

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3822232号
(P3822232)

(45) 発行日 平成18年9月13日(2006.9.13)

(24) 登録日 平成18年6月30日(2006.6.30)

(51) Int.C1.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 07 K 19/00	(2006.01)	C 07 K 19/00	
C 07 K 14/47	(2006.01)	C 07 K 14/47	
C 12 N 9/10	(2006.01)	C 12 N 9/10	
C 12 P 21/02	(2006.01)	C 12 P 21/02	C

請求項の数 6 (全 88 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-508203
 (86) (22) 出願日 平成6年8月26日(1994.8.26)
 (65) 公表番号 特表平9-502094
 (43) 公表日 平成9年3月4日(1997.3.4)
 (86) 國際出願番号 PCT/US1994/009700
 (87) 國際公開番号 WO1995/006415
 (87) 國際公開日 平成7年3月9日(1995.3.9)
 審査請求日 平成13年8月21日(2001.8.21)
 (31) 優先権主張番号 08/113,372
 (32) 優先日 平成5年8月30日(1993.8.30)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 08/153,564
 (32) 優先日 平成5年11月17日(1993.11.17)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者
 ベイラー・カレッジ・オブ・メディシン
 アメリカ合衆国77030テキサス州ヒュ
 ーストン、ワン・ベイラー・プラザ(番地
 の表示なし)
 (74) 代理人
 弁理士 青山 葉
 (74) 代理人
 弁理士 田村 恭生
 (74) 代理人
 弁理士 中嶋 正二
 (72) 発明者
 スミス、ジェームス・アール
 アメリカ合衆国77030テキサス州ヒュ
 ーストン、クリフウッド10311番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】老化細胞由来DNA合成阻害因子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

G S T - S D I - 1 融合タンパク質をコードする、配列番号10の配列の、G S T - S D I - 1 核酸分子。

【請求項2】

配列番号11のアミノ酸配列を含む、G S T - S D I - 1 融合タンパク質。

【請求項3】

A T C C 寄託番号69597 寄託物に含有されるプラスミドのcDNA挿入の配列により
 コードされる、請求項2のG S T - S D I - 1 融合タンパク質。

【請求項4】

請求項1のG S T - S D I - 1 核酸分子を含むプラスミド。

【請求項5】

請求項1のG S T - S D I - 1 核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項6】

ベクターがウイルスベクターである、請求項5の発現ベクター。

【発明の詳細な説明】

発明の分野:

本発明は、組換DNA技術の分野のものである。本発明は、細胞の能力を老化させる遺伝子配列およびタンパク質に関する。本発明は、政府基金により援助されたものである。該政府は本発明について一定の権利を有する。

関連出願の相互参照：

本出願は、米国特許出願07/970,462号（1992年11月2日に出願、および1994年4月12日に米国特許第5,302,706号として発行）および分割米国特許出願08/160,814（1993年12月3日に出願、継続中）および08/268,439（1994年6月30日に出願）の一部を継続するものである米国特許出願08/113,372号（1993年8月30日に出願）の一部を継続するものである米国特許出願08/153,564号（1993年11月17日に出願）の一部を継続するものである米国特許出願08/203,535号（1994年2月25日に出願）の一部を継続するものである米国特許出願08/229,420号（1994年4月15日に出願）の一部を継続するものである米国特許出願08/274,535号（1994年7月13日に出願）の一部を継続するものであり、これら全ての出願は、米国特許出願07/808,523号（1991年12月16日に出願、現在放棄されている）の一部を継続するものである。10

発明の背景：

正常なヒト二倍体細胞は、有限の増殖成長能力を有している（ハイフリック，L.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、25巻、585頁（1961年）；ハイフリック，L.、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、37巻、614頁（1965年））。実際に、イン・ビトロでの制御条件下では、培養ヒト細胞は最大限に増殖しても約80累積集団倍加（*cumulative population doublings*）までである。そのような細胞の増殖能力は、細胞が経験する累積集団倍加数の関数であることが見い出された（ハイフリック，L.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、25巻、585頁（1961年）；ハイフリック，L.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、37巻、614頁（1985年）20）。この能力は、また細胞提供者のイン・ビオ年齢に反比例している（マーチン，G.M.等、ラボラトリー・インベスティゲーション、23巻、86頁（1979年）；ゴールドシュタイン，S.等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ（U.S.A.）、64巻、155頁（1969年）；シュナイダー，E.L.等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ（U.S.A.）、73巻、3584頁（1976年）；レギルティ，Y.等、ゲレオントロジア、19巻、303頁（1973年））。

増殖成長に対するその能力を消盡した細胞は、“老化”してしまったと言われる。イン・ビトロでの細胞老化は、形態学的变化により示され、かつ外来成長因子に対する細胞の応答機能減退を伴う。従って、細胞老化は、細胞の増殖能力の喪失を表すものである。イン・ビトロでの細胞老化現象を説明するため、様々な理論が提案されているが、実験的証拠は、増殖能力の年齢依存性喪失が遺伝子プログラムの機能であろうことを示唆している（オーゲル，L.E.、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ（U.S.A.）、49巻、517頁（1963年）；デ・マース，R.等、ヒューマン・ジェネティックス、16巻、87頁（1972年）；M.ブックワルド、ミューターション・リサーチ、44巻、401頁（1977年）、マーチン，G.M.等、アメリカン・ジャーナル・オブ・パゾロジー、74巻、137頁（1974年）；スミス，J.R.等、Mech. Age. Dev.、13巻、387頁（1980年）；カーカウッド，T.B.等、セオリティカル・バイオロジー、53巻、481頁（1975年）30）。

イン・ビトロにおけるヒト纖維芽細胞での細胞融合研究は、細胞老化の静止状態型が、増殖状態型よりも優勢であることを示している（ペレイラ-スミス，O.M.等、ソマティック・セル・ジェネティックス、8巻、731頁（1982年）；ノルウッド，T.H.等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ（U.S.A.）、71巻、223頁（1974年）；ステイン，G.H.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、130巻、155頁（1979年）40）。

老化現象に対する洞察が、老化細胞および若い（即ち、非老化）細胞を融合して、ヘテロジカリオン（*heterokaryons*）を形成する研究から得られている。ヘテロジカリオンの“若い”核で老化を引き起こすためには（DNA合成の阻害により判定するとき）、融合する前に、老化細胞でタンパク質合成が起こらなければならない（バーマー，G.C.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、94巻、187頁（1982年）；ドレッチ50

ヤー・リンカーン, C. K. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、144巻、455頁(1983年); バーマー, G. C. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、145巻、708頁(1983年); ドレッチャーリンカーン, C. K. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、153巻、208頁(1984年))。

同様に、老化纖維芽細胞mRNAの若い纖維芽細胞へのマイクロインジェクションが、若い細胞のDNA合成能力を阻害することが見い出されている(ランプキン, C. K. 等、サイエンス、232巻、393頁(1986年))。研究者らは、イン・ビトロで老化細胞内で増殖されるユニークなmRNAを同定した(ウエスト, M. D. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、184巻、138頁(1989年); ジョルダノ, T. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、185巻、399頁(1989年))。

