあらかじめ決定した標準量とを比較し、それにより、哺乳動物対象の細胞においてABC1蛋白質の比較レベルを検出することを含む。ABC1の蛋白質の量は、当該分野で利用できる種々のイムノアッセイを用いて測定することができる。例えば、ABC1蛋白質の量は、(a)細胞試料を抗-ABC1抗体の集団と接触させ、ついで、(b)試料と会合した特異的-結合性ABC1抗体を検出することによって測定することができる。ABC1抗体を検出する適当な方法はウエスタンブロッティング、免疫沈殿およびFACSを含む。

【0037】

もう一つの態様において、本発明は、記載されたABC1ポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。一つの好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：2を含む単離されたポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体を提供する。もう一つの好ましい実施形態において、本発明は、配列番号：2に対する少なくとも98%同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体を提供する。該抗体はモノクローナル抗体とすることができるか、あるいは該抗体はポリクローナル抗体とすることができる。さらにもう一つの実施形態において、該抗体は、ABC1ポリペプチドへの結合に際して、ABC1ポリペプチドのコレステロール輸送活性を阻害する。

【0038】

加えて、本発明は、少なくとも1つのアッセイで十分な量の哺乳動物ABC1遺伝子の発現変調部分に作動可能に連結したレポーターcDNAおよび使用のための指令書を含むことを特徴とする、化合物のABC1発現変調活性を測定するために化合物をスクリーニングするのに適したキットを提供する。1つの好ましい実施形態において、該キットは、さらに、レポーター遺伝子を検出する手段を含む。もう1つの好ましい実施形態において、哺乳動物ABC1遺伝子の発現変調部分は配列番号：3を含む。さらにもう1つの好ましい実施形態において、哺乳動物ABC1遺伝子の発現変調部分は、配列番号：3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643、1394-1643または1394-1532を含む。適当なレポーターcDNAはルシフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールおよび緑色蛍光蛋白質cDNAを含む。好ましくはレポーターcDNAはルシフェラーゼである。該方法の特に好ましい実施形態において、組換えレポーター構築体はpAPR1である。

【0039】

また、本発明は、化合物がABC1-依存性コレステロール流出を変調するか否かを判断するために化合物をスクリーニングするのに適したキットを提供する。1つの好ましい実施形態において、該キットは、少なくとも1つのアッセイに十分な量の不活化抗-ABC1抗体および使用のための指令書を含む。もう1つの好ましい実施形態において、該キットは、少なくとも1つのアッセイに十分な量のアンチセンスABC1オリゴヌクレオチドおよび使用のための指令書を含む。特に好ましい実施形態において、アンチセンスABC1オリゴヌクレオチドは配列番号：53を含む。

【0040】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

本発明によると、細胞からのコレステロール流出を増加させる新規なポリペプチドが提供される。特に、本発明は、コレステロール流出を増加させることが示された新規なATP-結合カセット1(ABC1)ポリペプチドを提供する。

【0041】

A B C 1 は、細胞膜に存在し、A T P加水分解を利用して、原形質膜を横切って広く種々の基質を輸送するA T P - 結合カセット蛋白質のファミリーのメンバーである。用語「A B C 1」および(A B C A 1)はともに同一のA T P - 結合カセット蛋白質をいうことに注意すべきである。用語「A B C A 1」は命名委員会によって1999年に導入され、当該分野では限定された許容を受けている。今日まで、このファミリーの30を超えるメンバーはヒトゲノムで同定されている。これらの相同蛋白質は、それを通して、分子が細胞膜を通じて輸送されるチャネル - 様構造およびA T Pと結合してエネルギー発生A T P - 加水分解を輸送にカップリングされる1以上のドメインを含有する。ファミリーのメンバーは多薬物抵抗性因子(M D R / P糖蛋白質; C h e n ら., C e l l , 47:381-389(1986); S t r i d e ら, M o l . P h a r m a c o l . , 49:962-971(1996))、抗原提示に関連する輸送体(N e e f j e s ら, S c i e n c e , 261:769-771(1993); S h e p h e r d ら, C e l l , 74:577-584(1993))、および嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンスレギュレーター(C h a n g ら, J . B i o l . C h e m . , 269:18572-18575(1994); R o m m e n s ら, S c i e n c e , 245:1059-1065(1989))を含む。A B C輸送体ファミリーのメンバーは、一般に、長い荷電領域および高度に疎水性のセグメントによって連結された2つの対称半体内で見いだされる4つのドメインよりなる。各半分は、6つの膜貫通セグメントを含有する疎水性ドメインならびに多くのA T P a s e に典型的な高度に保存されたW a l k e r AおよびB配列モチーフを含有する親水性ヌクレオチド結合ドメインを含有する(H y d e ら, N a t u r e , 346:362-365(1990); L u c i a n i ら, G e n o m i c s , 21:150-159(1994))。輸送体の活性はヌクレオチド結合ドメインにおけるA T Pとの相互作用に依存し、2つの対称半体を連結する領域における残渣のリン酸化を介する調節による(B e c q ら, J . B i o l . C h e m . , 272:2695-2699(1997))。

【0042】

本明細書中に記載されたいくつかの系列の証拠は、細胞内コレステロール貯蔵のアポリポ蛋白質 - 媒介可動化における非常に重要な蛋白質としてABC1を同定した。まず、ここに提示された研究は、ABC1がタンジール病、以上HDL - コレステロール代謝によって特徴付けられる遺伝的障害において欠けていることを示した。すでに示され、本明細書中では実施例1に示したごとく、タンジール病における遺伝子欠陥は細胞内からのコレステロールのアポリポ蛋白質媒介流出の経路において欠陥を引き起こしてその結果、かなり減少したコレステロール流出活性および低いHDL - コレステロールレベルをもたらす (Oramら, J. Lipid Res., 37: 2743 - 2491 (1996); Francisら, J. Clin. Invest., 96: 78 - 87 (1995))。タンジール病を持つ家族の遺伝的連鎖解析は欠陥遺伝子を染色体9q31上の間隔に帰属させた (Restら, Nature Genetics, 20: 96 - 98 (1998))。公のデータベースのサーチは、ABC1遺伝子が染色体9q22 - 9q31に突き止められことを明らかとし、これはRustらで明らかにされた該間隔よりも広いがそれを含む。(Lucianiら, Supra (1994))。そのデータに基づき、ヒトABC1遺伝子の照射ハイブリッドマッピングを行い、これは、Rustらによって報告されたヒト染色体9q31の7 - cM領域内にはっきりとある2つのマーカーの間に該遺伝子を位置付けた。加えて、実施例2に示されるごとく、マイクロアレイ分析は、ABC1遺伝子が、正常な細胞と比較してタンジール患者細胞において2.5倍過小発現されることを明らかとした。これらの研究は、タンジール病における欠陥遺伝子をABC1として同定した。加えて、ここに示されたさらなる研究は、ABC1活性をコレステロール流出活性に結び付けた。まず、研究は、4,4 - ジイソチオシアノスチルベン - 2,2' - ジスルホン酸 (DIDS) およびスルホプロモフタレイン (BSP) のごときABC1輸送活性の阻害剤もまた繊維芽細胞からのアポA I - 媒介コレステロール流出を阻害することを示した (実施例6参照)。またアンチセンスABC1オリゴヌクレオチドを用い、ABC1遺伝子発現の阻害が、繊維芽細胞からのアポA I - 媒介コレステロール流出を阻害することを示した (実施例7)。対照的に、ABC1遺伝子がマウス単球細胞にトランスフェク

トされたトランスフェクション実験は、ABC1の過剰発現の結果、アポAI - 媒介流出の増加をもたらすことを示した（実施例8）。最後に、野生型およびタンジール患者mRNAを用いて行ったRI-PCRは、ABC1 mRNA発現が正常な皮膚繊維芽細胞におけるコレステロール流出に関連する細胞状態によって調製されるが、タンジール患者繊維芽細胞においてはそうではないことを明らかにした（実施例9）。これらの知見に基づき、ABC1はコレステロール流出において主要な役割を演じると判断された。

【0043】

ABC1は、原形質膜の外側リーフレットへの細胞内コレステロールの移動において役割を演じる。ABC1の欠如または欠陥ABC1による細胞内コレステロールの不十分な輸送の結果、それとアポAIおよび他のアポリポ蛋白質が特異的に相互作用する特異的膜ドメインにおけるコレステロールの欠如をもたらす（Stanglら, J. Biol. Chem., 273:31002-31008 (1998); Babbittら, J. Biol. Chem., 272:13242-13249 (1997)）。コレステロールのアポAIへの送達の失敗は、血症から迅速に除去されるコレステロール - 欠陥HDL粒子の形成に導く（Bojanovskiら, J. Clin. Invest., 80:1742-1747 (1987)）。

【0044】

定義

以下の定義は、本明細書を通じて用いるある用語の理解を容易にするために掲げる。

【0045】

本発明においては、「単離された」とは、その元の環境（例えば、もしそれが天然に生じるのであれば天然の環境）から取り出された物質をいい、かくして、その天然状態から「人の手によって」改変される。例えば、単離されたポリヌクレオチドはベクターまたは組成物の1部となることができるか、あるいは細胞内に含有することができ、依然として「単離されている」。なぜならば、ベクター、組成物または特定の細胞はポリヌクレオチドの元の環境ではないからである。

【0046】

本明細書で用いるごとく、「ポリヌクレオチド」は、合成および天然の双方の起源のDNAおよびRNAを含むように定義される。ポリヌクレオチドは一本鎖または二本鎖DNAまたはRNA、あるいはRNA/DNAヘテロデュプレックスとして存在することができる。かくして、本発明のポリヌクレオチドはいずれかのポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドよりなることができ、これは未修飾RNAまたはDNAあるいは修飾RNAまたはDNAで有り得る。例えば、ポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域、または一本鎖、二本鎖および三本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖、二本鎖RNA、および一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖または、より典型的には二本鎖または三本鎖、あるいは一本鎖および二本鎖領域の混合物で有り得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子より成り得る。加えて、ポリヌクレオチドは、RNAまたはDNAあるいはRNAおよびDNA双方を含む三本鎖領域よりなることができる。また、ポリヌクレオチドは1以上の修飾された塩基または安定性または他の理由で修飾されたDNAまたはRNA骨格を含有することもできる。「修飾された」塩基は、例えば、トリチル化塩基およびイノシンのごとき異常塩基を含む。種々の修飾をDNAおよびRNAに対して成すことができ；かくして、「ポリヌクレオチド」はポリヌクレオチドの化学的に酵素的にまたは代謝的に修飾された形態を含む。用語「ポリヌクレオチド」はしばしばオリゴヌクレオチドといわれる短いポリヌクレオチドも含む。

【0047】

用語「ポリペプチド」とは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合によって相互に連結した2以上のアミノ酸を含むいずれのペプチドまたは蛋白質もいう。「ポリペプチド」とは、通常はペプチドと言われる短いアミノ酸配列、ならびに一般に蛋白質といわれるより長いアミノ酸配列をとにもいう。ポリペプチドは20の遺伝子がコードするアミノ酸以外のアミノ酸を含有することができる。さらに、ポリペプチドは、プロセッシングおよび他の翻訳後修飾のごとき天然のプロセスによって、または当該分野でよく知られた化学的修飾技術によって修飾することができる。与えられたポリペプチドは多くのタイプの修飾を含有するこ

とができる。また、同一タイプの修飾が、ポリペプチドにおける1以上の部位において同一または種々の程度存在することができる。修飾は、ペプチドの骨格、アミノ酸の側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端を含めたポリペプチドのどこかで起こることができる。修飾は、限定されるものではないが、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、リン酸化、プレニル化、硫酸化、セレノイル化、ならびにヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体、脂質または脂質誘導体、またはホスファチジルイノシトールの共有結合を含む。他の修飾は架橋、環化、ピログルタメートの形成、GP Iアンカー形成、蛋白質分解プロセッシングラセミ化、およびアルギニル化およびユビキチン化のごときアミノ酸のt-RNA-媒介負荷を含む。例えば、Proteins-Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., T.E.Creighton, W.H.Freedman and Co., New York (1993); Word, F., Posttranslational Protein Modification: Perspectives and Prospects, in Posttranslation Covalent Modification of Proteins. B.C.Johnson.Ed., Academic Press, New York (1983); Seifterら., Meth.Enzymol., 182:626-646 (1990); and Rattanら., Protein Synthesis: Posttranslational Modification and Aging, Ann. N.Y.Acad.Sci., 663:48-62 (1992)) 参照。本発明のポリペプチドはいずれかの適当な方法で調製することができる。かかるポリペプチドは単離された天然に生じるポリペプチド、組換えにより生産されたポリペプチド、合成により生産されたポリペプチド、またはこれらの方法の組合せによって生産されたポリペプチドを含む。かかるポリペプチドを生産する手段は当該分野でよく知られている。

本発明の「ポリヌクレオチド」は、配列番号：3または配列番号：3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643、1394-1643または1394-1532、あるいはその相補体に対し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ハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドを含む。また、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6あるいはその相補体に対し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ハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドも含む。

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、50%フォルミド、5×SSC(750mM NaCl、75mMクエン酸ナトリウム)、mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルトの溶液、10%デキストラン硫酸塩、および20μg/mlの変成した剪断サケ精子DNAを含む溶液中での42℃における一晩のインキュベーション、続いての約65℃における0.1×SSC中でのフィルターの洗浄をいう。

【0049】

本明細書中で用いるごとく用語「相補性」とは、例えば、二本鎖ポリヌクレオチドの2つのストランドの間、またはオリゴヌクレオチドプライマーおよび増幅もしくは配列決定されるべき一本鎖ポリヌクレオチド上のプライマー結合部位の間のごときヌクレオチドの間のハイブリダイゼーションまたは塩基対合をいう。2つの一本鎖ヌクレオチド分子は、1つのストランドのヌクレオチドが、他のストランドのヌクレオチドの少なくとも約80%にて適当なヌクレオチド挿入、欠失または置換、対をもって最適に整列する場合に相補性であるといわれる。

【0050】

当該分野で知られている「同一性」は、配列を比較することによって決定して、2以上のポリヌクレオチド配列または2以上のポリヌクレオチド配列の間の関係である。また、「同一性」または「同様性」は、そのような配列のストリングの間のマッチによって決定して、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列の間の配列関連性の程度をいう当該分野で認められた意味を有する。「同一性」および「同様性」は、(Computational Molecular Bio

logy, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, (1993); Computer Analysis of Sequence data, Part I, Griggin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, (1987); and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, (1991); and Carillo, H., and Lipton, D. SIAM J Applied Math 48:1073 (1988)) に公表されて入るものを含めた多数のよく知られた方法を用いて計算することができる。2つの配列の間の同一性または同様性を判断するのに通常使用された方法は、限定されるものではないが、“Guide to Hugs Computers,” Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, (1994), and Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988) に開示されたものを含む。同一性を決定する好ましい方法は、テストされる配列の間に最大のマッチを与えるように設計される。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを整列させるための方法は、GCGプログラムパッケージ (Devereux, J., R, Nucleic Acids Research (1984) 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTIN, FASTA (Atschul, S.F.ら., J. Molec. Biol. 215:403 (1990)). Bestfit program (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix

, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711 (Smith および Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981) の局所的相同性アルゴリズムを使用) を含めたコンピュータプログラムに編集されている。

【0051】

特定の配列が、例えば、参照配列に対して90%同一であるか否かを判断するのに配列整列プログラムのいずれかを用いると、パラメーターは、同一性のパーセンテージが参照ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの全長にわたって計算され、参照ポリヌクレオチド中のヌクレオチドの合計数の10%までの同一性におけるギャップが許容されるように設定される。

【0052】

グローバル配列整列ともいわれる、クエリー配列(本発明の配列)および対象配列間の最良の総じてのマッチを決定する好ましい方法は、Brutlagら(Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990))のアルゴリズムに基づいたFASTDBコンピュータプログラムを用いて決定することができる。用語「配列」はヌクレオチドおよびアミノ酸配列を含む。配列整列において、クエリーおよび対象配列はともにヌクレオチド配列であるか、あるいはともにアミノ酸配列である。該グローバル配列整列の結果はパーセンと同一性で表す。パーセント同一性を計算するDNA配列のFASTDBサーチで用いる好ましいパラメーターは: マトリックス=ユニタリー、k-tuple=4、ミスマッチペナルティー=1、接合ペナルティー=30、ランダム化基長さ=0、およびカットオフスコア=1、ギャップペナルティー=5、ギャップサイズペナルティー0.05、およびウインドウサイズ=500またはどれだけ短かろうがヌクレオチド塩基におけるクエリー配列の長さである。アミノ酸整列のパーセント同一性および同様性を計算するのに使用される好ましいパラメーターは: マトリックス=PAM 150、k-tuple=2、ミスマッチペナルティー=1、接合ペナルティー=20、ランダム化基長さ=0、カットオフスコア=1、

ギャップペナルティー = 5、ギャップサイズペナルティー = 0.05、およびウィンドウサイズ = 500またはどれだけ短かろうがアミノ酸残基におけるクエリー配列の長さである。

【0053】

説明として、配列番号：1に含有される配列に対して少なくとも90%「同一性」のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド配列が配列番号：1の合計長さの各100ヌクレオチド当たり10までの点突然変異を含み得る以外は、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が配列番号：1に含まれる配列と同一であることを意味する。換言すれば、配列番号：1に対して少なくとも90%同一性を有するヌクレオチド配列を含みポリヌクレオチドを得るためには、配列番号：1に含まれる配列においてヌクレオチドの10%までを欠失し、挿入しまたは他のヌクレオチドで置き換えることができる。これらの変化はポリヌクレオチド全体のどこかで起こることができ、ヌクレオチド内または配列番号：1内の1以上の連続群で個々に分散し得る。

【0054】

同様に、配列番号：2に含まれる配列に対して少なくとも98%「同一性」のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、ポリペプチド配列が配列番号：2の合計長さの各100アミノ酸当たり2までのアミノ酸改変を含むことができる以外は、ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号：2に含まれる配列と同一であることを意味する。換言すれば、配列番号：2と少なくとも98%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るためには、配列番号：2に含まれる配列中のアミノ酸残基の2%までを欠失し、挿入し、または他のアミノ酸残基で置き換えることができる。これらの変化はポリペプチド全体のどこかで起こることができ、残基間または配列番号：2内の1以上の連続群で個々に分散することができる。

【0055】

「生物学的活性を有するポリペプチド」とは、用量依存性をもってまたはそれなくして、特定の生物学的アッセイにおいて測定して、本発明のポリペプチドの活性と同様であるが必ずしも同一ではない活性（例えば、コレステロール輸送活性）を呈するポリペプチドをいう、用量依存性が存在する場合には、それは、ポ

リペプチドのそれと同一である必要はないが、むしろ、本発明のポリペプチドと比較して与えられた活性における用量 - 依存性に実質的に同様である（例えば、候補ポリペプチドは、本発明のポリペプチドに対してより大きな活性または約25倍以下小さい、好ましくは、約10倍以内小さな活性、最も好ましくは約3倍以下小さい活性を呈するであろう）。

【0056】

「ポリペプチド変種」とは、本発明のABC1ポリペプチドと異なるが、その本質的な特性を保有するポリペプチドをいう。一般に、変種は総じて密接に似ており、多くの領域に置いて、配列番号：2を含むポリペプチドと同一である。好ましくは、ポリペプチド変種は生物学的活性、すなわち、コレステロール輸送活性を保持する。変種は、限定されるものではないが、スプライス変種および対立遺伝子変種並びに付加、欠失および置換変種を含む。

【0057】

同様に、「ポリヌクレオチド変種」とは、本発明のポリヌクレオチドとは異なるがその本質的な特性を保有するポリヌクレオチドをいう。該変種はコーディング領域、非コーディング領域、または双方において改変を含むことができる。かくして、例えば、ABC1ポリヌクレオチド変種は、配列番号：1のそれと異なるが、コレステロール輸送活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する。また、例えば、ポリヌクレオチド変種は、配列番号：3のそれと異なるが、プロモーター活性を保有するヌクレオチド配列を有する。特に好ましいものは、サイレント置換、付加または欠失を生じるが、コードされたポリペプチドの特性または活性を改変しない改変を含むポリヌクレオチド変種である。遺伝暗号の縮重のためサイレント置換によって生じたヌクレオチド変種が好ましい。さらに、10 - 20、5 - 10、1 - 5または1 - 2アミノ酸がいずれかの組合せにおいて置換され、欠失または付加された変種もまた好ましい。ポリヌクレオチド変種は、種々の理由で、例えば、特定の宿主のためのコドン発現を最適化するのに生じさせることができる（例えば、ヒトmRNAにおけるコドンでE. coliのごとき細菌宿主によって好まれるものへの変化）。

【0058】

「対立遺伝子変種」は、生物の染色体上の与えられた遺伝子座を占有する遺伝子のいくつかの代替形態のうちの1つをいう天然に生じる変種である (Gene s II, Lewin, B. 編, John Wiley & Sons, New York (1985))。これらの対立遺伝子変種はポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドレベルいずれかにおいて変化することができる。別法として、天然に生じない変種は突然変異誘発技術によってまたは直接的合成によって生じさせることができる。

【0059】

用語「保存的アミノ酸置換」とは、その部位におけるアミノ酸残基の極性または電荷に対してほとんどまたは全くないような、天然アミノ酸残基の非天然残基での置換をいう。例えば、保存的置換は、いずれかの他の非 - 極性残基でのポリペプチド中の非極性残基の置換に由来する。保存的置換のもう1つの例は酸性残基のもう1つの酸性残基での置換である。保存的置換は、天然に生じるABC1ポリペプチドのそれと同様な機能的および化学的特徴を有するABC1ポリペプチドを生じると期待させる。

【0060】

用語「オルソログ」とは、異なる主から同定されたポリペプチドに対応するポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトABC1ポリペプチドはオルソログと考えられる。

【0061】

用語「ベクター」を用いて、コーディング情報を宿主細胞に移動させるのに使用されるいずれかの分子 (例えば、核酸、プラスミドまたはウイルス) をいうのに用いられる。

【0062】

用語「発現ベクター」とは、宿主細胞の形質転換に適し、挿入された異種核酸配列の配列を指令しおよび/または制御する核酸配列を含むベクターをいう。発現は、限定されるものではないが、もしイントロンが存在すれば、転写、翻訳およびRNAスプライシングのごときプロセスを含む。

【0063】

本明細書中で用いるごとく、用語「転写調節領域」または「発現変調部分」とは、限定されるものではないが、プロモーター、エンハンサーおよびリプレッサーを含めた遺伝子のいずれかの領域をいう。

【0064】

本明細書中で用いるごとく、用語「プロモーター」とは、構造遺伝子の転写を制御する（一般に、約100ないし1000bp内の）構造遺伝子の開始コドンに対して上流（すなわち、5'側）に位置する転写されない配列をいう。

【0065】

本明細書中で用いるごとく、用語「エンハンサー」とは、プロモーターに作用して転写を増加させる、通常長さが10 - 300bpであるDNAのシス-作用性エレメントをいう。エンハンサーは比較的配向および位置非依存性である。それらは転写ユニットに対して5'および3'側に見いだされている。

【0066】

「宿主細胞」は形質転換またはトランスフェクトされている、あるいは外因性ポリヌクレオチド配列によって形質転換またはトランスフェクションが可能な細胞である。該用語は、選択された遺伝子が存在する限り、子孫がもとの親と形態または遺伝子的造りが同一であるか否かに拘わらず、親細胞の子孫を含む。

【0067】

用語「作動可能に連結した」は、ここでは、かく記載されたフランキング配列がその通常の機能を行うように配置されまたは組み立てられたフランキング配列の配置をいうのに用いられる。かくして、コーディング配列に作動可能に連結したフランキング配列はコーディング配列の複製、転写および/または翻訳を行うことができる。例えば、プロモーターが当該コーディング配列の転写を指令できる場合にコーディング配列はプロモーターに作動可能に連結している。フランキング配列は、それが正しく機能する限り、コーディング配列に隣接している必要はない。かくして、例えば、介在するいまだ翻訳されていないが転写された配列はプロモーター配列およびコーディング配列の間に存在することができ、プロモーター配列は依然としてコーディング配列に「作動可能に連結している」と考えられることができる。

【0068】

用語「トランスフェクション」は、細胞による外来性または外因性DNAの摂取をいうのに用いられ、外因性DNAが細胞膜の内部に導入されてしまっている細胞はトランスフェクトされている。多数のトランスフェクション技術が当該分野でよく知られており、ここに開示される。例えば、Grahamら, 1973, *Virology* 52:456; Sambrookら, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davisら, *Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986); and Chuら, 1981, *Gene* 13:197参照。そのような技術を用いて1以上の外因性DNA部位を適当な宿主細胞に導入することができる。

【0069】

ABC1ポリペプチド

本発明は新規なヒトABC1ポリペプチドに関する。1つの実施形態において、ABC1ポリペプチドは配列番号；2に示されたアミノ酸配列を含む。他の者によって報告されたヒトABC1蛋白質とは対照的に、配列番号；2に示されたABC1ポリペプチドはアミノ末端にさらに60個のアミノ酸を有し、これは2201アミノ酸よりも2261アミノ酸のABC1蛋白質を明らかにする(Langmannら, in *Biochem, Biophys. Res. Comm.* 257:20-33(1999)参照)。加えて、配列番号；2に示されたABC1ポリペプチドは、いくつかのアミノ酸残基において他の報告された配列とは異なる。具体的には配列番号；2に示された現在のABC1ポリペプチドは残基159においてRの代わりにK、765においてVの代わりにI、823においてIの代わりにM、1495においてTの代わりにI、1588においてPの代わりにL、1914においてRの代わりにK、および2108においてPの代わりにLを有する。公表された記録と合致させたままとするには、前記アミノ酸番号は配列番号；2のものよりもむしろ(Lawnら, *Clin. Invest.*, 104:R25-31(1999)のものである。後記にてさ

らに詳細に考察すると、配列の差異は、最初のA B C 1 c D N AがP C R - ベースの戦略を用いてマウスからクローンされ、引き続いて報告されたヒトA B C 1 c D N A配列がマウス蛋白質の配列から予測したという事実に由来するようである。A B C 1蛋白質は、S D S - P A G Eによって測定された240 k Dの近似的な分子量を有する。

【0070】

また、本発明は、配列番号：2のアミノ酸配列に対してその全長さにわたって少なくとも98%同一性を好ましくは有するアミノ酸配列を含むA B C 1ポリペプチドに関する。より好ましくは、ポリペプチドは配列番号：2のアミノ酸配列に対してその全長さにわたって少なくとも99%同一性を有する。より好ましくは、ポリペプチドは配列番号：2のアミノ酸に対してその全長さにわたって100%同一性を有する。すでに定義したごとく、用語「同一性」とは、ポリペプチド配列の間の配列関連性の程度をいい、これは後記にてさらに定義する。

【0071】

そのような関連A B C 1ポリペプチドは置換、欠失、および挿入変種ならびに対立遺伝子変種、スプライス変種、断片、誘導体およびオルソログを含む。好ましいポリペプチドおよびポリペプチド断片は、A B C 1の生物学的活性を保有するポリペプチドおよび断片を含む。特に、逆コレステロール輸送を媒介するポリペプチドおよび断片が好ましい。また、好ましいのは、改良された逆コレステロール輸送活性を有するポリペプチドおよび断片である。

【0072】

置換、欠失および挿入変種は、配列番号：2に記載されたA B C 1アミノ酸配列と比較して、1以上のアミノ酸配列置換、欠失および/または付加を含むアミノ酸配列を含むA B C 1ポリペプチドをいう。好ましい実施形態において、該変種は、1ないし5、約1ないし10、または約1ないし20、または約1ないし40、または約1ないし60アミノ酸置換、付加および/または欠失を有する。例えば、該変種は、当該変種は生物学的機能を保有する限り、ポリペプチド中のどこかに、ならびにカルボキシル末端および/またはアミノ末端に1以上のアミノ酸残基の付加を有することができる。また、例えば、1以上のアミノ酸は、生

物学的機能の実質的喪失無くしてカルボキシル末端および/またはアミノ末端を含めたポリペプチドのいずれかの領域から欠失させることができる (Ronら, J. Biol. Chem., 268:2984-2988 (1993); Dobeliら, J. Biotechnology, 7:199-216 (1988))。ABC1変種がその生物学的活性を保有する限りアミノ酸置換は保存的、非-保存的またはそのいずれかの組合せであり得る。加えて、置換は非-保存アミノ酸残基で行うことができ、ここに、置換された残基は遺伝暗号によってコードされていてもよくまたはされていなくてもよく、アミノ酸残基は置換された基を有する。

【0073】

ABC1ポリペプチドの適当な変種はよく知られている技術を用いて測定することができる。例えば、生物学的活性を破壊することなく変化させることができるABC1分子の領域を同定することによって、適当なABC1変種を測定することができる。また、当該分野で認識されているごとく、生物学的活性につき、または構造につき重要で有り得る領域でさえ、生物学的活性を破壊することなく、またはポリペプチド構造に有害に影響することなく保存的アミノ酸置換に付すことができる。生物学的活性を破壊することなく変化させることができるアミノ酸残基は、活性につき重要でないABC1ポリペプチドの領域を同定することによって測定することができる (Bowieら, Science, 247:1306-1310 (1990))。例えば、種々の種からのABC1ポリペプチドを比較して、保存された交差種であるABC1分子のアミノ酸残基および領域を測定することができる。保存されたアミノ酸残基は、生物学的機能および/または構造につき重要なようである。対照的に、保存された交差種でなく、かくして、天然の選択によって許容されるABC1分子の領域の変化は、生物学的活性および/または構造に有害に影響しないであろう。従って、非-保存領域において付加、欠失または置換をもつABC1ポリペプチドは適当な変種のようなものである。比較的保存された領域に置いてさえ、化学的に同様なアミノ酸は、活性を保有しつつ天然に生じる残基の代わりに置き換えることができる。

【0074】

加えて、活性または構造につき重要である、A B C RおよびA B C - Cのごとき、A T P - 結合カセット蛋白質ファミリーの他のメンバーにおける残渣を測定する、構造 - 機能実験を用いて適当なA B C 1変種を測定することができる。そのような実験は、他のA T P - 結合カセット蛋白質において活性または構造につき重要であるアミノ酸残渣に対応するA B C 1変種における重要なアミノ酸残基の予測を可能とする。例えば、他のA T P - 結合カセット蛋白質の構造 - 機能実験に基づき、A B C 1における重要なアミノ酸残基は、ヌクレオチド結合およびステロール輸送に関連する領域で見いだされるようである。適当な変種は、例えば、A B C 1ポリペプチドのそのような予測される重要なアミノ酸残基の代わりに化学的に同様なアミノ酸置換を有するポリペプチドを含む。

【0075】

特異的位置にアミノ酸変化を導入する遺伝子工学技術を用いて適当なA B C 1変種を測定して、ポリペプチド機能につき非常に重要な領域を同定することもできる。アミノ酸変化は、例えば、部位 - 特異的突然変異誘発またはアラニン - 走査突然変異誘発を用いて成すことができる (C u n n i n g h a m ら , S c i e n c e , 244 : 1081 - 1085 (1989))。ついで、例えば、本明細書中に記載したコレステロール流出アッセイの内のいずれか1つを用い、得られたA B C 1変種を生物学的活性につきテストすることができる。破壊されたコレステロール流出活性をもたらす特定のアミノ酸残基置換を有する変種は適当なA B C 1変種と考えられないであろう。

【0076】

適当な変種を同定するためのさらなる方法は当該分野でよく知られている。さらに、当業者であれば、蛋白質中のあるアミノ酸位置で許容されるであろうアミノ酸変化を認識するであろう (B o w i e ら , s u p r a (1990))。例えば、一般に、(蛋白質の三次構造内にある)最も埋もれたまたは内部のアミノ酸残基は非極性側鎖を必要とし、他方、表面または外部側鎖のより少ない特徴が一般に保存されることは知られている。さらに、許容された保存的アミノ酸置換は、死亡族または疎水性アミノ酸A l a、V a l、L e uおよびI l eの置換、ヒドロキシル残基S e rおよびT h rの置換、酸性残基A s pおよびG l uの置

換、アミド残基A s nおよびG l nの置換、塩基性残基L y s、A r gおよびH i sの置換、芳香族残基P h e、T y rおよびT r pの置換、小さなサイズのアミノ酸A l a、S e r、T h r、M e tおよびG l yの置換を含む。

【0077】

A B C 1変種は天然に生じるものであるか、人工的に構築されることができる。天然に生じる変種の例は対立遺伝子変種およびスプライス変種である。対立遺伝子変種は、生物または生物の集団の染色体上にある与えられた遺伝子座を占有する遺伝子のいくつかの代替形態の内の1つをいう(Lewin, B., ed., Genes II, John Wiley & Sons, New York (1985))。対立遺伝子変種はポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドレベルいずれかにおいて変化させることができる。スプライス変種とは核酸分子、通常RNAをいい、これはRNA転写体、および対応するポリペプチドにおけるイントロン配列の別のプロセッシングによって生じる。別法として、A B C 1変種は人工的に構築することができる。例えば、A B C 1変種は、部位-特異的突然変異誘発の技術を用いて構築することができる。また、例えば、A B C 1変種は、配列番号：1に記載された野生型DNA配列から記載されたごとく変化するDNA配列を有する、該変種をコードする対応する核酸分子から調製することができる。

【0078】

ポリペプチド断片とは、配列番号：2に記載されたA B C 1の全長アミノ酸配列未満を含むポリペプチドをいう。好ましいポリペプチド断片は、A B C 1の生物学的活性を保有する断片を含む。特に、逆コレステロール輸送を媒介する、または改良された逆コレステロール輸送活性を有する断片が好ましい。A B C 1断片は、生物学的機能が維持される限り、カルボキシル末端および/またはアミノ末端を含めた、ポリペプチドのいずれかの領域から欠失された1以上のアミノ酸を有することができる。A B C 1ポリペプチド断片は、代替スプライシングまたはイン・ビボプロテアーゼ活性を通じるとく天然で生じることができるか、よく知られた方法を用い、人工的に構築することができる。

【0079】

また、本発明は、ここに定義されるごとく、化学的に修飾されているA B C 1ポリペプチド、変種または断片をいうA B C 1ポリペプチド誘導体に関する。誘導体は、ポリペプチドに付着した分子のタイプまたは位置いずれかにおいて、天然に生じるA B C 1ポリペプチドとは異なるように修飾される。誘導体は、さらに、A B C 1ポリペプチドに天然で付着した1以上の化学基の欠失によって形成されたポリペプチドを含む。加えて、配列番号：2のアミノ酸配列を含むA B C 1ポリペプチドならびに前記A B C 1変種および断片を同種ポリペプチドに融合させて、ホモダイマーを形成することができ、あるいは、異種ポリペプチドに融合させてヘテロダイマーを形成させることができる。

【0080】

本発明のもう1つの態様は、タンジール患者から単離されたポリペプチドに対応する、突然変異体A B C 1ポリペプチドおよびその断片に関する。1つの好ましい実施形態において、A B C 1ポリペプチドは配列番号：8を含む。蛋白質はタンジール患者(T D 1)から単離し、実施例1および5に記載されたごとく配列決定する。配列番号：8に記載されたアミノ酸配列は、位置537におけるグルタミンからアルギニン残渣への置換を例外として野生型配列と同様である(残基番号は(Lawnら, J. Clin. Invest., 104:r25-31(1999))のものであり、これは、配列番号：8の位置597に対応する。この残基の位置はアミノ-末端親水性ドメイン内にあり、第1の予測される膜貫通ドメイン近くにある。置換は蛋白質のこの領域中のアミノ酸の電荷を変化させ、その結果図1に示されるように、かなり減少したコレステロール流出活性を有するA B C 1蛋白質がもたらされる。

【0081】

もう1つの好ましい実施形態において、突然変異体A B C 1ポリペプチドは配列番号：10を含む。該蛋白質はタンジール患者(T D 2)から単離されたポリペプチドに対応し、実施例1および5に記載されたごとく配列決定される。配列番号：10に記載されたアミノ酸配列は、残基527におけるアルギニンのトリプトファンへの置換を例外として野生型配列と同様である(残基の番号はLawnら, supra(1999)、これは配列番号：10の位置587に対応す

る)。T E D 1 ポリペプチドと同様に、この置換は、A B C 1 蛋白質のアミノ - 末端親水性ドメイン中のアミノ酸残基の電荷を変化させる。また、得られた突然変異体 A B C 1 蛋白質は、図 1 に示されるごとく、かなり減少したコレステロール流出活性を有する。

【0082】

A B C 1 ポリヌクレオチド

本発明のもう 1 つの態様は、新規な A B C 1 ポリペプチドおよびその変種をコードする単離されたポリヌクレオチドに関する。本発明は、例えば、全長 A B C 1 ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、野生型 A B C 1 の全長 c D N A を含有するポリヌクレオチド、野生型 A B C 1 のコーディング配列の全長を含むポリヌクレオチド、および A B C 1 の非 - コーディング 5 ' および 3 ' 配列を含むポリヌクレオチドを提供する。また、本発明は、タンジール患者のものごとき突然変異体 A B C 1 ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0083】

1 つの好ましい実施形態において、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号 : 2 を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。重要なことには、エクソン 3 に見いだされる予測された開始メチオニンに基づいて 2 2 0 1 アミノ酸の蛋白質につきコードする L a n g m a n n らの公表された配列とは対照的に (L a n g m a n n ら , B i o c h e m , B i o p h y s . R e s . C o m m . , 2 5 7 : 2 9 - 3 3 (1 9 9 9) (G e n B a n k 受託番号 A J O 1 2 3 7 6) 、現在特許請求されているヌクレオチド配列は 5 0 のエクソンを含有し、2 2 6 1 アミノ酸の蛋白質につきコードする (図 4 参照) 。本発明の対応するヌクレオチド配列は、以下の 6 0 アミノ酸 - 末端アミノ酸 :

MACWPQLRLLLWKNLTFRRRQTCQLLLEVAWPLFI
FLILISVRLSYPPYEQHECHFPNKA

に対応する 5 ' 末端にさらなる 1 8 0 ヌクレオチドを含むコーディング配列を含有する。

【0084】

この位置から上流にイン・フレーム停止コドン6ないし9ヌクレオチドがあると仮定すれば、新しく予測される開始部位は、連続的オープンリーディングフレームを生じ得る読所のメチオニンコドンである。該60のさらなるアミノ酸についてのオープンリーディングフレームをやはり含む関連するABC輸送体配列ABC RおよびABC - C (ABC 3としても知られている) とこの新しいABC 1 cDNA配列との整列は高度の同様性を示し、これは、相同ABC輸送体蛋白質が、ヒトABC 1で提案されたアミノ末端延長配列に関連する配列で始まることを意味する。ヒトABC 1の初期に公表された開始部位は、新しく開示されたメチオニンがイン・フレームではないように延長領域に余分なヌクレオチド「n」を含有する公表されたマウスABC 1 cDNA配列 (Lucianiら, Genomics, 21150-159 (1994); GenBank受託番号: X75926) から予測されたようである。しかしながら、もしマウス配列中の「n」ヌクレオチドが無視されれば、延長領域のマウスおよびヒト配列は同一である。これらの結果に徴すれば、全長ヒトABC 1蛋白質は、Langmannらによって従前に提案されて入るごとく、2201アミノ酸よりはむしろ2261アミノ酸を含有するようである。従って、LangmannらはヒトABC 1の十分なオープンリーディングフレームを提示していない。

【0085】

もう1つの好ましい実施形態において、単離されたポリヌクレオチドは、非コーディング5' および3' 配列いずれかの少なくとも1部を含む全長ABC 1 cDNAを含む。好ましくは、該ポリヌクレオチドは配列番号: 1に示されたヌクレオチド配列を含む。配列番号: 1に示された10.4 kbヒトABC 1 cDNA配列は、6783ヌクレオチド+5' および3' 非翻訳領域のオープンリーディングフレームを含有する。位置291に開始コドン、および位置7074に停止コドンがある。配列番号: 1に示された現在のABC 1 cDNAは、いくつかの点で公表されたABC 1 cDNA (GenBank 受託番号: AJ012376) とは異なる。まず、現在のABC 1 cDNAは5' 末端にさらなる350ヌクレオチドおよび3' 末端にさらなる3136ヌクレオチドを含む (ポリ(A)テールは含まず)。また、本発明のABC 1配列は、コーディン

グ領域における10ヌクレオチドの置換によって公表されたABC1 cDNAとは異なる。10の差の内、7つのヌクレオチドの差はアミノ酸変化を予測する。公表された記録と合致させるためには以下のヌクレオチドおよびアミノ酸番号は配列番号：1のものよりはむしろLawrence, Clin. Invest., 104:R25-31(1999)およびGenBank受託番号AJ012376のものである。ヌクレオチドおよびアミノ酸変化は以下の通りである：(1)ヌクレオチド414におけるGの代わりにA；(2)ヌクレオチド596におけるGの代わりにA(アミノ酸159におけるRの代わりにK)；(3)ヌクレオチド705におけるCの代わりにT；(4)ヌクレオチド1980におけるCの代わりにA；(5)2413におけるGの代わりにA(アミノ酸765におけるVの代わりにI)；(6)2589におけるAの代わりにG(アミノ酸823におけるIの代わりにM)；(7)4604におけるCの代わりにT(アミノ酸1495におけるTの代わりにI)；(8)4883におけるCの代わりにT(アミノ酸1588におけるPの代わりにL)；(9)5861におけるGの代わりにA(アミノ酸1914におけるRの代わりにK)；および(10)6443におけるCの代わりにT(アミノ酸2108におけるPの代わりにL)。アミノ酸変化の内5は保存的アミノ酸変化であり、多形または配列のエラーを表し得る。2つの例においれ、本発明の配列はGenBank配列からの重要なアミノ酸の差を予測する。該差の結果、残基1588におけるおよび2108におけるプロリンよりはむしろロイシンがもたらされる。興味深いことには、療法の位置において、予測されるロイシンは、分析した3つのTD試料の各々ならびに高度に保存されたマウスABC1蛋白質にも見いだされた。

【0086】

また、本発明は、配列番号：1を含むポリヌクレオチドに対してその全長にわたって少なくとも80%同一性を好ましくは有するヌクレオチド配列を含むABC1ポリヌクレオチドに関する。より好ましくは、ポリヌクレオチドは、配列番号：1を含むポリヌクレオチドに対してその全長にわたって少なくとも90%同一性を有する。なおより好ましくは、ポリヌクレオチドが、配列番号：1を含むポリヌクレオチドに対してその全長にわたって少なくとも95%同一性を有する

。最も好ましくは、ポリヌクレオチドは、配列番号：1を含むポリヌクレオチドに対してその全長にわたって100%同一性を有する。そのような関連するABC1ポリヌクレオチドは、置換、欠失および挿入変種、ならびに対立遺伝子変種、スプライス変種、断片、誘導体およびオルソログを含み、ここに、1以上のヌクレオチドは置換、欠失、挿入または誘導体化されている。好ましいポリヌクレオチドは、コレステロール流出活性のごとき生物学的活性を保有するABC1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0087】

もう1つの好ましい実施形態において、単離されたポリヌクレオチドはABC1の全コーディング配列を含む。特に好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは配列番号：1のヌクレオチド291-7074に示された配列を示す。この単離されたポリヌクレオチドは6783ヌクレオチドのABC1オープンリーディングフレームを含有し、前記したごとく、2261アミノ酸のポリペプチドをコードする。

【0088】

さらにもう1つの好ましい実施形態において、単離されたポリヌクレオチドは、ABC1変種ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。特に、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号：2のアミノ酸配列に対して少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。また、好ましいのは、配列番号：2のアミノ酸配列に対して少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドである。従って、本発明は、記載された置換、欠失および挿入変種、ならびにABC1対立遺伝子変種、スプライス変種、断片、誘導体、融合ポリペプチドおよびオルソログを含めた、前記ABC1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。好ましいポリヌクレオチドは、ABC1の生物学的活性を保有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。特に、逆コレステロール輸送を媒介するポリペプチドをコードするヌクレオチドが好ましい。また、好ましいのは、改良された逆コレステロール輸送活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。

【0089】

本発明のさらにもう1つの態様は、タンジール患者からの突然変異体ABC1ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドに関する。1つの好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは配列番号：8のポリペプチドをコードし、そのポリペプチドは患者TD1から単離され、それは前記されている。もう1つの好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは配列番号：7に記載されたヌクレオチド配列を含む。配列番号：7に記載されたヌクレオチド配列は十分はオープンリーディングフレーム、ならじに5'および3'フランキング配列を含む。該オープンリーディングフレームは、他の置換の内でも、位置537においてAからGへの置換をもたらすヌクレオチド置換を含む2261のアミノ酸のポリペプチドをコードする(Lawnら, supra(1999))のナンバリングを使用)。

【0090】

突然変異体ABC1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関連するもう1つの好ましい実施形態において、ポリペプチドは配列番号：10のポリペプチドをコードし、そのポリペプチドはタンジール患者TD2から単離され、これはやはり前記した。さらにもう1つの好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは配列番号：9に記載されたヌクレオチド配列を含む。配列番号：9に記載されたヌクレオチド配列は十分はオープンリーディングフレーム、ならびに5'および3'フランキング配列を含む。オープンリーディングフレームは、他の置換の内でも、残基527においてArgからTrypへの置換をもたらすポリヌクレオチド置換を含む2261アミノ酸のポリペプチドをコードする(Lawnら, supra(1999))のナンバリングを使用)。

【0091】

本発明のもう1つの態様は、ABC1の非-コーディング5'フランキングおよび3'フランキング領域を含む単離されたポリヌクレオチドに関する。1つの実施形態において、単離されたポリヌクレオチドはABC1の非-コーディング5'フランキング領域を含む。好ましくは、5'フランキング領域は、限定されるものではないが、ABC1プロモーター領域を含む。かくして、好ましい実施形

態において、ポリヌクレオチドは配列番号：3に示された配列を含む。異種レポーターアッセイによって示され、実施例15で議論したごとく、配列番号：3に記載されたポリヌクレオチドはABC1遺伝子の転写調節領域を含む。図13に示すごとく、配列番号：3に記載されたポリヌクレオチドは、位置1522、1435および1383におけるTATAボックスを含めたいくつかの転写調節エレメント、ならびにいくつかの推定SP1部位、およびいくつかの核レポーター半分部位を含めた転写因子結合部位を含有する1643b.p.非-コーディング配列である。加えて、同定されたステロール応答エレメントは位置1483-1500に見いだされる。実施例17に記載されたさらなる異種レポーターアッセイは、いくつかの区別される配列番号：3の部分がプロモーター活性を保有することを明らかとした。従ってもう1つの好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは配列番号：3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643または1394-1643を含む。特に好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは配列番号：3のヌクレオチド1394-1532を含み、この配列はABC1プロモーター活性を有することが示された(実施例17参照)。さらにもう1つの好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは配列番号：3のヌクレオチド1480-1510を含み、これはLXRリガンドに対するABC1転写応答を調節することが示される。

【0092】

また、5'フランキングポリヌクレオチドは、ストリンジェント条件下で配列番号：3に記載されたヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含み、ここに、該ヌクレオチド配列はABC1プロモーター活性を有する。さらにもう1つの実施形態において、ポリペプチドは、ストリンジェントな条件下で配列番号：3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643、または1394-1643を含むヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含み、ここに、該ヌクレオチド配列はABC1プロモーター活性を有する。

【0093】

もう1つの実施形態において、単離されたポリヌクレオチドはABC1の3'

フランキング領域を含む。ABC1転写体のポリアデニル化の代替部位を表すことができるいくつかの3'非翻訳領域が同定されて入る。好ましくは、3'フランキング領域は調節配列を含有する。例えば、全長3'UTR(配列番号:6)は、Vigilinの結合に必要なことが示されている46配列(AA)nCU/UC(AA)nを含有する。Vigilin、14K相同性ドメインを持つ普遍的蛋白質はエストロゲン-誘導性ピテロゲニンmRNA 3'-非翻訳領域結合蛋白質である(J. Biol. Chem., 272:12249-12252(1997))。結合HDLに加え、VigilinはmRNAの3'フランキング領域に結合し、mRNA転写体の半減期を増加させることが示されて入る(Mol. Cell. Biol., 18:3991-4003(1998))。かくして、3'-フランキング領域を変化させて、例えば、Vigilinの結合を増加させ、それにより、ABC1 mRNAの半減期を増加させることができるであろう。好ましくは、単離されたポリヌクレオチドは配列番号:4に示された配列を含む。また、好ましくは、単離されたポリヌクレオチドは配列番号:5に示された配列を含む。もう1つの好ましい実施形態において、単離されたポリヌクレオチドは配列番号:6に示された配列を含む。他の好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下で配列番号:4、配列番号:5または配列番号:6に記載されたヌクレオチド配列にハイブリダイズする配列を含む。

【0094】

また、本発明は関連するABC1の5'および3'フランキングポリヌクレオチドを含む。従って、本発明は、配列番号:3を含むポリヌクレオチド、配列番号:4を含むポリヌクレオチド、配列番号:5を含むポリヌクレオチド、配列番号:6を含むポリヌクレオチド、または配列番号:3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643または1394-1643を含むポリヌクレオチドに対してその全長にわたって少なくとも80%同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに関する。好ましくは、ポリヌクレオチドは、前記したフランキングポリヌクレオチドのいずれかの1つに対してその全長にわたって少なくとも80%、より好ましくは少なく

とも90%、より好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは100%同一性を有する。好ましいポリヌクレオチドは、転写調節活性のごとき生物学的活性を保有するポリヌクレオチドを含む。

【0095】

本発明は、さらに、前記したポリヌクレオチド配列のいずれか1つに相補的な単離されたポリヌクレオチドに関することが理解される。本明細書中に用いるごとく、用語「相補的」とは、例えば、二本鎖ポリヌクレオチドの2つのストランドの間のごときヌクレオチドの間のハイブリダイゼーションまたは塩基対合をいう。2つの二本鎖ヌクレオチド分子は、1つのストランドのヌクレオチドが、適当なヌクレオチド挿入、欠失または置換と最適に整列し、他のストランドのヌクレオチドの少なくとも約80%と対合する場合に相補的であるといわれる。