ヒト二倍体内皮細胞は、これらの細胞がイン・ビトロで細胞老化を真似することから、細胞老化研究の代替細胞型を与えるものである(マシアーカ, T. 等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、91巻、420頁(1981年); ゴードン, P. B. 等、イン・ビトロ、19巻、661頁(1983年); ジョンソン, A. 等、Mech Age. Dev.、18巻、1頁(1982年); ソーントン, S. C. 等、サイエンス、222巻、623頁(1983年); ヴァン・ヒンスベルグ, V. W. M. 等、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、42巻、101頁(1986年); ニコルス, W. W. 等、ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー、132巻、453頁(1987年))。

加えて、ヒト内皮細胞は、様々な機能的かつ可逆の表現型を発現する能力がある。内皮細胞は、幾つかの静止表現型および非末端分化表現型を示す(フォークマン, J. 等、ネイチャーリー、288巻、551頁(1980年); マシアーカ, T. 等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、94巻、511頁(1982年); マドリ, J. A. 等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、97巻、153頁(1983年); モンテサノ, R. 等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、99巻、1706頁(1984年); モンテサノ, R. 等、ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー、34巻、460頁(1988年))。

イン・ビトロにおけるヒト細胞分化の経路は、イン・ビトロでの成長因子誘導内皮細胞増殖を阻害するサイトカイン類により媒介される細胞静止状態の誘導に関与することが示唆されている(ジェイ, M. 等、サイエンス、228巻、882頁(1985年); マドリ, J. A. 等、イン・ビトロ、23巻、387頁(1987年); クボタ, Y. 等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、107巻、1589頁(1988年); イングバー, D. E. 等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、107巻、317頁(1989年))。

内皮細胞増殖の阻害因子(inhibitors)は、イン・ビトロでの内皮細胞分化中に引き起こされるごく初期の転写事象の調節因子としても機能しており、キャピラリー様、管状内皮細胞表現型の形成に関連する(マシアーカ, T. 等、インブループメント・アンド・アドバンス・オブ・オンコロジー、デ・ビータ, V. T. 等、出版、J. B. リッピンコット・フィラデルフィア、42頁(1990年); ゴールドゲイバー, D. 等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ(U. S. A.)86巻、7606頁(1990年); ヘラ, T. 等、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ、167巻、637頁(1990年))。細胞増殖の阻害因子とは以下のものを含む:

1. インターロイキン-1a(IL-1a)(モンテサノ, R. 等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、99巻、1706頁(1984年); モンテサノ, R. 等、ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー、122巻、424頁(1985年); マシアーカ, T. 等、サイエンス、249巻、1570-1574頁(1990年)):

2. 腫瘍壞死因子(フレイター・シュローダー, M. 等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ(U. S. A.)、84巻、5277頁(1987年); サトー, N. 等、ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート、76巻、1113頁(1986年); プバー, J. P. 等、アメリカン・ジャー

10

20

30

40

50

ナル・オブ・パソロジー、133巻、426頁(1988年)；シマダ, Y. 等、ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー、142頁、31頁(1990年)；

3. トランスフォーミング成長因子 (transforming growth factor-) (ベイルド, A. 等、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ、138巻、476頁(1986年)；ムリュー, G. 等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ(U. S. A.)、84巻、5600頁(1987年)；マイリ, J. A. 等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、106巻、1375頁(1988年))；

4. ガンマ-インターフェロン(フリーセル, R. 等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、104巻、689頁(1987年)；ツルオカ, N. 等、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ、155巻、429頁(1988年))および 10

5. 腫瘍プロモーター、ホルボールミリスチリン酸(PMA)(モンテサノ, R. 等、セル、42巻、469頁(1985年)；ドクトロウ, S. R. 等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、104巻、679頁(1987年)；モンテサノ, R. 等、ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー、130巻、284頁(1987年)；ホシ, H. 等、FASABジャーナル、2巻、2797頁(1988年))。

老化を逆行させ、かつ細胞の増殖能力を回復することへの期待は、多くの分野の努力活動にかかわっている。老齢疾患の多くは、この能力の喪失に関わっている。この能力の回復は、この疾患の、他の年齢関連疾患の、さらに加齢自身の治療に、広い範囲にわたるかかわりを持つものである。 20

加えて、培養細胞の増殖能力の回復は、医薬および製薬工業において利用される。非形質転換細胞を不死化する能力を用いれば、ある種の組織、さらには細胞生産物を無限に供給することも出来る。

従って、細胞老化の重要性は、数年来、高く評価されてきた(スミス, J. R. 、セルラー・エイジング、モノグラフス・イン・デベロップメンタル・バイオロジー；ソイアー, H. W. (出版)、S. カーガー、ニュー・ヨーク、N. Y. 、17巻、193-208頁(1984年)；スミス, J. R. 等、イクスペリメンタル・ゲロントロジー、24巻、377-381頁(1989年)、本明細書に参照して組み込んである)。研究者らは、細胞老化に関連した遺伝子をクローン化することを試みている。DNA合成阻害因子(an inhibitor of DNA synthesis)の存在と細胞老化現象の間の相関関係が認識されている(スピアリング, A. I. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、179巻、159-167頁(1988年)；ペレイラ-スミス, O. M. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、160巻、297-306頁(1985年)；ドレッチャーリンカーン, C. K. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、153巻、208-217頁(1984年)；ドレッチャーリンカーン, C. K. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、144巻、455-462頁(1983年))。更に、ある種の老化関連RNA分子の相対量(relative abundance)が同定されている(ランプキン, C. K. 等、サイエンス、232巻、393-395頁(1986年))。 30

幾つかの研究室では、“サブトラクション-ディファレンシャル(subtraction-differential)”スクリーニング法を用いて、老化細胞中で優先的に存在するRNA種に由来するcDNA分子を同定している(クラインセック, D. A. 、エイジ、12巻、55-60頁(1989年)；ジョルダノ, T. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、185巻、399-406頁(1989年)；シエラ, F. 等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー、9巻、5610-5616頁(1989年)；ペレイラ-スミス, O. M. 等、ジャーナル・オブ・セル・バイオケミストリー、(付録0(12部A))、193頁(1988年)；クラインセック, D. A. 、スミス, J. R. 、エイジ、10巻、125頁(1987年))。 40

“サブトラクション-ディファレンシャル(subtraction-differential)”スクリーニングと名付けられた1つの方法では、cDNA分子のプールを老化細胞から作成し、次いで

、成長細胞のcDNAまたはRNAとハイブリダイズして、これらの成長細胞に存在する核酸分子に相補的なcDNA分子を“控除(subtract out)”する。“サブトラクション-ディファレンシャル”法は、ある目的のためには有用であるけれども、老化関連cDNA分子が、老化の原因に関わっているのか、それとも老化の結果として生成したものかを確定できないという難点がある。実際に、この方法で同定された配列の多くは、細胞外マトリクスのタンパク質をコードすることが見い出されている。そのようなタンパク質の発現における変化が、老化を引き起こすのではないようである。

発明の要約：

本発明は、ある部分では、正常ヒト細胞がイン・ビトロで有限の複製能力を示し、ある回数分裂した後、老化に至るという観察に関係する。細胞が老化すると、それらは、細胞の大きさの肥大、細胞外マトリクス成分の変化、有糸分裂促進物質刺激に対する不応答、および成長調節遺伝子発現の機能減退のようないくつかの形態学的および生化学的变化を示す。

本発明は、老化細胞中に生成するDNA合成阻害因子を同定するものである。この阻害因子は、老化表現型の発現において重要な役割を果たす。阻害因子をコードする遺伝子は、老化細胞cDNAライブラリーを哺乳類発現ベクターに組み込むことにより同定した。次いで、該cDNAライブラリーを若い、サイクリング細胞(cycling cell)内にトランسفェクションし、DNA合成の開始を抑制するこれらのライブラリーの構成メンバーを同定した。

効率的DEAEDキストラン媒介トランسفェクションにより、3種の別々のcDNAクローンにおいて、老化細胞由来の阻害因子(SDI)配列と推定されるものの分離が出来た。1種(SDI-1)の発現は細胞老化にして20倍増加したのに対し、他のもの(SDI-2とSDI-3)は一定を保った。

要するに、本発明は、機能的なアッセー(assay)を用いて、DNA合成阻害因子のクローニングを達成するものである。この方法を応用して組織特異的分化および腫瘍抑制遺伝子のような、細胞周期の負の調節に関連する他の遺伝子をクローニングすることも出来る。この方法を用いて、3種の阻害因子配列がクローニングされている。これらの配列の1つ(SDI-1)は、細胞老化と密接に関係しているようである。

詳細には、本発明は、受容細胞におけるDNA合成を阻害する能力を持つタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸分子を提供するものである。

特に、本発明は、かかるタンパク質またはポリペプチドがサイクリンまたはサイクリン依存性キナーゼ、特に、該サイクリンは、サイクリンD1であり、該サイクリン依存性キナーゼは、CDK2である、と結合(アソシエート)する能力があり、特に、該タンパク質またはポリペプチドの発現が腫瘍抑制遺伝子により調節されているような実施態様に関係する。

本発明は、SDI-1またはSDI-1融合タンパク質、SDI-1のフラグメント、またはSDI-1の類似体をコードするような核酸分子、並びに、配列番号1、または配列番号1の相補体(complement)とハイブリダイズできる核酸分子を含む。

本発明は、三重構造の形成によりSDI-1の発現を阻害する能力を持つオリゴヌクレオチドにも関係し、このオリゴヌクレオチドは、GおよびC残基のみから成り、少なくとも鎖長20ヌクレオチドであり、SDI-1をコードする二本鎖核酸分子とハイブリダイズできるヌクレオチド配列を有するものであって、そのハイブリダイゼーションは、二本鎖分子の、少なくとも約65%がプリンであるか、または少なくとも約65%がピリミジンである領域に起こり、ここで、該ヌクレオチドは、SDI-1をコードする核酸分子における相補位置が、GC塩基対であるとき、G残基を有し、SDI-1をコードする核酸分子における相補位置がAT塩基対であるとき、T残基を有するものである。

本発明は、

- (i)受容細胞におけるDNA合成を阻害し、
- (ii)サイクリンまたはサイクリン依存性キナーゼと結合する

能力のある、タンパク質またはポリペプチドのアンタゴニストにも関係する。

10

20

30

40

50

本発明は、

- (i) 受容細胞におけるDNA合成を阻害し、
- (ii) サイクリンまたはサイクリン依存性キナーゼと結合する能力のある、タンパク質またはポリペプチドにも関係する。

本発明は、特に、SDI-1、および融合タンパク質およびそれらのフラグメントに関係し、特に、腫瘍抑制遺伝子産物によって引き起こされる場合、同様の特性を有するその他の分子に関係する。

本発明は、受容細胞におけるDNA合成を阻害し、サイクリンまたはサイクリン依存性キナーゼと結合する能力のあるような分子の類似体にも関係する。

本発明は、SDI-1に結合する、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかにも関係する。 10

本発明は、(i) 受容細胞におけるDNA合成を阻害し、かつ(ii) サイクリンまたはサイクリン依存性キナーゼと結合する薬剤を細胞中に導入することを含んで成る、細胞増殖を阻害する方法にも関係する。

本発明は、試料を、SDI-1と結合できる抗体と接触させ、抗体に結合した全てのSDI-1タンパク質の存在または量を測定することを含んで成る、試料中のSDI-1の存在または濃度を測定する方法にも関係する。

本発明は、受容細胞（および特に、細胞が腫瘍細胞、またはインビトロ培養における細胞である）におけるDNA合成を阻害できるタンパク質をコードする上記の核酸分子の有効量を細胞に与えることを含んで成る、ヒト細胞におけるDNA合成を阻害する方法も提供する。 20

本発明は、与えた核酸分子を細胞中で発現させ、その発現により、サイクリンまたはサイクリン依存性キナーゼ、特に、サイクリンD1、およびサイクリン依存性キナーゼCDK2の活性を減ずることができるタンパク質を産生する、上記方法の実施態様も提供する。

本発明は、更に、核酸分子、またはその相補体が、図5A-5Dに示した核酸配列（配列番号1）にハイブリダイズでき、および/または該核酸分子は、図5A-5Dに示した核酸配列（配列番号1）によりコードされたタンパク質のタンパク質類似体をコードするものであって、その類似体は、サイクリンまたはサイクリン依存性キナーゼ、特に、サイクリンD1、およびサイクリン依存性キナーゼCDK2の活性を減ずることができるものである、上記方法の実施態様に関係する。 30

本発明は、SDI阻害因子（タンパク質、核酸、または有機物質）の有効量を細胞に与えることを含んで成る、静止または老化ヒト細胞におけるDNA合成の阻害を抑制する方法をも提供する。このような核酸分子（DNAまたはRNAのいずれか）阻害因子は、受容細胞におけるDNA合成を阻害する能力があるタンパク質をコードするRNA分子に対して相補的な配列を持ち、かつ、生理学条件下で該分子をもう一方とハイブリダイズさせるに十分な長さを持つことができる。特に意図されるのは、細胞が内皮細胞、皮膚細胞、または損傷または火傷組織に存在する細胞である場合の実施態様である。本発明は、更にリンパ球、管組織（動脈、小動脈、毛細管、静脈など）、肝臓、腎臓、心臓、および他の筋肉、骨、脾臓などの皮膚以外の組織における本発明の薬剤の使用を意図するものである。

本発明は、血管形成を達成するためのSDI分子の使用に関係する。 40

本発明は、

(A) 標的細胞に輸送され得るSDI-1およびSDI-1のフラグメントからなる群から選択されるSDI部分に薬学的成分をコンジュゲートし；さらに、

(B) SDI部分を標的細胞に輸送させるに十分な条件で、標的細胞の存在下にコンジュゲートした分子をインキュベートし；輸送により、標的細胞への該成分のデリバリーを達成する、

ことを含んで成る製剤学的成分を標的細胞に輸送する方法をも提供する。

【図面の簡単な説明】

図1は、cDNAクローニングおよび発現ベクター、pCDSR (BはBamH I部位を表す) の構造を示す。

図 2 A、2 B、および 2 C は、若い細胞の DNA 合成に対して阻害性の c DNA クローンを同定するものである。異なる棒は、個々のプラスミドに対する独立したトランスフェクション実験を表しており、* は、実施されなかったことを示し、負の数は、対照より高い標識指数を示す。各グラフは、プラスミドの異なるプールに由来する結果を示す。