【0096】

本発明のもう1つの態様は、前記した新規なABC1および適当な担体を含む組成物に関する。1つの実施形態において、該組成物は、配列番号：2を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、配列番号：1を含むポリヌクレオチド、配列番号：1のヌクレオチド291-7074を含むポリヌクレオチド、配列番号：2のアミノ酸配列に対して少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および担体を含む。もう1つの実施形態において、該組成物は、配列番号：1を含むポリヌクレオチドに対してその全長にわたって少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一性を有するポリヌクレオチドおよび担体を含む。

【0097】

もう1つの実施形態において、該組成物は、ABC1 5'フランキング配列および適当な担体を含む。好ましくは、該組成物は、配列番号：3を含むポリヌクレオチド、または配列番号：3のヌクレオチド断片1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643または1394-1643を含むポリヌクレオチドおよび適当な担体を含む。また、好ましくは、該組成物は、記載した5'フランキング配列のいずれか1つを含むポリヌクレオチドのその全長にわたって少なくとも80%、90%または95%同一性を有するポリヌ

クレオチドおよび適当な担体を含む。さらにもう1つの実施形態において、該組成物は、A B C 1 3' フランキング配列を含むポリヌクレオチドおよび適当な担体を含む。好ましい組成物は、配列番号：4を含むポリヌクレオチド、配列番号：5を含むポリヌクレオチド、または配列番号：6を含むポリヌクレオチド、ならびにこれらのポリヌクレオチドのいずれかに対してその全長にわたって少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一性を有するポリヌクレオチドおよび適当な担体を含む。本発明のさらに他の組成物は突然変異体A B C 1 ポリヌクレオチドを含む。好ましくは、該組成物は配列番号：7を含むポリヌクレオチドまたは配列番号：9を含むポリヌクレオチドおよび適当な担体を含む。

【0098】

加えて、本発明の組成物は、いずれかの組合せにおいて、前記A B C 1 ポリヌクレオチドのうちの2以上および適当な担体を含む。いずれかの適当な水性担体を該組成物で用いることができる。好ましくは、該担体は、該組成物を、室温または貯蔵温度（すなわち、4℃ないし20℃）のごとき所望の温度で安定とし、適当な中性のpHのものである。適当な担体の例は当業者に公知であり、トリス-EDTAおよびDEPC-H₂Oを含む。

【0099】

A B C 1 ベクターおよび宿主細胞

また、本発明は、1以上の前記A B C 1 ポリヌクレオチドを含む組換えベクター、A B C 1 ポリヌクレオチドを含む該ベクターで遺伝子工学的に作成した宿主細胞、および組換え技術によるA B C 1 ポリヌクレオチドの生産に関する。前記したごとく、本発明は、前記した1以上の野生型A B C 1 ポリヌクレオチドを含む組換えベクターを提供する。好ましい実施形態において、組換えベクターは、配列番号：2を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、配列番号：1を含むポリヌクレオチド、および配列番号：1のヌクレオチド291-7074を含むポリヌクレオチドを含む。もう1つの好ましい実施形態において、組換えベクターは、配列番号：2のアミノ酸に対して少なくとも98%同一性であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする変種ポリヌクレオチドを含む。また

、もう1つの好ましい実施形態において、組換えベクターは、配列番号：1を含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%同一である変種ポリヌクレオチドを含む。さらにもう1つの好ましい実施形態において、組換えベクターは、これらのポリヌクレオチドのいずれかに相補的であるポリヌクレオチドを含む。

【0100】

もう1つの実施形態において、組換えベクターは、タンジール病患者から単離された突然変異体ABC1ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む。好ましい実施形態において、組換えベクターは配列番号：8を含むポリヌクレオチドを含む。もう1つの好ましい実施形態において、組換えベクターは配列番号：10を含むポリヌクレオチドを含む。また、組換えベクターは、これらの配列に対して相補的であるポリヌクレオチド配列を含む。

【0101】

また、組換えベクターは、いずれかの組合せにおいて、前記野生型、変種、または突然変異体ABC1ポリヌクレオチドのうちの2以上を含むことができることも理解される。

【0102】

前記した野生型、変種、または突然変異体ポリヌクレオチドのいずれかのごとき、単離されたABC1ポリヌクレオチドはよく知られた連結およびクローニング技術を用いベクターに挿入される。クローニング技術は、Davisら, Basic Methods in Molecular Biology (1986); Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring harbor, N.Y. (1989)); Ausbelら編, Current Protocols in Molecular Biology (1991), (Wiley and Sons (1994)); Goeddel編, Gene Expression Technology (Methods in Enzymology (1991)); Murray編, Gene Transfer and Expression Protocols (Human

Press, Clifton, NJ)を含めたすくつかの標準的なマニュアルに記載されている。

【0103】

ABC1ポリヌクレオチド挿入に適したいずれのベクターも用いることができる。ベクターは、典型的には、使用する特定の宿主細胞で機能するように選択される(すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅および/または発現が起こり得るように宿主細胞マシーンに適合する)。好ましくは、ベクターは細菌、昆虫、または哺乳動物宿主細胞に適合する。また、好ましくは、ベクターは発現ベクターである(発現ベクターのレビューについては、Goeddel, D.V. 編, *Methods Enzymol.*, Academic Press Inc., San Diego, CA(1990))。ベクターは、例えば、ファージ、プラスミド、ウイルス、またはレトロウイルスベクターであり得る。レトロウイルスベクターは複製コンピテントまたは複製欠陥であり得る。後者の場合、ウイルス増殖は、一般に、補充宿主細胞のみで起こるであろう。

【0104】

典型的には、宿主細胞のいずれかで使用される発現ベクターは、プラスミド維持のための、および外因性ヌクレオチド配列の発現のための配列を含有する。集合的に「フランキング配列」というそのような配列は、好ましくは、以下のヌクレオチド配列: プロモーター、1以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終止配列、ドナーおよびアクセプタースプライス部位を含有する完全なイントロン配列、ポリペプチド挿入のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるべきポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、および選択マーカーエレメントのうちの1以上を含むべきである。

【0105】

フランキング配列は同種(すなわち、宿主細胞と同一種および/または株)、異種(すなわち、宿主細胞種または株以外の種)、ハイブリッド(すなわち、1を超える源からのフランキング配列の組合せ)、または合成のものであり得る。また、フランキング配列は、通常、ABC1ポリペプチド発現を調節するように

機能する天然配列であり得る。フランキング配列の源は原核生物または真核生物、いずれかの脊椎生物または無脊椎生物、またはいずれかの植物であり得るが、フランキング配列は宿主細胞マシーンで機能し、それによって活性化され得るものとする。

【0106】

また、ベクターは、好ましくは、宿主における増殖のための少なくとも1つの選択マーカーを含むべきである。選択マーカーは、選択的培地で増殖する宿主細胞の生存および増殖に必要な蛋白質をコードする遺伝子エレメントである。適当な選択マーカー遺伝子は、(a) 原核生物宿主細胞についての抗生物質または他のトキシン、例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシンに対する抵抗性を付与する；(b) 細胞の栄養要求性欠陥を補う；または(c) 複合培地から利用できない臨界的栄養を供給する蛋白質をコードする。好ましい選択マーカーは真核生物培養についてのゼオシン、G418、ヒグロマイシン、またはネオマイシン抵抗性およびE. coli および他の細菌を培養するためのテトラサイクリン、カナマイシン、またはアンピシリン抵抗性を含む。

【0107】

他の適当な選択遺伝子は、発現された遺伝子を増幅するのに使用されるものを含む。増幅は、増殖に臨界的な蛋白質の生産に対して大きな要求がある遺伝子が、組換え細胞の継続的世代の染色体内で縦列反復するプロセスである。哺乳動物細胞のための適当な選択マーカーの例はジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR) およびチミジンキナーゼを含む。哺乳動物細胞形質転換体は選択圧下に置かれ、ここに、形質転換体のみが、ベクターに存在する選択遺伝子により生存するのにユニークに適合する。選択圧は、培地中の選択剤の濃度が連続的に変化し、それにより、選択遺伝子およびABC1 遺伝子双方の増幅に導く条件下で形質転換細胞を培養することによって課される。その結果、増大した量のABC1 ポリペプチドが増幅されたDNAから合成される。

【0108】

また、ベクターは、好ましくは、典型的には、ポリペプチドコーディング配列の末端の3'側に位置し、転写を終止させるように働く転写終止配列を含有する

。通常、原核生物における転写終止配列はG - Cリッチな断片、続いてのポリT配列である。該配列は商業的ベクターの一部として購入され、あるいは核酸合成のためのよく知られた方法を用い合成される。

【0109】

また、ベクターは、好ましくは、通常はmRNAの翻訳開始に必要で、シャインダルガノ配列（原核生物）またはコザック配列（真核生物）によって特徴付けられるリボソーム結合部位を含む。該エレメントは、典型的には、プロモーターの3'側であって、発現させるべきABC1ポリペプチドのコーディング配列の5'側である。シャイン - ダルガノ配列は同定されており、その各々はよく知られた方法によって容易に合成することができる。

【0110】

また、ベクターは、好ましくは、宿主生物によって認識され、コードされたポリヌクレオチドに作動可能に連結したプロモーターを含むべきである。プロモーターは誘導プロモーターまたは構成的プロモーターであり得る。誘導プロモーターは、栄養の存在または不存在、あるいは温度の変化のごとき、培養条件のある変化に応答して、増大したレベルのDNAからの転写をそれらの制御下で開始する。対照的に、構成的プロモーターは継続的遺伝子産物生産を開始する；その結果、遺伝子発現に対してほとんどまたは全く制御はない。制限酵素消化により源DNAからプロモーターを除去し、所望のプロモーター配列をベクターに挿入することによって、適当なプロモーターをポリヌクレオチドに作動可能に連結させる。前記したごとく、天然プロモーターを用いて、ポリヌクレオチドの増幅および/または発現を指令することができる。かくして、組換えベクターは配列番号：3に見いだされるもののごとき、前記した野生型、変種、または突然変異体ABC1ポリヌクレオチドおよびABC1プロモーターのうちの1つを含み得る。また、組換えベクターは、いずれかの組合せにおいて、前記野生型、変種または突然変異体ABC1ポリヌクレオチドおよびABC1プロモーターのうちの2以上を含むことができる。

【0111】

好ましくは、もしそれが天然ABC1プロモーターと比較してABC1蛋白質

のより大きな転写およびより高い収率を与えるならば、およびもしそれが使用のために選択されている宿主細胞系に適合するならば異種プロモーターを用いる。異種プロモーターは単独で、または天然ABC1プロモーターと組み合わせて用いることができる。かくして、1つの好ましい実施形態において、組換えベクターは前記野生型ABC1ポリヌクレオチドおよび異種プロモーターのいずれか1つを含む。もう1つの好ましい実施形態において、組換えベクターは前記変種ABC1ポリヌクレオチドおよび異種プロモーターのいずれか1つを含む。さらにもう1つの好ましい実施形態において、組換えベクターは、前記突然変異体ABC1ポリヌクレオチドおよび異種プロモーターのいずれか1つを含む。また、好ましい実施形態は、前記野生型、変種および突然変異体ABC1ポリヌクレオチドの2以上および異種プロモーターのいずれかの組合せを含む組換えベクターを含む。

【0112】

原核生物宿主で用いるのに適した異種プロモーターは限定されるものではないが、ベータ-ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系(Villa-Kamaroffら, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:3727-31)、アルカリ性フォスファターゼ、トリプトファン(trt)プロモーター系、およびtacプロモーター(Villa-Kamaroffら, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:3727-31)のごときハイブリッドプロモーターを含む。それらの配列は公表されており、それにより、いずれかの有用な制限部位を供給するのに必要なリンカーまたはアダプターを用い、当業者がそれらを所望のDNA配列に連結するのを可能とする。他の適当な異種プロモーターは当業者に知られている。

【0113】

哺乳動物宿主細胞で用いるのに適した異種プロモーターは良く知られており、限定されるものではないが、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、(アデノウイルス2のごとき)アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、鳥類、肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B-型肝炎ウイルスおよびシミア

ンウイルス40 (SV40) のときウイルスのゲノムから得られたものを含む。他の適当な哺乳動物プロモーターは異種哺乳動物プロモーター、例えば、熱-ショックプロモーターおよびアクチンプロモーターを含む。さらなる適当なプロモーターは、限定されるものではないが、SV40 初期プロモーターおよび後記プロモーター領域 (Bernois t and Chambon, 1981, Nature 290:340-10); ラウス肉腫ウイルスの3' ロングターミナルリピートに含まれるプロモーター (Yamamoto ら, 1980, Cell 22:787-97); ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagner ら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. . S. A. 78:1444-45); およびメタロチオニン遺伝子の調節配列 (Brinster ら, 1982, Nature 296:39-42) を含む。好ましくは、プロモーターはサイトメガロウイルスまたはSV40 プロモーターである。かくして、特に好ましい実施形態において、組換えベクターは前記野生型ABC1 ポリヌクレオチドのうちの1つ、前記した変種ABC1 ポリヌクレオチドの1つ、または前記した突然変異体ABC1 ポリヌクレオチドおよびサイトメガロウイルスプロモーターのうちの1つを含む。もう1つの特に好ましい実施形態において、組換えベクターは、いずれかの組合せにおいて、前記野生型、変種、またはABC1 ポリヌクレオチドおよびサイトメガロウイルスプロモーターの2以上を含む。

【0114】

また、ベクターは、好ましくは、ABC1 のとき、ポリヌクレオチドの転写を増加させるためのエンハンサー配列を含む。真核生物プロモーターの活性化のための適当なエンハンサーはSV40、サイトメガロウイルス初期プロモーター、ポリオーマおよびアデノウイルスエンハンサーのごときウイルスエンハンサーを含む。

【0115】

本発明の発現ベクターは、所望のフランキング配列の全てを含有してもまたはしなくても良い、商業的に入手可能なベクターのごとき出発ベクターから構築することができる。ここに記載するフランキング配列の1以上がベクターにすでに

存在しない場合、それらは個々に得ることができ、ベクターに連結することができる。フランキング配列の各々を得るのに用いる方法は当業者に良く知られている。

【0116】

好ましいベクターは、細菌、昆虫および哺乳動物宿主細胞に適合するものである。細菌で用いるのに好ましいベクターは、例えば、pQE70、pQE60およびpQE-9 (Qiagen, Inc.) ブルースクリプトベクター、ファージスクリプトベクター、pNH16A、pNH18A、pNH46A (Stratagene Cloning Systems, Inc.)、ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia Biotech, Inc.)、およびpCEP4 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)。好ましい真核生物ベクターは、限定されるものではないが、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXTIおよびpSG((Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL (Pharmacia) およびpGL3 (Promega, Madison, WI)を含む。他の適当なベクターは当業者に容易に明らかであろう。

【0117】

特に好ましい実施形態において、組換えベクターは、実施例4に記載し、図3に示されるpCEPhABC1を含む。組換えベクターpCEPhABC1はプラスミドpCEP4 (Invitrogen、サイトメガロウイルスプロモーターおよびエンハンサーを含有する発現ベクターを含む。ベクターpCEPhABC1は、さらに、異種サイトメガロウイルスプロモーターに作動可能に連結したABC1ポリヌクレオチドを含む。ABC1ポリヌクレオチドは、非-コーディング5'フランキング(すなわち、天然ABC1プロモータ)および3'フランキング配列を含めた全長ABC1 cDNAを含有する配列番号:1を含む。

【0118】

加えて、本発明はABC1フランキング配列ポリヌクレオチドを含む組換えベクターを提供する。1つの実施形態において、組換えベクターは、好ましくはプ

ロモータ活性を含有するA B C 1 5' フランキング配列を含むポリヌクレオチドを含む。かくして、好ましい実施形態において、組換えベクターは配列番号：3を含むポリヌクレオチドを含む。もう1つの好ましい実施形態において、組換えベクターは配列番号：3のヌクレオチド1 - 1 5 3 2、1 0 8 0 - 1 6 4 3、1 1 8 1 - 1 6 4 3、1 2 9 2 - 1 6 4 3、または1 3 9 4 - 1 6 4 3を含むポリヌクレオチドを含む。特に好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは配列番号：3のヌクレオチド1 3 9 4 - 1 5 3 2を含む。また、もう1つの実施形態において、組換えベクターは、ストリンジェントな条件下で配列番号：3に記載されたポリヌクレオチドまたは配列番号：3のヌクレオチド1 - 1 5 3 2、1 0 8 0 - 1 6 4 3、1 1 8 1 - 1 6 4 3、1 2 9 2 - 1 6 4 3、または1 3 9 4 - 1 6 4 3を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。さらにもう1つの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号：3を含むポリヌクレオチドまたは配列番号：3のヌクレオチド1 - 1 5 3 2、1 0 8 0 - 1 6 4 3、1 1 8 1 - 1 6 4 3、1 2 9 2 - 1 6 4 3、または1 3 9 4 - 1 6 4 3を含むポリヌクレオチドに対してその全長にわたって少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、なおより好ましくは少なくとも95%同一性を有するヌクレオチド配列を含む。また、組換えベクターは、前記5' フランキング配列のいずれかに相補的なポリヌクレオチドを含む。

【0119】

もう1つの実施形態において、組換えベクターは、A B C 1の3' フランキング配列を含むポリヌクレオチドを含む。好ましい実施形態において、組換えベクターは配列番号：4を含むポリヌクレオチドを含む。もう1つの好ましい実施形態において、組換えベクターは配列番号：5を含むポリヌクレオチドを含む。同等に好ましい実施形態において、組換えベクターは配列番号：6を含むポリヌクレオチドを含む。また、もう1つの実施形態において、組換えベクターは、ストリンジェントな条件下で配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6に記載されたポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。さらにもう1つの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6を含むポリヌクレオチドに対してその全長にわたって少な

くとも80%、より好ましくは少なくとも90%、なおより好ましくは少なくとも95%同一性を有するヌクレオチド配列を含む。また、組換えベクターは、前記3'フランキング配列のいずれかに相補的なポリヌクレオチドを含む。

【0120】

前記5'または3'フランキング配列ポリヌクレオチドのいずれかのごとき単離されたABC1フランキング配列ポリヌクレオチドは、よく知られた連結およびクローニング技術を用いベクターに挿入される。前記したベクターのいずれも用いることができる。好ましくは、ベクターは細菌、昆虫または哺乳動物宿主細胞に適合する。また、好ましくは、ベクターは発現ベクターである。ベクターは、例えば、ファージ、プラスミド、ウイルスまたはレトロウイルスベクターであり得る。

【0121】

ABC1フランキング配列に加えて、ベクターは以下のフランキングヌクレオチド配列：プロモーター、1以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終止配列、ドナーおよびアクセプタースプライス部位を含有する完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるべきポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、および選択マーカーエレメントのうちの1以上を含有することができる。前記したフランキングヌクレオチド配列のいずれも適当である。フランキング配列は同種、異種、ハイブリッドまたは合成のものであり得る。また、フランキング配列は、ABC1ポリペプチド発現を調節するように通常は機能する天然配列であり得る。フランキング配列の源は原核生物または真核生物、いずれかの脊椎生物または無脊椎生物、またはいずれかの植物であり得るが、フランキング配列は宿主細胞マシーンで機能し、それによって活性化できるものとする。

【0122】

好ましいベクターは、細菌、昆虫および哺乳動物宿主細胞に適合するものである。適当なベクターは前記したものであり、細菌で用いるpQE70、pQE60、pQE9、ブルースクリプトベクター、ファージスクリプトベクター、pN

H16A、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pkk223-3、pDR540、pRIT5およびpCEP4、および真核生物細胞で用いるpWLN EO、pSV2CAT、pOG44、pXTI、pSG、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVLおよびpGL3を含む。

【0123】

1つの特に好ましい実施形態において、組換えベクターは、ABC1遺伝子の5'フランキング領域を含むポリヌクレオチドを含み、さらに、異種ポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む。異種ポリヌクレオチドはABC1 5'フランキング配列に作動可能に連結している。ABC1 5'フランキング配列は、好ましくは、ABC1プロモーターを含有する。かくして、好ましくは、5'フランキング配列は配列番号：3に記載された配列を含む。同等に好ましくは、5'フランキング配列は配列番号：3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643または1394-1643を含む。異種ポリヌクレオチドは、好ましくは、完全な蛋白質または蛋白質の生物学的に活性な断片であるポリペプチドをコードする。ベクターは、1を超える異種ポリヌクレオチドを含有することができる。より好ましくは、異種ポリヌクレオチドはレポーター蛋白質をコードする。そのような場合、組換えベクターは、好ましくは、いずれのさらなるプロモーター配列も含有しない。適当なレポーター蛋白質の例はルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼトランスフェラーゼトランスフェラーゼ、および緑色蛍光蛋白質を含む。好ましくは、レポーターポリヌクレオチドはルシフェラーゼである。かくして、1つの特に好ましい実施形態において、組換えベクターは配列番号：3に記載された5'フランキング配列およびルシフェラーゼレポーターポリヌクレオチドを含む。他の同等に好ましい実施形態において、組換えベクターは、ヌクレオチド配列番号：3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643または1394-1643を含むポリヌクレオチドおよびルシフェラーゼレポーターポリヌクレオチドを含む。

【0124】

A B C 1 5' フランキング配列を含む発現ベクターは、レポーターポリヌクレオチドを含有する商業的に入手可能なベクターのごとき出発ベクターから構築することができる。適当な発現ベクターの例は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子 (Promega, Madison, WI および p β Gal-Basic (Clontech, Palo Alto, CA) を含有する pGL3-Basic を含む。好ましいベクターはプロモーターがない pGL3-Basic ルシフェラーゼレポーターベクターである。A B C 1 プロモーターを含有する 5' フランキング配列、例えば、配列番号: 3 は、ここに記載する方法 (実施例 15 参照) を含めた良く知られた方法を用い、前記発現ベクターのうちの 1 つに連結することができる。かくして、特に好ましい実施形態において、組換えベクターは pAPR1、配列番号: 3 を含むレポーター遺伝子構築体および pGL3 ベクターにおけるルシフェラーゼレポーター遺伝子である (図 11 参照)。

【0125】

また、本発明は、前記組換えベクターのいずれか 1 つを含む宿主細胞に関する。ベクターが構築された後、完成されたベクターを、増幅および/またはポリペプチド発現のために適当な宿主細胞に挿入することができる。宿主細胞は (E. coli のとき) 原核生物宿主細胞または (酵母細胞、昆虫細胞または脊椎動物細胞のとき) 真核生物宿主細胞であり得る。適当な条件下で培養すると、宿主細胞は A B C 1 ポリペプチド、あるいは、引き続いて測定することができるレポーターポリペプチドを合成する。宿主細胞は、形質転換された細胞系を含めた霊長類細胞系または齧歯類細胞系のとき哺乳動物宿主細胞であり得る。正常なジプロイド細胞、一次組織のイン・ビトロ培養に由来する細胞株、ならびに一次外植体も適当である。候補宿主細胞は、選択遺伝子に表現型的に欠陥があり得るか、または圧倒的に作用選択遺伝子を含有することができる。

【0126】

多数の適当な宿主細胞が当該分野で知られており、American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA から入手できる。適当な哺乳動物宿主細胞は、限定されるものではないが、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、CO DHFR-細胞 (Ur

laubら, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci., 97:4216:20)、ヒト胚腎臓(herk)293または293T細胞、または3T細胞、サルCOS-1およびCOS-7細胞系、およびCV-1細胞系を含む。他の適当な哺乳動物細胞系は、限定されるものではないが、マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa細胞、マウス1-929細胞、Swiss由来の3T3系、Balb-cまたはNIHマウス、BHKまたはHAKハムスター細胞系、Thp-1、HepG2およびマウスRAW細胞系を含む。これらの細胞系の各々は蛋白質発現分野の当業者に知られており、入手可能である。好ましい宿主細胞は、実施例8にその使用が記載されるマウス単球細胞系RAW264.7である。

【0127】

適当な細菌宿主細胞は、バイオテクノロジーの分野において宿主細胞として良く知られているE.coliの種々の株(例えば、HB101、DH50、DH10、およびMC1061)を含む。B.subtilis, Pseudomonas spp., other Bacillus spp., Streptomyces spp.などの種々の株もこの方法で使用することができる。また、酵母細胞の多くの株もABC1ポリペプチドの発現のための宿主細胞として入手できる。好ましい酵母細胞は、例えば、Saccharomyces cerevisiaeおよびPichia pastorisを含む。加えて、昆虫細胞系は適当な宿主細胞であり得る。昆虫細胞系は、例えば、Kittsら、1993, Biotechniques, 14:810-17; Lucklow, 1993, Curr.Opin.Biotechnol. 4:564-72; およびLucklowら、1993、J.Virol., 67:4566-79に記載されている。好ましい昆虫細胞はSf-9およびHi5 (Invitrogen)である。

【0128】

また、本発明は(a)検出可能なレベルのABC1蛋白質を生じさせるのに十分な量のABC1をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターで哺乳動物宿主細胞をトランスフェクトし、次いで、(b)生じたABC1蛋白質を

精製する工程を含む哺乳動物宿主細胞においてA B C 1蛋白質を発現する方法を提供する。1つの好ましい実施形態において、組換え発現ベクターは配列番号：2を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。もう1つの好ましい実施形態において、配列番号：1を含むポリヌクレオチド。さらにもう1つの好ましい実施形態において、配列番号：1のヌクレオチド291-7074を含むポリヌクレオチド。なおもう1つの好ましい実施形態において、配列番号：2を含むポリペプチドに対して少なくとも98%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【0129】

組換えA B C 1ベクターの哺乳動物宿主細胞への導入は、当該分野で良く知られた方法によって行うことができ、Sambrook、前掲のごとき標準的な実験室マニュアルに記載されている。好ましくは、組換えベクターは沈殿にてまたは荷電脂質との複合体にて宿主細胞に導入される。A B C 1ベクターの導入に適した方法はリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質-媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染、または当該分野で知られた他の方法を含む。これらの方法は、例えば、Davisら, Basic Methods in Molecular Biology (1986)に記載されている。もし組換えA B C 1ベクターがウイルスベクターであれば、それは適当なパッケージング細胞系を用いイン・ビトロにてパッケージC、次いで、宿主細胞に導入することができる。

【0130】

A B C 1 - ポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンもしくはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、およびレシチンクロマトグラフィーを含めたよく知られた方法を用い、組換え細胞培養から回収し、精製することができる[例えば、SmithおよびJohnson, Gene 63:31-40 (1988) 参照]。好ましくは、抗-A B C 1抗体を用いる

アフィニティークロマトグラフィーを精製で用いる。

【0131】

加えて、本発明は、哺乳動物対象においてA B C 1蛋白質を発現するのに十分な量のA B C 1をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを哺乳動物対象に投与する工程を含むことを特徴とする哺乳動物対象においてA B C 1蛋白質を発現させる方法を提供する。好ましくは、組換え発現ベクターは配列番号：2を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、配列番号：1を含むポリヌクレオチド、配列番号：1のヌクレオチド291-7074を含むポリヌクレオチド、または配列番号：2を含むポリペプチドに対して少なくとも98%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。組換えA B C 1ベクターの哺乳動物対象への導入は当該分野でよく知られた方法によって行うことができ、これはここに後記にて詳細に記載する。A B C 1の発現は、それに組換えA B C 1ベクターを投与した対象から血液試料を得、単球集団を分離し、マクロファージ細胞におけるA B C 1遺伝子発現を測定することによって測定することができる。A B C 1遺伝子発現は、R T - P C Rのごとき当該分野でよく知られた方法、および本明細書に記載された方法（実施例9および10参照）。A B C 1蛋白質のレベルは、対象から血液試料を得、単球集団を分離し、実施例11に記載された免疫沈殿のごときよく知られた方法を用い、マクロファージ細胞においてA B C 1蛋白質を測定することによって測定することができる。

【0132】

コレステロール流出を増加させるための方法および化合物

本発明のもう1つの態様において、哺乳動物対象において細胞からコレステロール流出を増加させるのに適した方法が提供される。かかる方法は、該細胞からコレステロール流出を増加させるのに十分な量でA B C 1ポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを哺乳動物対象に投与することを含む。組換えベクターは、コードされたA B C 1ポリペプチドが生物学的活性（すなわち、コレステロール輸送活性）を有する限り、前記した野生型または変種A B C 1ポリヌクレオチドのいずれかを含有する前記ベクターのいずれかであり得る。好ましくは、組換えベクターは配列番号：2を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

、配列番号：1のヌクレオチド291-7074を含むポリヌクレオチド、または配列番号：2のアミノ酸配列に対して少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。また、好ましくは、組換えベクターは、コードされたABC1ポリペプチドがコレステロール輸送活性を有する限り、配列番号：1を含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、90%または95%同一である変種ポリヌクレオチドを含む。

【0133】

組換えABC1発現ベクターの哺乳動物対象への投与を用いて、心血管病の治療のために該対象においてABC1遺伝子を発現させることができる。具体的には、この方法は、心血管病を持つ哺乳動物の動脈病巣で見いだされるマクロファージ細胞および他のコレステロール-蓄積細胞にABC1遺伝子を導入することによって治療効果を達成するであろう。標的細胞におけるABC1ポリヌクレオチドの発現はABC1蛋白質のより大きな生産を行うであろう。引き続いて生産されたABC1蛋白質は、動脈病巣で見出されるマクロファージおよび他のコレステロール-負荷細胞からのコレステロールの裸HDL粒子への流出を増加させることによって該病気を軽減するであろう。細胞流出は、動脈プラークのコレステロールリッチのコアのごとき末梢部位からの全コレステロールの除去に至るであろう。これらの病理学的病巣のサイズの同時減少は、心臓発作および狭心症に至る動脈閉塞の危険性を減少させる。この方法は、また、動脈壁におけるコレステロールの蓄積を防止するために予防的に用いることもできよう。

【0134】

十分な量のABC1発現ベクターは、哺乳動物対象の細胞からのコレステロール流出を増加させるABC1ベクターの量である。そのような量は、種々の投与量の組換えABC1発現ベクターの投与前（対照レベル）および後に対照の細胞中のコレステロール流出を測定し、対照レベルと比較したコレステロール流出の増加を行う用量を測定することによって決定することができる。コレステロール流出は、対象から血液試料を得、単球集団を分離し、対象のマクロファージ細胞におけるコレステロール流出の量を測定することによって測定することができる。ここに記載したアッセイのいずれを用いてコレステロール流出を測定すること

もできる。

【0135】

加えて、コレステロール流出は、組換えABC1発現ベクターの投与前（対照）および後に対象における血漿HDL - コレステロールのレベルを決定することによって測定することができる。組換えABC1発現ベクターの投与に続いて対象の血清におけるHDL - コレステロールの観察された増加は、コレステロール流出の増加を示す。血清中のHDL - コレステロールは当該分野で良く知られた方法を用いて測定することができる。

【0136】

加えて、コレステロール流出は、組換えABC1発現ベクターの投与前（対照レベル）および後に対照の動脈壁に見出されるアテローム性動脈硬化症病巣のサイズを測定することによって測定することができる。動脈病巣のサイズの低下は、コレステロール流出の増加を示す。動脈病巣を測定するアッセイは当該分野で良く知られている。例えば、動脈病巣からの増加したコレステロール流出は、Lawnら, Nature, 360:670-672(1992)に記載されているアテローム性動脈硬化症のマウスモデル、ならびに他の公知の方法のいずれかを用いて測定することができる。Lawnらに記載されたLDL受容体ノックアウトマウスを用い、コレステロール流出はABC1ベクターの投与前および後に測定することができる。アテローム発生ダイエットを与えられた動物の群における脂肪ストリーク病巣のサイズは、Lawnらに記載された大動脈切片の油 - レッドO染色によって測定することができる。対照ベクターを受け取った群と比較したABC1発現ベクターを受け取った群における脂肪ストリーク病巣のサイズの低下は、該病巣からのコレステロール流出の増加を示す。ヒトにおいては、動脈壁に見出されるアテローム性動脈硬化症病巣のサイズは、例えば、アンジオグラフィーおよび非侵襲的超音波方法を用いて測定することができる。

【0137】

別法として、コレステロール流出は、血液試料を得、次いで、組換えABC1発現ベクターの投与前および後に対象のマクロファージ細胞中のABC1 mRNAまたはABC1蛋白質のレベルを測定することによって測定することができる。

。ルーチンのアッセイを行って、ABC1 mRNA濃度およびコレステロール流出の間の相関を決定することができる。同様に、アッセイを行って、ABC1蛋白質の量とコレステロール流出の量と相関させることができる。そのような相関データを用い、組換えABC1発現ベクターの投与後における対象の細胞でのABC1 mRNAまたはABC1蛋白質の観察された増加を用いて、コレステロール流出の増加を示すことができる。ABC1 mRNAおよびABC蛋白質レベルは、ここに記載されたアッセイおよびmRNAおよび蛋白質の定量的ための他の良く知られた技術を用いて測定することができる。治療投与量および処方は後に詳細に議論する。

【0138】

核酸分子の標的細胞への導入に適した複数のウイルスおよび非ウイルス方法が当業者に利用できる。例えば、遺伝子治療に適したウイルス送達ベクターは、限定されるものではないが、アデノウイルス、単純疱疹ウイルス、ポックスウイルス（すなわち、ワクシニア）、肝炎ウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、アルファウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、パピローマウイルス、アデノ-関連ウイルス（AAV）、ポリオウイルス、およびレトロウイルスおよびシンドビスウイルスのごときRNAウイルスを含む。ABC1ポリヌクレオチドは、裸DNA送達（直接的注入、受容体-媒介導入（DNA-リガンド複合体）、エレクトロポレーション、アデノウイルス-リガンド-DNA複合体、リン酸カルシウム（ CaPO_4 ）沈殿、マクロ粒子衝撃（遺伝子銃技術）、リボソーム-媒介導入、およびリポフェクションのごとき非ウイルス送達系を用いて送達することができる。

【0139】

細胞の遺伝子的修飾は、遺伝子治療分野で良く知られた1以上の技術を用いて達成することができる（Mulligan, R., 1993, Science, 260(5110):926-32）。遺伝子治療の材料および方法は誘導性プロモーター、組織-特異的エンサナー-プロモーター、部位-特異的一体化のために設計したDNA配列、親細胞よりも優れた選択利点を提供することができるDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ

な選択系および発現制御系（安全性の尺度）、（細胞標的化のための）細胞 - 特異的結合剤、細胞 - 特異的内部化因子、およびベクターによって発現を増強するための転写因子ならびにベクター製造の方法を含むことができる。遺伝子治療の技術の実践のための方法および材料の例は（エレクトロポレーション技術を含む）米国特許第4,970,154号、（遺伝子送達のためのリポ蛋白質 - 含有系を記載する）第5,679,559号、（リポソーム担体を含む）第5,676,954号、（リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を記載する）第5,593,875号、および（生物学的に活性な粒子があるスピードで細胞に推進され、それにより、粒子が細胞の表面を貫き、細胞の内部に一体化するようになるプロセスを記載する）第4,945,050号、および（核リガンドを含む）PCT公開番号WO96/40958号に記載されている。

【0140】

アデノウイルスベクターは、真核生物細胞への遺伝子導入で特に有用であることが判明している（Rosenfeld, M.ら、Science, 252: 431 - 4 (1991)；米国特許第5,631,236号）。ヒトにおけるAd - 媒介遺伝子治療の最初の試験は嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンスレギュレータ（CFTR）遺伝子の肺への導入であった（Crystal, R.ら, 1994, Nat. Genet., 8(1): 42 - 51）。イン・ビボで組換えAdを異なる組織に投与するための実験ルートは器官内点滴注入（Rosenfeld, M.ら, 1992, Cell, 68(1): 143 - 55）、筋肉への注射（Quantin, B., ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89(7): 2581 - 4）、末梢静脈内注射（Herz, J. およびGerard, R., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90(7): 2812 - 6）および脳への定位接種（Le Gal La Salle, G., ら, 1993, Science, 259(5097): 988 - 90）を含むものであった。従って、アデノウイルスベクターは当業者に広く入手でき、本発明で用いるのに適する。

【0141】

アデノ - 関連ウイルス (AAV) は、最近、遺伝子治療における優れた適用にて遺伝子導入系として導入されてきた。野生型 AAV は、宿主細胞ゲノムへ一体化させるにおいて高レベルの感染性、広い宿主範囲および特異性を示す (Hermonat, P., および Muzyczka, N., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81(29):6466-70)。単純疱疹ウイルスタイプ - 1 (HSV - 1) は好ましいベクター系である (Geller, A., ら, 1991, Trends Neurosci., 14(10):428-32; Glorioso, J., ら, 1995, Mol. Biotechnol., 4(1):87-99; Glorioso, J., ら, 1995, Annu. Rev. Microbiol., 49:675-710)。ポックスウイルス科のワクシニアウイルスもまた発現ベクターとして開発されている (Smith, G., および Moss, B., 1983, Gene, 25(1):21-8; Moss, B., 1992, Biotechnology, 20:345-62; Moss, B., 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:25-38)。前記ベクターの各々は当業者に広く利用でき、本発明で用いるのに適しているであろう。

【0142】

好ましくは、ウイルス送達系はレトロウイルスベクターを利用する。レトロウイルスベクターは、大きな割合の標的細胞に感染し、細胞のゲノムに組み込むことができる (Miller, A., および Rosman, G., Biotechniques, 7(9):980-2, 984-6, 989-90(1989); 米国特許第 5,672,510 号)。レトロウイルスは、他のウイルスよりも比較的初期に遺伝子導入ベクターとして開発され、遺伝子マーキングおよびヒトリンパ球へのアデノシンデアミナーゼ (ADA) の cDNA の導入で最初に成功して用いられた。好ましくは、レトロウイルスベクターはネズミまたは鳥類レトロウイルスの誘導體であり、またはレンチウイルスベクターである。特に好ましいレトロウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。単一の外来性遺伝子を導入することができるレトロウイルスベクターの例は、限

定されるものではないが、M o l l o n e y ネズミ白血病ウイルス (M o M u L V)、H a r v e y ネズミ肉腫ウイルス (H a M u S V)、ネズミ乳癌ウイルス (M u M T V)、S I V、B I V、H I V およびラウス肉腫ウイルス R S V) を含む。多数のさらなるレトロウイルスベクターを複数遺伝子に組み込むことができる。これらのベクターの全ては、導入された細胞を同定し再生させることができるように、選択マーカーのための遺伝子に導入または一体化させることができる。

【 0 1 4 3 】

組換えレトロウイルスは欠陥があるので、それは感染性ベクター粒子を生じさせるには助けが必要である。この助けは、例えば、L T R 内の調節配列の制御下でレトロウイルスの構造遺伝子の全てをコードするプラスミドを含有するヘルパー細胞系を用いることによって提供することができる。該ヘルパープラスミドは、パッケージングメカニズムがカプセル化のためのRNA転写体を認識できるようにするヌクレオチド配列を欠く。かくして、ゲノムはパッケージされないので、ヘルパー細胞系は空のビリオンを生じる。適当なヘルパー細胞系は、限定されるものではないが、 ψ 2、P A 3 1 7 および P A 1 2 を含む。もしパッケージングシグナルが無傷であるが、構造遺伝子が他の注目する遺伝子によって置き換えられているそのような細胞にレトロウイルスベクターが導入されれば、該ベクターをパッケージし、ベクタービリオンを生じさせることができる。次いで、この方法によって生じたベクタービリオンを用いて、N A I H 3 T 3 細胞のごとき組織細胞系を感染させ、大量のキメラレトロウイルスビリオンを生じさせることができる。

【 0 1 4 4 】

本発明のベクターは、当業者に広く利用できる標準的な組換え技術を用いて構築することができる。そのような技術は、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l (S a m b r o o k ら , 1 9 8 9 , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s) , G e n e E x p r e s s i o n T e c h n o l o g y (M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , V o l . 1 8 5 , e d i t e d b y

D. Goeddel, 1991, Academic Press, San Diego, CA), および PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innisら, 1990, Academic Press, San Diego, CA) のごとき通常の分子生物学文献に見出すことができる。

【0145】

標的細胞内でのABC1ポリヌクレオチドの転写を得るためには、標的細胞中で遺伝子発現を駆動することができる転写調節領域が利用されなければならない。転写調節領域は、好ましくは、ABC1ポリヌクレオチドに作動可能に連結したプロモーターおよび/またはエンハンサーを含む。プロモーターはABC1遺伝子に対して同種または異種とすることができ、ただし、それは、当該構築体が挿入されるであろう細胞もしくは組織 - タイプで活性なものとする。選択された転写調節領域は標的細胞において高レベルの遺伝子発現を駆動すべきである。好ましくは、スカベンジャー受容体A型、マトリックスメタロプロテイナーゼプロモーター(MMP-12)、またはマクロファージ向性レンチウイルスプロモーターのごときマクロファージ - 特異的プロモーター(Fabunmiら, Atherosclerosis, 148:375-386(1999))を用いる。特に好ましいプロモーターはスカベンジャー受容体A型遺伝子の5'領域であり、これは、ABC1遺伝子の転写を駆動するのに用いることができる強力なマクロファージプロモーターを含有する。加えて、細胞において内因性ABC1ポリペプチドの発現を増加させるための手段は、プロモーター領域に1以上のエンハンサーエレメントを挿入することであり、ここに、エンハンサーエレメントはABC1遺伝子の転写活性を増加させるように働くことができる。同様に、使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝子をそこで活性化させることを望む組織に基づいて選択される。かくして、例えば、動脈組織、特にマクロファージ細胞で見出される細胞中でプロモーター活性化を付与することが知られているエンハンサーエレメントが選択されるであろう。本発明で用いるのに適した他の転写調節領域は、限定されるものではないが、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)即時型 - 初期エンハンサー(プロモーター、SV40初期エンハンサー/プロモ

ーター、JCポリオーマウイルスプロモーター、アルブミンプロモーター、PGK、およびCMVエンハンサーにカップリングした α -アクチンプロモーターを含む(Doll, R., ら、1996、Gene Ther., 3(5): 437-47)。

【0146】

ベクター構築体の他の構成要素は、所望により部位-特異的組込のために設計されたDNA分子(例えば、同種組換えで有用な内因性配列)、組織-特異的プロモーター、親細胞よりも優れた選択利点を供することができるDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、(細胞標的化のための)細胞特異的結合剤、細胞-特異的内部化因子、ベクターからの発現を増強させる転写因子、およびベクターの生産を可能とする因子を含むことができる。

【0147】

ひとつの実施形態において、ベクターは、部位-特異的組込のための標的化DNAを含むことができる。標的化DNAは、注目する遺伝子、例えば、ABC1遺伝子の領域に対して相補的(同種)であるヌクレオチド配列である。同種組換えを通じて、ゲノムに挿入されるべきDNA配列は、それを標的化DNAに結合させることによってABC1遺伝子に向けることができる。挿入のためのDNA配列は、例えば、ABC1ポリペプチド、例えば、フランキング配列の発現と相互作用し、またはそれを制御することができるDNAの領域を含む。かくして、所望のABC1ポリペプチドの発現は、ABC1ポリペプチドの転写のための認識可能なシグナルを持つ内因性遺伝子配列を供するDNA調節セグメントとカップリングした標的化DNAの使用によるよりも、ABC1遺伝子それ自体をコードするDNAのトランスフェクションによって達成される(Sauer, Curr. Opin. Biotechnol., 5: 521-27(1994); Sauer, Methods Enzymol., 225: 890-900(1993))。

【0148】

さらに他の実施形態において、標的細胞におけるABC1遺伝子の制御された

発現のために調節エレメントを含ませることができる。そのようなエレメントは、適当なエフェクターに応答してスイッチが入る。このように、治療ABC1ポリペプチドは望まれる場合に発現させることができる。ひとつの慣用的な制御手段は、DNA-結合蛋白質または転写活性化蛋白質のごとき、小分子-結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始させることができるドメインを含有するキメラ蛋白質をダイマー化するための小分子ディメライザーまたはラパログの使用を含む(PCT公開番号WO96/41865、WO97/31898およびWO97/31899参照)。蛋白質のダイマー化を用いて、トランスジーンの転写を開始させることができる。もう1つの適当な制御手段または遺伝子スイッチは、プロゲステロンアンタゴニストであるミフェプリストン(RU486)の使用を含む。プロゲステロンアンタゴニストに対する修飾されたプロゲステロン受容体リガンド-結合ドメインの結合は、次いで、核に通過してDNAをDNAに結合する2つの転写因子のダイマーを形成することによって転写を活性化させる。リガンド-結合ドメインは、天然リガンドに結合する受容体の能力を排除するように修飾される。修飾されたステロイドホルモン受容体系はさらに米国特許第5、364、791号およびPCT公開番号WO96/40911およびWO97/10337に記載されている。さらにもう1つの制御手段は、ポジティブなテトラサイクリン-制御可能トランスアクチベーターを用いる。この系は、転写を活性化するポリペプチドに連結した突然変異tetリプレッサー蛋白質(DNA-結合ドメイン(逆テトラサイクリン-調節トランスアクチベーター蛋白質がもたらされる、すなわち、それがテトラサイクリンの存在下でtetオペレーターに結合する突然変異tet R-4アミノ酸変化)を含む。そのような系は米国特許第5、464、758号、第5、650、298号および第5、654、168号に記載されている。さらなる発現制御系および核酸構築体は米国特許第5、741、679号および第5、834、186号に記載されている。

【0149】

ABC1ポリヌクレオチドを含有するウイルス送達ベクターは、それが、標的細胞に見出されるもう1つの分子に特異的なリガンドを含有するようにウイルスコートを変化させることによって標的特異的とすることができる。これは、ベク

ターが所望の細胞型に結合するのを可能とする。該リガンドは、細胞 - 表面受容体のごとき、標的細胞で見出される分子に特異的に結合する注目するいずれの化合物でもあり得る。好ましくは、受容体は専ら標的細胞で見出され、他の細胞では見出されない。例えば、スカベンジャー受容体Aに対するリガンドを用いて、ウイルス送達ベクターをマクロファージ細胞に向けることができる。別法として、それが、標的細胞上の抗原性エピトープを認識しそれに結合するFabまたは $F(ab')_2$ のごとき抗体または抗体断片を含有するようにウイルスコートを変化させることができる。ウイルスコートは、リガンドをコートするさらなるポリヌクレオチドをウイルスゲノムに挿入することによって変化させることができる。当業者であれば、ウイルスゲノムに挿入して、ABC1ポリヌクレオチドを含有するベクターの標的特異的送達を可能とすることができる他の特異的ポリヌクレオチド配列を知っている。

【0150】

前記したもののごとき、加えて、裸のABC1ポリヌクレオチドを投与することができる。ABC1ポリヌクレオチドおよび組換えABC1発現ベクターは医薬組成物として投与することができる。そのような組成物は、ここに先に定義した効果的な量のABC1ポリヌクレオチドまたは組換えABC1発現ベクター、および投与の形態でもって適当性で選択された医薬上許容される処方剤を含む。適当な処方材料は、好ましくは、使用される濃度において受容者に非毒性であり、これは後記する。

【0151】

ABC1ポリヌクレオチドまたはABC1組換え発現ベクターを含む医薬組成物は、例えば、組成物のpH、容量オスモル濃度、粘度、透明性、色、等張性、匂い、滅菌性、安定性、溶解もしくは放出、吸着または浸透の速度を修飾し、維持し、または保持するための処方材料を含有することができる。適当な処方材料は、限定されるものではないが、(グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシンのごとき)アミノ酸、抗微生物剤、(アルコールビン酸、亜硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウムのごとき)抗酸化剤、(ホウ酸塩、炭酸水素塩、トリス-HCl、クエン酸塩、リン酸塩、または他の有機酸のごと

き)緩衝液、(マンニトールまたはグリシンのごとき)増量剤、(エチレンジアミン4酢酸(EDTA)のごとき)キレート化剤、(カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータ-シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピル-ベータ-シクロデキストリンのごとき)複合体化剤、充填剤、単糖、二糖および(グルコース、マンニトールまたはデキストリンのごとき)他の炭水化物、(血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンのごとき)蛋白質、着色剤、香味剤、および希釈剤、乳化剤、(ポリビニルピロリドンのごとき)親水性ポリマー、低分子量ポリペプチド、(ナトリウムのごとき)塩-形成対イオン、(塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素のごとき)防腐剤、(グリセリン、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールのごとき)溶剤、(マンニトールまたはソルビトールのごとき)糖アルコール、懸濁化剤、(プルロニック;PEG;ソルビタンエステル;ポリソルベート20またはポリソルベート80のごときポリソルベート;トリロン;トロメタニン;レチシン;コレステロールまたはチロキサファルのごとき)界面活性剤または湿潤剤、(スクロースまたはソルビトールのごとき)安定性増強剤、(アルカリ金属ハライド(好ましくは塩化ナトリウムまたはカリウム-またはマンニトール、ソルビトールのごとき)等張性増強剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または医薬アジュバントを含む。Remington's Pharmaceutical Sciences(18th Ed., A.R. Gennaro, 編、Mack Publishing Company 1990)参照。

【0152】

医薬上活性な化合物(すなわち、ABC1ポリヌクレオチドまたはABC1ベクター)は、製薬の通常の方法に従って加工して、ヒトおよび他の哺乳動物を含めた患者への投与のために医薬剤を生産することができる。かくして、ABC1ポリヌクレオチドまたはABC1組換え発現ベクターを含む医薬組成物は(顆粒、粉末または坐薬を含めた)固体形態または液体形態(例えば、溶液、懸濁液またはエマルジョン)で作成することができる。経口投与のための固体投与形態は

カプセル剤、錠剤、丸剤、粉末および顆粒を含むことができる。そのような固体投与形態では、活性化合物はスクロース、ラクトースまたは澱粉のごとき少なくとも1つの不活性希釈剤と混合することができる。そのような投与形態は、通常のプラクティスにおいて、不活性希釈剤以外のさらなる物質、例えば、ステアリン酸マグネシウムのごとき滑沢剤を含むことができる。カプセル剤、錠剤および丸剤の場合には、投与形態は緩衝化剤を含むこともできる錠剤および丸剤は、加えて、腸溶コーティングを施して調製することができる。

【0153】

経口または非経口投与のための液体投与形態は、医薬上許容されるエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ、およびエリキシル（水のごとき当該分野で通常用いられる不活性希釈剤を含有）を含有する。そのような組成物は湿潤化剤、甘味剤、香味剤、および香料剤を含むこともできる。例えば、注射用の適当な担体は、恐らくは、非経口投与のための組成物に通常の他の物質を補足した水、生理食塩水または人工脳脊髄液であり得る。中性緩衝化生理食塩水または血清アルブミンを混合した生理食塩水はさらなる例示的担体である。他の例示的な医薬組成物は約pH7.0-8.5のトリス緩衝液、約pH4.0-5.5の酢酸緩衝液を含み、これは、さらにソルビトールまたは適当な代替物を含むことができる。

【0154】

ABC1ポリヌクレオチドまたはABC1発現ベクターを含む組成物で心血管病を治療する投与法は、心血管病のタイプ、患者の年齢、体重、性別および医学的状态、病気の酷さ、投与の経路および使用する特定の化合物を含めた種々の因子に基づく。かくして、投与法は広く代わり得るが、標準的な方法を用いルーチン的に決定することができる。例えば、投与すべきABC1ポリヌクレオチドまたはABC1発現ベクターの量は、哺乳動物対象の細胞からのコレステロール流出を増加させるのに十分な量である。そのような量は、例えば、ABC1ポリヌクレオチドまたはABC1発現ベクターの投与の前および後に対象の血漿HDL-コレステロールレベルを測定することによって決定することができる。ABC1ポリヌクレオチドまたはABC1発現ベクターの十分な量は、対象の血漿HDL-コレステロールレベルを増加させる量である。従って、臨床家は投与量を決

め、投与経路を修飾して最適な治療効果を得ることができる。典型的な投与量は、前記した因子に基づき、約0.1 mg/kgないし約100 mg/kg以上の範囲であり得る。

【0155】

投与の頻度は、使用すべき処方におけるABC1ポリヌクレオチドまたはベクターの薬物動態学パラメーターに依存するであろう。典型的には、所望の効果を達成する投与量に到達するまで、臨床家は組成物を投与するであろう。従って、該組成物は、経時的に単一用量として、（所望の分子の同一量を含むしてもまたはしなくてもよい）2または以上の用量にて、または異色デバイスまたはカテーテルを介する連続的注入として投与することができる。適当な投与量のさらなる工夫は当業者によってルーチン的になされ、それは当業者によってルーチン的になされる仕事の範囲内のものである。適当な投与量は、適当な用量 - 応答データを用いることによって確認することができる。

【0156】

哺乳動物対象の細胞はイン・ビボ、エクス・ビボまたはイン・ビトロにてトランスフェクトすることができる。イン・ビボにての、ABC1ポリヌクレオチドまたはABC1ポリヌクレオチドを含む組換えベクターの標的細胞への投与は、当業者に知られた種々の技術のうちのいずれかを用いて達成することができる。例えば、米国特許第5,672,344号は、組換え神経栄養HSV-1ベクターを含むイン・ビボウイルス - 媒介遺伝子導入系を記載する。ABC1ポリヌクレオチドおよび組換えABC1ベクターの前記組成物は、経口、口腔内、非経口、直腸または局所投与によって、並びに吸入スプレーによってイン・ビボにてトランスフェクトすることができる。本明細書中で用いる用語「非経口」は皮下、静脈内、筋肉内、胸骨内、注入技術または腹腔内を含む。

【0157】

経口投与では、ABC1ポリヌクレオチドまたは組換えABC1ベクターを含む医薬組成物は、例えば、カプセル剤、錠剤、懸濁液または液体の形態とすることができる。医薬組成物は、好ましくは、与えられた量のDNAまたはウイルスベクター粒子を含む投与単位の形態で作成する。例えば、これらは約1

$10^3 - 10^{15}$ ウイルス粒子、好ましくは約 $10^6 - 10^{12}$ ウイルス粒子の量を含むことができる。ヒトまたは他の哺乳動物についての適当な日用量は、患者の状態および他の因子に応じて広く変化させることができるが、再度、ルーチン的方法を用いて決定することができる。

【0158】

また、ABC1 DNAまたは組換えABC1ベクターを含む医薬組成物は直腸投与することもできる。ベクターの直腸投与用の適当な坐薬は、常温では固体であるが、直腸温度では液体であり、従って、直腸内では融解し、ベクターを放出するカカオバターおよびポリエチレングリコールのごとき適当な非-刺激性賦形剤とベクターとを混合することによって調製することができる。

【0159】

医薬組成物は吸入用に処方することもできる。例えば、ABC1ポリヌクレオチドまたはベクターは吸入用の乾燥粉末として処方することもできる。また、ABC1ポリヌクレオチドまたはベクター吸入溶液は、エアロゾル送達のためのプロペラントを用いて処方することができる。さらにもう1つの実施形態において、溶液は霧化することもできる。

【0160】

ABC1 DNAまたは組換えABC1ベクターを含む医薬組成物は注射することもできる。滅菌注射水性または油性懸濁液のごとき注射剤は、適当な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を用い、公知の方法に従って処方することができる。滅菌注射剤は、非毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の滅菌注射溶液または懸濁液とすることもでき、例えば、1、3-ブタンジオール中の溶液とすることができる。非経口注射用の特定の適当な担体は、ABC1ポリヌクレオチドまたはベクターを、適切に保存された滅菌等張溶液として処方される滅菌蒸留水である。使用することができる許容される担体および溶媒の中にはリンゲル液、および等張塩化ナトリウム溶液がある。加えて、滅菌不揮発性油が、便宜には、溶媒または懸濁化媒体として使用される。この目的では、合成モノ-またはジグリセリドを含めたいずれの温和な不揮発性油も使用することができる。加えて、オレイン酸のごとき脂肪酸は注射剤の調製で用いることができる。

。さらにもう1つの製剤は、注射マイクロスフィア、生分解性粒子、ポリマー化合物、ビーズまたはリポソームのごとき剤での所望のABC1分子の処方を含むことができ、これはABC1製品の制御されたまたは保持された放出を提供する（例えば、PCT/US93/00829; Epsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:3688-3692(1985)参照）。

【0161】

また、ABC1 DNAまたは組換えABC1ベクターを含有する医薬組成物は局所投与することができる。局所投与では、ベクターは処方の0.001%ないし10%w/w、例えば、1重量%ないし2重量%を含むことができるが、それは処方の10%w/wもと多くを、好ましくは5%w/w以下、より好ましくは0.1%ないし1%を含むことができる。局所投与に適した処方、皮膚を通じる浸透に適した液体または半液体製剤（例えば、リニメント、ローション、軟膏、クリーム、またはペースト）および目、耳または鼻への投与に適した点剤を含む。本発明のベクターの有効成分の適当な局所用量を毎日1ないし4回、好ましくは、2回または3回投与する。

【0162】

本発明の核酸および/またはベクターは唯一の活性な医薬剤として投与することができるが、それは本発明または他の剤の1以上のベクターと組み合わせて用いることもできる。組合せとして投与する場合、治療剤は、同一回数または異なる回数投与される別々の組成剤として処方されることができるか、あるいは治療剤は単一の組成物として投与することができる。

【0163】

本発明のもう1つの実施形態において、標的細胞は標的細胞集団に隣接する「プロジェクター細胞系」の異色によってイン・ビボでトランスフェクトされる（Culver, K., ら, 1994, Hum. Gene Ther., 5(3):343-79; Culver, Kら, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 59:685-90; Oldfield, E., 1993, Hum. Gene Ther.,

4 (1 9 : 3 9 - 6 9) 。該プロジューサー細胞系は、A B C 1 ポリヌクレオチドを含有するウイルスベクターを生産し、標的細胞、すなわち、好ましくは、アテローム性動脈硬化症病巣に見出されるマクロファージ細胞に近接してそのウイルス粒子を放出するように作成される。放出されたウイルス粒子の一部は標的マクロファージ細胞と接触し、その細胞に感染し、かくして、A B C 1 ポリヌクレオチドを標的マクロファージ細胞に送達する。標的細胞の感染に続き、A B C 1 ポリヌクレオチドの発現が起こり、マクロファージ細胞に機能的A B C 1 蛋白質を与える。

【 0 1 6 4 】

もう1つの実施形態において、本発明は、A B C 1 ポリヌクレオチドまたは組換えA B C 1 発現ベクターのex・ビボ導入によって心血管病を治療する方法を提供する。そのような例において、患者から摘出された細胞、組織または器官をA B C 1 組成物に暴露し、しかる後、細胞、組織または器官を引き続いて患者に戻して移植する。例えば、1つの方法は、心血管病を持つ対象から血液試料を摘出し、該試料を単球が豊富となるようにし、単離された単球を、A B C 1 ポリヌクレオチドを含有する組換え発現ベクターおよび、所望により、標的特異的遺伝子と接触させることを含む。所望により、単球細胞をG M - C S Fのごとき成長因子で処理して、対象へ再び細胞を導入する前に細胞増殖を刺激することもできる。再び導入すれば、当該細胞は、それが元来そこから単離された細胞集団を特異的に標的化する。このように、A B C 1 ポリペプチドの輸送活性を用いて、対象においてコレステロール流出を促進することができる。

【 0 1 6 5 】

ex・ビボ投与のもう1つの方法は、ウイルスを含有する細胞の皮膚移植によって、A B C 1 ポリヌクレオチドまたは組換えA B C 1 ベクターを哺乳動物対象に導入することを含む。好ましくは、レトロウイルスをこの投与方法で用いる。もし強力なハウスキーピング遺伝子プロモーターを用いて転写を駆動するならば、繊維芽細胞起源の細胞を用い、インプラントにおける外来性遺伝子の長期発現を達成することができる。例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (D H F R) 遺伝子プロモーターを用いることができる。繊維芽細胞のごとき細胞を、スカベンジャ

ーAのごとき特異的標的化を可能とする遺伝子、および強力なプロモーターと共にABC1ポリヌクレオチドを含有するレトロウイルス構築体を含有するビリオンで感染させることができる。感染した細胞を、受容者対象中の真皮の結合組織に移植することができるコラーゲンマトリックスに埋めることができる。レトロウイルスが増殖し、マトリックスから逃げるにつれ、それは標的細胞集団を特異的に感染するであろう。このようにして、移植の結果、輸送障害を呈する細胞においてコレステロール流出活性の増加した量をもたらされる。

【0166】

もう1つの実施形態において、米国特許第5、399、346号に記載されているごとく、ABC1ポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターをイン・ビトロ技術を用いて投与することができる。例えば、ここに記載するもののごとき方法を用い、遺伝子工学により作成したある種の細胞を移植することによって、ABC1ポリペプチドを送達してABC1ポリペプチドを発現させることができる。外来性種のポリペプチドの投与で起こり得るとき、ABC1ポリペプチドを投与すべき患者において潜在的な免疫反応を最小化するためには、ABC1ポリペプチドを生産する天然細胞はヒト起源であり、ヒトABC1ポリペプチドを生産するのが好ましい。かくして、ABC1ポリペプチドを生産する組換え細胞は、ヒトABC1ポリペプチドをコードする遺伝子を含有する発現ベクターで形質転換するのが好ましい。該細胞はオートログスまたはヘテログスであり得る。所望により、細胞は不滅化することができる。免疫応答の機会を減少させるためには、細胞をカプセル化して周囲の組織の侵入を回避することができる。カプセル化材料は、典型的には、蛋白質産物の報酬を可能とするが、患者の免疫系による、または周囲の組織からの他の有害な因子による細胞の破壊を防ぐ生体適合性の半浸透性ポリマーの容器または膜である。前記した方法を用い、トランスフェクトされた細胞を患者に投与することができる。

【0167】

生細胞のカプセル化のための技術は当該分野で知られており、カプセル化細胞の調製および患者におけるその移植はルーチンの達成することができる。例えば、Baetgeら、(PCT公開番号WO95/05452およびPCT/U

S 9 4 / 0 9 2 9 9) は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のための遺伝子工学作成細胞を含有する膜カプセルを記載する。該カプセルは生体適合性であって、容易に回収することができる。該カプセルは、哺乳動物宿主への移植に際してイン・ビボで下降調節に付されないプロモーターに作動可能に連結した生物学的に活性な分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化する。該デバイスが、受容者内の特異的な部位への、生細胞からの分子の送達を可能とする。加えて、米国特許第4、892、538号；第5、011、472号；および第5、106、627号参照。生細胞をカプセル化するためのシステムはPCT国際公開WO91/10425 (Aebischerら) に記載されている。また、PCT公開番号WO91/10470 (Aebischerら)；Winnら, 1991, Exper. Neurol. 113:322-29；Aebischerら, 1991, Exper. Neurol. 111:269-75；およびTrescoら, 1992, ASAIO 38:17-23参照。

【0168】

ABC1をコードするポリヌクレオチドのためのもう1つの送達系は「非ウイルス」送達系である。遺伝子治療で用いられるかまたは提案されている技術はDNA-リガンド複合体、アデノウイルス-リガンド-DNA複合体、DNAの直接的注入、CaPO₄沈殿、遺伝子銃技術、エレクトロポレーション、リポフェクションおよびコロイド分散を含む (Mulligan, R., 1993, Science, 260(5110):926-32)。これらの方法のいずれも当業者に広く利用でき、本発明で用いるのに適当であろう。他の適当な方法は当業者に利用可能であり、本発明はトランスフェクションの利用可能な方法のいずれを用いても達成できると理解されるべきである。いくつかのそのような方法は当業者に利用されており、種々の程度の成功をおさめている (Mulligan, R., 1993, Science, 260(5110):926-32)。

【0169】

好ましくは、非ウイルス送達系はコロイド分散系である。コロイド分散系はマ

クロ分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフィア、ビーズ、および水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセルおよびリポソームを含めた脂質 - ベースの系を含む。本発明の好ましいコロイド系はリポソームであり、これはイン・ビトロおよびイン・ビボにて送達ビヒクルとして有用な人工膜小胞である。リポソームは自己組立性のコロイド粒子であり、ここに、ホスファチジルセリンまたはホスファチジルコリンのごとき両親媒性分子より構成される脂質二層が、該脂質二層が親水性内部を囲むように周囲の媒質の一部をカプセル化する。単一ラメラまたは多ラメラリポソームは、内部が所望の化学物質、薬物、または本発明におけるごとく、単離されたDNA分子を含有するように構築することができる。例えば、 $0.2 - 4.0 \mu\text{m}$ のサイズの範囲である大きな単一ラメラ小胞 (LUV) が、RNA、DNAおよび無傷ビリオンのごとき大きなマクロ分子を含有する水性緩衝液の実質的パーセンテージをカプセル化できることが示されている。一旦水性内部内にカプセル化されれば、これらのマクロ分子は生物学的活性な形態で哺乳動物細胞に送達することができ (Fraleigh, R. および Papahadjopoulos, D. 1981, Trends Biochem. Sci., 6: 77 - 80)。リポソームが効果的な遺伝子導入ビヒクルとなるためには、以下の特徴が存在すべきである: (1) その生物学的活性を台なしにすることなく高効率で注目する遺伝子をカプセル化すること; (2) 非標的細胞と比較して標的細胞に優先的かつ実質的に結合すること; (3) 高効率で標的細胞の細胞質に小胞の水性内容物が送達されること; および (4) 遺伝的情報が正確かつ効果的に発現されること (Mannino, R. ら、1988、Biotechniques, 6(7): 682 - 90)。

【0170】

リポソームの組成物は、通常、通常はステロイド、特にコレステロールと組み合わせられた、リン脂質、特に高い相転移温度リン脂質の組合せである。他のリン脂質または他の脂質を用いることもできる。リポソームの物理的特徴はpH、イオン強度、および二価カチオンの存在に依存する。リポソームの生産で有用な脂質の例は、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシドお

よびガングリオシドのごときホスファチジル化合物を含む。特に好ましいのはジアシルホスファチジルグリセロールであり、ここに、脂質部位は14 - 18の炭素原子、特に16 - 18の炭素原子を含有し、飽和している。例示的なリン脂質は卵ホスファチジルコリン、ジパルミトリルホスファチジルコリンおよびジステアロイルホスファチジルコリンを含む。

【0171】

リポソームの標的化は解剖学のおよび機械的要因に基づいて分類されている。解剖学的分類は選択性のレベル、例えば、器官 - 特異性、細胞 - 特異性およびオルガネラ - 特異性に基づく。機械的標的化は、それが受動的または能動的であるかに基づいて区別することができる。受動的標的化は洞様毛細血管を含有する器官中の細網内皮細胞系 (RES) の細胞に分布するリポソームの天然の傾向を利用する。他方、能動的標的化は、ポリクローナルもしくはモノクローナル抗体、糖、糖脂質または蛋白質のごとき特異的リガンドにリポソームをカップリングさせることによって、あるいはリポソームの組成またはサイズを変化させて局所化の天然に起こる部位以外の器官および細胞型への標的化を達成することによって、リポソームを改変することを含む。好ましくは、該リガンドは、リポソームを特異的細胞 - 表面リガンドに標的化するのに用いることができるポリクローナルまたはモノクローナル抗体である。該リガンドは、それが標的細胞上の抗原性エピトープに効果的に結合する限り、FabまたはF(ab')₂のごとき抗体断片とすることもできる。好ましくは、抗体または抗体断片は、標的細胞に専ら見出される抗原を認識する。例えば、スカベンジャー受容体Aのごとき、マクロファージ細胞上に特異的に発現されるある種の抗原は、抗体 - ABC1リポソームを直接的にマクロファージ細胞に標的化する目的で開発することができる。

【0172】

多数の手法を用いて、リポソーム二層にポリクローナルもしくはモノクローナル抗体いずれかを共有結合させることができる。また、脂質基をリポソームの脂質二層に取り込んで、リポソーム二層と安定に会合した標的化リガンドを維持することができる。加えて、脂質鎖を標的化リガンドに接合するのに種々のリンキング基を用いることができる。

【0173】

ここに示す研究は、核受容体に対するリガンドがコレステロール流出の増加を行うことができるのを示した。従って、もう1つの実施形態において、本発明は、哺乳動物対象における細胞からのコレステロール流出を増加させるのに十分な量にて核受容体に対する少なくとも1つのリガンドを哺乳動物対象に投与する工程を含むことを特徴とする該細胞からのコレステロール流出を増加させるのに適した方法を提供する。医薬組成物を処方しそれを投与する前記方法を用い、核受容体に対するリガンドを含む医薬組成物を調製しそれを投与することができる。核受容体リガンドの十分な量はコレステロール流出を増加させるリガンドの量である。そのような量は、種々の投与量のリガンドの投与の前および後にコレステロールの流出を測定し、コレステロール流出の増加を行う用量を決定することによって決定することができる。コレステロール流出はさきに記載したアッセイを用いて測定することができる。

【0174】

核受容体は、小さな親油性ホルモンの効果を転写応答に導入することによって、脊椎動物の発生および成体生理学において臨界的な役割を演じるリガンド-活性化転写因子である。ペルオキシソームプロリフェレーター-活性化受容体 (PPAR)、肝臓X受容体 (LXR)、レチノイドX受容体 (RXR)、ファルネソイドX受容体 (FXR)、およびステロイドおよび生体内異物受容体 (SXR) を含めた核受容体のいくつかのファミリーが存在する。該PPARファミリーは、3つの密接に関連する遺伝子産物 PPAR α 、PPAR γ および PPAR β/δ を含む。PPAR σ は細胞内および細胞外脂質代謝の鍵となるレギュレーターとして示されてきた。脂肪酸に結合すると、PPAR α はペルオキシソームの増殖を刺激し、脂肪酸の β -酸化に関与するいくつかの酵素の合成を誘導する。また、PPAR α 受容体はフィブレート、高いトリグリセリドレベルの低下につき処方された薬物に対する分子標的でもある (Issemanら、Nature, 347, 645 (1990))。フィブレートは、リポ蛋白質および脂肪酸の代謝に影響する非常に多数の遺伝子の転写を調節するPPARリガンドとして作用する。加えて、チアゾリジンジオン化合物のクラスに属する化合物のごと

きPPAR γ リガンドはHDLを増加させ、ヒトにおいてトリグリセリドレベルを低下させることが示されている。

【0175】

LXRは、過剰コレステロールの異化を調節するオキシステロール受容体である。LXR α は、コレステロールの胆汁酸への変換で律速工程を担う酵素をコードするCYP7a遺伝子中のDNA応答エレメントに、RXRを持つヘテロダイマーとして結合することが示されている。研究は、ダイエットコレステロールに応答してCYP7a遺伝子の転写を増加させることができないため、コレステロール-リッチなダイエットを摂取した場合、LXR α を欠くマウスは膨大な量のコレステロールエステルをその肝臓に蓄積することを示してiru(Peetら, Cell, 93:693(1998))。LXR α ナルマウスでのさらなる研究は、コレステロールおよび脂肪酸のホメオスタシスに参画するいくつかの他の遺伝子の調節にもLXR α が関与することを示す。いくつかの組織において発現され、LXR α と同一のオキシステロールによって活性化される密接に関連する核受容体LXR β の生物学的役割は依然として明らかでない(Songら, Proc.Natl.Acad.Sci., 91:10809(1994); Seol, Mol.Endocrinol., 9:72(1995))。

【0176】

革命的にLXR α に関連するFXRもまたコレステロールのホメオスタシスに関与する。LXR α と同様に、FXRはRXR受容体とのヘテロダイマーとして機能する(Schwartzら, Curr.Opin.Lipidol., 9:113(1998); Vlahcevicら, Gastroenterology, 113:1949(1997))。FXRは、合成レチノイドTNPBおよび超生理学的濃度の全てのトランスレチノイン酸によって活性化される(Xavackiら, Proc.Natl.Acad.Sci., 94:70-0(1997))。最近の研究は、FXRが核胆汁酸受容体であることを示す。まず、FXRは、肝臓、腸および腎臓を含めた胆汁酸がそれを通して循環する組織で豊富に発現される(Seolら, Mol.Endocrinol

., 9:72 (1995); Formanら, Cell, 81:687 (1995)。また、FXRは、最近、そのうちケノデオキシコール酸(CDCA)が最も優れている生理学的濃度のいくつかの胆汁塩に対する受容体として働くことが示されている(Kliwerら, Science, 284:757-284 (1999); Makishimaら, Science, 284:1362-1363 (1999))。CDCAは、CYP7aおよび腸胆汁酸-結合蛋白質をコードするものを含めた、胆汁塩のホメオスタシスに参画するいくつかの遺伝子の発現を調節することが知られている。

【0177】

実施例13に詳細に記載するごとく、LXR、RXRおよびPPAR核受容体に対するリガンドが、コレステロール-負荷マウスマクロファージ細胞においてアポAI-誘導コレステロール流出を増加させることが示された。例えば、9シス-レチノイン酸(30 ng/ml)の投与は、これらの細胞においてアポAI-誘導コレステロール流出のほぼ三倍増加を生じた。同様に、22(R)ヒドロキシコレステロール(5 µ/ml)の投与は、アポAI-誘導コレステロール流出のほぼ3倍増加を生じた。フェンフィブレート(3 µg/ml)を摂取した細胞は、コレステロール流出のほぼ2倍増加を生じた。これらの結果は、核受容体を変調させて、マクロファージからのアポリポ蛋白質-媒介コレステロール流出の速度を増加させることを示す。さらに、実施例13に記載されているごとく、9-シス-RAは、用量依存的にマクロファージ細胞からのコレステロール流出を媒介した。ベンザフィブレートのごとき他の核受容体アクチベータはコレステロール流出を増加させることが示された(データは示さず)。

【0178】

従って、核受容体リガンドを投与することによってコレステロール流出を増加させる方法において、リガンドは、好ましくは、LXR、RXR、PPAR、FXRおよびSXR核受容体リガンドよりなる群から選択される。LXRリガンドを用いてコレステロール流出を増加させる好ましい実施形態において、リガンドは、より好ましくは、20(S)ヒドロキシコレステロール、22(R)ヒドロキシコレステロール、24-ヒドロキシコレステロール、25-ヒドロキシコレ

ステロール、および24(S)、25エポキシコレステロールLXRリガンドよりなる群から選択される。最も好ましくは、LXRリガンドは20(S)ヒドロキシコレステロールである。RXRリガンドを用いてコレステロール流出を増加させる好ましい実施形態において、リガンドは、より好ましくは、9-シスレチノイン酸、レチノール、レチナール、オール-トランスレチノイン酸、13-シスレチノイン酸、アシトレチン、フェンレチニド、エトレチネート、CD495、CD564、TTNN、TTNNPB、TTAB、LDG1069よりなる群から選択される。最も好ましくは、該RXRリガンドは9-シスレチノイン酸である。PPARリガンドを用いてコレステロール流出を増加させるもう1つの好ましい実施形態において、リガンドは、好ましくは、チアゾリジンジオン化合物のクラスから選択される。

【0179】

もう1つの好ましい実施形態において、1を超える核受容体リガンドが哺乳動物対象に投与されて、コレステロール流出を増加させる。好ましくは、2以上の核受容体リガンドを対象に投与する場合、リガンドはLXRおよびRXRリガンドである。より好ましくは、核受容体リガンドは20(S)ヒドロキシコレステロールおよび9-シスレチノイン酸である。

【0180】

さらにもう1つの実施形態において、本発明は、コレステロール流出を増加させるのに十分な量でエイコサノイドを哺乳動物対象に投与する工程を含むことを特徴とする哺乳動物対象において、細胞からのコレステロール流出を増加させるのに適した方法を提供する。医薬組成物を処方しそれを投与する前記方法を用い、エイコサノイドを含む医薬組成物を調製し、投与することができるエイコサノイドの十分な量は、コレステロール流出を増加させる量である。そのおうな量は、種々の投与量エイコサノイドの投与前および後にコレステロール流出を測定し、コレステロール流出の増加を行う用量を測定することによって決定することができる。コレステロール流出は前記したアッセイおよび方法を用いて測定することができる。

実施例14に記載されたごとく、エイコサノイドは、コレステロール-負荷マ

ウスマクロファージ細胞におけるアポA I - 誘導コレステロール流出を増加させることが示された。例えば、P G I 2 (2 5 n m) の投与は、これらの細胞においてアポ - 誘導コレステロール流出のほぼ2倍増加を生じさせた。同様に、P G E 1 (n M) の投与はアポA I - 誘導コレステロール流出のほぼ3倍増加を生じさせた。これらの結果はエイコサノイドが、マクロファージからのアポリポ蛋白質 - 媒介コレステロール流出の速度を増加させることができることを示す。従って、好ましい実施形態において、エイコサノイドはプロスタグランジンE 2、プロスタサイクリン (プロスタグランジン I 2) およびプロスタグランジン J 2 エイコサノイドよりなる群から選択される。

【0181】

A B C 1 発現 / 活性を増加させるための方法および化合物

コレステロール流出を促進するようにA B C 1 が機能するとすれば、コレステロール流出を増加させる1つの方法はA B C 1 の細胞発現を増加させることである。従って、本発明は、哺乳動物対象における細胞においてA B C 1 の発現を増加させる化合物の治療量を哺乳動物対象に投与することによって、該細胞からのコレステロール流出を増加させるのに適した方法を提供する。化合物の治療量は、A B C 1 発現を増加させる化合物の量である。そのような量は、種々の投与量の化合物の投与前および後にA B C 1 の遺伝子発現を測定し、A B C 1 遺伝子発現の増加を行う用量を測定することによって決定することができる。A B C 1 遺伝子の発現は、対象から血液試料を得、単球集団を分離し、R T - P C R のとき、当該分野で知られここに記載した方法を用いてA B C 1 m R N A の濃度を測定することによって測定することができる。

【0182】

1つの好ましい実施形態において、該方法は、c A M P アナログを投与してA B C 1 の遺伝子発現を増加させることを含む。図8に示すごとく、c A M P は、正常な繊維芽細胞においてA B C 1 m R N A の発現をほぼ10倍増加させる。好ましくは、c A M P アナログは、8 - ブロモc A M P、N 6 - ベンゾイルc A M P および8 - チオメチルc A M P よりなる群から選択される。もう1つの好ましい実施形態において、該方法は、c A M P の合成を増加させて、A B C 1 の遺

伝子発現を増大させることを含む。好ましくは、該化合物はフォルスコリンである。さらにもう1つの好ましい実施形態において、該方法は、cAMPの分解を阻害して、ABC1の遺伝子発現を増加させる化合物を投与することを含む。そのような化合物の例はホスホジエステラーゼ阻害剤である。好ましくは、ホスホジエステラーゼ阻害剤はロリプラム、テオフィリン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、R020-1724、ビンボセチン、ザプリナスト、ジピリダモール、ミルリノン、アムリノン、ピモベンダン、シロスタミド、エノキシモン、ペルオキシモン、およびベスナリノンホスホジエステラーゼ阻害剤よりなる群から選択される。

【0183】

もう1つの好ましい実施形態において、該方法は、ABC1の遺伝子発現を増加させるのに十分な量にて核受容体に対するリガンドを哺乳動物対象に投与することを含む。実施例17に記載され、図12に示されるごとく核受容体に対するリガンドはABC1の遺伝子発現を上昇調節できる。ABC1プロモーターの制御下でルシフェラーゼレポーター遺伝子を含むpAPR1を用いるトランスフェクション実験は、ABC1プロモーターが、LXRおよびRXR核受容体に対するリガンドの存在下で活性化されることを示した。具体的には、pAPR1でトランスフェクトされたマクロファージ細胞は、200H-コールの存在下でルシフェラーゼレポーター活性の19倍増加、9-シスRAの存在下でルシフェラーゼ活性の16倍増加、およびEtOH対照と比較して双方のリガンドの存在下でルシフェラーゼ活性の280倍増加を生じた。結果は、ステロールおよびレチノイドが共にABC1プロモーターからの強力な転写応答を誘導することを示す。さらに、双方のリガンドで処理した細胞で見出されたルシフェラーゼ活性の劇的な増加によって理解されるごとく、二つのクラスの化合物の間には明らかな相乗効果がある。本発明の方法によると、好ましくは、リガンドはLXR、RXR、PPAR、FXRおよびSXRリガンドよりなる群から選択される。

【0184】

ABC1蛋白質の細胞レベルの増加に加えて、ABC1蛋白質の活性を増強することによって、逆コレステロール輸送を促進することができる。かくして、も

う1つの実施形態において、本発明は、コレステロール流出を増加させるのに十分な量にてA B C 1活性を増加させる化合物の治療量を哺乳動物対象に投与する工程を含むことを特徴とする哺乳動物対象において細胞からのコレステロール流出を増加させるのに適した方法を提供する。そのような化合物を含む医薬組成物は、医薬組成物を処方しそれを投与する前記方法を用いて調製し、それを投与することができる。化合物の治療量は、コレステロール流出を増加させる化合物の量である。そのような量は、種々の投与量の化合物の投与の前および後にコレステロール流出を測定し、先に記載した方法を用いてコレステロール流出の増加を行う用量を測定することによって決定することができる。コレステロール流出の増加がA B C 1活性の増加によるか否かを判断するために、化合物の投与の前および後に細胞試料に存在するA B C 1蛋白質の量をここに記載する方法を用いて測定する（実施例11参照）。双方の測定（すなわち、化合物の投与前および投与後）につき、コレステロール流出活性の量をA B C 1蛋白質の濃度で割って、A B C 1蛋白質の標準的な濃度で見出されるコレステロール活性の量を決定する。蛋白質濃度に対して標準化されたコレステロール活性の観察された増加は、該増加がA B C 1活性の増加によるものであることを示す。

【0185】

治療化合物を同定する方法

本発明のもう1つの態様は、化合物がA B C 1の遺伝子発現を変調する（すなわち、上昇調節または下降調節）するか否かを判断するために化合物をスクリーニングする方法に関する。そのような化合物は、A B C 1発現を増加させ、それにより、コレステロール流出を促進し、H D L - コレステロールの血中レベルを上昇させる治療化合物の開発で有用であろう。従って、心血管病の治療で有用であり得る化合物を同定する方法が提供される。1つの実施形態において、本発明は、（a）哺乳動物A B C 1遺伝子の発現変調部分とレポーターc D N Aを作動可能に連結させて、組換えレポーター構築体を生じさせ；（b）組換えレポーター構築体を宿主細胞の集団にトランスフェクトし；（c）トランスフェクトされた宿主細胞の試料においてレポーター遺伝子発現のレベルをアッセイし；（d）トランスフェクトされた細胞を、スクリーニングすべきテスト化合物と接触させ

；（e）テスト化合物との接触の後にトランスフェクトされた宿主細胞の試料におけるレポーター遺伝子発現のレベルをアッセイし；次いで、（f）テスト化合物への暴露によって引き起こされたレポーター遺伝子発現のレベルの相対的变化を比較し、それにより、ABC1発現変調活性を決定する工程を含むことを特徴とするABC1発現変調活性につきテスト化合物をスクリーニングする方法を提供する。

【0186】

まず、ABC1遺伝子の発現変調部分に作動可能に連結した異種レポーター遺伝子を含む組換えレポーター構築体を構築する。Davisら、Basic Methods in Molecular Biology (1986)；Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd 編、(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))；and Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology, (Wiley and Sons (1994))を含めた、ここに記載された標準実験室的マニュアルにおけるものごとき、良く知られた連結およびクローニング技術を用い、ABC1発現変調ポリヌクレオチドおよびレポーター遺伝子をベクターに挿入することができる。別法として、ABC1発現変調ポリヌクレオチドは、先に記載したものごとき商業的に入手可能なレポーター構築体に挿入することができる。ABC1ポリヌクレオチドおよびレポーター遺伝子の挿入に適したいずれのベクターも用いることができる。選択されたベクターは、使用される特定の宿主細胞で機能すべきである。好ましくは、ベクターは哺乳動物宿主細胞に適合する。

【0187】

好ましくは、ABC1遺伝子の発現変調部分は、ABC1プロモーター活性を含有するABC1の5'フランキング領域である。1つの好ましい実施形態において、ABC1遺伝子の発現変調部分は配列番号：3を含む。もう1つの好ましい実施形態において、ABC1遺伝子の発現変調部分は配列番号：3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-16

43、1394-1643または1394-1532を含む。また、好ましくは、異種レポーターは、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールおよび緑色蛍光蛋白質をコードするポリヌクレオチドよりなる群から選択される。より好ましくは、異種レポーターは、ルシフェラーゼ蛋白質をコードするポリヌクレオチドである。特に好ましい実施形態において、組換えレポーター構築体は図11に示されるpAPR1である。

【0188】

次に、組換えレポーター構築体は宿主細胞の集団にトランスフェクトされる。組換えレポーター構築体は、先に記載されたトランスフェクション方法、並びに実施例8および15に記載された方法のいずれかを用いて宿主細胞に導入することができる。例えば、レポーター構築体は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質-媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染、他の公知の記載された方法のいずれかを用いてトランスフェクトすることができる（例えば、(Davisら, Basic Methods in Molecular Biology (1986) 参照)。宿主細胞は、適当な条件下で培養すると、引き続いて測定することができるレポーターポリペプチドを合成するいずれの細胞でもあり得る。好ましくは、宿主細胞は哺乳動物宿主細胞である。より好ましくは、哺乳動物宿主細胞はマクロファージ、繊維芽細胞、肝細胞または腸細胞である。より好ましくは、宿主細胞はRAW264.7細胞、Thp-1細胞およびHepG2細胞よりなる群から選択される。レポーター構築体の濃度およびトランスフェクションの持続は、トランスフェクション方法および用いる宿主細胞のタイプおよび濃度に依存して変化させることができる。レポーター構築体の適当な濃度およびトランスフェクション時間の決定は当業者の技量の範囲内のものである。

【0189】

トランスフェクションに続き、テスト化合物に暴露されなかったトランスフェクト宿主細胞の試料をアッセイして、レポーター遺伝子発現のレベルを測定する。未暴露トランスフェクト宿主細胞の試料で見出されるレポーター遺伝子発現の

レベルは対照測定を提供する。トランスフェクトされた宿主細胞を溶解させ、レポーター遺伝子発現のレベルを、当該分野で良く知られた方法のいずれかを用いてアッセイする。レポーター遺伝子発現のレベルを測定するのに用いられるアッセイは、トランスフェクションで用いるレポーター構築体に依存して異なる。例えば、もしルシフェラーゼレポーター構築体を用いれば、細胞溶解物のルシフェラーゼ活性は、実施例15に記載されたごとく、ルミノメーターを用いて光単位として測定される。

【0190】

トランスフェクトされた宿主細胞の異なる試料を、スクリーニングすべきテスト化合物と接触させ、これらの細胞で見出されるレポーター遺伝子発現のレベルを引き続いて測定する。好ましくは、トランスフェクトされた宿主細胞をテスト化合物と約4 - 48時間接触させる。より好ましくは、トランスフェクトされた宿主細胞をテスト化合物と約8 - 36時間接触させる。なおより好ましくは、トランスフェクトされた宿主細胞をテスト化合物と約24時間接触させる。未暴露（対照）細胞におけるレポーター遺伝子発現のレベルを測定するのに用いられる同一アッセイを用いて、テスト化合物に暴露された細胞におけるレポーター遺伝子発現のレベルを測定すべきである。

【0191】

最後に、未暴露対照細胞で見出されたレポーター遺伝子の発現のレベルをテスト化合物に暴露された細胞で見出されたレポーター遺伝子発現のレベルと比較して、テスト化合物がABC1発現変調活性を有するか否かを決定する。もし双方の細胞試料における遺伝子発現のレベルが同一またはほぼ同一であれば、テスト化合物はABC1遺伝子発現を変調しない。対照細胞で見出されたレポーター遺伝子発現のレベルに対するテスト化合物に暴露された細胞におけるレポーター遺伝子発現のより高いレベルは、テスト化合物がABC1の遺伝子発現を上昇調節することを示す。対照細胞で見出されたレポーター遺伝子発現のレベルに対するテスト化合物に暴露された細胞におけるレポーター遺伝子発現のより低いレベルは、テスト化合物がABC1の遺伝子発現を下降調節することを示す。

【0192】

本発明のもう1つの態様は、化合物がABC1-媒介コレステロール流出を促進するか否かを決定するためにテスト化合物をスクリーニングする方法に関する。そのような方法は、(a)培養中に維持された哺乳動物細胞の試料におけるコレステロール流出のレベルをアッセイして、コレステロール流出の対照レベルを決定し、(b)哺乳動物細胞をスクリーニングすべきテスト化合物と接触させ；(c)テスト化合物との接触の後に細胞の試料におけるコレステロール流出のレベルをアッセイし；次いで、(d)テスト化合物との接触の後に細胞の試料におけるABC1-依存性コレステロール流出のレベルをアッセイし、それにより、テスト化合物が培養中の細胞からのABC1-媒介コレステロール流出を促進するか否かを決定することを含む。

【0193】

培養細胞の試料におけるコレステロール流出のレベルは、当該分野で知られここに記載した方法を用いて測定することができる(実施例1参照)。培養に維持することができるいずれの哺乳動物細胞を用いてもコレステロール流出を測定することができる。該細胞は一次培養から、または不滅化細胞系から由来することができる。便宜のため、実施例1に記載されたごとく、ヒトパピローマウイルス16のインサート、オンコジインE6およびE7、および選択マーカー遺伝子を持つベクターを含有する両種性レトロウイルスでトランスフェクトすることによって細胞を不滅化することができる。好ましくは、培養された細胞は繊維芽細胞、マクロファージ、肝細胞または腸細胞である。より好ましくは、培養された細胞はRAW264.7細胞である。

【0194】

テスト細胞と接触されなかった細胞の試料におけるコレステロール流出のレベルを測定して、コレステロール流出の対照レベルが得られる。加えて、テスト化合物と接触された哺乳動物細胞の試料におけるコレステロール流出のレベルを測定して、テスト化合物によって影響されたコレステロール流出の量が測定される。また、テスト化合物と接触された哺乳動物細胞の試料におけるABC1-媒介コレステロール流出のレベルを測定して、テスト化合物によって影響されたABC1-媒介コレステロール流出の量が測定される。好ましくは、コレステロール

流出またはA B C 1 - 媒介コレステロール流出をアッセイする約8 - 24時間前に、細胞をテスト化合物と接触させる。A B C 1 - 媒介コレステロール流出のレベルは、結合に際して、A B C 1の活性を阻害する抗 - A B C 1抗体を用いてアッセイすることができる。別法として、A B C 1の発現を阻害するアンチセンスA B C 1ポリヌクレオチドを用い、A B C 1 - 媒介コレステロール流出のレベルをアッセイすることができる。例えば、配列番号：57を含むアンチセンスA B C 1ポリヌクレオチドを用い、A B C 1 - 媒介コレステロール流出のレベルをアッセイすることができる（実施例7参照）。テスト化合物と接触させると同時におよび同一の持続の間、細胞を抗 - A B C 1抗体またはアンチセンスA B C 1ポリヌクレオチドと接触させるべきである。

【0195】

もし対照コレステロール流出のレベルが、テスト化合物と接触させた細胞で見出されたコレステロール流出のレベルと同一またはほぼ同一であれば、当該化合物はコレステロール流出を促進しない。コレステロール流出の対照レベルよりも大きいテスト化合物と接触した細胞で見出されたコレステロール流出のレベルの増加は、テスト化合物によって促進されたコレステロール流出の量を示す。テスト化合物単独と接触した細胞で見出されたコレステロール流出およびテスト化合物および抗 - A B C 1抗体またはアンチセンスA B C 1ポリヌクレオチドと接触した細胞で見出されたコレステロール流出の間の差は、A B C 1を通じて媒介されたコレステロール流出の量を示す。例えば、もしコレステロール流出の対照レベルが1.0であって、テスト化合物と接触した細胞で見出されたコレステロール流出のレベルが1.1であれば、テスト化合物は10%だけコレステロール流出を促進する。もしテスト化合物および抗 - A B C 1抗体またはアンチセンスA B C 1ポリヌクレオチドと接触した細胞で見出されたコレステロール流出が1.0であれば、テスト化合物によって引き起こされたコレステロール流出の増加は全くA B C 1 - 媒介される。

【0196】

冠心臓病に対する罹患性を検出する方法

また、本発明は、ヒト対象を含めた哺乳動物対象においてA B C 1遺伝子また

は蛋白質の発現の比較レベルを検出する方法に関する。コレステロール流出におけるABC1の役割を仮定すれば、ABC1遺伝子または蛋白質発現のあらかじめ決定した標準レベルに対する哺乳動物対象におけるABC1遺伝子または蛋白質発現の増加したレベルの測定を用いて、該対象における冠心臓病に対する罹患性を示すことができる。従って、本発明は、(a)哺乳動物対象からテスト細胞試料を得；(b)テスト細胞試料においてABC1 mRNA発現のレベルをアッセイし；次いで、(c)テスト細胞試料におけるABC1 mRNA発現のレベルとABC1 mRNA発現のあらかじめ決定した標準レベルとを比較し、それにより、哺乳動物対象におけるABC1遺伝子発現の比較レベルを検出する工程を含むことを特徴とする哺乳動物対象においてABC1遺伝子発現の比較レベルを検出する方法を提供する。

【0197】

まず、ヒト対象を含めた哺乳動物対象からテスト細胞試料を得る。テスト細胞試料は、単球集団が豊富化された血液試料であり得る。単球は、例えば、細胞サイズ、細胞密度または細胞新和性に基づいて良く知られた細胞分離手法を用いて豊富化することができる。次に、テスト細胞試料におけるABC1 mRNA発現のレベルをアッセイする。ABC1 mRNA発現のレベルは、実施例2および9においてここに記載した方法を含めた、mRNAの調製および検出についての良く知られた方法のいずれかを用いてアッセイすることができる。例えば、ABC1 mRNAの濃度は、逆転写ポリメラーゼ鎖反応、ノーザンブロット分析またはRNAse保護アッセイによって測定することができる。ABC1 mRNA濃度は、テスト細胞試料で見出された全mRNAの濃度に対して標準化されるべきである。最後に、テスト細胞試料におけるABC1発現を、あらかじめ決定した標準レベルのABC1 mRNA発現と比較する。あらかじめ決定した標準レベルのABC1 mRNA発現は、哺乳動物対象の代表的な集団から採取した細胞試料で見出されたABC1 mRNAの平均濃度および分布を測定することによって得ることができ、ここに、哺乳動物対象は、それからテスト細胞試料が得られた対象と同一の種であり、およびここに、哺乳動物対象は冠心臓病、タンジール病、または低HDL-コレステロールに関連する他の病気を有さず、(

正常範囲内にあるHDL - コレステロールレベルによって示して) 正常範囲内のコレステロール流出活性を有すると考えられる。ABC1 mRNA発現のあらかじめ決定した標準レベルに対する哺乳動物対象のテスト細胞試料におけるABC1 mRNA発現の減少したレベルの測定を用いて、哺乳動物対象における冠心臓病に対する罹患性を示すことができる。

【0198】

同様に、ABC1蛋白質の減少したレベルの検出を用いて、コレステロール流出に対する減少した能力および冠心臓病に対する罹患性を示すことができる。従って、本発明のもう1つの実施形態は哺乳動物対象においてABC1蛋白質の比較レベルを検出する方法を提供する。そのような方法は、(a) 哺乳動物対象からテスト細胞試料を得；(b) テスト細胞試料においてABC1蛋白質の量をアッセイし；次いで(c) テスト細胞試料におけるABC1蛋白質の量をABC1蛋白質のあらかじめ決定した標準量と比較し、それにより、哺乳動物対象におけるABC1蛋白質の比較レベルを検出する工程を含む。

ABC1蛋白質の量は、蛋白質を測定する良く知られた方法のいずれかを用いてアッセイすることができる。好ましくは、ABC1蛋白質の量はイムノアッセイを用いて測定する。1つの実施形態において、ABC1蛋白質の量は、(a) 細胞試料を抗-ABC1抗体の集団と接触させ、次いで、(b) 細胞試料と会合した抗-ABC1抗体を検出することによって測定される。例えば、ABC1蛋白質は、実施例11に記載されたごとくC - 末端に位置するKNQTVVDALLTSFLQDEKVKESに対応する合成ペプチドに対して生起した抗血清と接触させることができる。抗-ABC1抗体は、例えば、ウエスタンブロッティング、免疫沈殿およびFACSを含めた当該分野で知られたいくつかの方法を用いて検出することができ、ここに、該検出は放射能、比色または蛍光標識を用いて達成することができる。細胞試料においてABC1蛋白質の量を測定するための1つの好ましい方法は免疫沈殿であり、ここに、ビオチン化ABC1蛋白質を抗-ABC1抗体と接触させ、結合した抗-ABC1抗体をストレプトアビジンホースラディッシュペルオキシダーゼを用いて検出する。

【0199】

テスト細胞試料中のA B C 1蛋白質の量をA B C 1蛋白質のあらかじめ決定した標準量と比較する。A B C 1蛋白質のあらかじめ決定した標準量は、哺乳動物対象の集団から採取した細胞試料で見出されたA B C 1蛋白質の平均濃度を測定することによって得ることができ、ここに、哺乳動物対象は、それからテスト細胞試料が得られた対象と同一の種であり、およびここに、哺乳動物対象は冠心臓病、タンジール病または低H D L - コレステロールに関連する他の病気を有さず、（正常範囲内にあるH D L - コレステロールレベルによって示して）正常範囲内のコレステロール流出活性を有すると考えられる。

【0200】

A B C 1 抗体

本明細書中で用いるごとく、「抗体」(A b)または「モノクローナル抗体」(M a b)は、無傷分子、ならびに蛋白質に特異的に結合することができる（例えば、F a bおよびF (a b') 2断片のごとき）抗体断片を含むことを意味する。F a bおよびF (a b') 2断片は無傷抗体のF c断片を欠き、循環からより迅速に除去され、無傷抗体よりも低い非特異的組織結合を有することができる（W a h lら, J. N u c l. M e d., 24, 316 - 325 (1983)）。かくして、これらの断片、ならびにF A Bの産物または他の免疫グロブリン発現ライブラリが好ましい。さらに、本発明の抗体はキメラ、単一鎖およびヒト化抗体を含む。

【0201】

さらなる実施形態はキメラ抗体、例えば、ネズミモノクローナル抗体のヒト化バージョンを含む。そのようなヒト化抗体は公知の技術によって調製することができ、該抗体をヒトに投与すると低下した免疫原性の利点を提供する。ひとつの実施形態において、ヒト化モノクローナル抗体はネズミ抗体の可変領域（またはちょうどその抗原結合部位）およびヒト抗体に由来する定常領域を含む。別法として、ヒト化抗体断片はネズミモノクローナル抗体の抗原結合部位およびヒト抗体に由来する（抗原結合部位を欠く）可変領域断片を含むことができる。キメラおよびさらに工夫したモノクローナル抗体の生産のための手法はR i e c h m a n nら, (N a t u r e 332:323, 1988), L i uら(PN

AS 84:3439, 1987), Larrickら, (Bio/Technology 7:934, 1989), およびWinterおよびHarris (TIPS 14:139, May 1993)に記載されているものを含む。