図 3 は、アンチセンス SD I c DNA トランスフェクションを示す。アンチセンス c DNA 発現プラスミドを作り、若い細胞中に p CMV と同時トランスフェクションした。レーン 1：対照 p c D S R 、レーン 2：p c D S R - SD I - 1、レーン 3：p c D S R アンチ SD I - 1、レーン 4：p c D S R - SD I - 2、レーン 5：p c D S R - アンチ SD I - 2。

図 4 は、細胞加齢中の総 RNA からのポリ A + RNA 回収における変化を示す。 10

図 5 A - 5 D は、SD I - 1 c DNA のスクレオチド配列とアミノ酸配列を与える。

図 6 は、4 Gy の - 照射にさらす（白抜き円）か、または 400 μM 過酸化水素に 1 時間さらした（塗りつぶし図）後に得られた若い細胞（集団倍加 28）における SD I - 1 誘導の動力学を示す。

発明の詳細な説明：

I. 細胞老化

培養における、ヒト正常二倍体纖維芽細胞の複製的老化は、充分に確立され、かつ広く受け入れられている細胞加齢モデルである（ヘイフリック、L. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、37巻、611 - 636 頁（1965年）；ノルウッド、T. H. 等、およびスミス、J. R. 等、ハンドブック・オブ・ザ・バイオロジー・オブ・エイジング（第 2 版）C. E. フィンチおよび E. L. シュナイダー、バン・ノストランド出版、ニューヨーク、290 - 311 頁（1985年）；ゴールドシュタイン、S. 等、サイエンス、249巻：1129 - 1133 頁（1990年））。有限回数の集団倍加（population doublings）後、細胞が老化すると、それらは分裂したり大きくて平らな形態を表したりする能力を失う。この現象の根底にある原因となるメカニズムは、生化学レベルおよび分子レベルで老化細胞を特徴付ける多くの観察にも拘わらず、まだ理解されていない。

1 次元および 2 次元タンパク質ゲル分析により、老化細胞に特異的なマーカータンパク質はほとんど無いことが明らかにされている（リンカーン、D. W. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、154巻、136 - 146 頁（1984年）；ワング、E. 等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、100巻、545 - 551 頁（1985年）；スコッティー、J. 等、ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー、131巻、210 - 217 頁（1987年）；ベイロイテール、K. 等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・U.S.A.、85巻、5112 - 5116 頁（1988年））。老化細胞を特定する抗原性決定因子が、原形質膜上に見つけられた（ポーター、M. B. 等、ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー、142巻、425 - 433 頁（1990年））。フィプロネクチンおよびコラゲナーゼなどの細胞外マトリクスの成分が、老化細胞の中で過剰に発現されることが見い出された（ウエスト、M. D. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、184巻、138 - 147 頁（1989年）；クマザキ、T. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、195巻、13 - 19 頁（1991年））。しかしながら、これらの観察と細胞老化との関連性は明らかでは無い。 40

細胞周期は、成長因子により調節および制御されていることが分かっている。成長因子は、特定の細胞表面受容体に結合することにより、細胞周期の第 1 間期（G₁）に作用し、次に、促進初期応答遺伝子および遅延初期応答遺伝子の両方の転写を最終的に支配するシグナリング・カスケード（signaling cascades）を引き起こす。成長周期は、キナーゼ類、特に、“サイクリン - 依存性キナーゼ類”（“CDKs”）により、“サイクリン類”自身により、またホスファターゼ類により統御される（シェール、C. J. 等、セル、73巻、1059 - 1065 頁（1993年）、本明細書に参照して組み込んである）。

DNA 合成周期に關係する哺乳類キナーゼ類を同定するために、かなりの努力が払われて来た。脊椎動物の細胞において、サイクリン類のファミリーが同定されている（キイオン、Y. 等、セル、71巻、505 - 514 頁（1992年））。これら数種のサイクリン

10

20

30

40

50

類をコードする遺伝子配列が単離されている(モトクラ, T. 等、ネイチャー、350巻、512-515頁(1991年); キイオン, Y. 等、セル、65巻、691-699頁(1991年); ルウ, D. J. 等、セル、65巻、1197-1206頁(1991年); キイオン, Y. 等、カレント・バイオロジー、1巻、362-364頁(1991年); マツシメ, H. 等、セル、65巻、701-7139頁(1991年); イナバ, T. 等、ゲノミックス、13巻、565-574頁(1992年); キイオン, Y. 等、ゲノミックス、13巻、575-584頁(1992年))。

サイクリンD類は、成長周期を開始するためにG₁段階でCDK2、CDK4、およびCDK5と相互作用する(マツシメ, H. 等、セル、65巻、701-7139頁(1991年); シェール, C. J. 等、セル、73巻、1059-1065頁(1993年))。 10

サイクリンE/CDK2相互作用は、S期の開始を調節する(ルウ, D. J. 等、セル、66巻、1197-1206頁(1991年); コフ, A. 等、セル、66巻、1217-1228頁(1991年))。サイクリンAは、CDK2と相互作用して、成長周期のS期を調節することが示唆されている(シェール, C. J. 等、セル、73巻、1059-1065頁(1993年))。サイクリンAおよびBは、CDC2と相互作用し、S期の終了とG₂期の開始を媒介すると考えられている(ノーブリー, C. 等、アナリティカル・レビュー・オブ・バイオケミストリー、61巻、441-470頁(1992年); フアン, F. 等、セル、66巻、731-742頁(1991年); ウォルカー, D. H. 等、ネイチャー、354巻、314-317頁(1991年))。

最近、幾つかの成長調節遺伝子の発現における変化が明らかにされた。c-fos cdc2、サイクリンAおよびBの発現が老化細胞では減少することが見い出された(セサドリ, T. 等、およびカンピシ, J. 等、サイエンス、247巻、205-209頁(1990年))。同様に、老化細胞は、網膜芽種タンパク質をリン酸化する能力がないことを明示している(ステイン, G. H. 等、サイエンス、249巻、666-669頁(1990年))。これらの観察は、これらが全て成長促進遺伝子発現の低下変化であることから、当該細胞がS期に入る能力の無いことを強力に説明し得ると思われるが、しかしながら、これらが老化の原因であるのか、結果であるのかは明らかではない。

老化を引き起こす役割を持つと思われる遺伝子発現におけるもう1つの付加的な変化は、若い纖維芽細胞ではなく、老化纖維芽細胞により生成されたDNA合成の阻害因子(群)である(スピアリング, A. I. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、195巻、541-545頁(1991年)参照)。阻害因子(群)が存在する証拠は、最初、ヘテロカリオン実験から得られ、その中で老化細胞は、ヘテロカリオンの中の若い核内でDNA合成の開始を阻害した(ノルウッド, T. H. 等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・U.S.A.、71巻、2231-2234頁(1974年); ペレイラースミス, O. M. 等、およびスミス, J. R. 等、ソマティック・セル・ジェネティックス、8巻、731-742頁(1982年))。老化細胞質体と若い細胞全体を含むサイブリッド(cybrids)の研究は、老化細胞中の、表面膜結合タンパク質のDNA合成阻害因子の存在に対して、更なる支持を与えるものであった(ドレッシャー・リンク, C. K. 等、およびスミス, J. R. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、153巻、208-217頁(1984年))。このことは、老化細胞由来の表面膜含量が豊富な調製物、またはその膜から抽出したタンパク質を若い細胞の培養培地に加えたとき、DNA合成を阻害することが見い出されることで直接説明された(ペリラ・スミス, O. M. 等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、160巻、297-306頁(1985年); スtein, G. H. 等、およびアトキンス, L. 等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・U.S.A.、83巻、9030-9034頁(1986年))。この阻害因子の生化学的方法による精製は、現在までのところ、成功していない。しかしながら、マイクロインジェクション実験では、DNA合成阻害性メッセージジャーRNAが非常に多く存在することが示されている(ランプキン, C. K. 等、サイエンス、232巻、393-395頁(1986年))。