【0202】

抗体を生産するひとつの方法は、トランスジェニックマウスのごとき非 - ヒト動物を、配列番号：1を含むポリヌクレオチド、配列番号：1のヌクレオチド291 - 7074を含むポリヌクレオチド、または配列番号：1を含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドから翻訳されたポリペプチドで免疫化し、それにより、記載したポリヌクレオチドから翻訳されたポリペプチドに対して向けられた抗体が該動物において創製されることを含む。非 - ヒト動物においてヒト抗体を創製するための手法が開発されている。該抗体は部分的にヒトであるか、または好ましくは完全にヒトのものとすることができる。その中に1以上の免疫グロブリン鎖をコードする遺伝物質が導入された(トランスジェニックマウスのごとき)非 - ヒト動物を使用することができる。そのようなトランスジェニックマウスは種々の方法で遺伝子的に改変することができる。遺伝子走査の結果、免疫化に際して動物によって生産された少なくともいくつかの(好ましくは、実質的にすべての)抗体において内因性免疫グロブリン鎖を置き換えたヒト免疫グロブリンポリペプチド鎖を得ることができる。トランスジェニック動物を、記載したポリヌクレオチドのいずれかから翻訳されたポリペプチドで免疫化することによって生産された抗体がここに提供される。

【0203】

1以上の内因性免疫グロブリン遺伝子が種々の手段で不活化されたマウスが調製されている。ヒト免疫グロブリン遺伝子はマウスに導入されて、不活化マウス遺伝子を置き換えている。動物で生産された抗体は、動物に導入されたヒト遺伝物質によってコードされたヒト免疫グロブリンポリペプチド鎖を一体化させる。生産のための技術およびかかるトランスジェニック動物の使用の例は、ここに引用して一体化させる米国特許第5、814、318号、第5、569、825号

および第5、545、806号に記載されている。

【0204】

モノクローナル抗体は、例えば、免疫化スケジュールの完了後にトランスジェニック動物から収穫された脾臓細胞の不滅化することによって通常の手法によって生産することができる。通常の手法によって、脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させてハイブリドーマを生産することができる。

【0205】

ハイブリドーマ細胞系を生産する方法は、そのようなトランスジェニック動物を、記載されたポリヌクレオチドのひとつから翻訳されたポリペプチドの少なくとも7つの連続アミノ酸残基を含む免疫原で免疫化し；免疫化された動物から脾臓細胞を収穫し；収穫された脾臓細胞を骨髓腫細胞系に融合させ、それにより、ハイブリドーマ細胞を創製し；次いで、記載したポリヌクレオチドの1つから翻訳されたポリペプチドに結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞系を同定するを含む。そのようなハイブリドーマ細胞系、およびそれから生産されたモノクローナル抗体は本発明に含まれる。ハイブリドーマ細胞系によって分泌されたモノクローナル抗体は通常の方法によって精製される。

【0206】

該抗体は、ABC1ポリペプチドへの特異的結合に際して、ABC1ポリペプチドの活性を阻害することができる。好ましくは、抗体は、結合に際して、ABC1ポリペプチドのコレステロール輸送活性を阻害する。そのような抗体は、コレステロール輸送に必須の領域に対応するポリペプチドで非-ヒト動物を免疫化することによって作成することができる。抗体は、記載したコレステロール流出アッセイのいずれかを用いて、それがコレステロール流出を阻害するか否かを判断するためにテストすることができる。そのような不活化抗体を用いて、ここに記載したコレステロール流出アッセイのいずれかのごときイン・ビトロアッセイで使用する、テスト化合物がABC1-媒介コレステロール流出を促進するか否かを決定することができる。また、不活化抗体をイン・ビトロアッセイで用いて、哺乳動物対象の細胞においてABC1蛋白質の比較レベルを検出することができる。該不活化抗体は、化合物がABC1-依存性コレステロール流出を変調す

るか否かを決定するために化合物をスクリーニングするのに適したキットで有用である。

【0207】

治療化合物を同定するためのキット

また、本発明は、化合物のABC1発現変調活性を測定するために化合物をスクリーニングするのに適したキットを含む。該キットは、少なくとも1つのアッセイを行うのに十分な量にて、別々にパッケージされた試薬として、哺乳動物ABC1遺伝子の発現変調部分に作動可能に連結したレポーターcDNAを含む組換えレポーター構築体を含む。パッケージされた試薬の使用のための指令書もまた典型的には含まれる。哺乳動物ABC1遺伝子の発現変調部分は5'フランキング配列を含む。1つの好ましい実施形態において、哺乳動物ABC1遺伝子の発現変調部分は配列番号：3を含む。1つの好ましい実施形態において、哺乳動物ABC1遺伝子の発現変調部分は配列番号：3のヌクレオチド1-1532、1080-1643、1181-1643、1292-1643、1394-1643または1384-1532を含む。レポーターcDNAはいずれの適当なレポーター遺伝子でもあり得る。特に好ましい実施形態において、組換えレポーター構築体はpAPR1である。もう1つの実施形態において、該キットは、さらに、レポーター蛋白質を検出するための手段を含む。かくして、キットは、レポーター蛋白質検出で用いられる緩衝液および基質のごとき試薬を含む。

【0208】

本明細書中で用いるごとく、用語「パッケージ」とは、本発明の組換えベクターを固定された限界内に保持することができるガラス、プラスチック、(例えば、ポリエチレン、ポリプロピレンまたはポリカルボネート)、紙、ホイル等のごとき固体マトリックスまたは材料を言う。かくして、例えば、パッケージは、ミリグラム量の考えられるベクターを含有させるのに用いるガラスバイアルであり得る。

【0209】

「使用のための指令書」は、典型的には、試薬濃度または試薬および混合すべき試料の相対的量、試薬/試料混合のための維持時間、温度、緩衝液の条件等の

ような少なくとも1つのアッセイ方法パラメーターを記載する触れることができる表現を含む。

【0210】

加えて、本発明は、化合物がABC1-依存性コレステロール流出を変調するか否かを決定するために化合物をスクリーニングするのに適したキットを含む。

1つの実施形態において、キットは、少なくとも1つのアッセイを行うのに十分な量にて、別々にパッケージされた試薬としての不活化抗-ABC1抗体を含む。パッケージされた試薬の使用のための指令書もまた典型的には含まれる。

【0211】

もう1つの実施形態において、キットは、少なくとも1つのアッセイに十分な量のアンチセンスABC1オリゴヌクレオチドおよび使用のための指令書を含む。好ましくは、アンチセンスABC1オリゴヌクレオチドは配列番号：53を含む。

【0212】

以下の実施例は本発明をさらに説明するが、本発明を断じて限定するものと解釈されるべきではない。

【0213】

(実施例1)

本実施例は、タンジール病(TD)を持つ患者はアポA-I-媒介脂質流出の不存在を有することを示す。

【0214】

細胞培養：ヒト繊維芽細胞は、ふたりの正常な対象(NL1)および3人のタンジール病(TD)を持つ無関係な患者からの皮膚外植体から得た。TD1細胞は、極端に低い血漿HDLコレステロールおよびアポA-Iレベルならびにタンジール病に典型的な臨床的兆候を持つ53歳の女性から得た。TD2細胞は、非常に低いレベルの血漿HDLコレステロールおよびアポA-Iを含めたタンジール病の臨床的、形態学的および生化学的特徴を持つ56歳の男性から得た(Francisら, J. Clin. Invest., 96, 78-87(1995))。TD3細胞は、オレンジ色の扁桃片、非対称運動神経障害、5mg/

d Lの血漿HDLコレステロールおよび16 mg / d LのLDLコレステロールを呈するタンジール病を持つ18歳の男性から得た(Lawnら, J. Clin. Invest., 104, R25-R31(1999))。正常な細胞およびTD対象細胞は、Oramら, J. Lipid Res., 40:1769-1781(1999)に記載されたごとく不滅化した。略言すれば、ヒトパピローマウイルスの16のオンコジーンE6およびE7のインサートおよびネオマイシン抵抗性選択マーカーを持つベクターを含有する両種性レトロウイルスで細胞をトランスフェクトした。対照細胞はベクター単独で感染させた(モック-感染)。プールした細胞集団をG418の存在下で2継代の間選択し、しかる後、G418を培地から排除した。繊維芽細胞を第5および16継代(初代)または第6および15継代(不滅化)の間で用いた。不滅化された正常およびTD細胞を16-mmウェルまたは35-mm皿に接種し、実験で使用する前にダルベッコの修飾イーグル培地(DMEM)+10%胎児ウシ血清(FBS)中で密集するまで増殖させた。また、RAW264.7マウス単球細胞(American Type Culture Collection, Rockville, MD)を、10%FBSを含有するDMEM中で維持した。

【0215】

脂質流出を測定するアッセイ：コレステロールおよびリン脂質のアポAI-媒介流出は、Francisら, J. Clin. Invest., 96:78-87(1995)に記載されている方法にしたがってアッセイした。正常およびTD対象からの培養された皮膚繊維芽細胞を、0.2-0.5 μ Ci/ml [3 H]コレステロール(40-60 Ci/ミリモル, Amersham Corp., Arlington Heights, IL)の存在下で密集するまで増殖させることによって標識した。細胞が60-80%密集すると、放射性コレステロールを血清-含有増殖培地に添加した。3日後、細胞をPBS/BSAで2回洗浄し、同時に増殖を阻止し、かつコレステロールを負荷して、アポリポ蛋白質-媒介脂質流出を最大化した。これは、無血清DMEM+2 mg/mlの無脂肪酸ウシ血清アルブミン(DMEM/BSA)(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)および30 μ g/ml非放射

性コレステロール中で細胞を48時間インキュベートすることによって達成された。RAW264.7細胞を、Smithら、J. Biol. Chem., 271:30647-30655 (1996)に記載されているごとく、アセチル化LDLでの24時間インキュベーションによってスカベンジャー受容体を介してコレステロール-負荷した。略言すれば、24-ウェル皿中のRAW264.7細胞をコレステロール-負荷し、AcLDLと共に37℃にて30分間プレインキュベートした、50 μ l/mlの1Mグルコース、10 μ l/mlの200mMグルタミンおよび2%BSAを、およびアセチル化低密度リポ蛋白質(AcLDL)および[3 H]-コレステロールを補足した0.5mlのDMEM中で一晩標識して、0.33 μ Ci/ml [3 H]-コレステロールの最終濃度を得た。引き続いて、1%BSAを含有するPBSで細胞を5回洗浄し、DMEM/BSA中で一晩(16-18時間)インキュベートして、コレステロールプールを平衡化した。

【0216】

コレステロールプールの平衡の後、細胞をPBS/BSAで4回すすぎ、流出インキュベーションの前にDMEM/BSAと共に37℃にて1時間インキュベートした。アルブミン単独(対照)、アルブミン+HDL(40 μ g蛋白質/ml)またはアルブミン+アポA-I(10 μ g/ml, Biodesign International, Kennebunk, ME)いずれかを含有する流出培地(DMEM/BSA)を添加し、細胞を4、24または48時間インキュベートした。DMEM/BSAの一晩の平衡培地中に10 μ Ci/mlの[3 H]コリン(75-85 Ci/ミリモル, Amersham Corp.)を含めることによってリン脂質を標識した。培養培地中に見出された放射能は、12,000gにおける15分間の遠心後のシンチレーションカウンティングによって測定した。細胞における放射能は、0.5mlの0.2M NaOH(Smithら、J. Biol. Chem., 271:30647-30655 (1996))中での可溶化またはFrancisら、J. Clin. Invest., 96, 78-87 (1995)に記載されているヘキサン:イソプロパノール(3:2 v/v)中での抽出の後のシンチレーションカウンテ

イングによって測定した。標識されたリン脂質を含有する細胞を1mlのイソプロパノールで1時間、次いで、前記したときヘキサン：イソプロパノールで抽出した。コレステロールまたはリン脂質の流出は、細胞および培地から回収された合計トリチウム化脂質カウントを超える培地中のトリチウム化脂質カウントのパーセンテージとして表した ($\text{cpm}_{\text{培地}} / \text{cpm}_{(\text{培地} + \text{溶解物})} \times 100$)。

【0217】

図1AおよびCに示すごとく、HDLまたはアポA-Iの添加の結果、正常対象から得られたコレステロール-負荷繊維芽細胞からコレステロールが除去される。しかしながら、TD細胞においては、コレステロールを除去するHDLの濃度はわずかに減少し、コレステロールを除去するアポA-Iの能力は完全に存在しない。図1は、正常およびTD繊維芽細胞が、アルブミンとの48時間のインキュベーションの間に、約3-4%の[細胞： ^3H]-コレステロールを培地に放出することを示す。アルブミン培地へのHDLの添加は正常およびTD繊維芽細胞双方からの[^3H]-コレステロールの流出を増加させるが、TD細胞では程度が低い(図1B、D)。アポA-Iの添加は正常な繊維芽細胞からの[^3H]-コレステロールの流出を促進した(図A、C)が、TD繊維芽細胞からの[^3H]-コレステロール流出に対してはほとんどまたは全く効果を有しなかった。

【0218】

(実施例2)

本実施例は、175の遺伝子が、正常細胞と比較して、TD細胞において、少なくとも2.5倍減少した発現を示し、375の遺伝子が少なくとも2.5倍増加した発現を示すことを示す。異なる遺伝子発現は、正常個体(非-TD)からの、およびTDを持つ患者からのcDNAの遺伝子-発現マイクロアレイ(GEM)分析を用いて測定した。

【0219】

細胞培養：正常個体および実施例1に記載されたTD患者から得られた不滅化細胞培養を用いた。密集培養をDMEM/BSA中に維持し、1mMの8-プロ

モ環アデノシン1リン酸(8-Br-cAMP, Sigma Chemical Co., Ct. Louis, MO)で24時間補足した。

【0220】

mRNA抽出およびcDNA合成：正常およびTD繊維芽細胞双方からのmRNAは、トリゾール(Life Technologies Inc., Bethesda, MD, Cat.#15596-026)で細胞から抽出した全RNAから調製した。該mRNAはOligotex mRNAキット(Qiagen Inc., Valencia, CA, Cat.#70022)を用い販売業者のプロトコルにしたがって単離した。Cy3またはCy5蛍光色素を用いてmRNAを逆転写して、DeRisiら, Science, 24:680-686(1997)に記載された方法にしたがって蛍光標識cDNAを得た。TD細胞から得られたcDNAをCy3蛍光色素で標識し、正常細胞からのcDNAをCy5蛍光色素(Incyte Genomics, Palo Alto, CA)で標識した。

【0221】

マイクロアレイ分析：TDを持つ個体および正常個体からの細胞における異なる遺伝子発現を分析するために、前記したごとく調製したCy3およびCy5蛍光標識cDNA試料を、顕微鏡スライド(Incyte Genomics, Palo Alto, CA)上のGene Albumマイクロアレイ(GEM)の組にハイブリダイズさせた。6つのスライドの各々は約9,800ヒトcDNA試料+200対照試料を含有し、58,800部分的cDNAのマイクロアレイとなった。したがって、重複性を見積もりを行い、発現されたヒト遺伝子のほぼ30-50%が表された。TD1細胞から調製されたCy3-標識cDNAおよび正常細胞からのCy5-標識cDNAのハイブリダイゼーションは、TD細胞 vs. 正常細胞の相対的RNA含有量の発現された遺伝子についての比較を可能とした。加えて、TD2細胞から調製されたCy3-標識cDNAおよび正常細胞からのCy5-標識cDNAをマイクロアレイの同一組にハイブリダイズさせて、異なるTD患者の間の遺伝子発現の変動を調べた。

【0222】

結果：データはGemToolsソフトウェア (Incyte Genomics, Palo Alto, CA) を用いて分析し、正常細胞に対するTD細胞のmRNAの比率として表した。結果は、大部分の遺伝子がTD1および正常細胞で比較的発現されることを示した。図2 (前記セクションにおける対角線の左側) に示すごとく、正常細胞と比較して175の遺伝子のみがTD1細胞において2.5倍過少発現され、他方、正常細胞と比較して375遺伝子がTD1細胞において2.5倍過剰発現された (下方であって対角線の右側) TD細胞でより高度に発現された遺伝子は、補償的応答として、または病気病理学に対する寄与として、タンジール突然変異の結果として異なって調節されるものを含む。TDの観察された表現型に寄与し、TD細胞でより高度に発現される遺伝子は、インターフェロン- β (IFN- β)、マクロファージ炎症性蛋白質-2 α 、顆粒球走化性蛋白質-2、IL-11、プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ-2 (COX-2)、トロンボスポンジンおよび単球走化性蛋白質1、3および4を含む (Lawn ら, J. Clin. Invest., 104: R25-R31 (1999))。

【0223】

正常繊維芽細胞で発現された単一RNAで、TD1またはTD2細胞いずれにおいても完全に存在しないものは見出されなかった。また、TD1およびTD2における異なって発現された遺伝子の比較により、個々のTD患者の間でほとんど変動はないことが明らかにされた。例えば、TD2細胞で最も高度に下降調節された遺伝子のうち、正常細胞と比較して92%もまたTD1細胞で過少発現された。遺伝子のうち、TD1またはTD2 vs. 正常細胞で2.5倍過少発現されたのはABC1蛋白質についての遺伝子であった。ABC1遺伝子はその相同体のいくつかの帰せられる機能のため追跡し、また、当該遺伝子がTD遺伝子領域として報告された染色体領域にほぼ位置決定されたからである。

【0224】

(実施例3)

本実施例は、ABC1遺伝子がヒト染色体9q31に位置決定されることを示す。

【0225】

従前の遺伝子連鎖分析がTD遺伝子をヒト染色体9q31の7-cM領域にマップした(Rustら, Nat. Genet., 20, 96-98(1998))。加えて、イン・サイチュハイブリダイゼーション分析により、ABC1遺伝子がより広い染色体間隔9q22-9q31に位置決定されることが明らかとされた(Lucianiら, Genomics, 21, 150-159(1994))。ヒト/ハムスター照射ハイブリッド(Research Genetics, Inc., Huntsville, AL)のGeneBridge4 パネルでのPCR方法を用い、ヒトABC1はマーカ-WI-14706およびWI-4062の間に位置すると決定され、これは、ヒト染色体9q31の7-cM領域に対応する。93ヒト/ハムスターハイブリッド細胞系からのDNAは、ヒトABC1-得意的プライマーLF:

CCTCTCATTACACAAAAACCAGAC (配列番号: 11) および
LR:

GCTTTCTTTCACTTCTCATCCTG (配列番号: 12)

を用いるPCRによって増幅した。各系はヒトABC1増幅産物につき陽性または陰性としてスコアを採り、このデータの分析から得られたABC1のマッピングは、インターネット(<http://carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/contig/fhmapper.pl>)を介してアクセスされるGenome Research SoftwareのためのWhitehead Institute/MIT Centerを用いて達成された。これらの結果は、さらに、同等の間隔からのヒトゲノム/酵母人工染色体クローン(Research Genetics, Inc.)へのサザンブロットハイブリダイゼーションによって確認された。加えて、公のデータベースサーチング(GeneMap'98; National Center for Biotechnology Information)および照射ハイブリッドマッピングは、報告された遺伝子間隔における位置からのマイクロアレイデータにおいて他の有意に過少発現された遺伝子を排除した。これらの補充的データは、ABC1遺伝子がヒト染色体9q31に位置することを示し、さらに、

A B C 1 遺伝子がタンジール病に関連することを示す。

【0226】

(実施例4)

本実施例は、フランキング領域および全コーディング領域を含めた野生型 A B C 1 遺伝子のヌクレオチド配列の決定を示す。

【0227】

DNA配列決定は、A B I P r i s m 3 1 0 遺伝子分析器を用い、またはD a v i s 配列決定 (D a v i s , C A) によって行った。両方のストランドは全体を配列決定した。正常な対象からのA B C 1 遺伝子のオープンリーディングフレームの配列は、正常繊維芽細胞RNAから構築した発現プラスミドライブラリから得られた全長cDNAクローンから決定した。プラスミドライブラリを構築するためにS t r a t a g e n e キットプロトコル (S t r a t a g e n e , L a , J o l l a , C A) にしたがってcDNAを合成した。略言すれば、5 - メチルc C T P の存在下で、X h o I 部位を持つオリゴ - b T プライマーおよびM M L V 逆転写構造を用い、第1ストランドcDNAをmRNAから合成した。未修飾d L T P の存在下で、R N a s e H およびDNAポリメラーゼIを用いて第2ストランドを合成した。cDNAをp f u DNAポリメラーゼで平滑末端とした後、E c o R I リンカーを該cDNAに連結した。次いで、該cDNAをX h o I で消化し、cDNAの3'末端にX h o I 末端を生じさせた。第1ストランド合成の間に、内部X h o I 部位をセミ - メチル化によるこの消化から保護した。合成されたcDNAをプラスミドp C E P 4 (I n v i t r o g e n C o r p . , C a r l s b a d , C A # V O 4 4 - 5 0) 、サイトメガロウイルスプロモーター / エンハンサーを含有する発現ベクターのH i n d I I I およびX h o I 部位にクローンした。5' - T C C T T G G G T T C A G G G G A T T A T C (配列番号 : 1 3) および5' - C A A T G T T T T T G T G G C T T C G G C (配列番号 : 1 4) であった既知のA B C 1 配列に基づくプライマーを用い、逆転写構造ポリメラーゼ鎖反応 (R T - P C R) によって585bp A B C 1 プローブを創製した。このA B C 1 プローブを用い、製造業者のプロトコルによるC l o n e C a p t u r e 選択キット (C L O N T E C H L

aboratories, Inc., Palo Alto, CA)を用いて、ヒトABC1 cDNAの10.5 kbインサートを含むクローンをライブラリから回収した。このクローンをpCEPhABC1として図3に示す。該10.5 kb ABC1 cDNAインサート配列は配列番号：1に示す。配列決定により、pCEPhABC1が6783ヌクレオチドのヒトABC1オープンリーディングフレーム+5'および3'非翻訳領域を含む、Langmannら in Biochem. Biophys. Res. Comm., 257, 29-33 (1999) (GenBank 受託番号AJ012376)によって報告されているcDNA配列よりも大きなオープンリーディングフレームを有することが確認された。

【0228】

(実施例5)

本実施例は、野生型ABC1遺伝子およびTD1、TD2およびTD3遺伝子配列の間の配列の差を示す。

【0229】

TD1、TD2およびTD3のcDNA合成：cDNAは、(1) sacI habcf、5'-AGTCGAGCTCCAAACATGTCAGCTGTTA CTGGAAGTGGCC (配列番号：15)； habcr3581、5'-TCTCTGGATTCTGGGTCTATGTC AG (配列番号：16)および(2) habcf3585、5'-GGGAGC CTTTGTGGAACTCTTTTC (配列番号：17)； habcrsal I、5'-ACTGGTCGACCATTTGAATTGCATTGCATTGA ATAGTATCAG (配列番号：18)と命名された、正常ヒトABC1遺伝子配列から設計されたプライマー対の2つの組を用い、製造業者のプロトコル (CLONTECH, Palo Alto, CA; Cat.#8417-1)に従い、Sueerscript Choice cDNAシステムおよび Advantage cDNAポリメラーゼミックスを用いる逆転写ポリメラーゼ鎖反応(RT-PCR)によって、TD1、TD2およびTD3細胞から調製した。0.4 μMの最終濃度のこれらのプライマーでの0.2-0.5 μgポリA

+RNAの増幅により、ほぼ3.5 kbの2つの重複する鋳型が生じた。QIAGEN EX IIシステム(QIAGEN, Inc., Valencia, CA; Cat. #20021)を用いて該鋳型をゲル-精製し、100 ng/μlの濃度に調整した。

【0230】

TD1、TD2およびTD3 cDNAの配列決定：前記したごとく創製された8 μlの各鋳型を、0.5 μMの最終濃度の野生型ABC1配列に基づいて設計された個々の配列決定プライマーでの反応で配列決定した。プライマーは以下のとおりであった：1F：5' - TTTCTGTGGTGGACAATGAA (配列番号：19)；2F：5' - AGTGACATGCGACAGGAG (配列番号：20)；3F：5' - GATCTGGAAGGCATGTGG (配列番号：21)；4F：5' - CCAGGCAGCATTGAGCTG (配列番号：22)；5F：5' - GGCCTGGACAACAGCATA (配列番号：23)；6F：5' - GGACAACCTGTTTGAGAGT (配列番号：24)；7F：5' - AAGACGACCACCATGTCA (配列番号：25)；8F：5' - ATATGGGAGCTGCTGCTG (配列番号：26)；9F：5' - GGGCATGAGCTGACCTATGTGCTG (配列番号：27)；10F：5' - AAGAGACTGCTAATTGCC (配列番号：28)；11F：5' - AGCGACAAAATCAAGAAG (配列番号：29)；12F：5' - TGGCATGCAATCAGCTCT (配列番号：30)；13F：5' - TCCTCCACCAATCTGCCT (配列番号：31)；14F：5' - TTCTTCCTCATTACTGTT (配列番号：32)；15F：5' - GATGCCATCACAGAGCTG (配列番号：33)；16F：5' - AGTGTCCAGCATCTAAA (配列番号：34)；1R：5' - CAAAGTTCACAAATACTT (配列番号：35)；2R：5' - CTTAGGGCACAATTCCACA (配列番号：36)；3R：5' - TGAAAGTTGATGATTTTC (配列番号：37)；4R：5' - TTTTTCACCATGTCGATGA (配列番号：38)；5R：5' - CTCCACTGATGAAGTGC (配列番号：39)；6R：5' - GTTTCCTTCATTT

G T T T G A (配列番号：40) ; 7 R : 5' - A G G G C G T G T C T G G G
 A T T G (配列番号：41) ; 8 R : 5' - C A G A A T C A T T T T G G A T C
 A G (配列番号：42) ; 9 R : 5' - C A T C A G A A C T G C T C T G A G
 (配列番号：43) ; 10 R : 5' - A G C T G G C T T G T T T T G C T T T
 (配列番号：44)、11 R : 5' - T G G A C A C G C C C A G C T T C A (配列番号：45)、
 12 R : 5' - C C T G C C A T G C C A C A C A C A (配列番号：46)、
 13 R : 5' - C T C A T C A C C C G C A G A A A G (配列番号：47)、
 14 R : 5' - C A C A C T C C A T G A A G C G A C (配列番号：48)、
 15 R : 5' - T C C A G A T A A T G C G G G A A A (配列番号：49)、
 16 R : 5' - T C A G G A T T G G C T T C A G G A (配列番号：50)、
 UTR1 R : 5' - A A G T T T G A G C T G G A T T T C T T G (配列番号：51)。

【0231】

結果：ヌクレオチドナンバリングはLawnら(1999)に見出されるナンバリングにしたがう。患者TD1は全長オープンリーディングフレームを保有し、野生型配列とは2つの実質的差異がある(配列番号：8)。これらのうち1つはAからGへの置換であり、その結果、Lawnら(1999)によって公表されているごとく、2201アミノ酸配列の位置537においてグルタミンからアルギニン残基への変化がもたらされる。この残基の位置は、第1の予測される膜貫通ドメインの近くの、NH₂-末端親水性ドメイン内にある。また、患者TD2はオープンリーディングフレームを保有し、残基527においてアルギニンからトリプトファンへの置換がある(配列番号：10)。かくして、TD1およびTD2は共に蛋白質の同一領域においてアミノ酸の電荷を変化させる置換を含む。TD3 DNAは、ひとつの対立遺伝子においてヌクレオチド5697に続くそのABC1 cDNA中に14ヌクレオチド挿入を含み、他の対立遺伝子においてヌクレオチド5062後に138bp挿入を含む。

【0232】

TD1、TD2およびTD3のDNAのゲノム配列決定は、各cDNAで見出された変化を確認した。TD1およびTD2からのcDNAで見出された突然変

異を含む繊維芽細胞から単離されたゲノムDNAの156bp領域のPCR増幅によって、ゲノム配列が創製された。ゲノム配列決定は、また、患者TD1がグルタミンからアルギニン置換につきホモ接合であることを示した。ゲノムDNA分析は、TD2が、検出された置換を含む1つの対立遺伝子および未決定の欠陥を含む（検出可能なmRNAを生産できない）第2の対立遺伝子に関し化合物ヘテロ接合であることを示した。非-TD個体のゲノムDNAの80を超える対立遺伝子において、置換突然変異は見出されなかった。TD3挿入は配列分析によって同定され、挿入点を囲うプライマーを用いるRT-PCRによって確認された。ヌクレオチド5697に続く14-bp挿入はフレームシフトを引き起こし、その結果、第2のATP結合ドメイン前の位置から、未成熟蛋白質終止の点までの、野生型アミノ酸配列の置換がもたらされた。他の対立遺伝子におけるヌクレオチド5062に続く138bp挿入はインフレーム停止コドンを含む。

【0233】

（実施例6）

本実施例は、ABC1輸送活性の阻害剤が繊維芽細胞からのアポA-I-媒介コレステロール流出を阻害することを示す。

【0234】

ABC1の阻害がアポリポ蛋白質-媒介コレステロール流出のプロセスに影響し得るか否かをテストするために、ABC1阻害剤であると報告された2つの化合物をアッセイでテストし、アポリポ蛋白質媒介コレステロール流出をモニターした。化合物4、4-ジイソチオシアノスチルベン-2、2'-ジスルホン酸（DIDS）およびスルホプロモフタレイン（BSP）は、用量依存的にABC1のアニオン輸送活性を阻害すると報告されている（Beckら，J.Biol.Chem.，272：2695-2699（1997）；Hamonら，Blood，90：2911-2915（1997））。アポリポ蛋白質-媒介コレステロール流出アッセイは、示された変化を施して実施例1に記載されているごとく行った。コレステロール-負荷および $[^3\text{H}]$ コレステロール-標識正常繊維芽細胞（ $n=3$ ）を、 $5\mu\text{g/ml}$ アポA-Iおよび0、0.2mMまたは0.4mM DIDSと共にまたはそれなくして6時間インキュベートし

た。加えて、コレステロール - 負荷および [^3H] コレステロール - 標識正常繊維芽細胞 ($n = 3$) を、 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ アポ A - I および 0.02 mM または 0.4 mM B S P と共にまたはそれなくして 6 時間インキュベートした [^3H] コレステロール流出は実施例 1 に記載されたシンチレーションカウンティングによって測定し、培地中に出現する全放射性標識コレステロールのパーセンテージとして計算した。結果は、アポ A - I - フリー培地についての値を差し引いた後におけるアポ A - I の存在下での流出の平均 $\pm$ S D ($n = 3$) として図 5 に示す。図 5 は、D I D S および B S P が共にアポリポ蛋白質 A - I によって媒介されるトリチウム化コレステロールの 6 時間流出を阻害することを示す。加えて、D I D S および B S P を用いるトリチウム化ホスファチジルコリンの流出で同様の阻害が観察された (データは示さず)。これらのテストの結果は、実施例 1 に記載された、T D を持つ患者に由来する繊維芽細胞における流出欠陥と似ている。

【0235】

(実施例 7)

本実施例は、A B C 1 mRNA 発現のアンチセンス阻害が繊維芽細胞からのアポ A - I - 媒介コレステロール流出を阻害することを示す。

【0236】

正常皮膚繊維芽細胞を実施例 1 に記載したごとく [^3H] コレステロールで標識した。次いで、 $30\text{ }\mu\text{M}$ 対照モルホリノオリゴヌクレオチド (β - グロビンサラセミア mRNA のアンチセンス相補体に対応する $5' - \text{CCTCTTACCTCAGTTACAAATTTATA} - 3'$; 配列番号: 52) または $30\text{ }\mu\text{M}$ A B C 1 アンチセンスモルホリノオリゴヌクレオチド ($5' - \text{CATGTTTGTT CATAGGGTGGGTAGCTC} - 3'$; 配列番号: 53) いずれかの存在下で掻き、新しい皿の上に再度接種することによって、細胞にオリゴヌクレオチドを負荷した。オリゴヌクレオチドの不存在下で掻き、再度接種することによって、対照細胞を [^3H] コレステロール - 標識後にモック - 負荷した。培地中に出現する全放射性標識コレステロールのパーセンテージとしてのシンチレーションカウンティングによって、12 時間後に、アポ A - I - 媒介流出を測定した。結果は、各実験においてオリゴヌクレオチドの不存在下でのアポ A - I - 特異的

流出についての値に対して正規化した、3つの独立した実験の平均 $\pm$ SEMとして図6に示す。図6に示すごとく、ABC1 mRNAに対して向けられたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、対照アンチセンスオリゴヌクレオチド(β -グロビンアンチセンスオリゴヌクレオチド)と比較して、正常繊維芽細胞からのコレステロール流出の50%低下を引き起こした。

【0237】

(実施例8)

本実施例は、ヒトABC1遺伝子の過剰発現の結果、単球細胞からのアポA-I-媒介コレステロール流出の増加がもたらされることを示す。

【0238】

RAW264.7細胞の安定なトランスフェクション：マウス単球RAW264.7細胞を、ヒトABC1についてのpCEPhABC1発現プラスミドで安定にトランスフェクトした。ヒトABC1のオープンリーディングフレームを含有するpCEPhABC1プラスミドの構築を実施例4に記載する。0.8ml無血清DMEM中の2 μ gのpCEPhABC1 DNAおよび12 μ lのGENEPORTERトランスフェクション試薬(Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA; CAT.#T201007)で、ほぼ 1×10^6 RAW264.7細胞を5時間トランスフェクトした。2日後、細胞を1:2 - 1:50の範囲の比率で分け、培養培地に150 μ g/mlヒグロマイシンを添加することによって選択を適用した。2週間後、ヒグロマイシン-抵抗性コロニーを拾い、増殖させた。

【0239】

アポA-I-媒介コレステロール流出アッセイ：親RAW264.7細胞およびヒトABC1を安定に発現する3つのクローン系(L3、L5およびL6)を密集するまで増殖させた。細胞をコレステロール-負荷し、実施例1に記載したごとく、0.5 μ Ci(ml)[3 H]コレステロールおよび50 μ g/mlアセチル化LDLでの24時間のインキュベーションによって標識した。DMEM/BSA中での一晩のインキュベーションによるコレステロールプールの平衡の後、細胞を洗浄し、実施例1に記載したごとく流出培地を添加した。細胞培地中

でのトリチウム化コレステロールのシンチレーションカウンティングによって、アポA - I - 媒介コレステロール流出を前記したごとく測定し、細胞および培地から回収された全カウントのパーセンテージとして表した。結果は、各実験内で親RAW264.7細胞からのアポA - I - 特異的流出についての値に対して正規化した3つの別々の実験の平均 $\pm$ SEMとして表す。図7は、親RAW264.7細胞およびL3、L5およびL6トランスフェクト細胞系からのアポA - I - 媒介コレステロール流出を示す。理解されるごとく、ABC1発現ベクターでのトランスフェクションの結果、アポA - I - 媒介コレステロール流出が4倍(L6)ないし6倍(L3およびL5)増加する。これらの結果は、ABC1遺伝子の過剰発現はマクロファージ細胞からのコレステロール流出の量を実質的に増加させることができるのを示す。

【0240】

(実施例9)

本実施例は、ABC1 mRNAの発現が、正常皮膚繊維芽細胞においてコレステロール流出に関連する細胞状態によって調節されるが、TD繊維芽細胞では調節されないことを示す。

【0241】

ABC1が細胞ステロール流出において律速的役割を演じるか否かを判断するために、コレステロール流出プロセスに関連する種々の細胞条件下でABC1の合成を測定した。具体的には、正常繊維芽細胞およびTD繊維芽細胞を過剰のcAMP、コレステロールまたはアポA - Iの条件に個々に暴露した。正常皮膚繊維芽細胞およびTD1およびTD2繊維芽細胞の細胞培養は実施例1に記載したごとく調製した。ABC1 mRNAのレベルはRT-PCRによって測定した。

【0242】

細胞培養：正常皮膚繊維芽細胞およびTD1およびTD2繊維芽細胞の不滅化細胞培養は実施例1に記載したごとく調製した。DMEM/BSAおよび示した添加剤での置換前に細胞をDMEM/10%FBS中で24または48時間密集下まで増殖させた。RNAは実施例2に記載したごとく調製した。

【0243】

RT-PCR: 定量的PCRは、GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて行った。略言すれば、500 ngのDNase-処理mRNAを2.5 μ のランダムヘキサマープライマーを用いて逆転写した。SYBR緑色コアキット (PE Applied Biosystems, Foster City, CA; #4304886) ならびにヒトABC1プライマーLF: 5' - CCTCTCATTTACACAAAAACCAGAC (配列番号: 11) およびLR: 5' - GCTTTTCTTTTCACTTCTCATCCTG (配列番号: 12) を用いるPCRによって、この反応のほぼ5%を増幅して、ヒトABC1のヌクレオチド7018 - 7099に対応する82 bp断片を得た。PCRサイクル条件は以下のとおりであった: 95 °Cにおける10分間; 続いて95 °C、15秒間の40サイクルおよび60秒間の60 °C。各PCRサイクルの間に生じた二本鎖増幅産物へのSYBR緑色結合によって引き起こされた蛍光の増加を検出することによって、各試料中のmRNAを定量した。全ての試料は三連で実行し、 β -アクチンmRNAに対して正規化し、プライマーアクチンF: 5' - TCACCCACACTGTGCCATCTACGA (配列番号: 54) およびアクチンB: 5' - CAGCGGAACCGCTCATTTGCCAATGG (配列番号: 55) での平行反応で増幅した。標準曲線は同一PCRプレート上でABC1および β -アクチン双方について作成した。

【0244】

8-Br-cAMPアッセイ: 正常、TD1およびTD2繊維芽細胞をDMEM/10% FBS中で密集下まで増殖させ、次いで、DMEM/BSA中の1 mMの8-Br-cAMPで24時間処理した。

【0245】

コレステロールアッセイ: 正常、TD1およびTD2繊維芽細胞をDMEM/10% FBS中で密集下まで増殖させ、次いで、DMEM/BSA中の30 μ g/ml 遊離コレステロールで48時間処理し、続いてDMEM/BSA中で18

- 24時間平衡化した。

【0246】

アポA - Iアッセイ：正常、TD1およびTD2繊維芽細胞をDMEM / 10% FBS中で密集下まで増殖させ、次いで、DMEM / BSA中の30 μ g / ml遊離コレステロールで48時間処理し、続いてDMEM / BSA + 10 μ / mlアポA - I中で18 - 24時間平衡化した。

【0247】

結果：図8は、正常繊維芽細胞においては、ABC1 mRNAは8 - Br - cAMPへの暴露によってほぼ10倍増加し、無血清培地中のコレステロールへの暴露によってほぼ17倍増加することを示す。コレステロール - 負荷細胞のアポA - Iへの引き続いての暴露の結果、ABC1 mRNA発現が顕著に減少する。メカニズムは示されていないが、従前の研究は、コレステロール流出はcAMPおよびコレステロールのごとき化合物の存在下で促進されることを示している(Hoklandら, J. Biol. Chem., 268:25343 - 25349 (1993))。本結果は、正常繊維芽細胞においては、ABC1 mRNAはコレステロール流出経路のこれらの既知のエフェクターによって誘導され、アポリポ蛋白質コレステロール受容体への暴露によって抑制されることを示し、これは、ABC1の発現がアポリポ蛋白質 - 媒介コレステロール流出に関連する細胞条件によって調節されることを示す。対照的に、TD患者からの繊維芽細胞はコレステロール流出のエフェクターによって調製されない。まず、TD1およびTD2細胞双方におけるABC1 mRNAのcAMP - 誘導レベルは正常細胞のそのほぼ40%に過ぎない。さらに、コレステロール - 負荷細胞のアポA - Iへの暴露はABC1発現を変化させず(TD1細胞)またはABC1発現をわずかに増加させた(TD2細胞)。これらの結果は、TD細胞について記載されたアポ - A - I媒介コレステロール流出における欠陥を反映する。興味深いことには、血清含有培地中での細胞の増殖は、ABC1メッセージを検出限界近くまで抑制した(データは示さず)。これは、脂質流出経路の機能は細胞休止または低下したコレステロール必要性の他の細胞状態を必要とするという事実を反映し得る。結論において、細胞コレステロールの増加した流出に関連する条

件（すなわち、コレステロール負荷、cAMP処理、血清枯渇）の結果、正常繊維芽細胞においてABC1 mRNAの発現が増加する。逆に、コレステロール - 負荷正常繊維芽細胞のアポA - Iへの暴露はABC1発現を低下させる。

【0248】

（実施例10）

本実施例は、20 - ヒドロキシコレステロールのごときLXR核受容体に対するリガンド、および9 - シスレチノイン酸のごときRXR受容体に対するリガンドがマウスRAW264.7細胞においてABC1遺伝子発現を増加させることができるのを示す。

【0249】

LXR核受容体は核受容体RXRを持つ絶対ヘテロダイマーを形成する転写因子であり、これは、22 - ヒドロキシコレステロールおよび20 - ヒドロキシコレステロールを含めたオキシステロールのクラスに結合することによって、活性化されてその標的遺伝子の転写を増強する（Janowskiら, Nature, 383:728-731(1996)）。それ自体、それらはコレステロール - 誘導遺伝子転写の媒介についての候補である。さらに、ABC1 mRNAおよび蛋白質がコレステロール負荷に応答して繊維芽細胞およびマクロファージで増加することを示した実験、およびLXRおよびRXR発現が酸化されたLDLへの暴露によってコレステロール - 負荷マクロファージ細胞で増加することを示した他の実験に徴すると、LXRおよびRXR核レポーターは、ABC1遺伝子の転写アクチベータについてのかかなり可能性のある候補である。LXRおよびRXRレポーターがABC1遺伝子発現で役割を演じるか否かを判断するために、ABC1 mRNAのレベルを、20 - ヒドロキシコレステロールおよび9 - シスレチノイン酸に応答して測定した。

【0250】

マウスRAW264.7細胞をDMEM/10%FBS中で密集下まで増殖させ、次いで、9 - シスレチノイン酸（10 μM）、20 - ヒドロキシコレステロール（10 μM）または双方のいっしょにしたリガンド（20 μM合計）を含む無血清DMEM/BSA中で24時間処理した。対照細胞はエタノールビヒクル

のみを摂取した(0.1% v/v)。RNAを抽出しDNaseで処理し、実施例9に記載したごとくPE Biosystems SYBR Green Technologyを用いるRT-PCRによってABC1 mRNAを測定した。図9は、20-ヒドロキシコレステロールまたは9-シスレチノイン酸いずれかでの処理の結果、ABC1 mRNA発現が増加することを示す。加えて、実施例9はいっしょにした双方のリガンドでの処理の結果、顕著な相乗的効果をもたらされ、いずれかのリガンド単独で観察されたABC1発現に対しほぼ6倍増加することを示す。これらの結果は核受容体LXRおよびRXRに対するリガンドがABC1遺伝子の発現を増加させることができるのを示す。

【0251】

(実施例11)

本実施例は、原形質膜におけるABC1蛋白質の増強された発現は脂質流出に関連することを示す。

【0252】

細胞 - 表面標識および免疫沈殿を用いて、原形質膜中でのABC1蛋白質の増加した発現がコレステロール流出の増加と相関するか否かを判断した(図10)。細胞表面のABC1の相対的量は、無傷細胞上の表面蛋白質を膜不浸透性剤スルホ-NHS-ビオチンで架橋させ、続いて、膜可溶化、ABC1抗体での免疫沈殿、SDS-PAGEおよびストレプトアビジンでの検出での工程によって測定した。

【0253】

細胞培養：正常およびTD1繊維芽細胞を実施例1に記載したごとく不滅化した。正常およびTD1細胞双方を制御条件およびアポリポ蛋白質-媒介コレステロール流出を増加させることが知られている条件(Oramら, J. Lip. Res., 40:1769-1781(1999))下で培養した。対照細胞をDMEM/10%FBS中で密集するまで増殖させ、次いで、添加物なくしてDMEM/BSA中で18時間インキュベートした(対照)。cAMP-処理細胞をDMEM/10%FBS中で密集するまで増殖させ、次いで、1mMの8-Br-cAMPを含むDMEM/BSA中で18時間インキュベートした(c

AMP)。コレステロール - 負荷細胞をDMEM / 10% FBS中で密集するまで増殖させ、次いで、30 μ g / ml コレステロールを含むDMEM / BSA中で48時間、および添加物なしで18時間インキュベートした(コレステロール)。cAMPで処理したコレステロール - 負荷細胞をDMEM / 10%中で密集するまで増殖させ、次いで、30 μ g / ml コレステロールを含むDMEM / BSA中で48時間、および1 mMの8 - Br - cAMPを含むので18時間インキュベートした(コレステロール + cAMP)。

【0254】

細胞 - 表面標識：原形質膜ABC1の選択的標識のために、1 mg / ml スルホ - nhS - ビオチン(30 μ g / ml コレステロールを含む(Pierce, Rockford, IL; Cat. # 21217))を含有する9 で30分間ビオチン化した(Walkerら, Biochemistry, 50:14009-14014(1993))参照。

【0255】

免疫沈殿：ヒトABC1のC - 末端に位置した推定ペプチドKNQTVVD AVLTSFLQDEKVKE Sに対応する合成ペプチドに対してABC1についてのウサギ抗血清を生起させた。1%トリトンX - 100(Sigm, St. Louis, MO)およびプロテアーゼ阻害剤ロイペプチン(1 mM)、およびペプスタチン(1 mM)、およびアプロチニン(1 mM)を含有するPBS中で細胞を可溶化することによって、免疫沈殿を行った。細胞抽出物を1:200希釈にて抗 - ABC1抗血清で細胞抽出物を4 にて一晩インキュベートし、5 μ lのプロテインA - 被覆磁性ビーズ(Dynal, Lake Success, NY; Cat. # 1001.01)と共にさらに1時間インキュベートした。抗体 - 抗原複合体を磁石で沈降させ、ビーズを1%トリトン - X / PBSで2回洗浄し、蛋白質を酢酸で1%溶出させた。

【0256】

ABC1蛋白質の検出：溶出したビオチン化蛋白質をSDS - PAGE(6%ゲル; 150 V、5時間)に付し、ニトロセルロース膜(200 mA、18時間)に移した。該ニトロセルロースをストレプトアビジン - ホースラディッシュペ

ルオキシダーゼ (Amersham Pharmacia Piscataway, NJ; Cat. #RPN1231) でプローブし、300倍希釈し、販売業者のプロトコル (Amersham Piscataway, Piscataway, NJ) に従って増強された化学ルミネセンス標識 (ECL) によって検出した。細胞内蛋白質の可能なビオチン化につきテストするために、免疫沈殿後上清を細胞内蛋白質 β -COP に対するマウスモノクローナル抗体で処理し、免疫沈殿したビオチン化 β -COP をストレプトアビジンブロッキングによってアッセイした。何も検出されなかった。

【0257】

結果：図10に示めごとく、240 kDa の ABC 1 蛋白質がダブレットとして出現する。正常 (10A) および TD 1 (10B) 双方において、ABC 1 蛋白質は原形質膜に部分的に局所化される。同様の結果が、第2の正常繊維芽細胞系で、および TD 2 繊維芽細胞で観察された (データは示さず)。ABC 1 の細胞 - 表面発現は、血清中で増殖させた細胞 (正常および TD 1 細胞) を 8 - Br - cAMP で処理した場合にわずかに増加した。正常および TD 1 細胞双方の血清枯渇およびコレステロール - 負荷は ABC 1 の細胞 - 表面発現を顕著に増加させ、これは cAMP 処理によってさらに増強された。これらの結果は、細胞表面における ABC 1 の発現が、アポリポ蛋白質 - 媒介脂質流出を増強する条件によって調節され、これは原形質膜へのその局所化がその脂質輸送機能において鍵となる役割を果たすという考えに合致することを示す。TD 1 および TD 2 細胞における突然変異は、ABC 1 の発現またはプロセッシングをひどくは損なわないようであり、これは、脂質輸送またはアクセサリー蛋白質との相互作用に対する二次効果がその NH₂ 末端ドメイン (ここで突然変異が起こる) に依存することを示唆する。

【0258】

(実施例 12)

本実施例は、ホスホジエステラーゼ阻害剤のごとき 3'、5' 環状 AMP の分解を阻害する剤がマクロファージ細胞からのアポリポ蛋白質 A - I - 媒介流出を増加させることを示す。

【0259】

図10に示すごとく、cAMPはABC1の活性を増加させる。本実験は、上昇したcAMPの存在下でマクロファージ細胞からのコレステロール流出を測定するために行った。上昇したレベルのcAMPは、cAMP合成を刺激するか、またはcAMPの分解を阻害する剤の存在下で達成することができる。例えば、ロリブラムは、ホスホジエステラーゼ(cAMPを分解する一群の酵素)を阻害することによってcAMPレベルを調節する化合物である。コレステロール流出に対する上昇したcAMPの効果は、実施例1に記載されたアポリポ蛋白質-媒介コレステロール流出アッセイを用いて測定した。略言すれば、 1.25×10^5 細胞/mlの密度で懸濁させたRAW264.7細胞を、ピルベートを補足したDMEM/10%FBS中で増殖させた。24時間後、培地を取り出し、DMEM/BSA+放射性標識コレステロール($1 \mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-コレステロール)および $50 \mu\text{g/ml}$ のアセチル化LDLで24時間で置き換えた。次いで、DMEM/BSA+アポA-I単独($20 \mu\text{g/ml}$)、アポA-Iおよび8-プロモ3'、5'-cAMP(1mM)またはアポA-Iおよびロリブラム($50 \mu\text{M}$)いずれかよりなる平衡培地中で細胞を24時間維持した。12-24時間後、実施例1に記載したごとくシンチレーションカウンティングによって [^3H] コレステロール流出を測定し、培地に出現する全放射性標識コレステロールのパーセンテージとして計算した。結果は、アポA-Iを摂取しなかったコレステロール-負荷対照細胞は3%コレステロール流出を示し、他方、アポA-Iのみを摂取した細胞は5%流出を示すことを示した。アポA-IおよびcAMPを摂取したコレステロール-負荷細胞は32%コレステロール流出を示し、これは上昇したcAMPがコレステロール流出を促進することを示す。同様に、アポA-Iおよびホスホジエステラーゼ阻害剤(ロリブラム)を摂取した細胞は17%コレステロール流出を示した。

【0260】

(実施例13)

本実施例は、LXR、RXRおよびPARR核受容体のごとき核受容体に対するリガンドである剤がマクロファージ細胞からのアポリポ蛋白質A-I-媒介流

出を増加させることを示す。

【0261】

核受容体に対するリガンドがアポリポ蛋白質 - 媒介コレステロール流出に影響するか否かを判断するために、実施例12に記載したアポA - I - 媒介コレステロール流出アッセイを用いて種々のリガンドをテストした。核受容体スーパーファミリーは、脂質代謝に関係づけられてきた (Russell, D.W., Cell, 97:539-542 (1999); Spiegelman, B.W., Cell, 93:153-155 (1998); Janowski et al., Nature, 383:728-731 (1996)) 肝臓受容体LXR、レチノイド受容体RXRおよびペルオキシソームプロリフェレーター - 媒介受容体PPARのごときいくつかのメンバーを含む。さらに、これらの受容体をいくつかに対するリガンドは血漿HDLを増加させることが観察されており、遺伝子発現プロファイリング (マイクロアレイ) データは、ホルモン受容体に参加されたLDLを介してコレステロール負荷に応答することを示した。前記したアッセイを用い、9シス - レチノイン酸 (RXRリガンド)、オキシステロール (LXRリガンド) およびフェンフィブレート (PPARリガンド) をテストして、コレステロール流出に対する効果を測定した。アポA - Iを摂取しなかったコレステロール - 負荷対照細胞は3%コレステロール流出を示し、他方、アポA - Iのみを摂取した細胞は5%流出を示した。対照的に、アポA - Iおよび9シス - レチノイン酸 (30 ng/ml) を摂取したコレステロール - 負荷細胞は16%コレステロール流出を示した。アポA - Iおよびオキシステロール (5 µg/ml) を受容する細胞は14%コレステロール流出を示した。アポA - Iおよびフェンフィブレート (3 µg/ml) を摂取した細胞は10%コレステロール流出を示した。これらの結果は、ホルモン受容体を変調して、マクロファージからのアポリポ蛋白質 - 媒介コレステロール流出の速度を増加させることができるのを示す。

【0262】

さらに、種々の濃度の9 - シス - RA (0.3 ng/ml、3.0 ng/ml または30 ng/ml) を用いて流出アッセイを行うと、結果は、9 - シス - R

Aが用量依存的にマクロファージからのコレステロール流出を媒介することを示した。具体的には、対照細胞（アポA - Iのみ）は1890 c . p . m . を示し、0 . 3 n g / m l の9 - シス - R A は1522 c . p . m . を示し、3 . 0 n g / m l の9 - シス - R A は3568 c . p . m . を示し、および30 n g / m l の9 - シス - R A は8597 c . p . m . を示した。加えて、RAW264 . 7細胞を48時間コレステロール - 負荷させる同様のアッセイを用い、22 - ヒドロキシコレステロール（LXRリガンド）およびベンズフィブレートのごとき他の核受容体アクチベータはコレステロール流出を増加させることが示された（データは示さず）。

【0263】

（実施例14）

本実施例は、プロスタグランジンE1およびプロスタグランジンPG12のごときエイコサノイドがマクロファージ細胞からのアポリポ蛋白質A - I - 媒介流出を増加させることを示す。

【0264】

プロスタグランジンおよびプロスタサイクリンのごときエイコサノイドは、高コレステロール血症の治療で効果的であることが示されている。エイコサノイドがアポリポ蛋白質 - 媒介流出に影響するか否かを判断するために、実施例12に記載されたアポA - I - 媒介コレステロール流出アッセイを用いてPEG1およびPG12をテストした。このアッセイは、アポA - Iを摂取したコレステロール - 負荷対照細胞は3%コレステロール流出を有し、アポA - Iのみを摂取した細胞は5%流出を有することを示した。アポA - IおよびPG12（25 nM）を摂取したコレステロール - 負荷細胞は10%コレステロール流出を示した。アポA - IおよびPEG1（25 nM）を摂取した細胞は15%コレステロール流出を示した。これらの結果は、エイコサノイドがマクロファージからのアポリポ蛋白質 - 媒介コレステロール流出の速度を増加させることができるを示す。

【0265】

（実施例15）

本実施例は、ABC1プロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子を用いて

、ABC1遺伝子発現を調節する能力につき化合物をテストすることができるの
を示す。

【0266】

pGL3レシフェラーゼレポーターベクターシステム (Promega, Madison, WI) を用いて、組換えプラスミドを創製し、ABC1プロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子発現を測定した。

【0267】

レポータープラスミドの構築：プロモーターなしのルシフェラーゼ遺伝子を含む対照プラスミドとして、プラスミドpGL3-Basic (Promega, Madison, WI; Cat. #E1751) を用いた。ABC1プロモーターおよびルシフェラーゼ遺伝子を含むレポーターは、ABC1遺伝子 (hAPR1 5' プロモーター、配列番号：3のヌクレオチド1080-1643に対応) の5' フランキング領域からのゲノム断片をGL3-BasicプラスミドのSacI部位にクローンして、プラスミドGL-6aを得ることによって作成した。つぎに、プラスミドGL-6aをSpeIおよびAcc651で消化した。配列番号：3のヌクレオチド1-1542に対応するABC1ゲノム配列を表す、ラムダサブクローンから切り出したBsiWI-SpeI断片を、この消化によって生じた残りのベクター：ABC1プロモーターに連結した。得られたプラスミドpAPR1は、ヒトABC1プロモーター配列の1.75kbの転写制御下にあるルシフェラーゼレポーター遺伝子をコードする。

【0268】

レポーター構築体のトランスフェクション：前記対照またはpAPR1プラスミドを、10%胎児ウシ血清を含むDMEM中に維持したRAW246.7細胞の密集培養にトランスフェクトした。12ウェル皿の各ウェルを、pGL3-Basic、pGL3-プロモーターまたはpAPR1 DNA (1 µg)、ルシフェラーゼプラスミドDNA (1 µg) および12 µlのGeneporter試薬 (Gene Therapy Systems, San Diego, CA; Cat. #T201007) いずれかで5時間トランスフェクトした。加えて、0.1 µgのpGMVβプラスミドDNA (Clontech, P

alo Alto, CA, Cat. #6177-1) を、トランスフェクション効率のための対照として添加した。5 時間後、培養培地を、アセチル化LDL ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) の存在下または不存在下で無血清DMEM/BSAで置き換え、24 時間インキュベートした。

【0269】

高スループットスクリーニングにおける負荷された便宜のために、培養された細胞を、以下の手法を用いレポータープラスミドで安定にトランスフェクトすることができる。まず、 $50 \mu\text{l}$ の Geneporter トランスフェクション試薬 (Gene Therapy Stratagene, San Diego, CA) を含む 10 ml の無血清DMEM中、 5×10^6 RAW264.7 細胞を、 $9 \mu\text{l}$ の pMPR1 プラスミドおよび pCMVscript (Stratagene, La Jolla, CA) で 60 mm 皿中で 5 時間トランスフェクトする。引き続き、トランスフェクション培地を完全培地で置き換え、細胞を 37

にて一晩インキュベートする。引き続き、1:5 ないし 1:1000 の範囲の希釈にて細胞を別々の皿に移し、 $800 \mu\text{g}/\text{ml}$ の G418 (Life Technologies, Bethesda, MD) を含有する選択培地中で 20 日間インキュベートする。目に見えるコロニーを拾い、増殖させ、後記するごとくルシフェラーゼ活性につきアッセイした。この方法を用い、ルシフェラーゼ活性につき陽性の 5 つのクローン細胞系が、高スループットアッセイで用いるために同定された。

【0270】

ルシフェラーゼアッセイ：トランスフェクションに続き、各ウエル中の細胞を $70 \mu\text{l}$ の 1X 細胞溶解試薬 8 Promega, Madison, WI, Cat. #E3971) 中で溶解させ、凍結 - 解凍の 1 サイクルに付し、溶解物を $12,000 \text{ g}$ において 5 分間の遠心によって除去した。遠心後に、 $100 \mu\text{l}$ のルシフェラーゼアッセイ試薬 (Promega, Madison, WI, Cat. #E1501) を $10 \mu\text{l}$ の溶解物に添加した。各溶解物のルシフェラーゼ活性を、ルミノメータを用いて光単位として測定した。加えて、製造業者の指示 (Tropix Inc., Bedford, MA: Cat. #BL100

G) に従い、Galacto - 光キット中に供給された化学ルミネセントアッセイ試薬を用いて、各溶解物の β - ガラクトシラーゼを測定した。ルシフェラーゼ活性値を測定された β - ガラクトシラーゼ値で割ることによって、各溶解物についての正規化されたルシフェラーゼ活性を決定し、相対的光単位として報告する。

【0271】

結果：pAPR1でトランスフェクトされた細胞で検出されたルシフェラーゼ活性は、ルシフェラーゼcDNAのみを含有するpGL3 - Basicプラスミドでトランスフェクトされた対照細胞で検出された活性よりも3.3倍高かった。これらの結果は、ABC1の転写調節領域が所定の位置にあることを示した。pAPR1でトランスフェクトした細胞を100 μ g/mlアセチルLDLとともに24時間インキュベートすると、ルシフェラーゼ活性はアセチルLDLで処理されていない細胞におけるよりも3.25倍高かった。これらの結果は、ゲノムABC1配列が、天然ABC1遺伝子のコレステロール負荷応答を媒介する5'フランキング領域で見出される「コレステロール応答性」エレメントを含有することを示唆する。このレポーター系は、他の化合物をテストして化合物がABC1発現を変調するか否かを決定するのに用いることができる。

【0272】

(実施例16)

本実施例は、内因性ABC1プロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子を用い、ABC1遺伝子発現を調節する能力につき化合物をテストするのに用いることができるさらなるアッセイを示す。

【0273】

このアッセイは、プロモーター無しのレポーター遺伝子および選択マーカー遺伝子を含有する組換えベクターを構築することを含む。該ベクターを線状化し、レポーター遺伝子が内因性ABC1プロモーターの下流の細胞ゲノムに組み込まれるように細胞にトランスフェクトする。このアッセイを用い、レポーター遺伝子の発現は、テスト化合物に応答して内因性ABC1プロモーターによって駆動される。

【0274】

レポータープラスミドの構築：プロモーターなしのレポーター遺伝子を含有する組換えベクターは、（ABC1開始部位を含む）エクソン0およびイントロン1の部分を含むABC1の7 kb EcoRIゲノム断片で出発して作成することができる。部位特異的突然変異誘発を用い、2つの既知の開始部位の上流のエクソン0配列に、SalI制限部位を生じさせることができる。組換えベクターは、ルシフェラーゼのごときプロモーター無しのレポーター遺伝子、およびピューロマイシン抵抗性のごときプロモーター無しの選択マーカーを含むDNA断片をSalI部位に挿入することによって生じさせる。内部リボソームエントリグナルは、遺伝子が正しい向きに転写されるようにレポーター遺伝子およびマーカー遺伝子の間に挿入すべきである。組換えベクターは2つのEco47III部位を含有し、そのうちの1つは、例えば、部位 - 特異的突然変異誘発を用いて排除されなければならない。エクソン0の上流に位置した残りのEco47III部位を用いてベクターを線状化する。

【0275】

レポーター構築体のトランスフェクション：レポーター遺伝子およびマーカー遺伝子を含有する線状化組換えベクターを、当該分野で知られた種々のトランスフェクション方法のいずれかによって、ヒト細胞を含めた培養細胞に導入する。例えば、実施例15に記載された方法を用い、線状化ベクターをトランスフェクトすることができる。線状化組換えベクターは、ベクターが内因性ABC1遺伝子の部位において細胞ゲノムに組み込まれるようにするABC1配列を含有する。培養培地への適当な抗生物質の添加は、レポーター遺伝子およびマーカー遺伝子が正しい向きで内因性ABC1プロモーターの下流に組み込まれている細胞のみの選択を可能とする。例えば、もしベクターがレポーター遺伝子の下流に挿入されたピューロマイシン抵抗性遺伝子を含有するならば、トランスフェクトされた細胞はピューロマイシンの存在下で増殖するはずである。適切に組み込まれたピューロマイシン抵抗性遺伝子を有し、それにより、機能的な蛋白質をコードすることができる細胞のみがピューロマイシンの存在下で生存する。かくして、トランスフェクトされた細胞は、適当な抗生物質の存在下でABC1プロモーター

活性を誘導する条件下で増殖するはずである。生存する細胞をクローン的に培養することができ、PCRまたはサザンブロット分析を用いてDNAを配列決定し、ゲノム配列の適切な組込につきテストすることができる。

【0276】

内因性ABC1プロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子を含有する得られた細胞を用いて、テスト化合物がABC1の発現を変調するか否かを決定することができる。化合物のABC1変調活性は、テスト化合物に暴露された細胞で見出されるレポーター遺伝子発現のレベルをアッセイすることによって決定される。例えば組み込まれたルシフェラーゼ遺伝子を有する細胞を用いて、化合物に暴露された細胞で見出されたルシフェラーゼ活性の量を測定することによって、テスト化合物のABC1変調活性を決定することができる。

【0277】

(実施例17)

本実施例は、核受容体に対するリガンドが、ABC1プロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子の発現を上昇調節することを示す。

【0278】

LXR α 、LXR β およびRXR α 核レポーターに対するリガンドがABC1遺伝子発現を調節できるか否かを判断するために、ABC1プロモーターの制御下にあるルシフェラーゼレポーター遺伝子を含有するpAPR1プラスミドを、核受容体に対する少なくとも1つのリガンドで処理したRAW264.7細胞にトランスフェクトした(図12)。

【0279】

レポーター構築体の構築およびトランスフェクション：レポーター構築体pAPR1および対照レポーター構築体pGL3-Basicを実施例15に記載されているごとく得た。RAW264.7細胞を培地に維持し、実施例15に記載されたごとくpGL3-Basic(1 μ g)またはpAPR(1 μ g)いずれかでトランスフェクトした。トランスフェクトされたRAW264.7細胞をエタノール(EtOH)(0.1% v/v)、20(S)-ヒドロキシコレステロール(20(S)OH-コール)(10 μ M)、9-シスレチノイン酸(9-シ

ス(RA)(10 α M)または20(S)OA-コールおよび9-シスRA(合計24 μ M)双方のいずれかで24時間処理した。ルシフェラーゼ活性を測定し、実施例15に記載されたごとく相対的光単位として報告する。

【0280】

結果：この実験の結果は図12に示す。pGL3-Basicでトランスフェクトした対照細胞はルシフェラーゼ活性を示さなかった(データは示さず)。EtOH対照と比較し、pAPR1でトランスフェクトされた細胞は20OH-コールの存在下でルシフェラーゼレポーター活性の19倍増加を生じ、9-シスRAの存在下でルシフェラーゼ活性の16倍増加を生じ、および双方のリガンドの存在下でルシフェラーゼ活性の280倍増加を生じた。これらの結果は、ステロールおよびレチノイドの双方はpAPR1におけるABC1 5'フランキング配列からの強力な転写応答を誘導することを示す。さらに、双方のリガンドで処理した細胞で見出されたルシフェラーゼ活性の劇的な増加によってわかるごとく、2つのクラスの化合物の明らかな相乗効果がある。LXR α およびRXR α レポーターは活性なヘテロダイマーを形成することが知られている。かくして、双方の核受容体のリガンド-誘導活性化は同時に転写の観察された相乗的増加を生じ得る。

【0281】

これらのデータは、20(S)ヒドロキシコレステロールのごときヒドロキシステロール、および9-シスレチノイン酸のごときレチノイドがABC1プロモーターを活性化することを示し、これは、これらおよび関連する化合物が、マクロファージ細胞においてABC1発現を増加させて、過剰のコレステロールの末梢部位を取り除く治療化合物の開発で有用で有り得ることを示す。加えて、本発明のABC1プロモーター/レポーター遺伝子スクリーニングアッセイを用いて、ABC1発現を増加させる他の化合物をスクリーニングし、さらなる治療化合物を同定することができる。

【0282】

(実施例18)

本実施例は、LXR応答エレメントの同定を含めたABC1プロモーター領域

のさらなる特徴付けを示す。

【0283】

A B C 1の5'フランキング領域のいずれの部分が核リガンドに応答して転写活性を保持するかを判断するために、5'フランキング領域の異なる部分およびルシフェラーゼレポーター遺伝子を含む種々のプラスミドを、核受容体に対する少なくとも1つのリガンドで処理したRAW264.7細胞にトランスフェクトした。この系を用い、配列番号；3のヌクレオチド1480-1510に対応するステロール応答エレメントを同定した。該ステロール応答エレメントは直接反復-4エレメントTGACCGatagTAACCTを含む。部位-特異的突然変異誘発およびバンド-シフトアッセイ技術を用いてステロール応答エレメントの確認が得られた。

【0284】

レポーター構築体の構築：レポーター構築体pAPR1および対照レポーター構築体pGL3-Basicは実施例15に記載されているごとく得られた。また、配列番号；3のヌクレオチド1-1523、1080-1643、1181-1643、1292-1643また1394-1643いずれかを含有するレポーター構築体を構築した。配列番号：3のヌクレオチド1080-1623を含有するレポーター構築体(GL-6a)は実施例15に記載したごとく構築した。配列番号：3のヌクレオチド1-1532を含有するレポーター構築体は、pAPR1をSpeIおよびNheIで消化し、ついで、ゲル-精製ベクター断片を再び連結することによって構築した。ヌクレオチド1181ないし1643を含有するレポーター構築体は、まずGL-6aをStyIで消化し、粘着末端をクレノウ酵素で平滑とし、得られたベクターをSacIで消化し、ついで、462塩基対平滑-SacI粘着末端断片を単離することによって構築した。GL-5aをAcc65Iで消化し、粘着末端をクレノウ酵素で平滑とし、SacIで消化し、ついで、ベクター断片をゲル単離することによって得られたベクターにこれをクローンした。ヌクレオチド1292-1643を含有するレポーター構築体は、GL-6aをAcc65Iで連続的に消化し、末端をクレノウ酵素で平滑とし、SacIIで消化し、末端をT4ポリメラーゼで平滑とし、ついで、

ゲル - 単離ベクター断片を再び連結することによって構築した。ヌクレオチド 1294 - 1643 を含有するレポーター構築体は、G L - 6 a を A c c 6 5 I で消化し、末端をクレノウ酵素で平滑とし、A p a I で引き続いて消化し、T 4 ポリメラーゼで末端を平滑とし、ついで、ゲル - 単離ベクター断片を再び連結することによって構築した。

【0285】

レポーター構築体のトランスフェクション：実施例 15 に記載された方法に従い、R A W 2 6 4 . 7 細胞を培養に維持し、p G L 3 - B a s i c (1 μ g)、p A P R 1 (1 μ g) または他のレポーター構築体の内の 1 ついずれかでトランスフェクトした。トランスフェクトされた R A W 2 6 4 . 7 細胞をエタノール (E t O H) (0 . 1 % v / v)、20 (S) - ヒドロキシコレステロール (20 (S) O H コール) (10 μ M)、22 (R) - ヒドロキシコレステロール (22 (R) O H - コール) (10 μ M)、9 - シスレチノイン酸 (9 - シス R A) (10 μ M)、または 20 (S) O H - コールおよび 9 - シス R A (合計 20 μ M) 双方のいずれかで 24 時間処理した。実施例 15 に記載されているごとく、ルシフェラーゼ活性を測定し、相対的光単位として報告した。

【0286】

部位 - 特異的突然変異誘発：配列番号：3 のヌクレオチド 1480 - 1510 に対応するステロール応答エレメントを、部位 - 特異的突然変異誘発を用いて前記 1080 - 1643 配列中に突然変異した。具体的には、製造業者のプロトコルに従い、Gene Editor システム (P r o m e g a , M a d i s o n , W I) を用いて、直接反復 - 4 エLEMENT T G A C C G a t a g T A A C C T を含有する応答エレメントを C T G C A C a t a g T A A C C T に突然変異した。

【0287】

ゲル - シフトアッセイ：O h l l s s o n ら , C e l l , 45 : 35 - 55 (1986) の方法によって、核抽出物を R A W 2 6 4 . 7 細胞から調製した。L X R 応答エレメント (T C G A G T G A C C G A T A G T A A C C T C T C G A ; 配列番号：56) およびその突然変異したカウンターパート (T C G A G C T G C A C A T A G T A A C C T C T C G A ; 配列番号：57) に対応する ³²P

- 標識オリゴヌクレオチド (5 ng) を、LXR α およびLXR β (Santa Cruz Biotechnology, Cat. No. SC-1591, Santa Cruz, CA) に対する1 μ g 抗血清またはRXR (Santa Cruz, Biotechnology, Cat. No. SC-774, Santa Cruz, CA) に対する抗血清の存在または不存在下、20 mMのH EPES、pH 7.9、60 mMのKCl、1 mMのMgCl₂、1 mMのDTT、66.6 μ g/mlのポリ (DidC) および10%グリセロール中で、室温にて30分間、5 μ gの核蛋白質と共に個々にインキュベートした。蛋白質-DNA複合体を、0.5 $\times$ TBE緩衝液中で150 Vにて4%非-変成ポリアクリルアミドゲルに1.5時間適用した。蛋白質-DNA複合体は乾燥したゲルのオートラジオグラフィーによって検出した。

【0288】

結果：配列番号：3のヌクレオチド1-1643 (すなわち、pAPR1)、1-1532、1080-1643、1181-1643、12921643、または1394-1643) に対応する5' フランキング領域を含有する個々のレポーター構築体でのトランスフェクション (各々は同一結果を生じた)。個々の構築体の全ては、EtOH対照と比較して、20 (S) OH-コールまたは22 (R) OH-コールの存在下で、ルシフェラーゼレポーター活性の3ないし4倍増加を生じた。また、個々の構築体の全ては、9-シスRAの存在下でルシフェラーゼレポーター活性の8ないし10倍増加を生じた。加えて、構築体のいずれかでのトランスフェクションは、EtOH対照と比較して、オキシステロールリガンド ((20 (S) OH-コールまたは22 (R) OHコール) いずれか) およびレチノイドリガンド (9-シスRA) の存在下で、ルシフェラーゼ活性の25ないし50倍増加を生じ、これは相乗的相互反応を示す。記載された構築体の各々は、テストしたリガンドに応答してルシフェラーゼ活性の匹敵するレベルを示し、これは、より短い5' フランキング配列がステロールおよびレチノイドについての転写調節配列を含有したことを示す。具体的には、これらの結果は、ステロールおよびレチノイドについての転写調節配列が配列番号：3のヌクレオチド1394-1532に対応する5' フランキング領域に位置することを示し

た。

【0289】

これらの結果は、配列番号：3のヌクレオチド1080-1643に対応する野生型配列を含有するレポーター構築体および配列番号：3のヌクレオチド1080-1643に対応する突然変異した配列を含有するレポーター構築体を用いるルシフェラーゼ活性によって確認され、ここに、ヌクレオチド1480-1500で見出されたステロール応答エレメントは前記したごとく突然変異させた。野生型配列でのトランスフェクションは、20(S)OH-コールまたは9-シスRA単独いずれかの存在下で、ルシフェラーゼ活性の増加によって測定して転写応答を生じ、リガンドと一緒にした双方の存在下で相乗的応答を生じた。対照的に、突然変異した配列でのトランスフェクションは、20(S)OH-コールまたは22(R)OH-コールの存在下で転写応答を生じなかった。突然変異した配列のトランスフェクションは9-シスRAに対する低下した応答を保持し、野生型配列で観察された8ないし10倍増加よりもむしろ、転写活性の4ないし5倍増加を生じた。また、突然変異した配列のトランスフェクションは、20(S)OH-コールおよび9-シスRAと一緒にした存在下で観察された相乗的転写応答を無くした。これらの結果は、さらに、ステロールコンセンサス配列(ヌクレオチド1480-1510)およびその突然変異したカウンターパートを用いるゲル-シフトアッセイによって確認した。ゲル-シフトアッセイは、RAW264.7細胞から単離された核結合蛋白質がステロールコンセンサス配列に結合したが、核蛋白質は突然変異した配列に結合しなかったことを示した。さらに、LXR抗血清の存在下での野生型ステロールコンセンサス配列との核蛋白質のインキュベーションの結果、スーパーシフトド複合体(すなわち、抗体-蛋白質-DNA複合体)が形成され、核受容体LXRに結合するステロール応答エレメントとしての配列が同定された。対照的に、RXR抗血清の存在下での野生型ステロール応答エレメントとの核蛋白質のインキュベーションの結果、スーパーシフトド複合体は形成されず、これは、RXRがこの配列に結合しないことを示す。これらの結果は、コンセンサス配列に結合する核蛋白質を破壊する突然変異がLXRリガンドに対する転写応答を無くさせ、RXRリガンドに対する応答

を減少させることを示す。さらに、L X RまたはR X R抗血清の存在下で行った核結合実験により、ヌクレオチド1480 - 1510で見出されたコンセンサス配列はL X R応答エレメントであることが確認された。このエレメントは、また、9 - シスRAに対する部分的応答を媒介する。

【0290】

特許および刊行物を含めた本明細書中に引用した文献の全ては、出典明示してその全体を本明細書に一体化させる。本発明を本発明の好ましい態様に対する強調を持って記載してきたが、好ましい実施形態の変形を用いることができ、本発明はここに具体的に記載された以外に実施できることが意図されることは当業者に明らかであろう。従って、本発明は、前記した特許請求の範囲によって定義された本発明の精神および範囲内に含まれる全ての修飾を含む。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Lawn, Richard M.

Wade, David

Garvin, Michael

<120> Compositions and Methods for Increasing Cholesterol

Efflux and Raising HDL using ATP Binding Cassette

Transporter Protein ABC1

<130> 99,395-B

<140>

<141>

<150> US 60/140,264

<151> 1999-06-18

<150> US 60/153,872

<151> 1999-08-14

<150> US 60/166,573

<151> 1999-11-19

<160> 57

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 10442

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggccgggacc cgcagagccg agccgaccct tctctcccg gctcggcag ggcagggcgg 60
ggagctccgc gcaccaacag agccggttct cagggcgctt tgctccttgt ttttccccc 120
gttctgtttt ctccccttct ccggaaggct tgtcaaggg taggagaaag agacgcaaac 180
acaaaagtgg aaaacagtta atgaccagcc acgggctcc ctgctgtgag ctctggccgc 240
tgccttccag ggctcccgag ccacacgctg ggcgtgctgg ctgagggaac atggcttgtt 300
ggcctcagct gaggttgctg ctgtggaaga acctcacttt cagaagaaga caaacatgtc 360
agctgttact ggaagtggcc tggcctctat ttatcttctt gatcctgac tctgttcggc 420
tgagctaccc accctatgaa caacatgaat gccattttcc aaataaagcc atgccctctg 480
caggaacact tecttgggtt caggggatta tctgtaatgc caacaacccc tgtttccgtt 540
acccgactcc tggggaggct cccggagttg ttggaaactt taacaaatcc attgtggctc 600
gcctgttctc agatgctcgg aggcttcttt tatacagcca gaaagacacc agcatgaagg 660
acatgcgcaa agttctgaga acattacagc agatcaagaa atccagctca aacttgaagc 720
ttcaagattt cctgggtggac aatgaaacct tctctgggtt cctatatcac aacctctctc 780
tcccaaagtc tactgtggac aagatgctga gggctgatgt cattctccac aagggtattt 840
tgcaaggcta ccagttacat ttgacaagtc tgtgcaatgg atcaaaatca gaagagatga 900
ttcaacttgg tgaccaagaa gtttctgagc tttgtggcct accaaaggag aaactggctg 960
cagcagagcg agtacttctg tccaacatgg acatcctgaa gccaatcctg agaacactaa 1020
actctacatc tcccttcccg agcaaggagc tggctgaagc cacaaaaaca ttgctgcata 1080
gtcttgggac tctggcccag gagctgttca gcatgagaag ctggagtga atgcgacagg 1140
aggatgatgt tctgaccaat gtgaacagct ccagctctc caccctaatc taccaggctg 1200
tgtctcgtat tgtctcgagg catcccgagg gaggggggct gaagatcaag tctctcaact 1260
ggatgagga caacaactac aaagccctct ttggaggcaa tggcactgag gaagatgctg 1320
aaaccttcta tgacaactct acaactcctt actgcaatga tttgatgaag aatttggagt 1380

ctagtcctct tccccgcatt atctggaaag ctctgaagcc gctgctcgtt gggaagatcc 1440
tgtatacacc tgacactcca gccacaaggc aggtcatggc tgagggtgaac aagaccttcc 1500
aggaaactggc tgtgttccat gatctggaag gcatgtggga ggaactcagc cccaagatct 1560
ggaccttcat ggagaacagc caagaaatgg accttgtccg gatgctgttg gacagcaggg 1620
acaatgacca cttttgggaa cagcagtttg atggcttaga ttggacagcc caagacatcg 1680
tggcgttttt ggccaagcac ccagaggatg tccagtccag taatggttct gtgtacacct 1740
ggagagaagc tttcaacgag actaaccagg caatccggac catatctcgc ttcattggagt 1800
gtgtcaacct gaacaagcta gaacccatag caacagaagt ctggctcatc aacaagtcca 1860
tgagactgct ggatgagagg aagttctggg ctggtattgt gttcactgga attactccag 1920
gcagcattga gctgccccat catgtcaagt acaagatccg aatggacatt gacaatgttg 1980
agaggacaaa taaaatcaag gatgggtact gggaccctgg tctcagagct gacctcttg 2040
aggacatgcg gtacgtcttg gggggcttcg cctacttgca ggatgtggtg gagcaggcaa 2100
tcatcagggg gctgacgggc accgagaaga aaactggtgt ctatatgcaa cagatgccct 2160
atccctgtta cgttgatgac atctttctgc ggggtgatgag ccggtcaatg cccctcttca 2220
tgacgctggc ctggatttac tcagtggctg tgatcatcaa gggcatcgtg tatgagaagg 2280
aggcacggct gaaagagacc atgcggatca tgggcctgga caacagcata ctctggttta 2340
gctggttcat tagtagcttc attcctcttc ttgtgagcgc tggcctgcta gtggtcatcc 2400
tgaagttagg aaacctgctg cctacagtg atcccagcgt ggtgtttgtc ttcctgtccg 2460
tgtttgctgt ggtgacaatc ctgcagtgtc tcttgattag cacactcttc tccagagcca 2520
acctggcagc agcctgtggg ggcattcatc acttcacgct gtacctgcc tacgtcctgt 2580
gtgtggcatg gcaggactac gtgggcttca cactcaagat cttcgttagc ctgctgtctc 2640
ctgtggcttt tgggtttggc tgtgagtact ttgccctttt tgaggagcag ggcattggag 2700
tgcatgtgga caacctgttt gagagtcttg tggaggaaga tggcttcaat ctcaccactt 2760
cgatctccat gatgtgttt gacaccttcc tctatggggt gatgacctgg tacattgagg 2820
ctgtctttcc aggccagtac ggaattccca ggccctggta ttttcttgc accaagtcct 2880
actggttttg cgaggaaagt gatgagaaga gccaccctgg ttccaaccag aagagaatgt 2940
cagaaatctg catggaggag gaaccacccc acttgaagct gggcgtgtcc attcagaacc 3000
tggtaaaagt ctaccgagat gggatgaagg tggtgtcga tggcctggca ctgaattttt 3060

atgagggcca gatcacctcc ttcttgggcc acaatggagc ggggaagacg accaccatgt 3120
 caatcctgac cgggttgttc cccccgacct cgggcacgcg ctacatcctg ggaaaagaca 3180
 ttctgtctga gatgagcacc atccggcaga acctgggggt ctgtccccag cataacgtgc 3240
 tgtttgacat gctgactgtc gaagaacaca tctggttcta tgcccgttg aaagggctct 3300
 ctgagaagca cgtgaaggcg gagatggagc agatggccct ggatgttggt ttgccatcaa 3360
 gcaagctgaa aagcaaaaca agccagctgt caggtggaat gcagagaaag ctatctgtgg 3420
 ccttggcctt tgtcggggga tctaagggtg tcattctgga tgaaccaca gctgggtgtg 3480
 acccttactc ccgcagggga atatgggagc tgctgtgaa ataccgacaa ggccgcacca 3540
 ttattctctc tacacaccac atggatgaag cggacgtcct gggggacagg attgccatca 3600
 tctcccatgg gaagctgtgc tgtgtgggct cctccctgtt tctgaagaac cagctgggaa 3660
 caggctacta cctgaccttg gtcaagaaag atgtggaatc ctccctcagt tcctgcagaa 3720
 acagtagtag cactgtgtca tacctgaaaa aggaggacag tgtttctcag agcagttctg 3780
 atgctggcct gggcagcgac catgagagtg acacgctgac catcgatgtc tctgctatct 3840
 ccaacctcat caggaagcat gtgtctgaag cccggctggt ggaagacata gggcatgagc 3900
 tgacctatgt gctgccatat gaagctgcta aggagggagc ctttgtggaa ctctttcatg 3960
 agattgatga ccggctctca gacctgggca tttctagtta tggcatctca gagacgaccc 4020
 tggagaagaa attcctcaag gtggccgaag agagtggggt ggatgtgag acctcagatg 4080
 gtaccttgcc agcaagacga aacaggcggg ccttcgggga caagcagagc tgtcttcgcc 4140
 cgttcactga agatgatgct gctgatccaa atgattctga catagacca gaatccagag 4200
 agacagactt gctcagtggg atggatggca aagggtccta ccaggtgaaa ggctggaaac 4260
 ttacacagca acagtttgtg gcccttttgt ggaagagact gctaattgcc agacggagtc 4320
 ggaaaggatt ttttgctcag attgtcttgc cagctgtgtt tgtctgcatt gcccttgtgt 4380
 tcagcctgat cgtgccaccc tttggcaagt accccagcct ggaacttcag ccctggatgt 4440
 acaacgaaca gtacacattt gtcagcaatg atgtctctga ggacacggga accctggaac 4500
 tcttaaagcg cctcaccaaa gacctgggt tcgggacccg ctgtatggaa ggaaacccaa 4560
 tcccagacac gccctgccag gcaggggagg aagagtggac cactgccccca gttccccaga 4620
 ccatcatgga cctcttcag aatgggaact ggacaatgca gaaccttca cctgcatgcc 4680
 agtgtagcag cgacaaaatc aagaagatgc tgctgtgtg tccccaggg gcaggggggc 4740
 tgctcctcc acaaagaaaa caaaacactg cagatatcct tcaggacctg acaggaagaa 4800

acatttcgga ttatctggtg aagacgtatg tgcagatcat agccaaaagc ttaaagaaca 4860
agatctgggt gaatgagttt aggtatggcg gcttttccct ggggtgcagt aatactcaag 4920
cacttcctcc gagtcaagaa gttaatgatg ccatcaaaca aatgaagaaa cacctaaagc 4980
tggccaagga cagttctgca gatcgatttc tcaacagctt gggaagattt atgacaggac 5040
tggacaccag aaataatgtc aaggtgtggt tcaataacaa gggctggcat gcaatcagct 5100
ctttcctgaa tgcctcaac aatgccattc tccgggccaa cctgcaaaag ggagagaacc 5160
ctagcatta tggaattact gctttcaatc atccccgaa tctcaccaag cagcagctct 5220
cagaggtggc tctgatgacc acatcagtggt atgtccttgt gtccatctgt gtcactcttg 5280
caatgtcctt cgtcccagcc agctttgtcg tttcctgat ccaggagcgg gtcagcaaag 5340
caaaacacct gcagttcatc agtggagtga agcctgtcat ctactggctc tctaattttg 5400
tctgggatat gtgcaattac gttgtccctg ccacactgggt cattatcatc ttcactctgt 5460
tccagcagaa gtcctatgtg tcctccacca atctgcctgt gctagccctt ctacttttgc 5520
tgtatgggtg gtcaatcaca cctctcatgt acccagcctc ctttgtgttc aagatcccca 5580
gcacagccta tgtggtgctc accagcgtga accctctcat tggcattaat ggcagcgtgg 5640
ccacctttgt gctggagctg ttcaccgaca ataagctgaa taatatcaat gatatcctga 5700
agtccgtgtt cttgatcttc ccacattttt gcctgggacg agggctcatc gacatgggtga 5760
aaaaccaggc aatggctgat gccctggaaa ggtttgggga gaatcgcttt gtgtcaccat 5820
tatcttggga cttggtggga cgaaacctct tcgccatggc cgtggaagggt gtggtgttct 5880
tcctcattac tgttctgac cagtacagat tcttcatcag gccagacct gtaaatgcaa 5940
agctatctcc tctgaatgat gaagatgaag atgtgaggcg ggaaagacag agaattcttg 6000
atggtggagg ccagaatgac atcttagaaa tcaaggagtt gacgaagata tatagaagga 6060
agcgggaagc tgctgttgac aggatttgcg tgggcattcc tcctggtgag tgctttgggc 6120
tcctgggagt taatggggct ggaaaatcat caactttcaa gatgttaaca ggagatacca 6180
ctgttaccag aggagatgct ttccttaaca aaaatagtat cttatcaaac atccatgaag 6240
tacatcagaa catgggctac tgcctcagt ttgatgccat cacagagctg ttgactggga 6300
gagaacacgt ggagttcttt gcccttttga gaggagtccc agagaaagaa gttggcaagg 6360
ttggtgagtg ggcgattcgg aaactgggcc tcgtgaagta tggagaaaaa tatgctggta 6420
actatagtgg aggcaacaaa cgcaagctct ctacagccat ggctttgate ggcgggcctc 6480

ctgtggtgtt tctggatgaa cccaccacag gcatggatcc caaagcccgg cggttcttgt 6540
 ggaattgtgc cctaagtgtt gtcaaggagg ggagatcagt agtgcttaca tctcatagta 6600
 tggaagaatg tgaagctctt tgcactagga tggcaatcat ggtcaatgga aggttcaggt 6660
 gccttggcag tgtccagcat ctaaaaaata ggtttggaga tggttatata atagtgttac 6720
 gaatagcagg gtccaacccg gacctgaagc ctgtccagga tttctttgga cttgcatttc 6780
 ctggaagtgt tctaaaagag aaacaccgga acatgctaca ataccagctt ccatcttcat 6840
 tatcttctct ggccaggata ttcagcatcc tctcccagag caaaaagcga ctccacatag 6900
 aagactactc tgtttctcag acaacacttg accaagtatt tgtgaacttt gccaaaggacc 6960
 aaagtgtatg tgaccactta aaagacctct cattacacaa aaaccagaca gtagtggacg 7020
 ttgcagtctc cacatctttt ctacaggatg agaaagttaa agaaagctat gtatgaagaa 7080
 tcctgttcat acgggggtggc tgaaagtaaa gaggaactag actttccttt gcaccatgtg 7140
 aagtgttgtg gagaaaagag ccagaagtgt atgtgggaag aagtaaaactg gatactgtac 7200
 tgatactatt caatgcaatg caattcaatg caatgaaaac aaaattccat tacaggggca 7260
 gtgcctttgt agcctatgtc ttgtatggct ctcaagttaa agacttgaat ttagtttttt 7320
 acctatacct atgtgaaact ctattatgga acccaatgga catatgggtt tgaactcaca 7380
 cttttttttt tttttgttc ctgtgtattc tcattggggt tgcaacaata attcatcaag 7440
 taatcatggc cagcgattat tgatcaaaat caaaaggtaa tgcacatcct cattcactaa 7500
 gccatgccat gcccaggaga ctggtttccc ggtgacacat ccattgctgg caatgagtgt 7560
 gccagagtta ttagtgccaa gtttttcaga aagtttgaag caccatggtg tgtcatgttc 7620
 acttttgtga aagctgctct gctcagagtc tatcaacatt gaatatcagt tgacagaatg 7680
 gtgccatgct tggctaacat cctgctttga ttccctctga taagctgttc tgggtggcagt 7740
 aacatgcaac aaaaatgtgg gtgtctctag gcacgggaaa cttggttcca ttgttatatt 7800
 gtcctatgct togagccatg ggtctacagg gtcacctta tgagactctt aaatatactt 7860
 agatcctggt aagaggcaaa gaatcaacag ccaaactgct ggggctgcaa gctgctgaag 7920
 ccagggcatt ggattaaaga gattgtgcgt tcaaacctag ggaagcctgt gccatttgt 7980
 cctgactgtc tgctaacatg gtacactgca totcaagatg tttatctgac acaagtgtat 8040
 tatttctggc tttttgaatt aatctagaaa atgaaaagat ggagtgtat ttgacaaaa 8100
 atgtttgtac tttttaatgt tttttggaat ttttaagttct atcagtgaact tctgaatcct 8160
 tagaatggcc tctttgtaga accctgtggt atagaggagt atggccaactg cccactatt 8220

tttattttct tatgtaagtt tgcataatcag tcatgactag tgcctagaaa gcaatgtgat 8280
 ggtcaggatc tcatgacatt atatttgagt ttctttcaga tcatttagga tactcttaat 8340
 ctcaattcat caatcaaata ttttttgagt gtatgctgta gctgaaagag tatgtacgta 8400
 cgtataagac tagagagata ttaagtctca gtacacttcc tgtgccatgt tattcagctc 8460
 actggtttac aaatataggt tgtcttggtg ttgtaggagc ccactgtaac aatattgggc 8520
 agcctttttt tttttttttt aattgcaaca atgcaaaaagc caagaaagta taagggtcac 8580
 aagtttaaac aatgaattct tcaacaggga aaacagctag cttgaaaact tgctgaaaaa 8640
 cacaacttgt gtttatggca ttttagtacct tcaaataatt ggctttgcag atattggata 8700
 ccccatataa tctgacagtc tcaaattttt catctcttca atcactagtc aagaaaaata 8760
 taaaaacaac aaatacttcc atatggagca tttttcagag ttttctaacc cagtcttatt 8820
 tttctagtca gtaaacatth gtaaaaatac tgtttcacta atacttactg ttaactgtct 8880
 tgagagaaaa gaaaaaatatg agagaactat tgtttgggga agttcaagtg atctttcaat 8940
 atcattacta acttcttcca ctttttccaa aatttgaata ttaacgctaa aggtgtaaga 9000
 cttcagatth caaattaatc tttctatatt ttttaaattt acagaatatt atataacca 9060
 ctgctgaaaa agaaaaaat gattgtttta gaagttaaag tcaatattga ttttaaatat 9120
 aagtaatgaa ggcatatttc caataactag tgatatggca tcgttgcaat ttacagtatc 9180
 ttcaaaaaata cagaatttat agaataattt ctcttcattt aatatttttc aaaatcaaag 9240
 ttatggtttc ctcatthtac taaaatcgta ttctaattct tcattatagt aaatctatga 9300
 gcaactcctt acttcgggtc ctctgatttc aaggccatat tttaaaaaat caaaaggcac 9360
 tgtgaactat ttggaagaaa acacgacatt ttaatacaga ttgaaaggac ctcttctgaa 9420
 gctagaaaca atctatagtt atacatcttc attaatactg tgttaccttt taaaatagta 9480
 attttttaca ttttctgtg taaacctaat tgtggtagaa atttttacca actctatact 9540
 caatcaagca aaatttctgt atattccctg tggaaatgtac ctatgtgagt ttcagaaatt 9600
 ctcaaaaatac gtgttcaaaa atttctgctt ttgcatcttt gggacacctc agaaaactta 9660
 ttaacaactg tgaatatgag aaatacagaa gaaaataata agcctcttat acataaatgc 9720
 ccagcacaat tcattgttaa aaaacaacca aacctcacac tactgtatth cattatctgt 9780
 actgaaagca aatgctttgt gactattaaa tgttgacat cattcattca ctgtatagta 9840
 atcattgact aaagccattt gctgtgtttt cttcttggtg ntgnatatat caggtaaaat 9900

attttcacaa gagccatgtg tcatgtaata ctgaaccctt tgatattgag acattaattt 9960
 ggacccttgg tattatctac tagaataatg taatactgna gaaatattgc tctaattctt 10020
 tcaaaatggg gcatccccct taaaangttc tatttcata aggatttagc ttgcttatcc 10080
 cttcttatac cctaagatga agctgttttt gtgctctttg ttcattcattg gccctcattc 10140
 caagcacttt acgctgtctg taatgggatc tatttttgca ctggaatata tgagaattgc 10200
 aaaactagac aaaagtttca caacagattt ctaagttaaa tcattttcat taaaaggaaa 10260
 aaagaaaaaa aattttgtat gtcaataact ttatatgaag tattaataatg catattttcta 10320
 tgttgtaata taatgagtca caaaataaag ctgtgacagt tctgttaaaa aaaaaaaaaa 10380
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 10440
 aa 10442

<210> 2

<211> 2261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Cys Trp Pro Gln Leu Arg Leu Leu Leu Trp Lys Asn Leu Thr

1 5 10 15

Phe Arg Arg Arg Gln Thr Cys Gln Leu Leu Leu Glu Val Ala Trp Pro

20 25 30

Leu Phe Ile Phe Leu Ile Leu Ile Ser Val Arg Leu Ser Tyr Pro Pro

35 40 45

Tyr Glu Gln His Glu Cys His Phe Pro Asn Lys Ala Met Pro Ser Ala

50 55 60

Gly Thr Leu Pro Trp Val Gln Gly Ile Ile Cys Asn Ala Asn Asn Pro			
65	70	75	80
Cys Phe Arg Tyr Pro Thr Pro Gly Glu Ala Pro Gly Val Val Gly Asn			
	85	90	95
Phe Asn Lys Ser Ile Val Ala Arg Leu Phe Ser Asp Ala Arg Arg Leu			
	100	105	110
Leu Leu Tyr Ser Gln Lys Asp Thr Ser Met Lys Asp Met Arg Lys Val			
	115	120	125
Leu Arg Thr Leu Gln Gln Ile Lys Lys Ser Ser Ser Asn Leu Lys Leu			
	130	135	140
Gln Asp Phe Leu Val Asp Asn Glu Thr Phe Ser Gly Phe Leu Tyr His			
145	150	155	160
Asn Leu Ser Leu Pro Lys Ser Thr Val Asp Lys Met Leu Arg Ala Asp			
	165	170	175
Val Ile Leu His Lys Val Phe Leu Gln Gly Tyr Gln Leu His Leu Thr			
	180	185	190
Ser Leu Cys Asn Gly Ser Lys Ser Glu Glu Met Ile Gln Leu Gly Asp			
	195	200	205
Gln Glu Val Ser Glu Leu Cys Gly Leu Pro Lys Glu Lys Leu Ala Ala			

210	215	220	
Ala Glu Arg Val Leu Arg Ser Asn Met Asp Ile Leu Lys Pro Ile Leu			
225	230	235	240
Arg Thr Leu Asn Ser Thr Ser Pro Phe Pro Ser Lys Glu Leu Ala Glu			
	245	250	255
Ala Thr Lys Thr Leu Leu His Ser Leu Gly Thr Leu Ala Gln Glu Leu			
	260	265	270
Phe Ser Met Arg Ser Trp Ser Asp Met Arg Gln Glu Val Met Phe Leu			
	275	280	285
Thr Asn Val Asn Ser Ser Ser Ser Ser Thr Gln Ile Tyr Gln Ala Val			
	290	295	300
Ser Arg Ile Val Cys Gly His Pro Glu Gly Gly Gly Leu Lys Ile Lys			
305	310	315	320
Ser Leu Asn Trp Tyr Glu Asp Asn Asn Tyr Lys Ala Leu Phe Gly Gly			
	325	330	335
Asn Gly Thr Glu Glu Asp Ala Glu Thr Phe Tyr Asp Asn Ser Thr Thr			
	340	345	350
Pro Tyr Cys Asn Asp Leu Met Lys Asn Leu Glu Ser Ser Pro Leu Ser			
	355	360	365

Arg Ile Ile Trp Lys Ala Leu Lys Pro Leu Leu Val Gly Lys Ile Leu
 370 375 380

Tyr Thr Pro Asp Thr Pro Ala Thr Arg Gln Val Met Ala Glu Val Asn
 385 390 395 400

Lys Thr Phe Gln Glu Leu Ala Val Phe His Asp Leu Glu Gly Met Trp
 405 410 415

Glu Glu Leu Ser Pro Lys Ile Trp Thr Phe Met Glu Asn Ser Gln Glu
 420 425 430

Met Asp Leu Val Arg Met Leu Leu Asp Ser Arg Asp Asn Asp His Phe
 435 440 445

Trp Glu Gln Gln Leu Asp Gly Leu Asp Trp Thr Ala Gln Asp Ile Val
 450 455 460

Ala Phe Leu Ala Lys His Pro Glu Asp Val Gln Ser Ser Asn Gly Ser
 465 470 475 480

Val Tyr Thr Trp Arg Glu Ala Phe Asn Glu Thr Asn Gln Ala Ile Arg
 485 490 495

Thr Ile Ser Arg Phe Met Glu Cys Val Asn Leu Asn Lys Leu Glu Pro
 500 505 510

Ile Ala Thr Glu Val Trp Leu Ile Asn Lys Ser Met Glu Leu Leu Asp

515	520	525
Glu Arg Lys Phe Trp Ala Gly Ile Val Phe Thr Gly Ile Thr Pro Gly		
530	535	540
Ser Ile Glu Leu Pro His His Val Lys Tyr Lys Ile Arg Met Asp Ile		
545	550	555
		560
Asp Asn Val Glu Arg Thr Asn Lys Ile Lys Asp Gly Tyr Trp Asp Pro		
565	570	575
Gly Pro Arg Ala Asp Pro Phe Glu Asp Met Arg Tyr Val Trp Gly Gly		
580	585	590
Phe Ala Tyr Leu Gln Asp Val Val Glu Gln Ala Ile Ile Arg Val Leu		
595	600	605
Thr Gly Thr Glu Lys Lys Thr Gly Val Tyr Met Gln Gln Met Pro Tyr		
610	615	620
Pro Cys Tyr Val Asp Asp Ile Phe Leu Arg Val Met Ser Arg Ser Met		
625	630	635
		640
Pro Leu Phe Met Thr Leu Ala Trp Ile Tyr Ser Val Ala Val Ile Ile		
645	650	655
Lys Gly Ile Val Tyr Glu Lys Glu Ala Arg Leu Lys Glu Thr Met Arg		
660	665	670