DNA合成阻害因子(群)をコードする遺伝子(群)のクローニングを試みるために、機能的ス 50

クリーニング法 (a functional screening procedure) が用いられた。この方法により、若いサイクリング細胞中に導入した場合に DNA 合成阻害活性を示す 3 種の c DNA を分離および同定した。これらの分子は、“老化細胞由来阻害因子群” (“SDI”) として本明細書に引用される好ましい分類の分子群である。

本発明の SDI 分子のクローニング、単離、配列決定、および特性化に続いて (例えは、PCT 出願番号 US 93/12251 参照) 、他の研究グループも同様の研究を行った。このような後続研究では、本発明の SDI-1 分子を WAF1、CIP1、PINC1、および p21 として記載している (ハーパー, J. W. 等、セル、75巻、805-816 頁 (1993 年) ; エル - デイリー, W. S. 等、セル、75巻、817-825 頁 (1993 年) ; キイオン, Y. 等、ネイチャー、366巻、701-704 頁 (1993 年) ; ハンター, T. 等、セル、75巻、839-841 頁 (1993 年)) 。

I I . 細胞老化の誘導物質のクローニング

本発明の実施に際し、老化ヒト二倍体纖維芽細胞中に存在する DNA 合成阻害性配列群の分子クローニングのために有効な方法が好適に用いられる。生物学的に重要な遺伝子群のクローニングを試みる場合そうであるように、その生産物の活性は容易に検出し得るのに、細胞老化にかかわる所望の遺伝子を精製するには可能でないこともある。

このような遺伝子配列を同定するために構想され得る 1 つの方法は、老化細胞由来 c DNA ライブリーのディファレンシャル (differential) またはサブトラクティブ (subtractive) スクリーニングを用いることであろう。この方法は、ヴェルナー症候群患者由来の細胞において過剰発現される c DNA 分子を同定するのに用いられている (ムラノ, S. 等、モレキュラー・セル・バイオロジー、11巻、3905-3914 頁 (1991 年 8 月)) 。ヴェルナー症候群は、希に遺伝する疾病である。それは早熟加齢 (premature aging) により特徴付けられている。自然の加齢とヴェルナー症候群との関連性は知られていない。

不運にも、このようなスクリーニングは、老化細胞の特定には重要であるけれども、老化の主要な原因ではない、多数の遺伝子を同定するだろう。更に、全長 c DNA のクローニングにおける技術的な制約が、これらの方法によりクローニングされる遺伝子群の機能決定を困難にしている。これらの理由から、このようなディファレンシャル法は、老化関連遺伝子配列群を同定するには、一般的に適切でもなく、また最も望ましい方法でもない。

反対に、発現スクリーニングは、このような老化関連遺伝子配列群の好ましい同定および分離方法を与えるものである。このスクリーニング法では、クローニングした遺伝子を受容細胞において発現する能力を有するベクター内で c DNA を直接クローニングする。こうして、DNA 合成における何等かの阻害に対して直接受容細胞をスクリーニングすることが出来る。

発現スクリーニングにおいて、最も重要な段階は、c DNA の合成である。酵素は、夾雜物がないように、注意深く選択されるべきである。c DNA 合成は、満足の行く結果 (即ち、正確な逆転写および十分な長さの転写サイズ) が得られることを確実にするために、好ましくは数回繰り返される。最終的に、c DNA 生産物は、好ましくは、断片になったり早すぎて終了した c DNA 生産物を除去するために、サイズ画分される。二本鎖 c DNA 生産物は、次いで、大きさに基づく画分、即ち、0.5-2.0、2.0-4.5、4.5-10 kb 画分に好適に分けられる。膜結合タンパク質の多くが、相対的に高い分子量を有するという推定のもとに、2-4.5 kb c DNA 画分を用いて、c DNA ライブリーを作成した。c DNA 群は適切な発現ベクター、好ましくは pCDSR の中に挿入され、挿入された配列群は若い細胞内で高レベルで転写され得る。

最も好ましいトランスフェクション法は、DEAE デキストラン媒介トランスフェクションであり、高い割合で若いサイクリング細胞を一時的に発現させる条件下で行われる。トランスフェクション頻度は、実験毎に変化するため、c DNA プールプラスミドを、pCMV (- ガラクトシダーゼをコードする) などのマーカープラスミドと一緒にトランスフェクションし、標識指数を - ガラクトシダーゼ陽性細胞のみでアッセイした。一般に、トランスフェクションした遺伝子群の同時発現は、トランスフェクション・コンピテ

10

20

30

40

50

ントな細胞が多くのプラスミドを受け入れることから、かなり高い。この簡単な同時トランسفエクション法は、細胞外DNAを発現する細胞におけるDNA合成の評価を可能にした。

同時トランسفエクションされるプラスミド量は、パイロット試験から容易に決定できる。トランسفエクション頻度と加えたプラスミドの量との間の相互関係は、マーカープラスミドを用いて試験され、最大効率は、プラスミド100-500ngの範囲で得られる。この結果を考慮に入れて、好ましくはcDNAライブラリーを、各プールが5種の独立したプラスミドクローンを含む小さいプールに分けた。次いで、pCMV 約100ngとcDNAプラスミド約400ngとで同時トランسفエクションを行う。これらのパラメーターは、マーカープラスミドのトランسفエクション頻度を低減すること無く、- ガラクトシダーゼ陽性細胞におけるcDNAの同時発現を最大にすることが見い出された。

スクリーニングの第2ラウンド後、DNA合成の強力な阻害を示した単一のプラスミドを、第1ラウンドスクリーニングの時に陽性と判断されたプールからうまく分離することが出来た(図2A、2B、2C)。図2A、2B、および2Cでは、第1ラウンドスクリーニングにおいて陽性を示したcDNAプールを個々のプラスミドに分け、再びトランسفエクションした。各cDNAプール(図2A、2B、2Cにおいて、それぞれA、BおよびC)について、プラスミドNo.1ないし5は、それぞれ単一プラスミドトランسفエクションの結果を示している。プールBでは、No.1プラスミドは、単なる空のベクターであることが分かった。プラスミドの阻害性活性は、好ましくは、核マイクロインジェクション実験により、更に確かめられる。このような実験は、分離されたプラスミドがDNA合成を阻害する能力を持つ配列群を含むことの、より直接的な証拠を与えるものである。

I I I . 本発明の分子

本発明の薬剤成分(“SDI分子類”として総括的に表す)は、活性細胞におけるDNA合成の阻害を誘導するか、または老化または静止細胞における、このような阻害を抑制するかのいずれかの能力を持つものである。それ自体、これらは、広範囲の治療および応用に用いられ得る。