Ile Met Gly Leu Asp Asn Ser Ile Leu Trp Phe Ser Trp Phe Ile Ser
 675 680 685

Ser Leu Ile Pro Leu Leu Val Ser Ala Gly Leu Leu Val Val Ile Leu
 690 695 700

Lys Leu Gly Asn Leu Leu Pro Tyr Ser Asp Pro Ser Val Val Phe Val
 705 710 715 720

Phe Leu Ser Val Phe Ala Val Val Thr Ile Leu Gln Cys Phe Leu Ile
 725 730 735

Ser Thr Leu Phe Ser Arg Ala Asn Leu Ala Ala Ala Cys Gly Gly Ile
 740 745 750

Ile Tyr Phe Thr Leu Tyr Leu Pro Tyr Val Leu Cys Val Ala Trp Gln
 755 760 765

Asp Tyr Val Gly Phe Thr Leu Lys Ile Phe Ala Ser Leu Leu Ser Pro
 770 775 780

Val Ala Phe Gly Phe Gly Cys Glu Tyr Phe Ala Leu Phe Glu Glu Gln
 785 790 795 800

Gly Ile Gly Val Gln Trp Asp Asn Leu Phe Glu Ser Pro Val Glu Glu
 805 810 815

Asp Gly Phe Asn Leu Thr Thr Ser Ile Ser Met Met Leu Phe Asp Thr

820	825	830	
Phe Leu Tyr Gly Val Met Thr Trp Tyr Ile Glu Ala Val Phe Pro Gly			
835	840	845	
Gln Tyr Gly Ile Pro Arg Pro Trp Tyr Phe Pro Cys Thr Lys Ser Tyr			
850	855	860	
Trp Phe Gly Glu Glu Ser Asp Glu Lys Ser His Pro Gly Ser Asn Gln			
865	870	875	880
Lys Arg Met Ser Glu Ile Cys Met Glu Glu Glu Pro Thr His Leu Lys			
885	890	895	
Leu Gly Val Ser Ile Gln Asn Leu Val Lys Val Tyr Arg Asp Gly Met			
900	905	910	
Lys Val Ala Val Asp Gly Leu Ala Leu Asn Phe Tyr Glu Gly Gln Ile			
915	920	925	
Thr Ser Phe Leu Gly His Asn Gly Ala Gly Lys Thr Thr Thr Met Ser			
930	935	940	
Ile Leu Thr Gly Leu Phe Pro Pro Thr Ser Gly Thr Ala Tyr Ile Leu			
945	950	955	960
Gly Lys Asp Ile Arg Ser Glu Met Ser Thr Ile Arg Gln Asn Leu Gly			
965	970	975	

Val Cys Pro Gln His Asn Val Leu Phe Asp Met Leu Thr Val Glu Glu
 980 985 990

His Ile Trp Phe Tyr Ala Arg Leu Lys Gly Leu Ser Glu Lys His Val
 995 1000 1005

Lys Ala Glu Met Glu Gln Met Ala Leu Asp Val Gly Leu Pro Ser Ser
 1010 1015 1020

Lys Leu Lys Ser Lys Thr Ser Gln Leu Ser Gly Gly Met Gln Arg Lys
 1025 1030 1035 1040

Leu Ser Val Ala Leu Ala Phe Val Gly Gly Ser Lys Val Val Ile Leu
 1045 1050 1055

Asp Glu Pro Thr Ala Gly Val Asp Pro Tyr Ser Arg Arg Gly Ile Trp
 1060 1065 1070

Glu Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Gln Gly Arg Thr Ile Ile Leu Ser Thr
 1075 1080 1085

His His Met Asp Glu Ala Asp Val Leu Gly Asp Arg Ile Ala Ile Ile
 1090 1095 1100

Ser His Gly Lys Leu Cys Cys Val Gly Ser Ser Leu Phe Leu Lys Asn
 1105 1110 1115 1120

Gln Leu Gly Thr Gly Tyr Tyr Leu Thr Leu Val Lys Lys Asp Val Glu

1125	1130	1135
Ser Ser Leu Ser Ser Cys Arg Asn Ser Ser Ser Thr Val Ser Tyr Leu		
1140	1145	1150
Lys Lys Glu Asp Ser Val Ser Gln Ser Ser Ser Asp Ala Gly Leu Gly		
1155	1160	1165
Ser Asp His Glu Ser Asp Thr Leu Thr Ile Asp Val Ser Ala Ile Ser		
1170	1175	1180
Asn Leu Ile Arg Lys His Val Ser Glu Ala Arg Leu Val Glu Asp Ile		
1185	1190	1195
		1200
Gly His Glu Leu Thr Tyr Val Leu Pro Tyr Glu Ala Ala Lys Glu Gly		
1205	1210	1215
Ala Phe Val Glu Leu Phe His Glu Ile Asp Asp Arg Leu Ser Asp Leu		
1220	1225	1230
Gly Ile Ser Ser Tyr Gly Ile Ser Glu Thr Thr Leu Glu Glu Ile Phe		
1235	1240	1245
Leu Lys Val Ala Glu Glu Ser Gly Val Asp Ala Glu Thr Ser Asp Gly		
1250	1255	1260
Thr Leu Pro Ala Arg Arg Asn Arg Arg Ala Phe Gly Asp Lys Gln Ser		
1265	1270	1275
		1280

Cys Leu Arg Pro Phe Thr Glu Asp Asp Ala Ala Asp Pro Asn Asp Ser
 1285 1290 1295

Asp Ile Asp Pro Glu Ser Arg Glu Thr Asp Leu Leu Ser Gly Met Asp
 1300 1305 1310

Gly Lys Gly Ser Tyr Gln Val Lys Gly Trp Lys Leu Thr Gln Gln Gln
 1315 1320 1325

Phe Val Ala Leu Leu Trp Lys Arg Leu Leu Ile Ala Arg Arg Ser Arg
 1330 1335 1340

Lys Gly Phe Phe Ala Gln Ile Val Leu Pro Ala Val Phe Val Cys Ile
 1345 1350 1355 1360

Ala Leu Val Phe Ser Leu Ile Val Pro Pro Phe Gly Lys Tyr Pro Ser
 1365 1370 1375

Leu Glu Leu Gln Pro Trp Met Tyr Asn Glu Gln Tyr Thr Phe Val Ser
 1380 1385 1390

Asn Asp Ala Pro Glu Asp Thr Gly Thr Leu Glu Leu Leu Asn Ala Leu
 1395 1400 1405

Thr Lys Asp Pro Gly Phe Gly Thr Arg Cys Met Glu Gly Asn Pro Ile
 1410 1415 1420

Pro Asp Thr Pro Cys Gln Ala Gly Glu Glu Glu Trp Thr Thr Ala Pro

1425	1430	1435	1440
Val Pro Gln Thr Ile Met Asp Leu Phe Gln Asn Gly Asn Trp Thr Met			
1445	1450	1455	
Gln Asn Pro Ser Pro Ala Cys Gln Cys Ser Ser Asp Lys Ile Lys Lys			
1460	1465	1470	
Met Leu Pro Val Cys Pro Pro Gly Ala Gly Gly Leu Pro Pro Pro Gln			
1475	1480	1485	
Arg Lys Gln Asn Thr Ala Asp Ile Leu Gln Asp Leu Thr Gly Arg Asn			
1490	1495	1500	
Ile Ser Asp Tyr Leu Val Lys Thr Tyr Val Gln Ile Ile Ala Lys Ser			
1505	1510	1515	1520
Leu Lys Asn Lys Ile Trp Val Asn Glu Phe Arg Tyr Gly Gly Phe Ser			
1525	1530	1535	
Leu Gly Val Ser Asn Thr Gln Ala Leu Pro Pro Ser Gln Glu Val Asn			
1540	1545	1550	
Asp Ala Ile Lys Gln Met Lys Lys His Leu Lys Leu Ala Lys Asp Ser			
1555	1560	1565	
Ser Ala Asp Arg Phe Leu Asn Ser Leu Gly Arg Phe Met Thr Gly Leu			
1570	1575	1580	

Asp Thr Arg Asn Asn Val Lys Val Trp Phe Asn Asn Lys Gly Trp His
 1585 1590 1595 1600

Ala Ile Ser Ser Phe Leu Asn Val Ile Asn Asn Ala Ile Leu Arg Ala
 1605 1610 1615

Asn Leu Gln Lys Gly Glu Asn Pro Ser His Tyr Gly Ile Thr Ala Phe
 1620 1625 1630

Asn His Pro Leu Asn Leu Thr Lys Gln Gln Leu Ser Glu Val Ala Leu
 1635 1640 1645

Met Thr Thr Ser Val Asp Val Leu Val Ser Ile Cys Val Ile Phe Ala
 1650 1655 1660

Met Ser Phe Val Pro Ala Ser Phe Val Val Phe Leu Ile Gln Glu Arg
 1665 1670 1675 1680

Val Ser Lys Ala Lys His Leu Gln Phe Ile Ser Gly Val Lys Pro Val
 1685 1690 1695

Ile Tyr Trp Leu Ser Asn Phe Val Trp Asp Met Cys Asn Tyr Val Val
 1700 1705 1710

Pro Ala Thr Leu Val Ile Ile Ile Phe Ile Cys Phe Gln Gln Lys Ser
 1715 1720 1725

Tyr Val Ser Ser Thr Asn Leu Pro Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu

1730	1735	1740	
Tyr Gly Trp Ser Ile Thr Pro Leu Met Tyr Pro Ala Ser Phe Val Phe			
1745	1750	1755	1760
Lys Ile Pro Ser Thr Ala Tyr Val Val Leu Thr Ser Val Asn Leu Phe			
	1765	1770	1775
Ile Gly Ile Asn Gly Ser Val Ala Thr Phe Val Leu Glu Leu Phe Thr			
	1780	1785	1790
Asp Asn Lys Leu Asn Asn Ile Asn Asp Ile Leu Lys Ser Val Phe Leu			
	1795	1800	1805
Ile Phe Pro His Phe Cys Leu Gly Arg Gly Leu Ile Asp Met Val Lys			
	1810	1815	1820
Asn Gln Ala Met Ala Asp Ala Leu Glu Arg Phe Gly Glu Asn Arg Phe			
	1825	1830	1835
			1840
Val Ser Pro Leu Ser Trp Asp Leu Val Gly Arg Asn Leu Phe Ala Met			
	1845	1850	1855
Ala Val Glu Gly Val Val Phe Phe Leu Ile Thr Val Leu Ile Gln Tyr			
	1860	1865	1870
Arg Phe Phe Ile Arg Pro Arg Pro Val Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu			
	1875	1880	1885

Asn Asp Glu Asp Glu Asp Val Arg Arg Glu Arg Gln Arg Ile Leu Asp
 1890 1895 1900

Gly Gly Gly Gln Asn Asp Ile Leu Glu Ile Lys Glu Leu Thr Lys Ile
 1905 1910 1915 1920

Tyr Arg Arg Lys Arg Lys Pro Ala Val Asp Arg Ile Cys Val Gly Ile
 1925 1930 1935

Pro Pro Gly Glu Cys Phe Gly Leu Leu Gly Val Asn Gly Ala Gly Lys
 1940 1945 1950

Ser Ser Thr Phe Lys Met Leu Thr Gly Asp Thr Thr Val Thr Arg Gly
 1955 1960 1965

Asp Ala Phe Leu Asn Lys Asn Ser Ile Leu Ser Asn Ile His Glu Val
 1970 1975 1980

His Gln Asn Met Gly Tyr Cys Pro Gln Phe Asp Ala Ile Thr Glu Leu
 1985 1990 1995 2000

Leu Thr Gly Arg Glu His Val Glu Phe Phe Ala Leu Leu Arg Gly Val
 2005 2010 2015

Pro Glu Lys Glu Val Gly Lys Val Gly Glu Trp Ala Ile Arg Lys Leu
 2020 2025 2030

Gly Leu Val Lys Tyr Gly Glu Lys Tyr Ala Gly Asn Tyr Ser Gly Gly

2035	2040	2045
Asn Lys Arg Lys Leu Ser Thr Ala Met Ala Leu Ile Gly Gly Pro Pro		
2050	2055	2060
Val Val Phe Leu Asp Glu Pro Thr Thr Gly Met Asp Pro Lys Ala Arg		
2065	2070	2075
		2080
Arg Phe Leu Trp Asn Cys Ala Leu Ser Val Val Lys Glu Gly Arg Ser		
2085	2090	2095
Val Val Leu Thr Ser His Ser Met Glu Glu Cys Glu Ala Leu Cys Thr		
2100	2105	2110
Arg Met Ala Ile Met Val Asn Gly Arg Phe Arg Cys Leu Gly Ser Val		
2115	2120	2125
Gln His Leu Lys Asn Arg Phe Gly Asp Gly Tyr Thr Ile Val Val Arg		
2130	2135	2140
Ile Ala Gly Ser Asn Pro Asp Leu Lys Pro Val Gln Asp Phe Phe Gly		
2145	2150	2155
		2160
Leu Ala Phe Pro Gly Ser Val Leu Lys Glu Lys His Arg Asn Met Leu		
2165	2170	2175
Gln Tyr Gln Leu Pro Ser Ser Leu Ser Ser Leu Ala Arg Ile Phe Ser		
2180	2185	2190

Ile Leu Ser Gln Ser Lys Lys Arg Leu His Ile Glu Asp Tyr Ser Val
 2195 2200 2205

Ser Gln Thr Thr Leu Asp Gln Val Phe Val Asn Phe Ala Lys Asp Gln
 2210 2215 2220

Ser Asp Asp Asp His Leu Lys Asp Leu Ser Leu His Lys Asn Gln Thr
 2225 2230 2235 2240

Val Val Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Phe Leu Gln Asp Glu Lys Val
 2245 2250 2255

Lys Glu Ser Tyr Val
 2260

<210> 3

<211> 1643

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gaattccttg ctggtggctc cacatgcact tccagggcct gcttggtctt tctatgggtc 60
 tgtcctgagt gttgatagaa cactgatgt gactacctgg gcttgagcgt ggccctggaga 120
 tctgttgac ttagcatgg agggggcttg tcagctgaat gtctgtatgc aggtggtggg 180
 agttctggaa tatgatggag ctggaggtgg gaagagaagt aggcttgggg cagctctctc 240
 atgccacctc attctggcca aaactcaggt caaactgtga agagtctaaa tgtgaatctg 300
 cccttcaagg tggctacaaa ggtatctttg tcaaggtagg agaccttggt gcctccacgt 360

gcacttccag ggccctgcttg gcctcttcta cgggtctgtc ctgagtcctc tatgaatctc 420
 ccttcagggc agattcatat ttagactctt cacagtttga cctgagtttt ggccagaata 480
 aggtgacatt tagtttgctg gcttgatgaa tgacttaaata atttagacat atggtgtgta 540
 ggccctgcatt cctactcttg cctttttttt tgccctcca gtgttttggg tagttttgct 600
 cccctacag ccaaaggcaa acagataagt tggaggtctg gagggtctac ataattttac 660
 acgactgcaa ttctctggct gcacttcaca aatgtataca aactaaatac aagtcctgtg 720
 tttttatcac agggaggctg atcaatataa tgaattaaa agggggctgg tcccatattg 780
 ttctgtgttt ttgtttgttt gtttcttttt ttgtttttgt ggccctcttc ctctcaattt 840
 atgaagagaa gcagtaagat gttcctctcg ggtcctctga gggacctggg gagctcaggc 900
 tgggaatctc caaggcagta ggtcgcttat caaaaatcaa agtccaggtt tgtgggggga 960
 aaacaaaagc agcccattac ccagaggact gtccgccttc ccctcaccac agcctaggcc 1020
 tttgaaagga aacaaaagac aagacaaaat gattggcgctc ctgagggaga ttcagcctag 1080
 agctctctct cccccaatcc ctccctccgg ctgaggaaac taacaaagga aaaaaaatt 1140
 gcggaaaagc ggatttagag gaagcaaatt ccaactggtgc ccttggtgc cggaacgtg 1200
 gactagagag tctgcggcgc agcccgagc ccagcgcttc ccgcgcgtct taggccggcg 1260
 ggcccgggcg ggggaaggcg acgcagaccg cggaccctaa gacacctgct gtaccctcca 1320
 ccccccaccc acccacctcc ccccaactcc ctagatgtgt cgtgggcggc tgaacgtgc 1380
 ccgtttaagg ggcgggcccc ggtccacgt gctttctgct gactgactga actacataaa 1440
 cagaggccgg gaacggggcg gggaggagg agagcacagg ctttgaccga tagtaacctc 1500
 tgcgctcggc gcagccgaat ctataaaagg aactagtccc ggcaaaaacc ccgtaattgc 1560
 gagcgagagt gactggggcc gggaccgca gagccgagcc gacctttctc tcccgggctg 1620
 cggcagggca gggcggggag etc 1643

<210> 4

<211> 748

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

attccaanaa ctttttcng catctgtggt tgccaactca caatgtcttt ctttttctga 60
 acttaccnc caaatgaagn tcggcacgca attatgtagt agcnactctt aggcccccg 120
 cttacactta tgcttcggc tngttgtgtg ggaattggac ggataccatt tcacncagga 180
 aacagatatg nccatgatta cgccaagtta tttaggtgcn cgatagaata ctcaagcttg 240
 gaattcggc ccgcagtcga cggacccccg ggaagattc ctctcattac acaaaaacca 300
 gacagtagtg gacgttgag ttctcacatc ttctctacag gatgagaaag tgaaagaaag 360
 ctatgtatga agaatcctgt tcatacggg tggtgaaag taaagaggaa ctagactttc 420
 ctttgacca tgtgaagtgt tgggagaaa agagccagaa gttgatgtgg gaagaagtaa 480
 actggatact gtactgatac tattcaatgc aatgcaattc aatgcaatga aaacaaaatt 540
 ccattacagg ggcagtgctt ttgtagccta tgccttgat ggctctcaag tgaaagactt 600
 gaatttagtt ttttacctat acctatgtga aactctatta tggaacccaa tggacatatg 660
 ggtttgaact cacacttttt ttttttgtt cctgtgtatt ctcatgggg ttgcaacaat 720
 aattcatcaa gtaaaaaaaa aaaaaaaa 748

<210> 5

<211> 2011

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

agaatcctgt tcatactggg gtggcttgaa agtaaatgga ggaactagac tttcctttgc 60
 accatgtgaa gtgttgagg gaaaagagcc agaagttgat gtgggaagaa gtaaaactgga 120
 tactgtactg atactattca atgcaatgca attcaatgca atgaaaacaa aattccatta 180
 caggggcaag tgcctttgta gcccatgtct tgtatggctc tcaagtgaag gacttgaatt 240
 tagtttttta cctataccta tgtgaaactc tattatggaa cccaatggac atatggggtt 300
 gaactcacac tttttttttt tttgttcct gtgtattctc attggggttg caacaataat 360
 tcatcaagta atcatggcca gcgattattg atcaaatca aaaggtaatg cacatcctca 420
 ttcactaagc catgccatgc ccaggagact ggtttcccg tgacacatcc attgctggca 480

atgagtgtgc cagagttatt agtgccaagt ttttcagaaa gtttgaagca ccatgggtgtg 540
 tcatgctcac ttttgtgaaa gctgctctgc tcagagtcta tcaacattga atatcagttg 600
 acagaatggg gccatgcgtg gctaacatcc tgctttgatt cctctgata agctgttctg 660
 gtggcagtaa catgcaacaa aaatgtgggt gtctctaggg acgggaaact tgggtccatt 720
 gttatattgt cctatgcttc gagccatggg tctacagggg catccttatg agactcttaa 780
 atatacttag atcctggtaa gaggcaaaga atcaacagcc aaactgctgg ggctgcaagc 840
 tgctgaagcc agggcatggg attaaagaga ttgtgcgttc aaacctaggg aagcctgtgc 900
 ccatttgtcc tgactgtctg ctaacatggg aactgcatc tcaagatgtt tatctgacac 960
 aagtgtatta tttctggctt tttgaattaa tctagaaaat gaaaagatgg agttgtattt 1020
 tgacaaaaat gtttgtactt tttaatgtta tttggaattt taagttctat cagtgaacttc 1080
 tgaatcctta gaatggcctc tttgtagaac cctgtgggtat agaggagtat ggccactgcc 1140
 ccactatttt tattttctta tgtaagttg catatcagtc atgactagtg cctagaaagc 1200
 aatgtgatgg tcaggatctc atgacattat atttgagttt ctttcagatc atttaggata 1260
 ctcttaattc cacttcatca atcaaatatt ttttgagtgt atgctgtagc tgaaagagta 1320
 tgtacgtacg tataagacta gagagatatt aagtctcagt acacttcctg tgccatgtta 1380
 ttcagctcac tggtttaca atatataggtg tcttgtgggt gtaggagccc actgtaacaa 1440
 tattgggcag cctttttttt tttttttttt aattgcaaca atgcaaaagc caagaaagta 1500
 taagggtcac aagtctaaac aatgaattct tcaacagggg aaacagctag ctagaaaact 1560
 tgctgaaaaa acaacttgtg tttatggcat ttagtacctt caaataattg gctttgcaga 1620
 tattggatac ccatttaa atgacagtct caaatttttc atctcttcaa tcactagtca 1680
 agaaaaatat aaaaacaaca aatacttcca tatggagcat ttttcagagt tttctaacc 1740
 agtcttattt ttctagtcag taaacatttg taaaaatact gtttcactaa tacttactgt 1800
 taactgtctt gagagaaaag aaaaatatga gagaactatt gtttggggaa gttcaagtga 1860
 tctttcaata tcattactaa cttcttccac tttttccaaa atttgaatat taacgctaaa 1920
 ggtgtaagga cttcagattt caaattaatc tttctatatt ttttaaattt acagaatatt 1980
 atataacca ctgctgaaaa aaaaaaaaaa a 2011

<210> 6

<211> 3366

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

agaatcctgt tcatacgggg tggctgaaag taaagaggaa ctagactttc ctttgcacca 60
tgtgaagtgt tgtggagaaa agagccagaa gttgatgtgg gaagaagtaa actggatact 120
gtactgatac tattcaatgc aatgcaattc aatgcaatga aaacaaaatt ccattacagg 180
ggcagtgcct ttgtagccta tgtcttgat ggctctcaag tgaagactt gaatttagtt 240
ttttacctat acctatgtga aactctatta tggaaaccaa tggacatatg ggtttgaact 300
cacacttttt tttttttttt gtctctgtgt attctcattg gggttgcaac aataattcat 360
caagtaatca tggccagcga ttattgatca aaatcaaaag gtaatgcaca tcctcattca 420
ctaagccatg ccatgcccag gagactggtt tcccggtgac acatccattg ctggcaatga 480
gtgtgccaga gttattagt ccaagttttt cagaaagttt gaagcaccat ggtgtgtcat 540
gctcactttt gtgaaagctg ctctgctcag agtctatcaa cattgaatat cagttgacag 600
aatggtgcc a tgcgtggcta acatcctgct ttgattccct ctgataagct gttctggtgg 660
cagtaacatg caacaaaaat gtgggtgtct ctaggcacgg gaaacttggg tccattgtta 720
tattgtccta tgcttcgagc catgggtcta cagggtcatc cttatgagac tcttaaatat 780
acttagatcc tggtaagagg caaagaatca acagccaaac tgctggggct gcaagctgct 840
gaagccaggg catgggatta aagagattgt gcgttcaaac ctagggaagc ctgtgccccat 900
ttgtcctgac tgtctgctaa catggtacac tgcctctcaa gatgtttatc tgacacaagt 960
gtattatttc tggctttttg aattaatcta gaaaatgaaa agatggagtt gtattttgac 1020
aaaaatgttt gtacttttta atgttatttg gaattttaag ttctatcagt gacttctgaa 1080
tccttagaat ggcctctttg tagaaccctg tggatatagag gagtatggcc actgcccac 1140
tatttttatt ttcttatgta agtttgcata tcagtcatga ctagtgccta gaaagcaatg 1200
tgatggctcag gatctcatga cattatattt gagtttcttt cagatcattt aggatactct 1260
taatctcact tcacaaatca aatatttttt gagtgtatgc tgtagctgaa agagtatgta 1320
cgtacgtata agactagaga gatattaagt ctcagtacac ttctgtgcc atgttattca 1380
gctcactggt ttacaaatat aggttgtctt gtggtttag gagccactg taacaatatt 1440

gggcagcctt tttttttttt ttttaattgc aacaatgcaa agccaagaa agtataagg 1500
tcacaagttt aaacaatgaa ttcttcaaca gggaaaacag ctagcttgaa aacttgctga 1560
aaaacacaac ttgtgtttat ggcatttagt accttcaa attggtctt gcagatattg 1620
gatacccat taaatctgac agtctcaa ttttcattc ttcaatcact agtcaagaaa 1680
aatataaaaa caacaaatac ttccatatgg agcatttttc agagtcttct aaccagctct 1740
tatttttcta gtcagtaaac atttgtaaaa atactgtttc actaatactt actgttaact 1800
gtcttgagag aaaagaaaaa tatgagagaa ctattgtttg gggaggttca agtgatcttt 1860
caatatcatt actaacttct tccacttttt ccaaaatttg aatattaacg cttaaagggt 1920
aagacttcag atttcaaatt aatctttcta tattttttta atttacagaa tattatataa 1980
cccactgctg aaaaagaaaa aaatgattgt tttagaagt aaagtcaata ttgattttta 2040
atataagtaa tgaaggcata ttccaataa ctagtgatat ggcactgttg caatttacag 2100
tatcttcaaa aatacagaat ttatagaata attctctctc atttaataatt tttcaaaatc 2160
aaagttatgg ttctctcatt ttactaaaat cgtattctaa ttcttcatta tagtaaatct 2220
atgagcaact ccttacttgg gtctctctga ttccaaggcc atatttttaa aaatcaaaag 2280
gcactgtgaa ctattttgaa gaaaacacga cattttaata cagattgaaa ggacctcttc 2340
tgaagctaga aacaatctat agttatacat cttcattaat actgtgttac cttttaaatt 2400
agtaattttt tacattttcc tgtgtaaaac taattgtggt agaaattttt accaactcta 2460
tactcaatca agcaaaattt ctgtatatcc cctgtggaat gtacctatgt gagtttcaga 2520
aattctcaaa atactgttcc aaaaatttct gcttttgcac ctttgggaca cctcagaaaa 2580
cttattaaca actgtgaata tgagaaatac agaagaaaat aataagccct ctatacataa 2640
atgccagca caattcattg ttaaaaaaca accaaacctc acactactgt atttcattat 2700
ctgtactgaa agcaaatgct ttgtgactat taaatgttgc acatcattca ttactgtat 2760
agtaatcatt gactaaagcc atttgctgtg ttttcttctt gtggnatgnat atacaggta 2820
aaatattttc caaagagcca tgtgtcatgt aatactgaac ctttgatat tgagacatta 2880
atttggaccc ttggtattat ctactagaat aatgtaatac tgnagaaata ttgctcta 2940
tctttcaaaa tgggtgatcc cctttaaana gttctatttc cataaggatt tagcttgctt 3000
atcccttctt ataccctaag atgaagctgt ttttgtgttc tttgttcac attggccctc 3060
attccaagca ctttacgctg tctgtaatgg gatctatctt tgcactggaa tatctgagaa 3120
ttgcaaaact agacaaaagt ttcacaacag atttctaagt taaatcattt tcattaaaag 3180

gaaaaaagaa aaaaaatttt gtatgtcaat aactttatat gaagtattaa aatgcatatt 3240
tctatgttgt aatataatga gtcacaaaat aaagctgtga cagttctgtt aaaaaaaaaa 3300
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3360
aaaaaa 3366

<210> 7

<211> 10474

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

tctagaactg ggtaccagct gctagcaagc ttcggcacga gccgcagagc cgagccgacc 60
cttctctccc gggctgcggc agggcagggc ggggagctcc gcgcaccaac agagccgggt 120
ctcagggcgc tttgctcctt gttttttccc cggttctgtt ttctccctt ctccggaagg 180
cttgtcaagg ggtaggagaa agagacgcaa acacaaaagt ggaaaacagt taatgaccag 240
ccacgggcgt ccctgctgtg agctctggcc gctgccttcc agggctcccc agccacacgc 300
tgggcgtgct ggctgagggg acatggcttg ttggcctcag ctgagggttg tgctgtggaa 360
gaacctcact ttcagaagaa gacaaacatg tcagctgtta ctggaagtgg cctggcctct 420
atattatctt ctgactctga tctctgttcg gctgagctac ccacctatg aacaacatga 480
atgccatttt ccaaataaag ccattgccctc tgcaggaaca cttccttggg ttcaggggat 540
tatctgtaat gccacaacc cctgtttccg ttaccgcact cctggggagg ctcccgaggt 600
tgttggaac ttaacaaat ccattgtggc tcgcctgttc tcagatgctc ggaggcttct 660
tttatacagc cagaaagaca ccagcatgaa ggacatgcgc aaagtctga gaacattaca 720
gcagatcaag aaatccagct caaacttgaa gcttcaagat ttcttggtgg acaatgaaac 780
cttctctggg ttcttatatc acaacctctc tctcccaaag tctactgttg acaagatgct 840
gagggctgat gtcattctcc acaaggtatt ttgcaaggc taccagttac atttgacaag 900
tctgtgcaat ggatcaaaat cagaagagat gattcaactt ggtgaccaag aagtttctga 960
gctttgtggc ctaccaaagg agaaactggc tgcagcagag cgagtacttc gttccaacat 1020

ggacatcctg aagccaatcc tgagaacact aaactctaca tctcccttcc cgagcaagga 1080
gctggctgaa gccacaaaaa cattgctgca tagtcttggg actctggccc aggagctgtt 1140
cagcatgaga agctggagtg acatgcgaca ggaggtgatg tttctgacca atgtgaacag 1200
ctccagctcc tccacccaaa tctaccaggc tgtgtctcgt attgtctcgc ggcacccga 1260
gggagggggg ctgaagatca agtctctcaa ctggtatgag gacaacaact acaaagccct 1320
ctttggaggc aatggcactg aggaagatgc tgaaaccttc tatgacaact ctacaactcc 1380
ttactgcaat gatttgatga agaatttggg gtctagtccct ctttcccga ttatctggaa 1440
agctctgaag ccgctgctcg ttgggaagat cctgtatata cctgacactc cagccacaag 1500
gcaggtcatg gctgaggtga acaagacctt ccaggaactg gctgtgttcc atgatctgga 1560
aggcatgtgg gaggaactca gccccaagat ctggaccttc atggagaaca gccaaagaaat 1620
ggaccttgtc cggatgctgt tggacagcag ggacaatgac cacttttggg aacagcagtt 1680
ggatggctta gattggacag cccaagacat cgtggcgttt ttggccaagc acccagagga 1740
tgtccagtcc agtaatggtt ctgtgtacac ctggagagaa gctttcaacg agactaacca 1800
ggcaatccgg accatatctc gcttcatgga gtgtgtcaac ctgaacaagc tagaaccat 1860
agcaacagaa gtctggctca tcaacaagtc catggagctg ctggatgaga ggaagtctc 1920
ggctgggtatt gtgttcaactg gaattactcc aggcagcatt gagctgcccc atcatgtcaa 1980
gtacaagatc cgaatggaca ttgacaatgt ggagaggaca aataaaatca aggatgggta 2040
ctgggacctt ggtcctcgag ctgaccttct tgaggacatg cggtagctct gggggggctt 2100
cgctacttg cgggatgtgg tggagcaggc aatcatcagg gtgctgacgg gcaccagaaa 2160
gaaaactggg gtctatatgc aacagatgcc ctatccctgt tacgttgatg acatctttct 2220
gcgggtgatg agccgggtcaa tgccctctt catgacgctg gcctggattt actcagtggc 2280
tgtgatcatc aagggcatcg tgtatgagaa ggaggcacgg ctgaaagaga ccatgcggat 2340
catgggcctg gacaacagca tactctggtt tagctggttc attagtagcc tcattcctct 2400
tcttgtagc gctggcctgc tagtgggtcat cctgaagtta ggaaacctgc tgccctacag 2460
tgatcccagc gtgggtgttg tcttctgtc cgtgtttgct gtggtgacaa tcctgcagt 2520
cttctgatt agcacactct tctccagagc caacctggca gcagcctgtg ggggcatcat 2580
ctacttcacg ctgtacctgc cctacgtcct gtgtgtggca tggcaggact acgtgggctt 2640
cacactcaag atcttcgcta gcctgctgtc tctgtgggt tttgggttg gctgtgagta 2700
ctttgccctt tttagaggagc agggcattgg agtgcagtgg gacaacctgt ttgagagtcc 2760

tgtggaggaa gatggcttca atctcaccac ttcgatctcc atgatgctgt ttgacacctt 2820
 cctctatggg gtgatgacct ggtacattga ggctgtcttt ccaggccagt acggaattcc 2880
 caggccctgg tattttcctt gcaccaagtc ctactggttt ggcgaggaaa gtgatgagaa 2940
 gagccacctt ggttccaacc agaagagaat gtcagaaatc tgcattggagg aggaacccac 3000
 ccacttgaag ctgggctgtt ccattcagaa cctggtaaaa gtctaccgag atgggatgaa 3060
 ggtggctgtc gatggcctgg cactgaattt ttatgagggc cagatcacct ccttctctgg 3120
 ccacaatgga ggggggaaga cgaccacat gtcaatcctg accgggttgt tcccccgac 3180
 ctggggcacc gctacatcc tgggaaaaga cattcgctct gagatgagca ccatccggca 3240
 gaacctgggg gtctgtcccc agcataacgt gctgtttgac atgctgactg tcgaagaaca 3300
 catctggttc tatgcccgtt tgaaagggtt ctctgagaag cacgtgaagg cggagatgga 3360
 gcagatggcc ctggatgttg gtttgccatc aagcaagctg aaaagcaaaa caagccagct 3420
 gtcagggtga atgcagagaa agctatctgt ggcttggcc tttgtcgggg gatctaaggt 3480
 tgtcattctg gatgaacca cagctggtgt ggaccttac tcccgagggg gaatatggga 3540
 gctgctgctg aaataccgac aaggccgcac cattattctc tctacacacc acatggatga 3600
 agcggacgtc ctgggggaca ggattgccat catctcccat gggaaagctgt gctgtgtggg 3660
 ctctccctg tttctgaaga accagctggg aacaggctac tacctgacct tggtaagaa 3720
 agatgtggaa tcctccctca gttcctgcag aaacagtagt agcactgtgt catacctgaa 3780
 aaaggaggac agtgtttctc agagcagttc tgatgctggc ctgggcagcg accatgagag 3840
 tgacacgctg accatcgatg tctctgctat ctccaacctc atcaggaagc atgtgtctga 3900
 agccccgctg gtggaagaca tagggcatga gctgacctat gtgctgcat atgaagctgc 3960
 taaggaggga gcctttgtgg aactctttca tgagattgat gaccggtct cagacctggg 4020
 catttctagt tatggcatct cagagacgac cctggaagaa atattcctca aggtggccga 4080
 agagagtggg gtggatgctg agacctcaga tggtaacctg ccagcaagac gaaacaggcg 4140
 ggccctcggg gacaagcaga gctgtcttcg cccgttcact gaagatgatg ctgctgatcc 4200
 aatgattct gacatagacc cagaatccag agagacagac ttgctcagtg ggatggatgg 4260
 caaagggtcc taccaggtga aaggctggaa acttacacag caacagtttg tggccctttt 4320
 gtggaagaga ctgctaattg ccagacggag tcggaaagga ttttttgctc agattgtctt 4380
 gccagctgtg tttgtctgca ttgcccttgt gttcagcctg atcgtgccac cctttggcaa 4440

gtacccacgc ctggaacttc agccctggat gtacaacgaa cagtacacat ttgtcagcaa 4500
 tgatgtctct gaggacacgg gaaccctgga actcttaaac gccctcacca aagaccctgg 4560
 cttcgggacc cgctgtatgg aaggaaaccc aatcccagac acgccctgcc aggcagggga 4620
 ggaagagtgg accactgccc cagttcccca gaccatcatg gacctcttcc agaatgggaa 4680
 ctggacaatg cagaaccctt cacctgcatg ccagtgtagc agcgacaaaa tcaagaagat 4740
 gctgcctgtg tgtcccccag gggcaggggg gctgcctcct ccacaaagaa aacaaaacac 4800
 tgcagatata cttcaggacc tgacaggaag aaacatttcg gattatctgg tgaagacgta 4860
 tgtgcagatc atagccaaaa gcttaaagaa caagatctgg gtgaatgagt ttaggtatgg 4920
 cggcttttcc ctgggtgtca gtaatactca agcacttcct ccgagtcaag aagttaatga 4980
 tgccatcaaaa caaatgaaga aacacctaaa gctggccaag gacagttctg cagatcgatt 5040
 tctcaacagc ttgggaagat ttatgacagg actggacacc agaaataatg tcaagggtgtg 5100
 gttcaataac aagggtctggc atgcaatcag ctctttcctg aatgtcatca acaatgccat 5160
 tctccggggc aacctgcaaa agggagagaa ccctagccat tatggaatta ctgctttcaa 5220
 tcatcccttg aatctcacca agcagcagct ctccagaggc gctctgatga ccacatcagt 5280
 ggatgtcctt gtgtccatct gtgtcatctt tgcaatgtcc ttcgtcccag ccagctttgt 5340
 cgtattcctg atccaggagc gggtcagcaa agcaaaacac ctgcagttca tcagtggagt 5400
 gaagcctgtc atctactggc tctctaattt tgtctgggat atgtgcaatt acgttgtccc 5460
 tgccacactg gtcattatca tcttcactct cttccagcag aagtccctatg tgtectccac 5520
 caatctgcct gtgctagccc ttctactttt gctgtatggg tggatcaatca cacctctcat 5580
 gtacccagcc tcctttgtgt tcaagatccc cagcacagcc tatgtgggtg tcaccagcgt 5640
 gaacctcttc attggcatta atggcagcgt ggccaccttt gtgctggagc tgttcacoga 5700
 caataagctg aataatatca atgatatcct gaagtccgtg ttcttgatct tcccacattt 5760
 ttgcctggga cgagggctca tcgacatggg gaaaaaccag gcaatggctg atgccctgga 5820
 aaggtttggg gagaatcgct ttgtgtcacc attatcttgg gacttgggtg gacgaaacct 5880
 cttcgccatg gccgtggaag ggggtgtgtt cttcctcatt actgttctga tccagtacag 5940
 attcttcata aggccagac ctgtaaatgc aaagctatct cctctgaatg atgaagatga 6000
 agatgtgagg cgggaaagac agagaattct tgatgggtgga ggccagaatg acatcttaga 6060
 aatcaaggag ttgacgaaga tatatagaag gaagcggag cctgctgttg acaggatttg 6120
 cgtgggcatt cctcctgggt agtgcttttg gctcctggga gttaatgggg ctggaaaatc 6180

atcaactttc aagatgttaa caggagatac cactgttacc agaggagatg ctttccttaa 6240
caaaaatagt atcttatcaa acatccatga agtacatcag aacatgggct actgccctca 6300
gtttgatgcc atcacagagc tgttgactgg gagagaacac gtggagtctt ttgccctttt 6360
gagaggagtc ccagagaaaag aagtggcaa gggttggtgag tgggcgattc ggaaactggg 6420
cctcgtgaag tatggagaaa aatatgctgg taactatagt ggaggcaaca aacgcaagct 6480
ctctacagcc atggctttga tcggcgggccc tcctgtggtg tttctggatg aaccaccac 6540
aggcatggat cccaaagccc ggcggttctt gtggaattgt gccctaagtg ttgtcaagga 6600
ggggagatca gtagtgctta catctcatag tatggaagaa tgtgaagctc tttgcactag 6660
gatggcaatc atggccaatg gaagggttcag gtgccttggc agtgtccagc atctaaaaaa 6720
taggtttgga gatgggtata caatagttgt acgaatagca gggccaacc cggacctgaa 6780
gcctgtccag gatttctttg gacttgcatt tcctggaagt gttctaaaag agaaacaccg 6840
gaacatgcta caataccagc ttccatcttc attatcttct ctggccagga tattcagcat 6900
cctctcccag agcaaaaagc gactccacat agaagactac tctgtttctc agacaacact 6960
tgaccaagta tttgtgaact ttgccaagga ccaaagtgat gatgaccact taaaagacct 7020
ctcattacac aaaaaccaga cagtagtgga cgttcagtt ctcacatctt ttctacagga 7080
tgagaaagtg aaagaaagct atgtatgaag aatcctgttc atacgggggtg gctgaaagta 7140
aagaggaact agactttcct ttgcaccatg tgaagtgttg tggagaaaag agccagaagt 7200
tgatgtggga agaagttaaac tggatactgt actgatacta ttcaatgcaa tgcaattcaa 7260
tgcaatgaaa acaaaattcc attacagggg cagtgccttt gtagcctatg tcttgatagg 7320
ctctcaagtg aaagacttga atttagtttt ttacctatac ctatgtgaaa ctctattatg 7380
gaacccaatg gacatatggg ttgaaactca cacttttttt ttttttttgt tcctgtgtat 7440
tctcattggg gttgcaaca taattcatca agtaatcatg gccagcgatt attgatcaaa 7500
atcaaaaggt aatgcacatc ctcatcact aagccatgcc atgccagga gactgggttc 7560
ccggtgacac atccattgct ggcaatgagt gtgccagagt tattagtgcc aagtttttca 7620
gaaagtgtga agcaccatgg tbtgtcatgc tcacttttgt gaaagctgct ctgctcagag 7680
tctatcaaca ttgaatatca gttgacagaa tggtgccatg cgtggctaac atcctgcttt 7740
gattccctct gataagctgt tctggtggca gtaacatgca acaaaaatgt ggggtgtctct 7800
aggcacggga aacttggttc cattgttata ttgtcctatg cttcgagcca tgggtctaca 7860

gggtcatect tatgagactc ttaaataatac ttagatcctg gtaagaggca aagaatcaac 7920
 agccaaactg ctggggctgc aagctgctga agccagggca tgggattaaa gagattgtgc 7980
 gttcaaacct agggaagcct gtgcccattt gtcttgactg tctgctaaca tggtaactg 8040
 catctcaaga tgtttatctg acacaagtgt attatttctg gctttttgaa ttaatctaga 8100
 aaatgaaaag atggagtgtt attttgacaa aaatgtttgt actttttaat gttatttgga 8160
 attttaagtt ctatcagtga cttctgaatc cttagaatgg cctctttgta gaacctgtg 8220
 gtatagagga gtatggccac tgcccacta tttttatttt cttatgtaag ttgcatatc 8280
 agtcatgact agtgcctaga aagcaatgtg atggtcagga tctcatgaca ttatatttga 8340
 gtttctttca gatcatttag gatactctta atctcacttc atcaatcaaa tttttttgga 8400
 gtgtatgctg tagctgaaag agtatgtacg tacgtataag actagagaga tattaagtct 8460
 cagtacactt cctgtgccat gttattcagc tcactgggtt acaaataatag gttgtcttgt 8520
 ggttgttaga gccactgta acaatattgg gcagcctttt tttttttttt ttaattgcaa 8580
 caatgcaaaa gccaaagaaag tataagggtc acaagttaa acaatgaatt cttcaacagg 8640
 gaaaacagct agcttgaaaa cttgctgaaa aacacaactt gtgtttatgg catttagtac 8700
 cttcaaataa ttggctttgc agatattgga taccocatta aatctgacag tctcaaattt 8760
 ttcatctctt caatcactag tcaagaaaaa tataaaaaa acaaataactt ccatatggag 8820
 catttttcag agttttctaa ccagtcctta tttttctagt cagtaaacat ttgtaaaaat 8880
 actgtttcac taatacttac tgttaactgt cttgagagaa aagaaaaata tgagagaact 8940
 attgtttggg gaagtccaag tgatctttca atatcattac taacttcttc cactttttcc 9000
 aaaatttgaa tattaacgct aaagggtgta gacttcagat ttcaaattaa tctttctata 9060
 ttttttaaat ttacagaata ttatataacc cactgctgaa aaagaaaaaa atgattgttt 9120
 tagaagttaa agtcaatatt gattttaaat ataagtaatg aaggcatatt tccaataact 9180
 agtgatatgg catcggtgca atttacagta tcttcaaaaa tacagaattt atagaataat 9240
 ttctctcat ttaatatatt tcaaaatcaa agttatgggt tcttcatttt actaaaatcg 9300
 tattctaat cttcattata gtaaacttat gagcaactcc ttacttcggg tctctgatt 9360
 tcaaggccat attttaaaaa atcaaaaggc actgtgaact attttgaaga aaacacgaca 9420
 ttttaataca gattgaaagg acctctctg aagctagaaa caatctatag ttatacatct 9480
 tcattaatac tgtgttacct tttaaaatag taatttttta cattttctctg tgtaaaccta 9540
 attgtggtag aaatttttac caactctata ctcaatcaag caaaatttct gtatattccc 9600

tgtggaatgt acctatgtga gtttcagaaa ttctcaaaat acgtgttcaa aaatttctgc 9660
 ttttgcattct ttgggacacc tcagaaaact tattaacaac tgtgaatatg agaaatacag 9720
 aagaaaaataa taagccctct atacataaat gccagcaca attcattgtt aaaaaacaac 9780
 caaacctcac actactgtat ttcattatct gtactgaaag caaatgcttt gtgactatta 9840
 aatgttgcaac atcattcatt cactgtatag taatcattga cttaaagccat ttgctgtgtt 9900
 ttcttcttgt ggntgnatat atcaggtaaa atattttcca aagagccatg tgcatgttaa 9960
 tactgaaccc tttgatattg agacattaat ttggaccctt ggtattatct actagaataa 10020
 tgtaatactg nagaaatatt gctctaattc ttcaaaaatg gtgcatcccc cttaaaangt 10080
 tctattttcca taaggattta gcttgcttat cccttcttat accctaagat gaagctgttt 10140
 ttgtgctctt tggctcatcat tggccctcat tccaagcact ttacgctgtc tgtaatggga 10200
 tctatttttg cactggaata tctgagaatt gcaaaactag acaaaagttt cacaacagat 10260
 ttctaagtta aatcattttc attaaaagga aaaaagaaaa aaaattttgt atgtcaataa 10320
 ctttatatga agtattaaaa tgcataattc tatgttgtaa tataatgagt cacaaaaataa 10380
 agctgtgaca gttctgttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 10440
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 10474

<210> 8

<211> 2261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Ala Cys Trp Pro Gln Leu Arg Leu Leu Leu Trp Lys Asn Leu Thr