本発明のSDI分子類は、SDI核酸分子類(例えば、SDI-1をコードする核酸分子、SDI-1フラグメントをコードする分子、SDI-1融合物をコードする分子、SDIアンチセンス分子、SDI三重鎖抑制分子、等)、SDIタンパク質分子類(即ち、SDI-1およびその融合体およびフラグメント類、かかる分子に対する抗体類、およびタンパク質類似体類およびかかる分子のもどき体類)、および非タンパク質もどき体類およびかかる分子の類似体類を含む。

このような分子類は、天然由来、または非天然由来のいずれかであり得る。天然由来のSDI-1分子は、該分子を含有する天然由来調製物中に存在するか、または存在し得る1またはそれ以上の分子が、除去されているか、または通常存在する濃度よりも低い濃度で存在するように、精製することができる。

本発明の分子類は、SDIタンパク質分子の構造に似ているかまたは模倣する三次構造を有する、核酸類、タンパク質類、炭水化物類、または、より好ましくは、有機分子類のいずれかができる。本発明は、更に、あらゆる天然由来SDI分子の代わりに、または該分子に加えて、SDI核酸分子類、SDIタンパク質分子類等のような分子類の生物学的に活性なフラグメントの使用に関係する。本明細書で使用する場合、分子は、受容細胞の増殖能力における影響を媒介する能力があるならば、細胞増殖に関して“生物学的に活性”であると言う。このような生物学的に活性とは、アンチセンス抑制を媒介する能力、または特定の核酸部位に、またはタンパク質、レセプター等の特定の活性部位と結合する(またはかかる結合のためにその他の分子と競合する)能力などの構造特性であり得る。これとは別に、このような特性は、触媒的であることもでき、また生物学的に活性な分子が化学反応、または受容細胞における応答を媒介する能力を含むこともある。

本発明は、このようなSDI分子類全ての“純化”形態での単離を可能にするものである。本明細書で使用する場合、SDI分子が、その天然状態で通常はSDI分子と結合する

10

20

30

40

50

分子が存在しない調製物中に存在するならば、“純化”と言う。タンパク質、脂質、SDI分子をコードしない核酸配列は、天然ではSDI分子と結合する分子の例である。

A. SDI核酸分子類、およびそれらのオリゴヌクレオチド

またはポリヌクレオチドフラグメント類

SDI核酸分子の好ましい分類は、核酸分子：SDI-1、SDI-2、およびSDI-3、およびそれらの生物学的に活性なフラグメントを含む。このようなフラグメントを同定するために、SDI核酸分子を、機械による方法により、またはより好ましい制限エンドヌクレアーゼ切断により、切断し、それによって、候補となるフラグメント（candidate fragments）を產生できる。次いで、このようなフラグメント類を細胞に与えることができ、それらがDNA合成を阻害する能力を追跡することができる。一実施態様では、タンパク質SDI分子のフラグメントをコードする遺伝子配列を受容細胞に投与することができる。

（連接した配列とともに、または、なしで）核酸SDI分子のフラグメントを投与することにより、SDI核酸分子の特定のフラグメントが、その構造からして生物学的な活性を有するかどうかを評価することが可能である。従って、例えば、かかる候補となるSDI分子を、正常細胞、不死化細胞、または腫瘍細胞のいずれかに導入してもよく、細胞が更に増殖する能力を追跡することができる。

この方法で、細胞増殖を抑制する、または静止を誘導する配列を同定できる。

かかる方法を使用することにより、SDI-1のアミノ末端側半分をコードする核酸分子が、不死化細胞または腫瘍細胞を静止状態に転換させる能力を示すことが分かった。より詳細には、SDI-1アミノ酸残基1-70をコードする核酸分子は、細胞静止を導く能力があることが分かった。残基1-70がSDI-1の触媒ドメインを含有するという認識により、SDI-1をコードする配列のその他のフラグメントが触媒活性を有することが示される。候補となる好ましいオリゴヌクレオチドフラグメントは、SDI-1アミノ酸残基：5-70、10-70、15-70、20-70、25-70、30-70、35-70、または40-70をコードする核酸分子を含む。

下記のとおり、本発明の一態様は、SDI-1 mRNAのレベルを測定する方法に関係する。SDI核酸分子とハイブリダイズする能力のある核酸分子は、かかる診断目的に使用できる。本明細書で使用する場合、2つの核酸分子は、2つの分子が、逆平行構造、二本鎖核酸構造を形成できるならば、もう一方とハイブリダイズできると言う。これらの分子は、これらが、少なくとも常用の“低ストリンジエンシー”条件でもう一方にアニールした状態を維持させるに十分な安定性を伴ってもう一方とハイブリダイズできるならば、“最小限に相補的”であると言われる。同様にして、これらの分子は、これらが、常用の“高ストリンジエンシー”条件でもう一方にアニールした状態を維持させるに十分な安定性を伴ってもう一方とハイブリダイズできるならば、“相補的”であると言う。理解されると思うが、相補的分子は、“完全な相補性”（即ち、1方の分子の全てのヌクレオチドが、他方のヌクレオチドに対して相補的である）を示す必要はなく、その配列が、所定の溶媒および塩濃度下で安定な二本鎖構造を形成できるために十分に相補的であることが必要である。核酸分子は、これらが、完全な相補性を示すならば、もう一方の核酸分子の“相補体（complement）”であると言う。常用のストリンジエンシー条件は、サンブルック、J.等により（モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリ・マニュアル、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・プレス、ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー（1989年）に）、およびヘイムス、B.D.等により（ヌクレオイック・アシッド・ハイブリダイゼーション、ア・プラクティカル・アプローチ、IRLプレス、ワシントンDC（1985年）、両方とも本明細書に参照して組み込んである）記載されている。従って、完全な相補性がなくても、それが、分子の二本鎖構造形成能力を完全に妨げるものでなければ、差し支えないである。

SDI核酸分子にハイブリダイズさせるために使用され得る核酸分子は、好ましくは、かかるSDI分子よりも短いものである。好ましい分子は、SDI核酸分子に対して完全に相補性であり、約15ないし約250ヌクレオチドの長さ、最も好ましくは約15ないし

10

20

30

40

50

約30ヌクレオチドの長さを有するものである。

このような核酸分子は、固相オリゴヌクレオチド合成法を用いて得ることができるが、より好ましくは、このような分子を、SDI核酸分子のフラグメントに対して相補的であるプライマー分子のポリメラーゼ媒介化鑄型依存性鎖伸長を介して得る。このようなSDI核酸分子のフラグメントは、約15ないし約250ヌクレオチドの長さを有し、最も好ましくは、約15ないし約30ヌクレオチドの長さを有する。かかるフラグメントは、DNAまたはRNAであることができ、かつ、ベクター内に組み込まれていてもよく、または実質的に他の核酸分子がない状態であり得る。

B. 核酸SDI分子によりコードされるタンパク質およびポリペプチド

本発明は、更に、SDI核酸分子またはそれらのオリゴヌクレオチドフラグメントによりコードされるタンパク質およびポリペプチドを含む。SDI核酸分子の配列は、静止および老化に関連するDNA合成の阻害を抑制するか、またはかかる状態を増殖細胞に引き起こすかのいずれかのために使用され得るコード化タンパク質およびポリペプチド分子の帰属および同定を可能にするものである。かかる分子のアミノ酸配列は、核酸分子のヌクレオチド配列とそれがコードするタンパク質のアミノ酸配列との知られた関係から容易に得ることができる。治療上有効なタンパク質類およびポリペプチド類を、治療上有効なSDI核酸フラグメントを同定する上記方法に類似した方法を用いて同定できる。かかるタンパク質を変異させることにより、DNA合成を阻害する能力を欠失した分子を同定することが可能である。このような変異分子の中には、SDIコード化タンパク質およびポリペプチドの阻害作用を反転させるに十分な優位作用を発揮できるタンパク質がある。

一実施態様では、かかる分子を、核酸SDI分子を切断し、次いで、切断フラグメントを翻訳可能な発現ベクター内に組み込むことにより、同定する。この方法では、それぞれが異なるポリペプチドフラグメントを生成する核酸分子のライブラリーを得ることができ、かつ評価できる。このような発現は、付加的または外来タンパク質がなくても良く、また、特定の融合タンパク質に対するSDIフラグメントの融合体を含んでなる場合もある。発現したタンパク質の生物学的な活性は、かかるフラグメントを受容細胞中に導入し、静止または増殖におけるかかる導入の影響を測定することにより評定できる。別法として、かかる分子を、生物学的に活性なSDI分子と結合するように前処理したカラムに通すことができる。かかるカラムは、例えば、p53、SDI-1、RB、サイクリンD、cdk2、等を結合させた状態で含有することができ、かかる分子に結合する能力を有するフラグメントを同定できる。

タンパク質フラグメントSDI分子の例には、SDI-1の最初の70アミノ酸があり、これは、SDI-1の場合と類似する生物学的な活性を有する。より小さいフラグメント（例えば、SDI-1残基：5-70、10-70、15-70、20-70、25-70、30-70、35-70、または40-70を含有するもの）を採用することもできる。SDI-1アミノ酸残基29-45を有するタンパク質フラグメントが、特に望まれる。保存的アミノ酸置換を考慮するとき、SDI-1のこの領域は、PCNAに対して31%の同一性と62%の類似性を示す。SDI-1とPCNAの双方がサイクリン-Cdk複合体と相互作用するため、共通の保存領域（SDI-1アミノ酸残基29-45）は、かかる相互作用に關係していると考えられている。従って、この保存領域を含有するSDI-1のフラグメントは、SDI-1の阻害因子を含んでなり、実際にSDI-1機能を示すことができる。

典型的には、SDIタンパク質およびタンパク質フラグメントは、付加的なアミノ酸残基のない状態で生成されるものである。別法として、SDIタンパク質およびタンパク質フラグメントは、アミノ酸またはポリペプチドに融合した状態で生成されることもある。かかる合成は、常用のペプチド合成法を用いて、または、より好ましくは、組換え法を用いて達成できる。融合分子が望まれる場合は、かかる分子は、融合分子のSDI部を該融合タンパク質の残部から切断できるような選択可能な切断部位を含有し得る。

特に好ましい融合分子は、グルタチオンS-トランスフェラーゼグルタチオン結合配列をSDI分子のアミノ末端に融合することにより生じる。かかる融合タンパク質は、カラム

10

20

30

40

50

にかけた場合のそれらの保持時間によって容易に回収できる。この融合タンパク質は、グルタチオンで洗浄することによりカラムから除去できる。GST-SDI-1融合タンパク質は、ペプチド合成、例えば、SDIタンパク質をグルタチオンS-トランスフェラーゼとの融合体として合成することにより、生成できる。別法として、組換えDNA法を用いて、GSTをコードするポリヌクレオチドをSDI-1またはそれらのフラグメントをコードするポリヌクレオチドとつなぐことができる。グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)の配列は知られており、この配列を含有するベクターが、報告されている(ロス、V.L.等、バイオケミカル・ジャーナル、294巻、373-380頁(1993年);コムストック、K.E.等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、268巻、16958-16965頁(1993年);タカハシ、Y.等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、268巻、8893-8898頁(1993年);クロン、A.等、バイオケミカル・ジャーナル、285巻、925-928頁(1992年);スタンベルグ、G.等、プロテイン・エクスプレッション・アンド・プリフィケーション、3巻、80-84頁(1992年);モロー、C.S.等、ジーン、75巻、3-12頁(1989年))。

これとは別の好ましい融合分子は、アミノ末端[His]6リーダー配列を有するものである。かかるリーダー配列が存在すると、SDIタンパク質の活性は実質的に低減しない。より好ましくは、SDI-1のアミノ末端メチオニンと結合した配列MRGSHHHHHGA(配列番号4)を有するリーダー配列を採用する。

好ましい融合体は、実質的に全てのGSTタンパク質を含む。特に好ましい融合体として、シストソーマ・ジャポニカムのGSTを採用する。このGSTの配列は、スミス等(ジーン、67巻、31頁(1988年))に記載されており、このGSTをコードするポリヌクレオチドは、商業的に入手できる(pGEX-2T; ファルマシア)。シストソーマ・ジャポニカムのGSTをコードするDNA配列は、配列番号5として示しており; コード化アミノ酸配列は、配列番号6に示している。様々な方法のどれを用いても、かかる好ましい融合体を産生できる: 詳細な方法は、実施例20に与えている。一実施態様において、シストソーマ・ジャポニカムのGSTをコードするポリヌクレオチドにおける制限エンドヌクレアーゼ認識部位を用いて、このポリヌクレオチドを切断できる。次いで、切断生成物を、所望のSDI分子をコードするポリヌクレオチドにライゲートできる。こうして、例えば、シストソーマ・ジャポニカムのGSTをコードする配列をBamHIで切断して、GSTをコードするポリヌクレオチドのヌクレオチド1-673を含有するポリヌクレオチドフラグメントを得(該分子のヌクレオチド673-678に位置する部位でBamHI切断する)、次いで、そのフラグメントをSDI遺伝子配列(SDI-1をコードするポリヌクレオチドなど)にライゲートすることにより、好ましい融合体を作成できる。例えば、SDI-1をコードするポリヌクレオチドを用いる場合、発現時に、SDI-1のアミノ末端につなげられたGSTの232アミノ酸の最初の226を含有する融合タンパク質が産生されるように、遺伝子融合により、GSTフラグメントをSDI-1ポリヌクレオチドにつなぐ。

下記のとおり、本発明の一態様は、SDI-1に対する抗体に関係する。上記タンパク質およびポリペプチドを用いて、本発明の方法に従い使用され得るポリクローナルまたはモノクローナル抗体を顕現させることができる。

C. SDI分子の機能的類似体

本発明は、SDI分子の“機能的類似体”にも関係する。かかる類似体は、“古典類似体”と“もどき類似体”的双方を含む。SDI分子の古典類似体とは、類似の生物学的活性を持ち、化学的にSDI分子に関連しているものである。例示説明すると、SDI活性を有する非天然由来の変異体タンパク質は、タンパク質SDI分子の古典類似体を構成するものである。同様に、変異化SDI核酸分子は、SDI遺伝子配列の古典類似体の一例を構成するものである。また、ヒト以外の哺乳類(例えば、マウス、サルなど)から単離されたSDI分子は、SDI遺伝子配列の古典類似体の一例を構成するものである。これとは反対に、SDI分子の“もどき類似体”とは、その分子の生物学的活性は保有するが、