1 5 10 15

Phe Arg Arg Arg Gln Thr Cys Gln Leu Leu Leu Glu Val Ala Trp Pro

20 25 30

Leu Phe Ile Phe Leu Ile Leu Ile Ser Val Arg Leu Ser Tyr Pro Pro
 35 40 45

Tyr Glu Gln His Glu Cys His Phe Pro Asn Lys Ala Met Pro Ser Ala
 50 55 60

Gly Thr Leu Pro Trp Val Gln Gly Ile Ile Cys Asn Ala Asn Asn Pro
 65 70 75 80

Cys Phe Arg Tyr Pro Thr Pro Gly Glu Ala Pro Gly Val Val Gly Asn
 85 90 95

Phe Asn Lys Ser Ile Val Ala Arg Leu Phe Ser Asp Ala Arg Arg Leu
 100 105 110

Leu Leu Tyr Ser Gln Lys Asp Thr Ser Met Lys Asp Met Arg Lys Val
 115 120 125

Leu Arg Thr Leu Gln Gln Ile Lys Lys Ser Ser Ser Asn Leu Lys Leu
 130 135 140

Gln Asp Phe Leu Val Asp Asn Glu Thr Phe Ser Gly Phe Leu Tyr His
 145 150 155 160

Asn Leu Ser Leu Pro Lys Ser Thr Val Asp Lys Met Leu Arg Ala Asp
 165 170 175

Val Ile Leu His Lys Val Phe Leu Gln Gly Tyr Gln Leu His Leu Thr
 180 185 190

Ser Leu Cys Asn Gly Ser Lys Ser Glu Glu Met Ile Gln Leu Gly Asp
 195 200 205

Gln Glu Val Ser Glu Leu Cys Gly Leu Pro Lys Glu Lys Leu Ala Ala
 210 215 220

Ala Glu Arg Val Leu Arg Ser Asn Met Asp Ile Leu Lys Pro Ile Leu
 225 230 235 240

Arg Thr Leu Asn Ser Thr Ser Pro Phe Pro Ser Lys Glu Leu Ala Glu
 245 250 255

Ala Thr Lys Thr Leu Leu His Ser Leu Gly Thr Leu Ala Gln Glu Leu
 260 265 270

Phe Ser Met Arg Ser Trp Ser Asp Met Arg Gln Glu Val Met Phe Leu
 275 280 285

Thr Asn Val Asn Ser Ser Ser Ser Thr Gln Ile Tyr Gln Ala Val
 290 295 300

Ser Arg Ile Val Cys Gly His Pro Glu Gly Gly Gly Leu Lys Ile Lys
 305 310 315 320

Ser Leu Asn Trp Tyr Glu Asp Asn Asn Tyr Lys Ala Leu Phe Gly Gly
 325 330 335

Asn Gly Thr Glu Glu Asp Ala Glu Thr Phe Tyr Asp Asn Ser Thr Thr
 340 345 350

Pro Tyr Cys Asn Asp Leu Met Lys Asn Leu Glu Ser Ser Pro Leu Ser
 355 360 365

Arg Ile Ile Trp Lys Ala Leu Lys Pro Leu Leu Val Gly Lys Ile Leu
 370 375 380

Tyr Thr Pro Asp Thr Pro Ala Thr Arg Gln Val Met Ala Glu Val Asn
 385 390 395 400

Lys Thr Phe Gln Glu Leu Ala Val Phe His Asp Leu Glu Gly Met Trp
 405 410 415

Glu Glu Leu Ser Pro Lys Ile Trp Thr Phe Met Glu Asn Ser Gln Glu
 420 425 430

Met Asp Leu Val Arg Met Leu Leu Asp Ser Arg Asp Asn Asp His Phe
 435 440 445

Trp Glu Gln Gln Leu Asp Gly Leu Asp Trp Thr Ala Gln Asp Ile Val
 450 455 460

Ala Phe Leu Ala Lys His Pro Glu Asp Val Gln Ser Ser Asn Gly Ser
 465 470 475 480

Val Tyr Thr Trp Arg Glu Ala Phe Asn Glu Thr Asn Gln Ala Ile Arg
 485 490 495

Thr Ile Ser Arg Phe Met Glu Cys Val Asn Leu Asn Lys Leu Glu Pro
 500 505 510

Ile Ala Thr Glu Val Trp Leu Ile Asn Lys Ser Met Glu Leu Leu Asp
 515 520 525

Glu Arg Lys Phe Trp Ala Gly Ile Val Phe Thr Gly Ile Thr Pro Gly
 530 535 540

Ser Ile Glu Leu Pro His His Val Lys Tyr Lys Ile Arg Met Asp Ile
 545 550 555 560

Asp Asn Val Glu Arg Thr Asn Lys Ile Lys Asp Gly Tyr Trp Asp Pro
 565 570 575

Gly Pro Arg Ala Asp Pro Phe Glu Asp Met Arg Tyr Val Trp Gly Gly
 580 585 590

Phe Ala Tyr Leu Arg Asp Val Val Glu Gln Ala Ile Ile Arg Val Leu
 595 600 605

Thr Gly Thr Glu Lys Lys Thr Gly Val Tyr Met Gln Gln Met Pro Tyr
 610 615 620

Pro Cys Tyr Val Asp Asp Ile Phe Leu Arg Val Met Ser Arg Ser Met
 625 630 635 640

Pro Leu Phe Met Thr Leu Ala Trp Ile Tyr Ser Val Ala Val Ile Ile
 645 650 655

Lys Gly Ile Val Tyr Glu Lys Glu Ala Arg Leu Lys Glu Thr Met Arg
 660 665 670

Ile Met Gly Leu Asp Asn Ser Ile Leu Trp Phe Ser Trp Phe Ile Ser
 675 680 685

Ser Leu Ile Pro Leu Leu Val Ser Ala Gly Leu Leu Val Val Ile Leu
 690 695 700

Lys Leu Gly Asn Leu Leu Pro Tyr Ser Asp Pro Ser Val Val Phe Val
 705 710 715 720

Phe Leu Ser Val Phe Ala Val Val Thr Ile Leu Gln Cys Phe Leu Ile
 725 730 735

Ser Thr Leu Phe Ser Arg Ala Asn Leu Ala Ala Ala Cys Gly Gly Ile
 740 745 750

Ile Tyr Phe Thr Leu Tyr Leu Pro Tyr Val Leu Cys Val Ala Trp Gln
 755 760 765

Asp Tyr Val Gly Phe Thr Leu Lys Ile Phe Ala Ser Leu Leu Ser Pro
 770 775 780

Val Ala Phe Gly Phe Gly Cys Glu Tyr Phe Ala Leu Phe Glu Glu Gln
 785 790 795 800

Gly Ile Gly Val Gln Trp Asp Asn Leu Phe Glu Ser Pro Val Glu Glu
 805 810 815

Asp Gly Phe Asn Leu Thr Thr Ser Ile Ser Met Met Leu Phe Asp Thr
 820 825 830

Phe Leu Tyr Gly Val Met Thr Trp Tyr Ile Glu Ala Val Phe Pro Gly
 835 840 845

Gln Tyr Gly Ile Pro Arg Pro Trp Tyr Phe Pro Cys Thr Lys Ser Tyr
 850 855 860

Trp Phe Gly Glu Glu Ser Asp Glu Lys Ser His Pro Gly Ser Asn Gln
 865 870 875 880

Lys Arg Met Ser Glu Ile Cys Met Glu Glu Glu Pro Thr His Leu Lys
 885 890 895

Leu Gly Val Ser Ile Gln Asn Leu Val Lys Val Tyr Arg Asp Gly Met
 900 905 910

Lys Val Ala Val Asp Gly Leu Ala Leu Asn Phe Tyr Glu Gly Gln Ile
 915 920 925

Thr Ser Phe Leu Gly His Asn Gly Ala Gly Lys Thr Thr Thr Met Ser
 930 935 940

Ile Leu Thr Gly Leu Phe Pro Pro Thr Ser Gly Thr Ala Tyr Ile Leu
 945 950 955 960

Gly Lys Asp Ile Arg Ser Glu Met Ser Thr Ile Arg Gln Asn Leu Gly
 965 970 975

Val Cys Pro Gln His Asn Val Leu Phe Asp Met Leu Thr Val Glu Glu
 980 985 990

His Ile Trp Phe Tyr Ala Arg Leu Lys Gly Leu Ser Glu Lys His Val
 995 1000 1005

Lys Ala Glu Met Glu Gln Met Ala Leu Asp Val Gly Leu Pro Ser Ser
 1010 1015 1020

Lys Leu Lys Ser Lys Thr Ser Gln Leu Ser Gly Gly Met Gln Arg Lys
 1025 1030 1035 1040

Leu Ser Val Ala Leu Ala Phe Val Gly Gly Ser Lys Val Val Ile Leu
 1045 1050 1055

Asp Glu Pro Thr Ala Gly Val Asp Pro Tyr Ser Arg Arg Gly Ile Trp
 1060 1065 1070

Glu Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Gln Gly Arg Thr Ile Ile Leu Ser Thr
 1075 1080 1085

His His Met Asp Glu Ala Asp Val Leu Gly Asp Arg Ile Ala Ile Ile
 1090 1095 1100

Ser His Gly Lys Leu Cys Cys Val Gly Ser Ser Leu Phe Leu Lys Asn
 1105 1110 1115 1120

Gln Leu Gly Thr Gly Tyr Tyr Leu Thr Leu Val Lys Lys Asp Val Glu
 1125 1130 1135

Ser Ser Leu Ser Ser Cys Arg Asn Ser Ser Ser Thr Val Ser Tyr Leu
 1140 1145 1150

Lys Lys Glu Asp Ser Val Ser Gln Ser Ser Ser Asp Ala Gly Leu Gly
 1155 1160 1165

Ser Asp His Glu Ser Asp Thr Leu Thr Ile Asp Val Ser Ala Ile Ser
 1170 1175 1180

Asn Leu Ile Arg Lys His Val Ser Glu Ala Arg Leu Val Glu Asp Ile
 1185 1190 1195 1200

Gly His Glu Leu Thr Tyr Val Leu Pro Tyr Glu Ala Ala Lys Glu Gly
 1205 1210 1215

Ala Phe Val Glu Leu Phe His Glu Ile Asp Asp Arg Leu Ser Asp Leu
 1220 1225 1230

Gly Ile Ser Ser Tyr Gly Ile Ser Glu Thr Thr Leu Glu Glu Ile Phe
 1235 1240 1245

Leu Lys Val Ala Glu Glu Ser Gly Val Asp Ala Glu Thr Ser Asp Gly
 1250 1255 1260

Thr Leu Pro Ala Arg Arg Asn Arg Arg Ala Phe Gly Asp Lys Gln Ser
 1265 1270 1275 1280

Cys Leu Arg Pro Phe Thr Glu Asp Asp Ala Ala Asp Pro Asn Asp Ser
 1285 1290 1295

Asp Ile Asp Pro Glu Ser Arg Glu Thr Asp Leu Leu Ser Gly Met Asp
 1300 1305 1310

Gly Lys Gly Ser Tyr Gln Val Lys Gly Trp Lys Leu Thr Gln Gln Gln
 1315 1320 1325

Phe Val Ala Leu Leu Trp Lys Arg Leu Leu Ile Ala Arg Arg Ser Arg
 1330 1335 1340

Lys Gly Phe Phe Ala Gln Ile Val Leu Pro Ala Val Phe Val Cys Ile
 1345 1350 1355 1360

Ala Leu Val Phe Ser Leu Ile Val Pro Pro Phe Gly Lys Tyr Pro Ser
 1365 1370 1375

Leu Glu Leu Gln Pro Trp Met Tyr Asn Glu Gln Tyr Thr Phe Val Ser
 1380 1385 1390

Asn Asp Ala Pro Glu Asp Thr Gly Thr Leu Glu Leu Leu Asn Ala Leu
 1395 1400 1405

Thr Lys Asp Pro Gly Phe Gly Thr Arg Cys Met Glu Gly Asn Pro Ile
 1410 1415 1420

Pro Asp Thr Pro Cys Gln Ala Gly Glu Glu Glu Trp Thr Thr Ala Pro
 1425 1430 1435 1440

Val Pro Gln Thr Ile Met Asp Leu Phe Gln Asn Gly Asn Trp Thr Met
 1445 1450 1455

Gln Asn Pro Ser Pro Ala Cys Gln Cys Ser Ser Asp Lys Ile Lys Lys
 1460 1465 1470

Met Leu Pro Val Cys Pro Pro Gly Ala Gly Gly Leu Pro Pro Pro Gln
 1475 1480 1485

Arg Lys Gln Asn Thr Ala Asp Ile Leu Gln Asp Leu Thr Gly Arg Asn
 1490 1495 1500

Ile Ser Asp Tyr Leu Val Lys Thr Tyr Val Gln Ile Ile Ala Lys Ser
 1505 1510 1515 1520

Leu Lys Asn Lys Ile Trp Val Asn Glu Phe Arg Tyr Gly Gly Phe Ser
 1525 1530 1535

Leu Gly Val Ser Asn Thr Gln Ala Leu Pro Pro Ser Gln Glu Val Asn
 1540 1545 1550

Asp Ala Ile Lys Gln Met Lys Lys His Leu Lys Leu Ala Lys Asp Ser
 1555 1560 1565

Ser Ala Asp Arg Phe Leu Asn Ser Leu Gly Arg Phe Met Thr Gly Leu
 1570 1575 1580

Asp Thr Arg Asn Asn Val Lys Val Trp Phe Asn Asn Lys Gly Trp His
 1585 1590 1595 1600

Ala Ile Ser Ser Phe Leu Asn Val Ile Asn Asn Ala Ile Leu Arg Ala
 1605 1610 1615

Asn Leu Gln Lys Gly Glu Asn Pro Ser His Tyr Gly Ile Thr Ala Phe
 1620 1625 1630

Asn His Pro Leu Asn Leu Thr Lys Gln Gln Leu Ser Glu Val Ala Leu
 1635 1640 1645

Met Thr Thr Ser Val Asp Val Leu Val Ser Ile Cys Val Ile Phe Ala
 1650 1655 1660

Met Ser Phe Val Pro Ala Ser Phe Val Val Phe Leu Ile Gln Glu Arg
 1665 1670 1675 1680

Val Ser Lys Ala Lys His Leu Gln Phe Ile Ser Gly Val Lys Pro Val
 1685 1690 1695

Ile Tyr Trp Leu Ser Asn Phe Val Trp Asp Met Cys Asn Tyr Val Val
 1700 1705 1710

Pro Ala Thr Leu Val Ile Ile Ile Phe Ile Cys Phe Gln Gln Lys Ser
 1715 1720 1725

Tyr Val Ser Ser Thr Asn Leu Pro Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu
 1730 1735 1740

Tyr Gly Trp Ser Ile Thr Pro Leu Met Tyr Pro Ala Ser Phe Val Phe
 1745 1750 1755 1760

Lys Ile Pro Ser Thr Ala Tyr Val Val Leu Thr Ser Val Asn Leu Phe
 1765 1770 1775

Ile Gly Ile Asn Gly Ser Val Ala Thr Phe Val Leu Glu Leu Phe Thr
 1780 1785 1790

Asp Asn Lys Leu Asn Asn Ile Asn Asp Ile Leu Lys Ser Val Phe Leu
 1795 1800 1805

Ile Phe Pro His Phe Cys Leu Gly Arg Gly Leu Ile Asp Met Val Lys
 1810 1815 1820

Asn Gln Ala Met Ala Asp Ala Leu Glu Arg Phe Gly Glu Asn Arg Phe
 1825 1830 1835 1840

Val Ser Pro Leu Ser Trp Asp Leu Val Gly Arg Asn Leu Phe Ala Met
 1845 1850 1855

Ala Val Glu Gly Val Val Phe Phe Leu Ile Thr Val Leu Ile Gln Tyr

1860

1865

1870

Arg Phe Phe Ile Arg Pro Arg Pro Val Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu

1875

1880

1885

Asn Asp Glu Asp Glu Asp Val Arg Arg Glu Arg Gln Arg Ile Leu Asp

1890

1895

1900

Gly Gly Gly Gln Asn Asp Ile Leu Glu Ile Lys Glu Leu Thr Lys Ile

1905

1910

1915

1920

Tyr Arg Arg Lys Arg Lys Pro Ala Val Asp Arg Ile Cys Val Gly Ile

1925

1930

1935

Pro Pro Gly Glu Cys Phe Gly Leu Leu Gly Val Asn Gly Ala Gly Lys

1940

1945

1950

Ser Ser Thr Phe Lys Met Leu Thr Gly Asp Thr Thr Val Thr Arg Gly

1955

1960

1965

Asp Ala Phe Leu Asn Lys Asn Ser Ile Leu Ser Asn Ile His Glu Val

1970

1975

1980

His Gln Asn Met Gly Tyr Cys Pro Gln Phe Asp Ala Ile Thr Glu Leu

1985

1990

1995

2000

Leu Thr Gly Arg Glu His Val Glu Phe Phe Ala Leu Leu Arg Gly Val

2005

2010

2015

Pro Glu Lys Glu Val Gly Lys Val Gly Glu Trp Ala Ile Arg Lys Leu
2020 2025 2030

Gly Leu Val Lys Tyr Gly Glu Lys Tyr Ala Gly Asn Tyr Ser Gly Gly
2035 2040 2045

Asn Lys Arg Lys Leu Ser Thr Ala Met Ala Leu Ile Gly Gly Pro Pro
2050 2055 2060

Val Val Phe Leu Asp Glu Pro Thr Thr Gly Met Asp Pro Lys Ala Arg
2065 2070 2075 2080

Arg Phe Leu Trp Asn Cys Ala Leu Ser Val Val Lys Glu Gly Arg Ser
2085 2090 2095

Val Val Leu Thr Ser His Ser Met Glu Glu Cys Glu Ala Leu Cys Thr
2100 2105 2110

Arg Met Ala Ile Met Val Asn Gly Arg Phe Arg Cys Leu Gly Ser Val
2115 2120 2125

Gln His Leu Lys Asn Arg Phe Gly Asp Gly Tyr Thr Ile Val Val Arg
2130 2135 2140

Ile Ala Gly Ser Asn Pro Asp Leu Lys Pro Val Gln Asp Phe Phe Gly
2145 2150 2155 2160

Leu Ala Phe Pro Gly Ser Val Leu Lys Glu Lys His Arg Asn Met Leu
2165 2170 2175

Gln Tyr Gln Leu Pro Ser Ser Leu Ser Ser Leu Ala Arg Ile Phe Ser
2180 2185 2190

Ile Leu Ser Gln Ser Lys Lys Arg Leu His Ile Glu Asp Tyr Ser Val
2195 2200 2205

Ser Gln Thr Thr Leu Asp Gln Val Phe Val Asn Phe Ala Lys Asp Gln
2210 2215 2220

Ser Asp Asp Asp His Leu Lys Asp Leu Ser Leu His Lys Asn Gln Thr
2225 2230 2235 2240

Val Val Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Phe Leu Gln Asp Glu Lys Val
2245 2250 2255

Lys Glu Ser Tyr Val
2260

<210> 9

<211> 10474

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

tctagaactg ggtaccagct gctagcaagc ttcggcacga gccgcagagc cgagccgacc 60

cttctctccc gggctgcggc agggcagggc ggggagctcc gcgcaccaac agagccgggt 120
 ctcagggcgc tttgctcctt gttttttccc cggttctgtt ttctccoctt ctccggaagg 180
 cttgtcaagg ggtaggagaa agagacgcaa acacaaaagt ggaaaacagt taatgaccag 240
 ccacgggcgt ccttgcctgt agctctggcc gctgccttcc agggctcccg agccacacgc 300
 tgggctgtct ggctgaggga acatggcttg ttggcctcag ctgaggttgc tgctgtggaa 360
 gaacctcact ttcagaagaa gacaaacatg tcagctgtta ctggaagtgg cctggcctct 420
 atttatcttc ctgatcctga tctctgttcg gctgagctac ccacctatg aacaacatga 480
 atgccatttt ccaaataaag ccattgccctc tgcaggaaca ctctcttggg ttcaggggat 540
 tatctgtaat gccacaacc cctgtttccg ttacccgact cctggggagg ctcccgaggt 600
 tggttgaaac ttaacaaat ccattgtggc tcgcctgttc tcagatgttc ggaggttct 660
 ttatacagc cagaaagaca ccagcatgaa ggacatgcgc aaagtctga gaacattaca 720
 gcagatcaag aaatccagct caaactgaa gcttcaagat ttctgtgtgg acaatgaaac 780
 cttctctggg ttcttatatc acaacctctc tctcccaaag tctactgtgg acaagatgct 840
 gagggctgat gtcattctcc acaaggtatt ttgcaaggc taccagttac atttgacaag 900
 tctgtgcaat ggatcaaaat cagaagagat gattcaactt ggtgaccaag aagtttctga 960
 gctttgtggc ctaccaagg agaaactggc tgcagcagag cgagtacttc gttccaacat 1020
 ggacatcctg aagccaatcc tgagaacact aaactctaca tctcccttcc cgagcaagga 1080
 gctggctgaa gccacaaaaa cattgctgca tagtcttggg actctggccc aggagctgtt 1140
 cagcatgaga agctggagtg acatgcgaca ggaggtgatg tttctgacca atgtgaacag 1200
 ctccagctcc tccacccaaa tctaccaggc tgtgtctcgt attgtctgcg ggcatcccg 1260
 gggagggggg ctgaagatca agtctctcaa ctggtatgag gacaacaact acaaagccct 1320
 ctttgagggc aatggcactg aggaagatgc tgaaaccttc tatgacaact ctacaactcc 1380
 ttactgcaat gatttgatga agaatttgga gtctagtctt ctttcccgca ttatctggaa 1440
 agctctgaag ccgctgctcg ttgggaagat cctgtataca cctgacactc cagccacaag 1500
 gcaggctcat gctgaggtga acaagacctt ccaggaactg gctgtgttcc atgatctgga 1560
 aggcattgtg gaggaactca gcccgaagat ctggaccttc atggagaaca gccaaagaaat 1620
 ggaccttgct cggatgctgt tggacagcag ggacaatgac cacttttggg aacagcagtt 1680
 ggatggctta gattggacag cccaagacat cgtggcgttt ttggccaagc acccagagga 1740

tgtccagtc agtaatggtt ctgtgtacac ctggagagaa gctttcaacg agactaacca 1800
ggcaatccgg accatatctc gcttcatgga gtgtgtcaac ctgaacaagc tagaacccat 1860
agcaacagaa gtctggctca tcaacaagtc catggagctg ctggatgaga ggaagttctg 1920
ggctgggtatt gtgttcactg gaattactcc aggcagcatt gagctgcccc atcatgtcaa 1980
gtacaagatc cgaatggaca ttgacaatgt ggagaggaca aataaaatca aggatgggta 2040
ctgggaccct ggtcctcgag ctgacccctt tgaggacatg tggtagctot gggggggctt 2100
cgcctacttg caggatgtgg tggagcaggc aatcatcagg gtgctgacgg gcaccgagaa 2160
gaaaactggt gtctatatgc aacagatgcc ctatccctgt tacgttgatg acatctttct 2220
gcgggtgatg agccggtcaa tgcctctctt catgacgctg gcctggattt actcagtggc 2280
tgtgatcatc aagggcacg tgtagagaa ggaggcacgg ctgaaagaga ccatgcggat 2340
catgggcctg gacaacagca tactctggtt tagctgggtc attagtagcc tcattcctct 2400
tcttgtagc gctggcctgc tagtggctat cctgaagtta ggaaacctgc tgccctacag 2460
tgatccacg gtggtgtttg tcttcctgtc cgtgtttgct gtggtgacaa tctgacgtg 2520
cttctgatt agcacactct tctccagagc caacctggca gcagcctgtg ggggcatcat 2580
ctacttcacg ctgtacctgc cctacgtcct gtgtgtggca tggcaggact acgtgggctt 2640
cacactcaag atcttctgta gcctgctgtc tctgtggct tttgggtttg gctgtgagta 2700
ctttgccctt tttagaggagc agggcattgg agtgcagtgg gacaacctgt ttgagagtc 2760
tgtggaggaa gatggcttca atctcaccac ttcatctcc atgatgctgt ttgacacct 2820
cctctatggg gtgatgacct ggtacattga ggctgtctt ccaggccagt acggaattcc 2880
caggccctgg tattttcctt gcaccaagtc ctactggttt ggcgaggaaa gtgatgagaa 2940
gagccacctt ggttccaacc agaagagaat gtcagaaatc tgcatggagg aggaaccac 3000
ccacttgaag ctgggcgtgt ccattcagaa cctggtaaaa gtctaccgag atgggatgaa 3060
gggtggctgt gatggcctgg cactgaattt ttatgagggc cagatcacct ccttctggg 3120
ccacaatgga gcggggaaga cgaccacct gtcaatcctg accgggttgt tcccccgac 3180
ctcgggcacc gcctacatcc tgggaaaaga cattcgtctt gagatgagca ccatccggca 3240
gaacctgggg gtctgtcccc agcataacgt gctgtttgac atgctgactg tcgaagaaca 3300
catctgggtc tatgcccgct tgaaagggt ctctgagaag cacgtgaagg cggagatgga 3360
gcagatggcc ctggatgttg gtttgccatc aagcaagctg aaaagcaaaa caagccagct 3420
gtcaggtgga atgcagagaa agctatctgt ggccttggcc ttgtcgggg gatctaaggt 3480

tgtcattctg gatgaaccca cagctggtgt ggacccttac tcccgcaggg gaatatggga 3540
gctgctgctg aaataccgac aaggccgcac cattattctc tctacacacc acatggatga 3600
agcggacgtc ctgggggaca ggattgccat catctcccat gggaaagctgt gctgtgtggg 3660
ctcctccctg tttctgaaga accagctggg aacaggctac tacctgacct tggtaagaa 3720
agatgtggaa tctccctca gtccctgcag aaacagtagt agcactgtgt catacctgaa 3780
aaaggaggac agtggtttctc agagcagttc tgatgctggc ctgggcagcg accatgagag 3840
tgacacgctg accatcgatg tctctgctat ctccaacctc atcaggaagc atgtgtctga 3900
agcccgctg gtggaagaca tagggcatga gctgacctat gtgctgccat atgaagctgc 3960
taaggaggga gcctttgtgg aactctttca tgagattgat gaccggctct cagacctggg 4020
catttctagt tatggcatct cagagacgac cctggaagaa atattcctca aggtggccga 4080
agagagtggg gtggatgctg agacctcaga tggtaacctg ccagcaagac gaaacaggcg 4140
ggccttcggg gacaagcaga gctgtcttcg cccgttcact gaagatgatg ctgctgatcc 4200
aatgattctt gacatagacc cagaatccag agagacagac ttgctcagtg ggatggatgg 4260
caaagggtcc taccaggtga aaggctggaa acttacacag caacagtttg tggccctttt 4320
gtggaagaga ctgctaattg ccagacggag tcggaaagga ttttttgctc agattgtctt 4380
gccagctgtg tttgtctgca ttgcccttgt gtccagcctg atcgtgccac cctttggcaa 4440
gtacccacgc ctggaacttc agccctggat gtacaacgaa cagtacacat ttgtcagcaa 4500
tgatgctcct gaggacacgg gaacctgga actcttaaac gccctcacca aagacctgg 4560
cttcgggacc cgctgtatgg aaggaaaccc aatcccagac acgccctgcc aggcagggga 4620
ggaagagtgg accactgcc cagttcccca gaccatcatg gacctcttc agaatgggaa 4680
ctggacaatg cagaacctt cacctgcatg ccagtgtagc agcgacaaaa tcaagaagat 4740
gctgcctgtg tgtcccccag gggcagggg gctgcctcct ccacaaagaa aacaaaacac 4800
tgcagatata cttcaggacc tgacaggaag aaacatttcg gattatctgg tgaagacgta 4860
tgtgcagatc atagccaaaa gcttaaagaa caagatctgg gtgaatgagt ttaggtatgg 4920
cggcttttcc ctgggtgtca gtaatactca agcacttcct ccgagtcaag aagttaatga 4980
tgccatcaaa caaatgaaga aacacctaaa gctggccaag gacagtctg cagatcgatt 5040
tctcaacagc ttgggaagat ttatgacagg actggacacc agaaataatg tcaaggtgtg 5100
gttcaataac aagggtctggc atgcaatcag ctctttcctg aatgtcatca acaatgccat 5160

tctccggggc aacctgcaaa agggagagaa ccttagccat tatggaatta ctgctttcaa 5220
tcacccctg aatctcacca agcagcagct ctcagagggtg gctctgatga ccacatcagt 5280
ggatgtcctt gtgtccatct gtgtcatctt tgcaatgtcc ttctgtcccag ccagctttgt 5340
cgtattcctg atccaggagc gggtcagcaa agcaaaacac ctgcagttca tcagtggagt 5400
gaagcctgtc atctactggc tctctaattt tgtctgggat atgtgcaatt acgttgtccc 5460
tgccacactg gtcattatca tcttcactctg cttccagcag aagtcctatg tgtcctccac 5520
caatctgcct gtgctagccc ttctactttt gctgtatggg tggtaaatca cactctcat 5580
gtacccagcc tccttttgtt tcaagatccc cagcacagcc tatgtggtgc tcaccagcgt 5640
gaacctcttc attggcatta atggcagcgt ggccaccttt gtgctggagc tgttcaccga 5700
caataagctg aataatatca atgatatcct gaagtcctg ttcttgatct tcccacattt 5760
ttgcctggga cgagggtca tcgacatggt gaaaaaccag gcaatggctg atgccttga 5820
aagggttggg gagaatcgtt ttgtgtcacc attatcttgg gacttggtgg gacgaaacct 5880
cttcgccatg gcctggaag ggggtggtgtt cttcctcatt actgttctga tccagtacag 5940
attcttcate aggccagac ctgtaaatgc aaagctatct cctctgaatg atgaagatga 6000
agatgtgagg cgggaaagac agagaattct tgatgggtga ggccagaatg acatcttaga 6060
aatcaaggag ttgacgaaga tatatagaag gaagcggaag cctgctgttg acaggatttg 6120
cgtgggcatt cctcctggtg agtgctttgg gctcctggga gttaatgggg ctggaaaatc 6180
atcaacttcc aagatgttaa caggagatac cactgttacc agaggagatg ctttccttaa 6240
caaaaatagt atcttatcaa acatccatga agtacatcag aacatgggct actgccttca 6300
gtttgatgcc atcacagagc tgttgactgg gagagaacac gtggagttct ttgccctttt 6360
gagaggagtc ccagagaaaag aagttggcaa ggttggtgag tgggcgattc ggaaactggg 6420
cctcgtgaag tatggagaaa aatatgctgg taactatagt ggaggcaaca aacgcaagct 6480
ctctacagcc atggctttga tcggcggggc tctgtggtg tttctggatg aaccaccac 6540
aggcatggat cccaaagccc ggcggttctt gtggaattgt gccctaagtg ttgtcaagga 6600
ggggagatca gtagtgctta catctcatag tatggaagaa tgtgaagctc tttgcactag 6660
gatggcaatc atggtcaatg gaaggttcag gtgccttggc agtgtccagc atctaaaaaa 6720
taggtttgga gatggttata caatagttgt acgaatagca gggccaacc cggacctgaa 6780
gcctgtccag gatttctttg gacttgcatc tcttgaagt gttctaaaag agaaacaccg 6840
gaacatgcta caataccagc ttccatcttc attatcttct ctggccagga tattcagcat 6900

cctctcccag agcaaaaagc gactccacat agaagactac tctgtttctc agacaacact 6960
tgaccaagta tttgtgaact ttgccaagga ccaaagtgat gatgaccact taaaagacct 7020
ctcattacac aaaaaccaga cagtagtgga cgttgacgtt ctcacatctt ttctacagga 7080
tgagaaagtg aaagaaagct atgtatgaag aatcctgttc atacgggggtg gctgaaagta 7140
aagaggaact agactttcct ttgcaccatg tgaagtgttg tggagaaaag agccagaagt 7200
tgatgtggga agaagtaaac tggatactgt actgatacta ttcaatgcaa tgcaattcaa 7260
tgcaatgaaa acaaaattcc attacagggg cagtgccttt gtagcctatg tcttgtatgg 7320
ctctcaagtg aaagacttga atttagtttt ttacctatac ctatgtgaaa ctctattatg 7380
gaacccaatg gacatatggg ttgaaactca cacttttttt ttttttttgt tctgtgtat 7440
tctcattggg gttgcaaca taattcatca agtaatcatg gccagcgatt attgatcaaa 7500
atcaaaaggt aatgcacatc ctcatcact aagccatgcc atgccagga gactggtttc 7560
ccggtgacac atccattgct ggcaatgagt gtgccagagt tattagtgcc aagtttttca 7620
gaaagtttga agcaccatgg tgtgtcatgc tcacttttgt gaaagctgct ctgctcagag 7680
tctatcaaca ttgaatatca gttgacagaa tgggtgccatg cgtggctaac atcctgcttt 7740
gattccctct gataagctgt tctgggtggca gtaacatgca acaaaaatgt ggggtgtctct 7800
aggcacggga aacttggttc cattgttata ttgtcctatg ctctgagcca tgggtctaca 7860
gggtcatcct tatgagactc ttaaatatac ttagatcctg gtaagaggca aagaatcaac 7920
agccaaactg ctggggctgc aagctgctga agccagggca tgggattaaa gagattgtgc 7980
gttcaaactt agggaagcct gtgcccattt gtcttgactg tctgctaaca tggtaactg 8040
catctcaaga tgtttatctg acacaagtgt attatttctg gctttttgaa ttaatctaga 8100
aaatgaaaag atggagttgt attttgacaa aaatgtttgt actttttaat gttatttggga 8160
attttaagtt ctatcagtga cttctgaatc cttagaatgg cctcttttga gaaccctgtg 8220
gtatagagga gtatggccac tgcccacta tttttatatt cttatgtaag ttgcatatc 8280
agtcatgact agtgcctaga aagcaatgtg atggtcagga tctcatgaca ttatatattga 8340
gtttctttca gatcatttag gatactctta atctcacttc atcaatcaaa tattttttga 8400
gtgtatgctg tagctgaaag agtatgtacg tacgtataag actagagaga tattaagtct 8460
cagtacactt cctgtgccat gttatttcagc tcactgggtt acaaatatag gttgtcttgt 8520
ggttgtagga gcccaactga acaatattgg gcagcctttt tttttttttt ttaattgcaa 8580

caatgcaaaa gccaaagaaag tataaggggtc acaagtttaa acaatgaatt cttcaacagg 8640
gaaaacagct agcttgaaaa cttgctgaaa aacacaactt gtgtttatgg catttagtac 8700
cttcaataa ttggctttgc agatattgga taccattta aatctgacag tctcaaat 8760
ttcatctctt caatcactag tcaagaaaaa tataaaaaa acaaatactt ccatatggag 8820
catttttcag agttttctaa ccagttctta tttttctagt cagtaaacat ttgtaaaaat 8880
actgtttcac taatacttac tgttaactgt cttgagagaa aagaaaaata tgagagaact 8940
attgtttggg gaagttcaag tgatctttca atatcattac taacttcttc cactttttcc 9000
aaaatttgaa tattaacgct aaaggtgtaa gacttcagat ttcaaattaa tctttctata 9060
ttttttaaat ttacagaata ttatataacc cactgctgaa aaagaaaaa atgattgttt 9120
tagaagttaa agtcaatatt gatttttaaat ataagtaatg aaggcatatt tccaataact 9180
agtgatatgg catcggtgca atttacagta tcttcaaaaa tacagaattt atagaataat 9240
ttctcctcat ttaatat tcaaaatcaa agttatgggt tctcatttt actaaaatcg 9300
tattctaatt cttcattata gtaaacttat gagcaactcc ttacttcggt tctctgatt 9360
tcaaggccat attttaaaaa atcaaaaggc actgtgaact attttgaaga aaacacgaca 9420
ttttaatata gattgaaagg acctcttctg aagctagaaa caatctatag ttatacatct 9480
tcattaatac tgtgttacct tttaaaatag taatttttta cattttcctg tgtaaaccta 9540
attgtggtag aaatttttac caactctata ctcaatcaag caaaatttct gtatattccc 9600
tgtggaatgt acctatgtga gtttcagaaa ttctcaaat acgtgttcaa aaatttctgc 9660
ttttgcatct ttgggacacc tcagaaaact tattaacaac tgtgaatatg agaaatacag 9720
aagaaaaata taagccctct atacataaat gccagcaca attcattggt aaaaaacaac 9780
caaacctcac actactgtat ttcattatct gtactgaaag caaatgcttt gtgactatta 9840
aatgttgac atcattcatt cactgtatag taatcattga ctaaagccat ttgctgtgtt 9900
ttcttcttgt ggntgnatat atcaggtaaa atattttcca aagagccatg tgctcatgta 9960
tactgaaccc ttgatattg agacattaat ttggaccctt ggtattatct actagaataa 10020
tgtaatactg nagaaatatt gctctaattc tttcaaaatg gtgcatcccc cttaaaangt 10080
tctattttca taaggattta gcttgcttat ccttcttat acctaaagat gaagctgttt 10140
ttgtgctctt tgttcacat tggccctcat tccaagcact ttacgctgtc tgtaatggga 10200
tctatttttg cactggaata tctgagaatt gcaaaactag acaaaagttt cacaacagat 10260
ttctaagtta aatcattttc attaaaagga aaaaagaaaa aaaattttgt atgtcaataa 10320

ctttatatga agtattaaaa tgcataatttc tatgttgtaa tataatgagt cacaaaaataa 10380
 agctgtgaca gttctgttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 10440
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 10474

<210> 10

<211> 2261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ala Cys Trp Pro Gln Leu Arg Leu Leu Leu Trp Lys Asn Leu Thr

1 5 10 15

Phe Arg Arg Arg Gln Thr Cys Gln Leu Leu Leu Glu Val Ala Trp Pro

20 25 30

Leu Phe Ile Phe Leu Ile Leu Ile Ser Val Arg Leu Ser Tyr Pro Pro

35 40 45

Tyr Glu Gln His Glu Cys His Phe Pro Asn Lys Ala Met Pro Ser Ala

50 55 60

Gly Thr Leu Pro Trp Val Gln Gly Ile Ile Cys Asn Ala Asn Asn Pro

65 70 75 80

Cys Phe Arg Tyr Pro Thr Pro Gly Glu Ala Pro Gly Val Val Gly Asn

85 90 95

Phe Asn Lys Ser Ile Val Ala Arg Leu Phe Ser Asp Ala Arg Arg Leu

100

105

110

Leu Leu Tyr Ser Gln Lys Asp Thr Ser Met Lys Asp Met Arg Lys Val

115

120

125

Leu Arg Thr Leu Gln Gln Ile Lys Lys Ser Ser Ser Asn Leu Lys Leu

130

135

140

Gln Asp Phe Leu Val Asp Asn Glu Thr Phe Ser Gly Phe Leu Tyr His

145

150

155

160

Asn Leu Ser Leu Pro Lys Ser Thr Val Asp Lys Met Leu Arg Ala Asp

165

170

175

Val Ile Leu His Lys Val Phe Leu Gln Gly Tyr Gln Leu His Leu Thr

180

185

190

Ser Leu Cys Asn Gly Ser Lys Ser Glu Glu Met Ile Gln Leu Gly Asp

195

200

205

Gln Glu Val Ser Glu Leu Cys Gly Leu Pro Lys Glu Lys Leu Ala Ala

210

215

220

Ala Glu Arg Val Leu Arg Ser Asn Met Asp Ile Leu Lys Pro Ile Leu

225

230

235

240

Arg Thr Leu Asn Ser Thr Ser Pro Phe Pro Ser Lys Glu Leu Ala Glu

245

250

255

Ala Thr Lys Thr Leu Leu His Ser Leu Gly Thr Leu Ala Gln Glu Leu
 260 265 270

Phe Ser Met Arg Ser Trp Ser Asp Met Arg Gln Glu Val Met Phe Leu
 275 280 285

Thr Asn Val Asn Ser Ser Ser Ser Ser Thr Gln Ile Tyr Gln Ala Val
 290 295 300

Ser Arg Ile Val Cys Gly His Pro Glu Gly Gly Gly Leu Lys Ile Lys
 305 310 315 320

Ser Leu Asn Trp Tyr Glu Asp Asn Asn Tyr Lys Ala Leu Phe Gly Gly
 325 330 335

Asn Gly Thr Glu Glu Asp Ala Glu Thr Phe Tyr Asp Asn Ser Thr Thr
 340 345 350

Pro Tyr Cys Asn Asp Leu Met Lys Asn Leu Glu Ser Ser Pro Leu Ser
 355 360 365

Arg Ile Ile Trp Lys Ala Leu Lys Pro Leu Leu Val Gly Lys Ile Leu
 370 375 380

Tyr Thr Pro Asp Thr Pro Ala Thr Arg Gln Val Met Ala Glu Val Asn
 385 390 395 400

Lys Thr Phe Gln Glu Leu Ala Val Phe His Asp Leu Glu Gly Met Trp
 405 410 415

Glu Glu Leu Ser Pro Lys Ile Trp Thr Phe Met Glu Asn Ser Gln Glu
 420 425 430

Met Asp Leu Val Arg Met Leu Leu Asp Ser Arg Asp Asn Asp His Phe
 435 440 445

Trp Glu Gln Gln Leu Asp Gly Leu Asp Trp Thr Ala Gln Asp Ile Val
 450 455 460

Ala Phe Leu Ala Lys His Pro Glu Asp Val Gln Ser Ser Asn Gly Ser
 465 470 475 480

Val Tyr Thr Trp Arg Glu Ala Phe Asn Glu Thr Asn Gln Ala Ile Arg
 485 490 495

Thr Ile Ser Arg Phe Met Glu Cys Val Asn Leu Asn Lys Leu Glu Pro
 500 505 510

Ile Ala Thr Glu Val Trp Leu Ile Asn Lys Ser Met Glu Leu Leu Asp
 515 520 525

Glu Arg Lys Phe Trp Ala Gly Ile Val Phe Thr Gly Ile Thr Pro Gly
 530 535 540

Ser Ile Glu Leu Pro His His Val Lys Tyr Lys Ile Arg Met Asp Ile
 545 550 555 560

Asp Asn Val Glu Arg Thr Asn Lys Ile Lys Asp Gly Tyr Trp Asp Pro
 565 570 575

Gly Pro Arg Ala Asp Pro Phe Glu Asp Met Trp Tyr Val Trp Gly Gly
 580 585 590

Phe Ala Tyr Leu Gln Asp Val Val Glu Gln Ala Ile Ile Arg Val Leu
 595 600 605

Thr Gly Thr Glu Lys Lys Thr Gly Val Tyr Met Gln Gln Met Pro Tyr
 610 615 620

Pro Cys Tyr Val Asp Asp Ile Phe Leu Arg Val Met Ser Arg Ser Met
 625 630 635 640

Pro Leu Phe Met Thr Leu Ala Trp Ile Tyr Ser Val Ala Val Ile Ile
 645 650 655

Lys Gly Ile Val Tyr Glu Lys Glu Ala Arg Leu Lys Glu Thr Met Arg
 660 665 670

Ile Met Gly Leu Asp Asn Ser Ile Leu Trp Phe Ser Trp Phe Ile Ser
 675 680 685

Ser Leu Ile Pro Leu Leu Val Ser Ala Gly Leu Leu Val Val Ile Leu
 690 695 700

Lys Leu Gly Asn Leu Leu Pro Tyr Ser Asp Pro Ser Val Val Phe Val
 705 710 715 720

Phe Leu Ser Val Phe Ala Val Val Thr Ile Leu Gln Cys Phe Leu Ile
 725 730 735

Ser Thr Leu Phe Ser Arg Ala Asn Leu Ala Ala Ala Cys Gly Gly Ile
 740 745 750

Ile Tyr Phe Thr Leu Tyr Leu Pro Tyr Val Leu Cys Val Ala Trp Gln
 755 760 765

Asp Tyr Val Gly Phe Thr Leu Lys Ile Phe Ala Ser Leu Leu Ser Pro
 770 775 780

Val Ala Phe Gly Phe Gly Cys Glu Tyr Phe Ala Leu Phe Glu Glu Gln
 785 790 795 800

Gly Ile Gly Val Gln Trp Asp Asn Leu Phe Glu Ser Pro Val Glu Glu
 805 810 815

Asp Gly Phe Asn Leu Thr Thr Ser Ile Ser Met Met Leu Phe Asp Thr
 820 825 830

Phe Leu Tyr Gly Val Met Thr Trp Tyr Ile Glu Ala Val Phe Pro Gly
 835 840 845

Gln Tyr Gly Ile Pro Arg Pro Trp Tyr Phe Pro Cys Thr Lys Ser Tyr
 850 855 860

Trp Phe Gly Glu Glu Ser Asp Glu Lys Ser His Pro Gly Ser Asn Gln
 865 870 875 880

Lys Arg Met Ser Glu Ile Cys Met Glu Glu Glu Pro Thr His Leu Lys
 885 890 895

Leu Gly Val Ser Ile Gln Asn Leu Val Lys Val Tyr Arg Asp Gly Met
 900 905 910

Lys Val Ala Val Asp Gly Leu Ala Leu Asn Phe Tyr Glu Gly Gln Ile
 915 920 925

Thr Ser Phe Leu Gly His Asn Gly Ala Gly Lys Thr Thr Thr Met Ser
 930 935 940

Ile Leu Thr Gly Leu Phe Pro Pro Thr Ser Gly Thr Ala Tyr Ile Leu
 945 950 955 960

Gly Lys Asp Ile Arg Ser Glu Met Ser Thr Ile Arg Gln Asn Leu Gly
 965 970 975

Val Cys Pro Gln His Asn Val Leu Phe Asp Met Leu Thr Val Glu Glu
 980 985 990

His Ile Trp Phe Tyr Ala Arg Leu Lys Gly Leu Ser Glu Lys His Val
 995 1000 1005

Lys Ala Glu Met Glu Gln Met Ala Leu Asp Val Gly Leu Pro Ser Ser
 1010 1015 1020

Lys Leu Lys Ser Lys Thr Ser Gln Leu Ser Gly Gly Met Gln Arg Lys
 1025 1030 1035 1040

Leu Ser Val Ala Leu Ala Phe Val Gly Gly Ser Lys Val Val Ile Leu
 1045 1050 1055

Asp Glu Pro Thr Ala Gly Val Asp Pro Tyr Ser Arg Arg Gly Ile Trp
 1060 1065 1070

Glu Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Gln Gly Arg Thr Ile Ile Leu Ser Thr
 1075 1080 1085

His His Met Asp Glu Ala Asp Val Leu Gly Asp Arg Ile Ala Ile Ile
 1090 1095 1100

Ser His Gly Lys Leu Cys Cys Val Gly Ser Ser Leu Phe Leu Lys Asn
 1105 1110 1115 1120

Gln Leu Gly Thr Gly Tyr Tyr Leu Thr Leu Val Lys Lys Asp Val Glu
 1125 1130 1135

Ser Ser Leu Ser Ser Cys Arg Asn Ser Ser Ser Thr Val Ser Tyr Leu
 1140 1145 1150

Lys Lys Glu Asp Ser Val Ser Gln Ser Ser Ser Asp Ala Gly Leu Gly
 1155 1160 1165

Ser Asp His Glu Ser Asp Thr Leu Thr Ile Asp Val Ser Ala Ile Ser

1170

1175

1180

Asn Leu Ile Arg Lys His Val Ser Glu Ala Arg Leu Val Glu Asp Ile

1185

1190

1195

1200

Gly His Glu Leu Thr Tyr Val Leu Pro Tyr Glu Ala Ala Lys Glu Gly

1205

1210

1215

Ala Phe Val Glu Leu Phe His Glu Ile Asp Asp Arg Leu Ser Asp Leu

1220

1225

1230

Gly Ile Ser Ser Tyr Gly Ile Ser Glu Thr Thr Leu Glu Glu Ile Phe

1235

1240

1245

Leu Lys Val Ala Glu Glu Ser Gly Val Asp Ala Glu Thr Ser Asp Gly

1250

1255

1260

Thr Leu Pro Ala Arg Arg Asn Arg Arg Ala Phe Gly Asp Lys Gln Ser

1265

1270

1275

1280

Cys Leu Arg Pro Phe Thr Glu Asp Asp Ala Ala Asp Pro Asn Asp Ser

1285

1290

1295

Asp Ile Asp Pro Glu Ser Arg Glu Thr Asp Leu Leu Ser Gly Met Asp

1300

1305

1310

Gly Lys Gly Ser Tyr Gln Val Lys Gly Trp Lys Leu Thr Gln Gln Gln
 1315 1320 1325

Phe Val Ala Leu Leu Trp Lys Arg Leu Leu Ile Ala Arg Arg Ser Arg
 1330 1335 1340

Lys Gly Phe Phe Ala Gln Ile Val Leu Pro Ala Val Phe Val Cys Ile
 1345 1350 1355 1360

Ala Leu Val Phe Ser Leu Ile Val Pro Pro Phe Gly Lys Tyr Pro Ser
 1365 1370 1375

Leu Glu Leu Gln Pro Trp Met Tyr Asn Glu Gln Tyr Thr Phe Val Ser
 1380 1385 1390

Asn Asp Ala Pro Glu Asp Thr Gly Thr Leu Glu Leu Leu Asn Ala Leu
 1395 1400 1405

Thr Lys Asp Pro Gly Phe Gly Thr Arg Cys Met Glu Gly Asn Pro Ile
 1410 1415 1420

Pro Asp Thr Pro Cys Gln Ala Gly Glu Glu Glu Trp Thr Thr Ala Pro
 1425 1430 1435 1440

Val Pro Gln Thr Ile Met Asp Leu Phe Gln Asn Gly Asn Trp Thr Met
 1445 1450 1455

Gln Asn Pro Ser Pro Ala Cys Gln Cys Ser Ser Asp Lys Ile Lys Lys
 1460 1465 1470

Met Leu Pro Val Cys Pro Pro Gly Ala Gly Gly Leu Pro Pro Pro Gln
 1475 1480 1485

Arg Lys Gln Asn Thr Ala Asp Ile Leu Gln Asp Leu Thr Gly Arg Asn
 1490 1495 1500

Ile Ser Asp Tyr Leu Val Lys Thr Tyr Val Gln Ile Ile Ala Lys Ser
 1505 1510 1515 1520

Leu Lys Asn Lys Ile Trp Val Asn Glu Phe Arg Tyr Gly Gly Phe Ser
 1525 1530 1535

Leu Gly Val Ser Asn Thr Gln Ala Leu Pro Pro Ser Gln Glu Val Asn
 1540 1545 1550

Asp Ala Ile Lys Gln Met Lys Lys His Leu Lys Leu Ala Lys Asp Ser
 1555 1560 1565

Ser Ala Asp Arg Phe Leu Asn Ser Leu Gly Arg Phe Met Thr Gly Leu
 1570 1575 1580

Asp Thr Arg Asn Asn Val Lys Val Trp Phe Asn Asn Lys Gly Trp His
 1585 1590 1595 1600

Ala Ile Ser Ser Phe Leu Asn Val Ile Asn Asn Ala Ile Leu Arg Ala
 1605 1610 1615

Asn Leu Gln Lys Gly Glu Asn Pro Ser His Tyr Gly Ile Thr Ala Phe
1620 1625 1630

Asn His Pro Leu Asn Leu Thr Lys Gln Gln Leu Ser Glu Val Ala Leu
1635 1640 1645

Met Thr Thr Ser Val Asp Val Leu Val Ser Ile Cys Val Ile Phe Ala
1650 1655 1660

Met Ser Phe Val Pro Ala Ser Phe Val Val Phe Leu Ile Gln Glu Arg
1665 1670 1675 1680

Val Ser Lys Ala Lys His Leu Gln Phe Ile Ser Gly Val Lys Pro Val
1685 1690 1695

Ile Tyr Trp Leu Ser Asn Phe Val Trp Asp Met Cys Asn Tyr Val Val
1700 1705 1710

Pro Ala Thr Leu Val Ile Ile Ile Phe Ile Cys Phe Gln Gln Lys Ser
1715 1720 1725

Tyr Val Ser Ser Thr Asn Leu Pro Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu
1730 1735 1740

Tyr Gly Trp Ser Ile Thr Pro Leu Met Tyr Pro Ala Ser Phe Val Phe
1745 1750 1755 1760

Lys Ile Pro Ser Thr Ala Tyr Val Val Leu Thr Ser Val Asn Leu Phe
1765 1770 1775

Ile Gly Ile Asn Gly Ser Val Ala Thr Phe Val Leu Glu Leu Phe Thr
 1780 1785 1790

Asp Asn Lys Leu Asn Asn Ile Asn Asp Ile Leu Lys Ser Val Phe Leu
 1795 1800 1805

Ile Phe Pro His Phe Cys Leu Gly Arg Gly Leu Ile Asp Met Val Lys
 1810 1815 1820

Asn Gln Ala Met Ala Asp Ala Leu Glu Arg Phe Gly Glu Asn Arg Phe
 1825 1830 1835 1840

Val Ser Pro Leu Ser Trp Asp Leu Val Gly Arg Asn Leu Phe Ala Met
 1845 1850 1855

Ala Val Glu Gly Val Val Phe Phe Leu Ile Thr Val Leu Ile Gln Tyr
 1860 1865 1870

Arg Phe Phe Ile Arg Pro Arg Pro Val Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu
 1875 1880 1885

Asn Asp Glu Asp Glu Asp Val Arg Arg Glu Arg Gln Arg Ile Leu Asp
 1890 1895 1900

Gly Gly Gly Gln Asn Asp Ile Leu Glu Ile Lys Glu Leu Thr Lys Ile
 1905 1910 1915 1920

Tyr Arg Arg Lys Arg Lys Pro Ala Val Asp Arg Ile Cys Val Gly Ile
 1925 1930 1935

Pro Pro Gly Glu Cys Phe Gly Leu Leu Gly Val Asn Gly Ala Gly Lys
 1940 1945 1950

Ser Ser Thr Phe Lys Met Leu Thr Gly Asp Thr Thr Val Thr Arg Gly
 1955 1960 1965

Asp Ala Phe Leu Asn Lys Asn Ser Ile Leu Ser Asn Ile His Glu Val
 1970 1975 1980

His Gln Asn Met Gly Tyr Cys Pro Gln Phe Asp Ala Ile Thr Glu Leu
 1985 1990 1995 2000

Leu Thr Gly Arg Glu His Val Glu Phe Phe Ala Leu Leu Arg Gly Val
 2005 2010 2015

Pro Glu Lys Glu Val Gly Lys Val Gly Glu Trp Ala Ile Arg Lys Leu
 2020 2025 2030

Gly Leu Val Lys Tyr Gly Glu Lys Tyr Ala Gly Asn Tyr Ser Gly Gly
 2035 2040 2045

Asn Lys Arg Lys Leu Ser Thr Ala Met Ala Leu Ile Gly Gly Pro Pro
 2050 2055 2060

Val Val Phe Leu Asp Glu Pro Thr Thr Gly Met Asp Pro Lys Ala Arg
 2065 2070 2075 2080

Arg Phe Leu Trp Asn Cys Ala Leu Ser Val Val Lys Glu Gly Arg Ser
 2085 2090 2095

Val Val Leu Thr Ser His Ser Met Glu Glu Cys Glu Ala Leu Cys Thr
 2100 2105 2110

Arg Met Ala Ile Met Val Asn Gly Arg Phe Arg Cys Leu Gly Ser Val
 2115 2120 2125

Gln His Leu Lys Asn Arg Phe Gly Asp Gly Tyr Thr Ile Val Val Arg
 2130 2135 2140

Ile Ala Gly Ser Asn Pro Asp Leu Lys Pro Val Gln Asp Phe Phe Gly
 2145 2150 2155 2160

Leu Ala Phe Pro Gly Ser Val Leu Lys Glu Lys His Arg Asn Met Leu
 2165 2170 2175

Gln Tyr Gln Leu Pro Ser Ser Leu Ser Ser Leu Ala Arg Ile Phe Ser
 2180 2185 2190

Ile Leu Ser Gln Ser Lys Lys Arg Leu His Ile Glu Asp Tyr Ser Val
 2195 2200 2205

Ser Gln Thr Thr Leu Asp Gln Val Phe Val Asn Phe Ala Lys Asp Gln
 2210 2215 2220

Ser Asp Asp Asp His Leu Lys Asp Leu Ser Leu His Lys Asn Gln Thr
2225 2230 2235 2240

Val Val Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Phe Leu Gln Asp Glu Lys Val
 2245 2250 2255

Lys Glu Ser Tyr Val
 2260

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
 amplification primer

<400> 11

cctctcatta cacaaaaacc agac

24

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
amplification primer

<400> 12

gctttcttttc acttctcatc ctg

23

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1 RT-PCR
primer

<400> 13

tccttgagggt caggggatta tc

22

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1 RT-PCR
primer

<400> 14

caatgttttt gtggttcgg c

21

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1 RT-PCR
primer

<400> 15

agtcgagctc caaacatgtc agctgttact ggaagtggcc

40

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1 RT-PCR
primer

<400> 16

tctctggatt ctgggtctat gtcag

25

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1 RT-PCR
primer

<400> 17

gggagccttt gtggaactct ttc

23

<210> 18

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1 RT-PCR
primer

<400> 18

actggtcgac cattgaattg cattgcattg aatagtatca g

41

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 19

tttcctggtg gacaatgaa

19

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 20

agtgacatgc gacaggag

18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 21

gatctggaag gcatgtgg

18

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 22

ccaggcagca ttgagctg

18

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 23

ggcctggaca acagcata

18

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 24

ggacaacctg tttgagagt

19

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 25

aagacgacca ccatgtca

18

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 26

atatgggagc tgctgctg

18

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 27

gggcatgagc tgacctatgt gctg

24

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 28

aagagactgc taattgcc

18

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 29

agcgacaaaa tcaagaag

18

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 30

tggcatgcaa tcagctct

18

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 31

tcctccacca atctgct

18

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 32

ttcttctctca ttactgtt

18

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 33

gatgccatca cagagctg

18

<210> 34

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 34

agtgtccagc atctaaa

17

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 35

caaagttcac aaatactt

18

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 36

cttagggcac aattccaca

19

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 37

tgaaagttga tgattttc

18

<210> 38

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 38

tttttcacca tgtcgatga

19

<210> 39

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 39

ctccactgat gaactgc

17

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 40

gtttcttcat ttgtttga

18

<210> 41

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 41

agggcgtgtc tgggattg

18

<210> 42

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 42

cagaatcatt tggatcag

18

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 43

catcagaact gctctgag

18

<210> 44

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 44

agctggcttg ttttgcctt

19

<210> 45

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 45

tggacacgcc cagcttca

18

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 46

cctgccatgc cacacaca

18

<210> 47

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 47

ctcatcaccc gcagaaag

18

<210> 48

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 48

cacactccat gaagcgag

18

<210> 49

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 49

tccagataat gcgggaaa

18

<210> 50

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 50

tcaggattgg cttcagga

18

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1
sequencing primer

<400> 51

aagtttgagc tggatttctt g

21

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: beta-globin
antisense oligonucleotide

<400> 52

cctcttacct cagttacaat ttata

25

<210> 53

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: ABC1 antisense
oligonucleotide

<400> 53

catgttggtc ataggggtggg tagctc

26

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: beta-actin
amplification primer

<400> 54

tcacccacac tgtgccatct acga

24

<210> 55

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: beta-actin
amplification primer

<400> 55

cagcggaacc gctcattgcc aatgg

25

<210> 56

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: sterol
response element oligonucleotide

<400> 56

tcgagtgacc gatagtaacc tctcga

26

<210> 57

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutated sterol
response element oligonucleotide

<400> 57

tcgagctgca catagtaacc tctcga

26

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 の A - D は、対照コレステロール流出、および正常繊維芽細胞（1 A、C）およびタンジール病患者からの繊維芽細胞（1 B、D）からの HDL およびアポ A - I の存在下でのコレステロール流出の結果を示すグラフである。塗りつぶしていない丸は HDL またはアポ A - I に暴露されなかった細胞からのコレステロール流出を表し、塗りつぶした丸は HDL に暴露された細胞からのコレステロール流出を表し、塗りつぶした菱形はアポ A - I に暴露されたコレステロール流出を表す。

【図 2】

図 2 は、タンジール患者（TD 1）からの細胞で見出された遺伝子発現および

正常細胞で見出されたその比較を示す遺伝子発現マイクロアレイ分析のグラフ表示であり、それにより、合計58、800ヒトcDNAはcAMP - 処理TD1細胞cDNAのmRNAから調製されたcDNA (Cy3色素で標識) と、およびcAMP - 処理正常細胞のmRNAから調製されたcDNA (Cy5色素で標識) とハイブリダイズした。

【図3】

図3は、ヒトABC1遺伝子のオープンリーディングフレームを含有する組換え発現ベクターpCEPhABC1の制限地図を示す模式図である。

【図4】

図4は、公表されたヒトABC1アミノ酸配列 (GenBank、受託番号AJ012376) およびN - 末端に60のさらなるアミノ酸を有する現在開示され特許請求されたヒトABC1アミノ酸配列 (「CVT」) の間の比較を示す、ヒトABC1の遺伝子構造の模式図である。

【図5】

図5は、ABC1輸送阻害剤4、4 - ジイソチオシアノスチルベン - 2、2' - ジスルホン酸 (DIDS) およびスルホプロモフタレイン (BSP) がアポA - I - 媒介コレステロール流出に対して有する阻害効果を示すグラフ表示であり、ここに、塗りつぶしていない丸はBSPの存在下におけるアポA - I - 媒介コレステロールを示し、塗りつぶした丸はDIDSの存在下におけるアポA - I - 媒介コレステロールを示す。

【図6】

図6は、アポA - I - 媒介コレステロール流出に対するアンチセンスABC1オリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフであり、アンチセンスオリゴヌクレオチドなくしてインキュベートした細胞におけるアポA - I - 媒介コレステロール流出、30 μ Mの β - グロビンアンチセンスオリゴヌクレオチドに暴露された細胞におけるアポA - I - 媒介コレステロール流出、および30 μ MのABC1アンチセンスオリゴヌクレオチドに暴露された細胞におけるアポA - I - 媒介コレステロール流出を示す。

【図7】

図7は、ヒトABC1についての発現プラスミド(pCEPhABC1)で安定にトランスフェクトされたRAW264.7マウスマクロファージ細胞を用いてABC1遺伝子の過剰発現によって引き起こされたアポA-I-媒介コレステロール流出の刺激を示すグラフ表示であり、対照親細胞(pCEPhABC1無し)におけるアポA-I-媒介コレステロール流出およびpCEPhABC1でトランスフェクトされたクローン細胞(L3、L5、L6)におけるアポA-I-媒介コレステロール流出を示す。

【図8】

図8は、アルブミン(塗りつぶした棒線)に暴露された、8-bR-cAMP(塗りつぶしていない棒線)に暴露した、コレステロール-負荷(陰を付けた棒線)に暴露された、またはコレステロール-負荷および引き続いてアポA-I-(ハッチングを施した棒線)に暴露したのいずれかである正常細胞およびタンジール病患者(TD1およびTD2)からの細胞におけるABC1遺伝子発現のレベルを示す逆転写ポリメラーゼ鎖反応(RT-PCR)のグラフ表示である。

【図9】

図9はエタノール(0.1% v/v)、9-シスレチノイン酸(9-シスRA; 10 μM)、20(S)ヒドロキシコレステロール(20(S)-OH; 10 μM)、または9-シスRAおよび20(S)-OH(各々10 μM)いずれかに暴露されたRAW264.7細胞におけるABC1遺伝子発現のレベルを示すRT-PCR分析の結果のグラフ表示である。

【図10】

図10は、添加物無し(対照)、8-Br-cAMP(1 mM)、コレステロール(30 μg/ml)またはコレステロールおよび8-Br-cAMP(各々、30 μg/mlおよび1 mM)の存在下で正常繊維芽細胞(NL1、10A)およびタンジール病患者(TD1、10B)で見出された細胞-表面ABC1蛋白質のレベルを示す免疫沈殿分析の結果を示す。

【図11】

図11は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子のオープンリーディングフレームの上流に位置したABC1遺伝子の5'フランキング領域を含有する、組換え発

現ベクター p A P R 1 の制限地図を示す模式図である。

【図12】

図12は、EtOH(対照)、20(S)-OH(10 μ M)、9-シスRA(10 μ M)、または20(S)-OHおよび9-シスRA双方(各々10 μ M)の存在下でpARP1でトランスフェクトしたRAW264.7細胞において誘導されたルシフェラーゼレポーター遺伝子発現のレベルを示すグラフ表示である。

。

【図13】

図13は、ABC1遺伝子の5'フランキング領域の模式図である。

【図1】

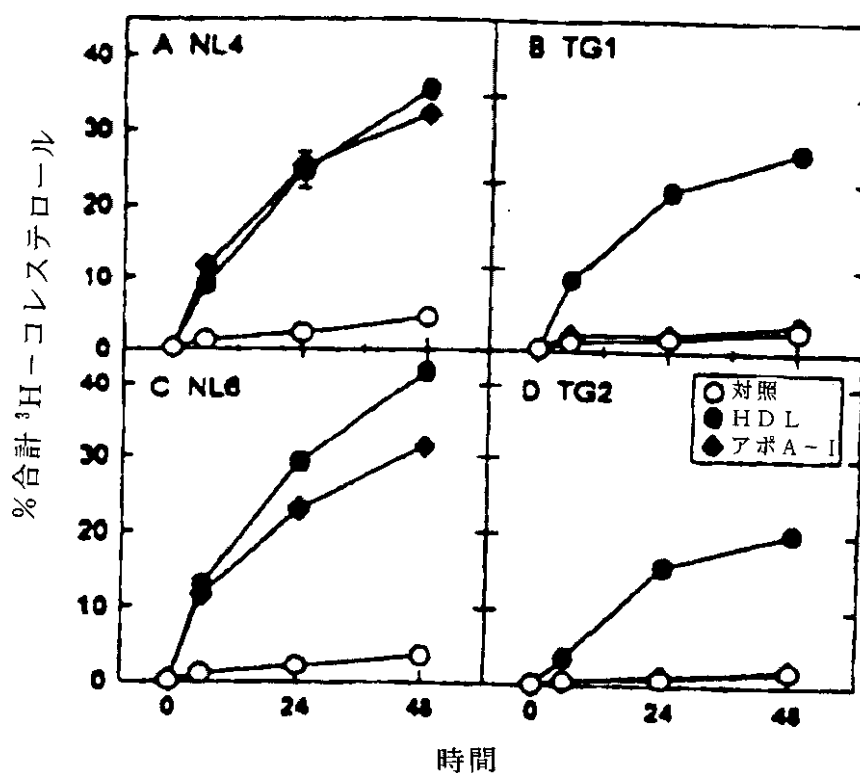


FIG. 1

【図2】

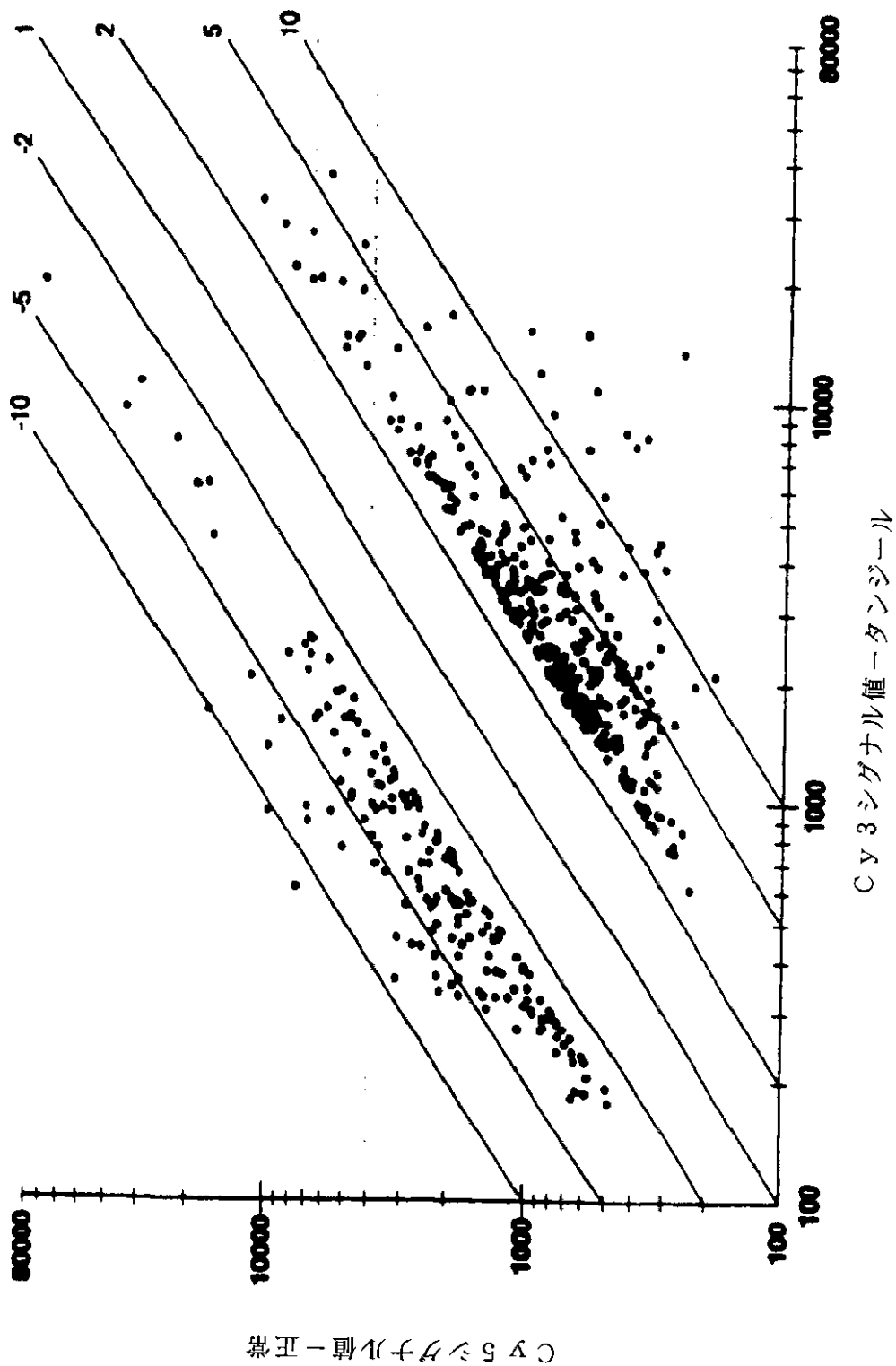


FIG. 2

【図 3】

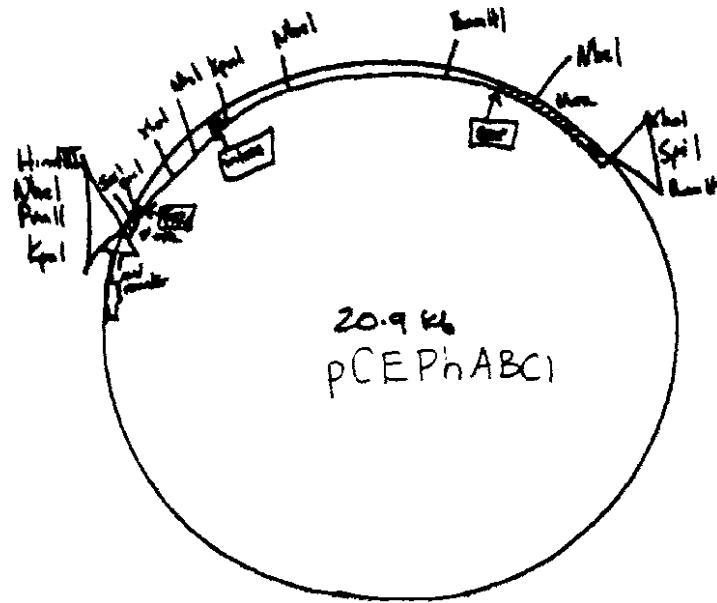


FIG. 3

【図4】

CVT ABCA1 遺伝子構造

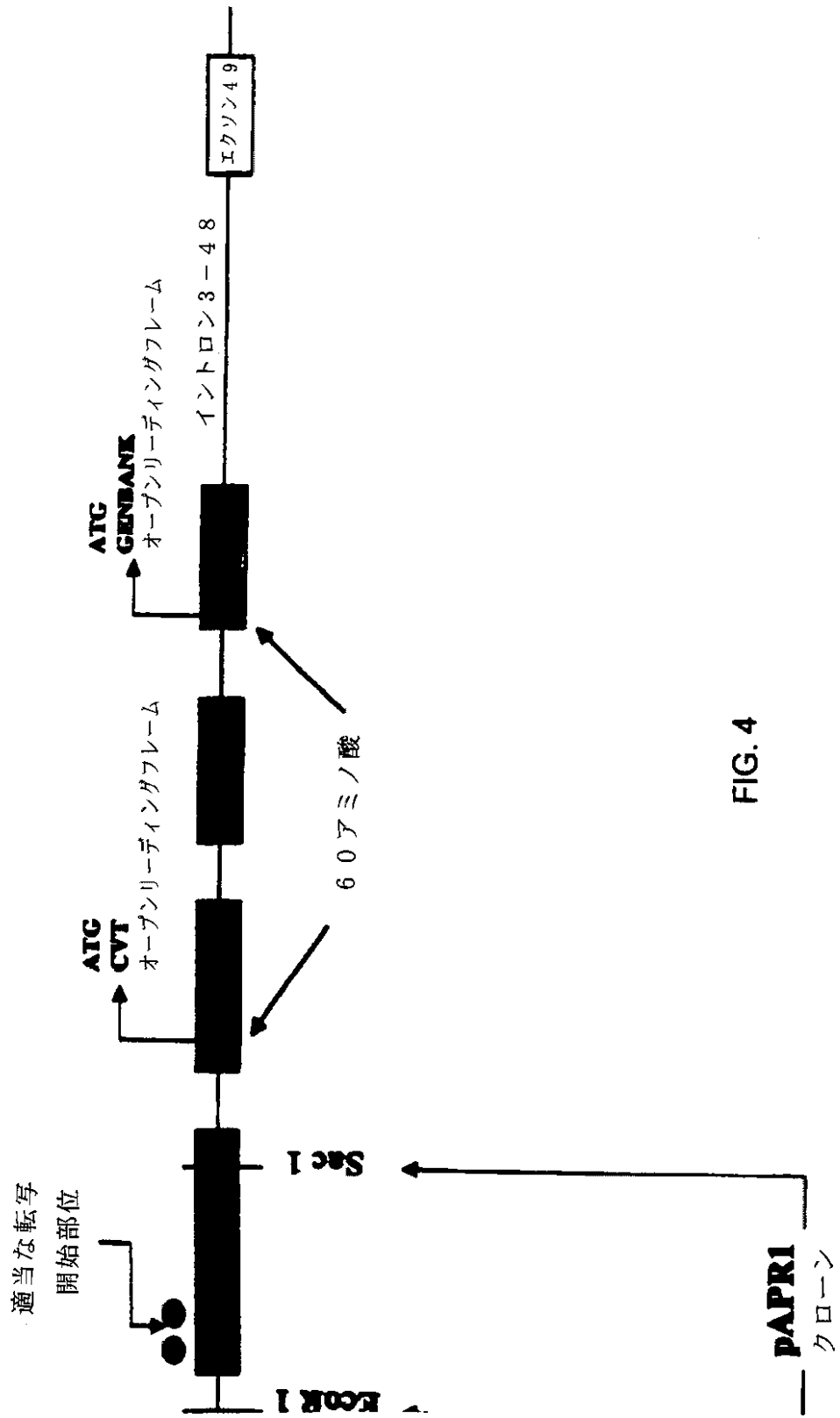


FIG. 4

【図5】

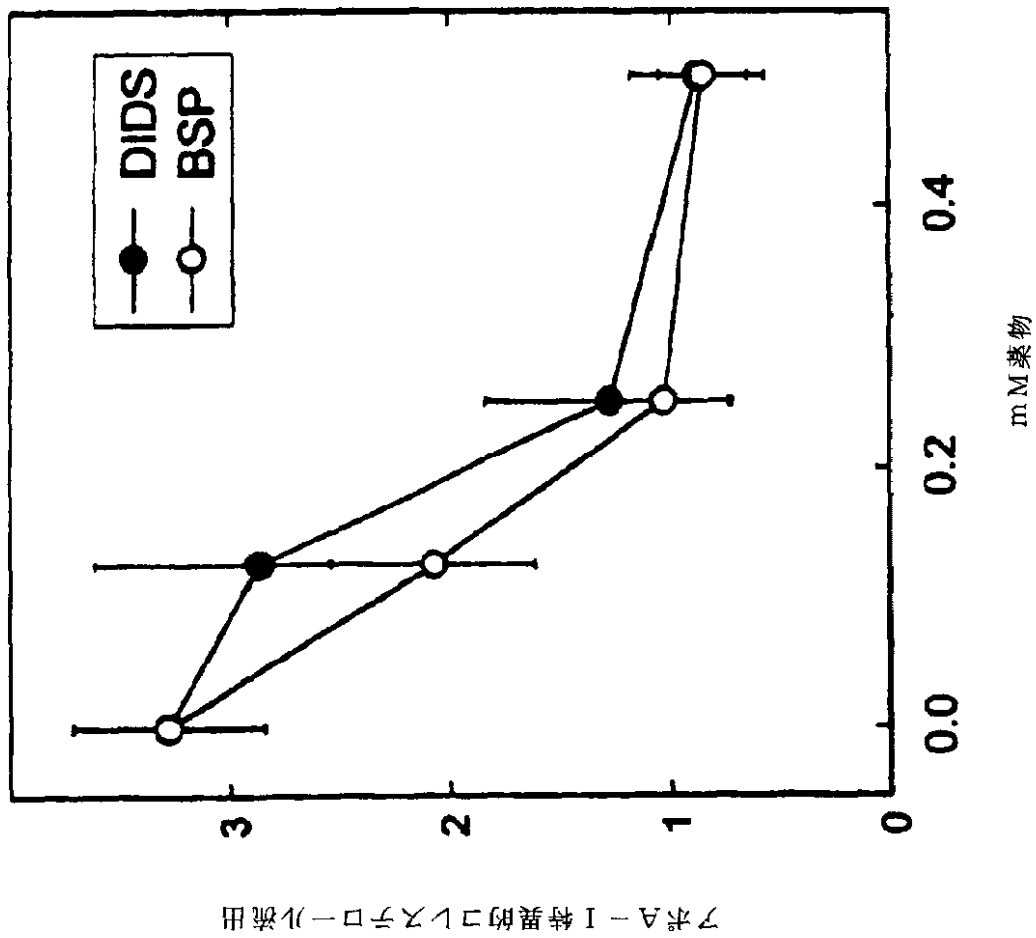


FIG. 5

【図6】

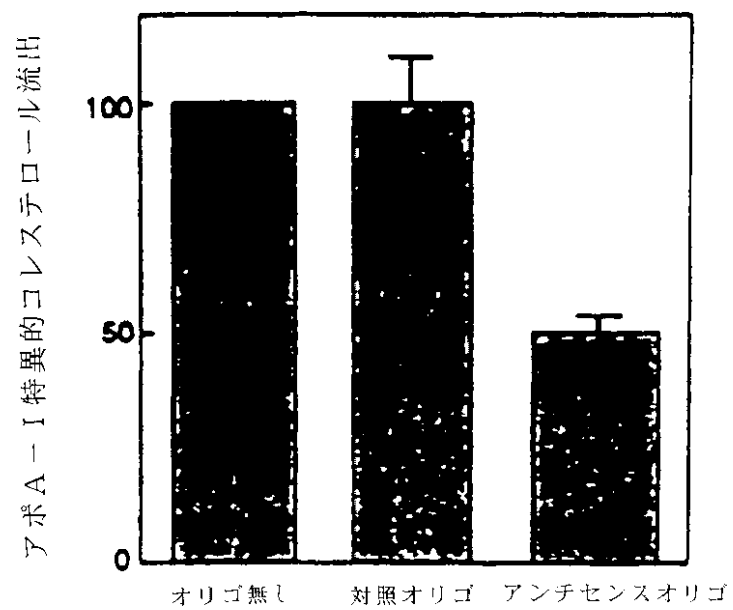


FIG. 6

【図7】

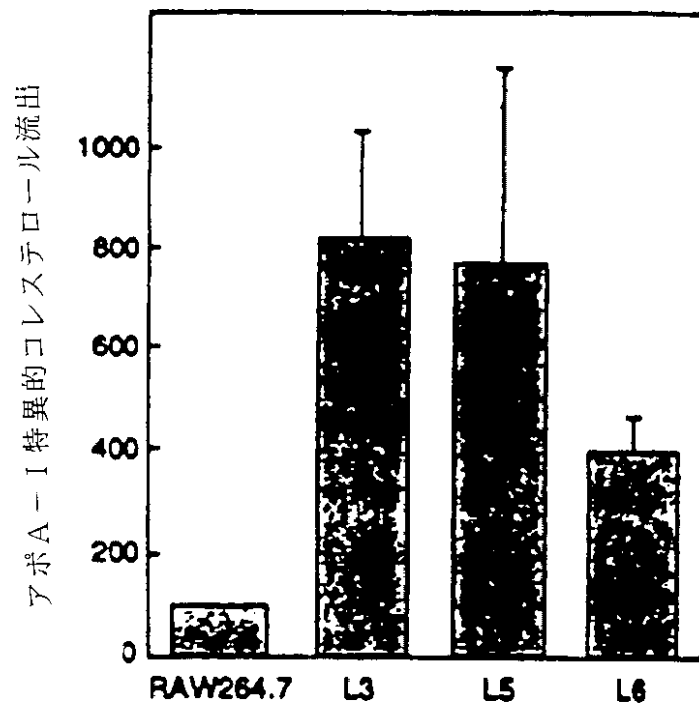


FIG. 7

【図8】

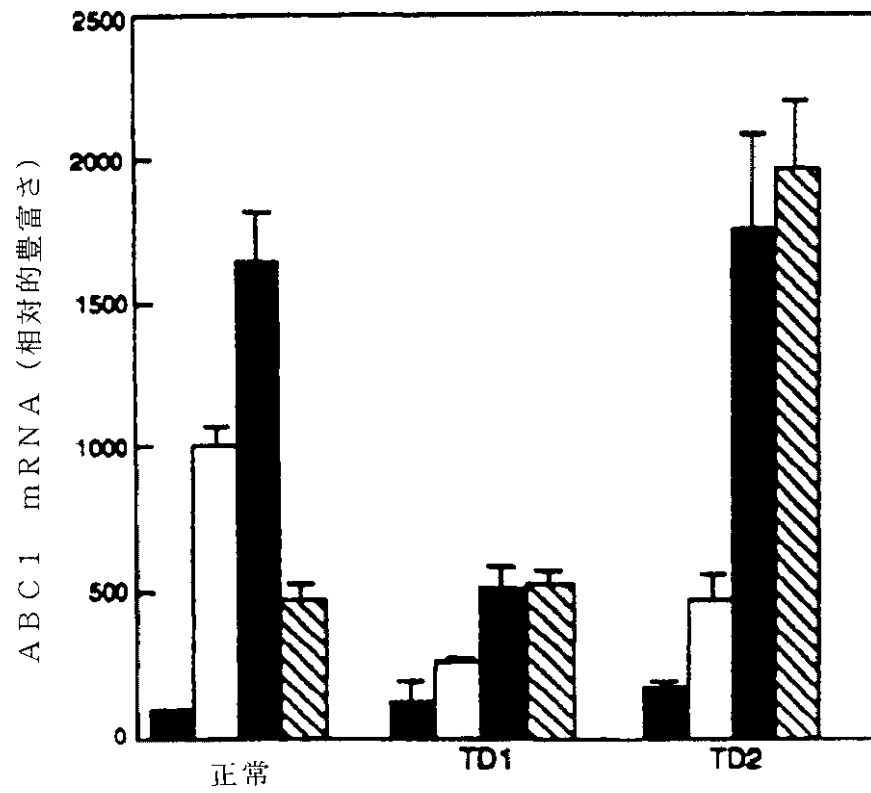


FIG. 8

【図9】

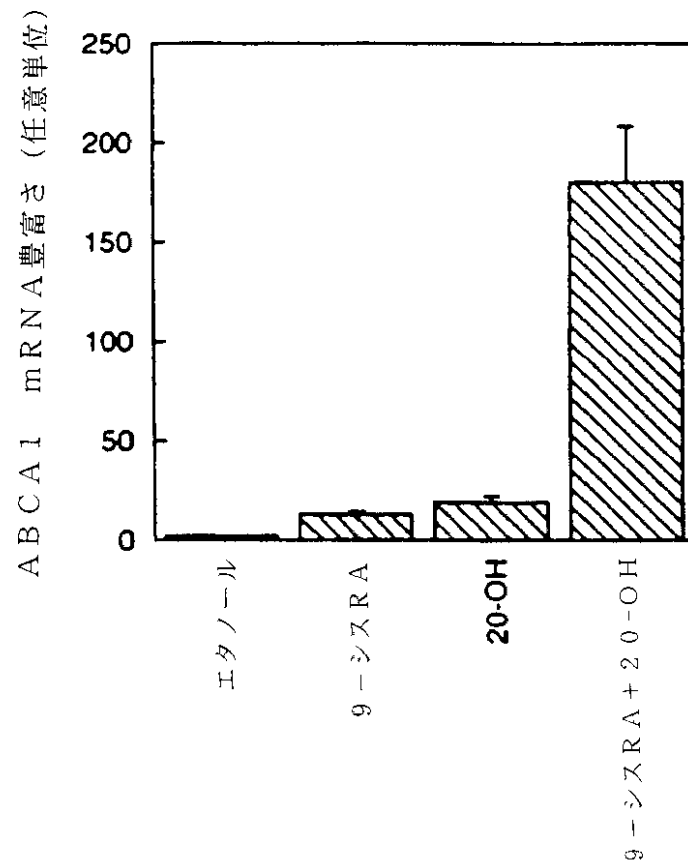


FIG. 9

【図10】

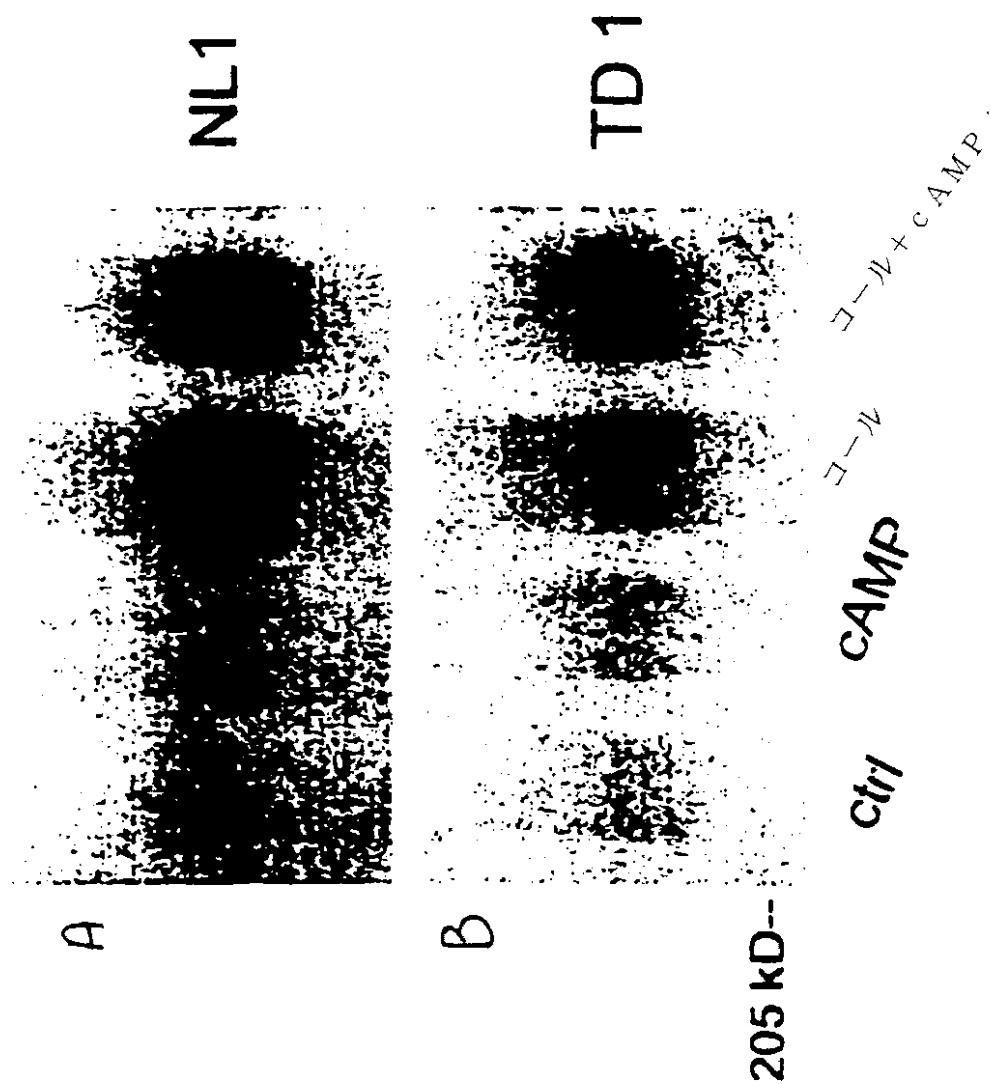


FIG. 10

【図11】

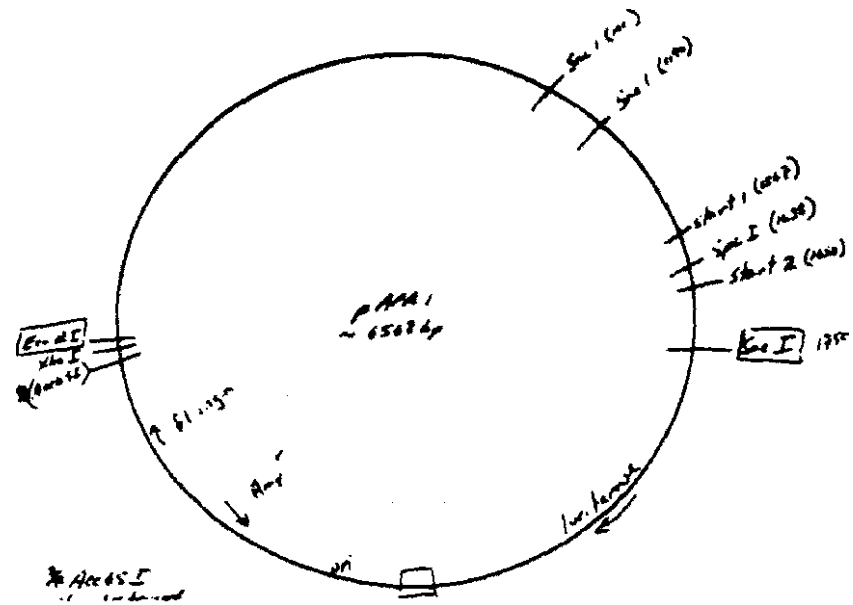


FIG. 11

【図12】

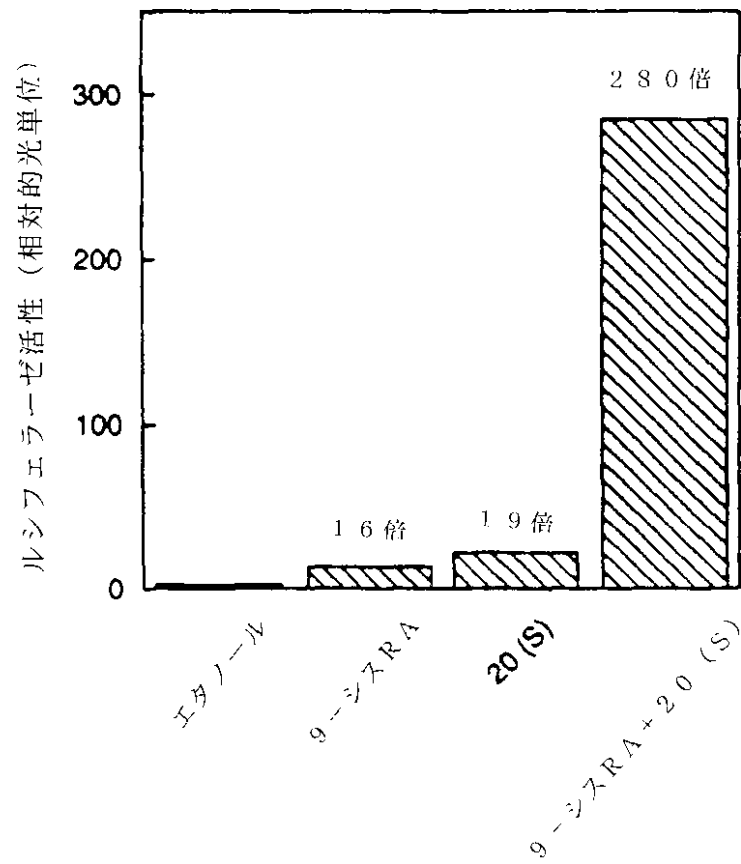


FIG. 12

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/16591	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/52 C07K14/705 C12Q1/68 C07K16/18 A61K38/00	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 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) STRAND, EPO-Internal, BIOSIS	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
	Relevant to claim No.
A	LANGMANN T, KLUCKEN J, REIL M, LIEBISCH G, LUCIANI MF, CHIMINI G, KAMINSKI WE, SCHMITZ G: "Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages" BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN, vol. 257, no. 1, 2 April 1999 (1999-04-02), pages 29-33, XP000877240
X	cited in the application the whole document --- -/--
	1-3 33,35
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☐ Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 March 2001	12.07.2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HW Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer CHAM BONNET, F

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/16591

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	SCHWARTZ K ET AL: "ABCI GENE EXPRESSION AND APOA-I-MEDIATED CHOLESTEROL EFFLUX ARE REGULATED BY LXR" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 274, no. 3, 11 August 2000 (2000-08-11), pages 794-802, XP000960872 ISSN: 0006-291X the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 international application No.
 PCT/US 00/16591
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

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

Although claims 35 to 45 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

see further information sheet invention 1.

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-24 33-36 38 44 70-73 and partially 37 39-43 45 74

An isolated polypeptide comprising SEQ ID NO 2 or an amino acid sequence that has at least 98% identity with it; an isolated polynucleotide selected from the group of consisting of a polynucleotide encoding said polypeptide or comprising at least nucleotides 291-7074 of SEQ ID NO 1, or that is at least 90% identical to SEQ ID NO 1, or complementary thereof; a composition comprising such a polynucleotide and a suitable carrier; a recombinant vector comprising such a polynucleotide; a composition or a host cell comprising said vector; a method for producing an ABC1 protein using said vector; methods for increasing cholesterol influx or ABC1 expression from cells of a mammalian subject using thereof; an isolated antibody that binds specifically to said isolated polypeptide and a kit for screening containing said antibody;

2. Claims: 25-27 31

An isolated polypeptide comprising SEQ ID NO 8; an isolated polynucleotide encoding said polypeptide or comprising SEQ ID NO 7; a recombinant vector comprising said polynucleotide.

3. Claims: 28-30 32

An isolated polypeptide comprising SEQ ID NO 10; an isolated polynucleotide encoding said polypeptide or comprising SEQ ID NO 9; a recombinant vector comprising said polynucleotide.

4. Claims: partially 37 39-43 45 74

A method suitable for increasing cholesterol efflux from the cells of a mammalian subject comprising the step of administering to the mammalian subject a polynucleotide encoding ABC1 in an amount sufficient to increase cholesterol efflux from said cells; as far as not covered by the previous subject.

5. Claims: 46-54

A method suitable for increasing cholesterol efflux of the cells of a mammalian subject comprising the step of

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

administering to the mammalian subject a therapeutic amount of a compound that increases the expression of ABC1 in said cells; a method suitable for increasing the expression of ABC1 in the cells of a mammalian subject comprising the step of administering to the mammalian subject a cAMP analogue in an amount sufficient to increase the expression of ABC1 in said cells; a method suitable for increasing cholesterol efflux of the cells of a mammalian subject comprising the step of administering to the mammalian subject a compound that increases ABC1 activity in said cells; as far as not covered by the previous subject;

6. Claims: 55-61 and partially 74 75 76

A method for screening a test compound to determine whether the test compound promotes ABC1-mediated cholesterol efflux from cells in culture comprising the steps of : assaying the level of cholesterol efflux in a sample of mammalian cells maintained in culture to determine a control level of cholesterol efflux; contacting the cells with the test compound being screened; assaying the level of cholesterol efflux in a sample of cells after contact with the test compound; and assaying the level of ABC1-mediated cholesterol efflux in a sample of cells after contact with the test compound, thereby determining whether the test compound promotes ABC1-mediated cholesterol efflux from cells in culture; a kit suitable for said screening method comprising an inactivating ABC1 antibody or an antisense ABC1 oligonucleotide; as far as not covered by a previous subject;

7. Claims: 62-69

A method for detecting the comparative level of ABC1 expression in the cells of a mammalian subject comprising the steps of : obtaining a cell sample from the mammalian subject; assaying the level of ABC1 mRNA expression in the cell sample with a pre-determined standard level of ABC1 mRNA expression, thereby detecting the comparative level of ABC1 expression in the cells of a mammalian subject ;

8. Claim : Partially 74

A kit suitable for screening a compound to determine whether the compound modulates ABC-1 dependent cholesterol efflux comprising an inactivating ABC1 antibody in an amount sufficient for at least one assay and instructions for use; as far as not covered by a previous subject.

9. Claim : Partially 75 and 76

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A kit suitable for screening a compound to determine whether the compound modulates ABC1-dependent cholesterol efflux comprising an antisense ABC1 oligonucleotide in an amount sufficient for at least one assay and instructions for use; as far as not covered by a previous subject.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)	
A 6 1 K	45/00	A 6 1 P	3/06	4 C 0 8 4
	48/00		9/10	4 C 0 8 5
A 6 1 P	3/06	C 0 7 K	14/47	4 C 0 8 6
	9/10		16/18	4 H 0 4 5
C 0 7 K	14/47	C 1 2 N	1/15	
	16/18		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 P	21/02	C
	1/21	C 1 2 Q	1/02	
	5/10		1/68	A
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/02		33/50	Z
	1/68		33/53	D
G 0 1 N	33/15			M
	33/50		33/92	A
	33/53	C 1 2 P	21/08	
		C 1 2 R	1:91	
	33/92	C 1 2 N	15/00	Z N A A
// C 1 2 P	21/08		5/00	A
(C 1 2 N	5/10			B
C 1 2 R	1:91)	A 6 1 K	37/02	
(C 1 2 P	21/02			
C 1 2 R	1:91)			

(31)優先権主張番号 6 0 / 1 6 6 , 5 7 3

(32)優先日 平成11年11月19日(1999 . 11 . 19)

(33)優先権主張国 米国 (U S)

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
 T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J
 , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,
 M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K
 E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G
 , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D ,
 R U , T J , T M) , A E , A L , A M , A T , A U ,
 A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C
 N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , E E , E S
 , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U ,
 I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K
 R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V
 , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O ,
 N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S
 I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A
 , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W

- (72)発明者 ローン、 リチャード エム .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州
94116 サンフランシスコ エイス アヴ
ェニュー 1927
- (72)発明者 ウエイド、 デイヴィッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州
94306 パロ アルト アpartment
エル カートナー アヴェニュー 383
- (72)発明者 オラム、 ジョン エフ .
アメリカ合衆国 ワシントン州 98195
シアトル エヌ . イー . ナオミ プレー
ス 1738
- (72)発明者 ガーヴィン、 マイケル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州
94019 サンフランシスコ ホワイト ス
トリート 17

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB20 CB01 DA12
DA13 DA14 DA36 DA69 DA77
FA16 FB02 FB03 FB05 FB07
FB12 HA16
4B024 AA01 BA21 BA63 CA04 DA02
EA02 EA04 GA11 HA01
4B063 QA05 QQ08 QR48 QS07
4B064 AG20 AG27 CA10 CA19 CC24
DA01
4B065 AA90X AA93X AA99Y AB01
AC14 BA02 CA24 CA44
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17
BA01 BA08 BA22 BA23 MA01
NA14 ZA402 ZA452 ZC332
4C085 AA13 AA14 CC32 DD62 EE01
GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16
MA01 MA04 NA14 ZA40 ZA45
ZC33
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40
DA01 DA50 DA75 EA28 FA74

专利名称(译)	使用ATP结合盒转运蛋白ABC1通过增加胆固醇流出来增加HDL的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2003508031A	公开(公告)日	2003-03-04
申请号	JP2001515880	申请日	2000-06-16
[标]申请(专利权)人(译)	CV治疗公司 华盛顿大学		
申请(专利权)人(译)	Suivi Therapeutics公司		
[标]发明人	ローンリチャードエム ウエイドデイヴィッド オラムジョンエフ ガーヴィンマイケル		
发明人	ローン、リチャード エム. ウエイド、デイヴィッド オラム、ジョン エフ. ガーヴィン、マイケル		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/07 A61K31/11 A61K31/167 A61K31/202 A61K31/203 A61K31/216 A61K31/557 A61K31/5575 A61K31/5585 A61K31/56 A61K31/575 A61K31/7088 A61K35/14 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/43 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/06 A61P3/10 A61P5/14 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P25/32 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/92		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/16 A61P25/32 C07K14/705 C12N2799/022 C12N2799/027		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P3/06 A61P9/10 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/92.A C12P21/08 C12R1/91 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045 /DA36 2G045/DA69 2G045/DA77 2G045/FA16 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/HA16 4B024/AA01 4B024/BA21 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024 /EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QS07 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065 /AA93X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084 /BA23 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA402 4C084/ZA452 4C084/ZC332 4C085/AA13 4C085 /AA14 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA40 4C086/ZA45 4C086 /ZC33 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA28 4H045/FA74		
优先权	60/140264 1999-06-18 US 60/153872 1999-09-14 US 60/166573 1999-11-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及新颖的ABC1多肽和编码它们的核酸分子。本发明还涉及包含重组载体，宿主细胞和ABC1多核苷酸的组合物，以及产生ABC1多肽的方法。本发明还涉及与ABC1多肽特异性结合的抗体。另外，本发明涉及增加胆固醇外流以及增加ABC1的表达和

活性的方法。本发明进一步涉及鉴定调节ABC1表达的化合物的方法和检测哺乳动物受试者中ABC1多肽和多核苷酸的相对水平的方法。本发明还提供了适用于筛选化合物以确定其ABC1表达调节活性以及确定化合物是否调节ABC1依赖性胆固醇外排的试剂盒和组合物。合适的试剂盒和组合物。