典型的に、化学的には無関係である。その構造が S D I タンパク質の活性部位によく似ているような有機分子は、そのタンパク質の“もどき類似体”を構成するものである。同様に、S D I の核酸結合部位に結合できる、または S D I により認識される非核酸分子は、その分子のもどき類似体である。

従って、機能的類似体は、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、タンパク質性化合物（グリコシル化、および非グリコシル化タンパク質を含む）、または非タンパク質性化合物（例えば、ステロイド、糖脂質など）のいずれかであることができ、ただし、該成分は、S D I 核酸分子の全体、またはそれらのオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドフラグメントのいずれか、またはかかる分子またはフラグメントによりコードされるタンパク質またはポリペプチドの機能をまねるものである。好ましい古典類似体には、その配列が S D I タンパク質の活性触媒部位または結合部位を含んで成るポリペプチド（環状ペプチド並びに直鎖状ペプチドを含む）、または S D I 活性を抑制するか、または誘導するかのいずれかの能力を有する核酸 S D I 分子のオリゴヌクレオチドフラグメントがある。好ましいもどき類似体には、S D I タンパク質のフラグメントまたはそれらの変異体ではないにもかかわらず、S D I 様の手段で静止を誘導したり、S D I アンタゴニストのような手段で細胞増殖を誘導する能力を示すポリペプチドがある。

古典類似体は、下記のとおり、合理的に、または確立された変異誘発法を介して、同定できる（例えば、ワトソン、J. D. 等、モレキュラー・バイオロジー・オブ・ザ・ジーン、第4版、ベンジャミン/キュミングス、メンロ・パーク、カルフォルニア（1987年））。重要なのは、無作為変異誘発法は、変異させる遺伝子配列についての *priori* 情報を必要としないことである。この方法は、その機能に基づいて、特定の変異が望ましいかどうかを評価する利点を有し、従って、どのように、または、なぜ、生じた変異体タンパク質が特定のコンホーメーションを取るかを理解する必要がない。実際に、標的遺伝子配列の無作為の変異は、所望の特性を有する変異体タンパク質を得るために使用される1つの手法である（レザーバロウ、R. J. 、プロテイン・エンジニアリング、1巻、7-16頁（1986年）；ノウルス、J. R. 、サイエンス、236巻、1252-1258頁（1987年）；ショウ、W. V. 、バイオケミカル・ジャーナル、246巻、1-17頁（1987年）；ゲリ、J. A. 、ケミカル・レビュー、87巻、1079-1105頁（1987年））。別法として、特定配列の変更が望まれる場合、部位指向性変異誘発（site-directed mutagenesis）法を採用できる。従って、このような方法を使用して、重要であると考えられるようなタンパク質のアミノ酸のみを選択的に変えることができる（クライク、C. S. 、サイエンス、228巻、291-297頁（1985年）；クロニン、C. S. 等、バイオケミストリー、27巻、4572-4579頁（1988年）；ウィルクス、H. M. 等、サイエンス、242巻、1541-1544頁（1988年））。

S D I 分子の核酸類似体は、p 53、またはその他の細胞調節因子により調節されるそれらの能力により評価され得る。これとは別に、細胞増殖に影響を与えるそれらの能力を直接アッセイすることができる。S D I のタンパク質類似体の場合、変異体タンパク質を精製し、その活性を S D I 分子と比較することにより、このような研究を達成できる。かかる変異体の分析は、ファージ表示タンパク質リガンドスクリーニング系（phage display protein ligand screening system）の使用により促進され得る（ロウマン、H. B. 等、バイオケミストリー、30巻、10832-10838頁（1991年）；マークランド、W. 等、ジーン、109巻、13-19頁（1991年）；ロバーツ、B. L. 等、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシス（U. S. A. ）、89巻、2429-2433頁（1992年）；スミス、G. P. 、サイエンス、228巻、1315-1317頁（1985年）；スミス、R. P. 等、サイエンス、248巻、1126-1128頁（1990年）、全て本明細書に参照して組み込んである）。一般に、この方法は、所望のタンパク質リガンドがウイルスのコートタンパク質（例えば、M 13 遺伝子IIIコートタンパク質、またはラムダコートタンパク質）の C 末端に融合している融合タンパク質を発現することを含んでいる。

10

20

30

40

50

天然由来 S D I 分子のもどき類似体は、常用のまたは合理的な薬剤デザインの原理を用いて得ることができる（アンドリュース，P. R. 等、プローシーディングス・オブ・ザ・アルフレッド・ベンゾン・シンポジウム、28巻、145-165頁、ムンクスガールト、コペンハーゲン（1990年）；マックパーソン，A.、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー、189巻、1-24頁（1990年）；ホル，W. G. J. 等、モレキュラー・レコグニション：ケミカル・アンド・バイオケミカル・プロブレンズ、ロバート，S. M. 編；ロイヤル・ソサイエティー・オブ・ケミストリー；84-93頁（1989年）；ホル，W. G. J. 、アルツナイム・ホルシュ、39巻、1016-1018頁（1989年）；ホル，W. G. J. 、アグニュー・ケミカル・インターナショナル・エディション・イングリッシュ、25巻、767-778頁（1986年）、全て 10 本明細書に参照して組み込んである）。

常用の薬剤デザイン法に従い、所望のもどき分子は、その構造が“本来”の S D I 分子の構造と共に通の特質を有するものである分子、または S D I 分子と相互作用する分子を無作為に試験することにより得られる。結合する分子の特定の基を変えることにより生じる量的貢献を、本来の S D I 分子と推定もどき体との競合、または協同性の能力を測ることにより、測定できる。

合理的薬剤デザインの一実施態様では、もどき体は、S D I 分子の最も安定な三次元コンホーメーション特性を共有するように設計される。従って、S D I 分子のもどき類似体を、S D I 分子により示されるのと類似のイオン性、疎水性、またはファン・デル・ワールス相互作用を引き起こすのに十分な方法で配向される化学基を所有するように設計できる 20 。合理的デザインの第2の方法では、特定の S D I 分子がコンホーメーション的“休息”（conformational “breathing”）を受ける能力を活用する。このような“休息”---異なる分子コンホーメーションを一時的かつ可逆的にとること---は、十分に認識される現象であり、温度、熱力学的因子により、また分子の触媒活性により生じる。S D I 分子の三次元構造は、かかる評価を容易ならしめるものである。S D I 分子の天然のコンホーメーション変化を評価すると、ヒンジ部位である可能性のある部位、即ち、水素結合、イオン結合、またはファン・デル・ワールス結合が生じ得るかまたは分子の休息等によって排除され得る可能性のある部位、の認識が容易である。このような認識は、S D I 分子がとり得る更なるコンホーメーションの同定を可能にし、かかるコンホーメーションを共有するもどき類似体の合理的デザインおよび生成を可能にする。 30

合理的もどき体デザインを行うのに好ましい方法は、S D I 分子の三次元構造の画像（RIBBON（プリエストル，J.、ジャーナル・オブ・モレキュラー・グラフィックス、21巻、572頁（1988年）を用いて得られるようなもの）、QUANTA（ポリゲン）、InSite（ビオシン）、またはナノビジョン（アメリカン・ケミカル・ソサイエティー）を形成できるコンピューターシステムを採用するものである。このような分析は、ホル，W. G. J. 等により（モレキュラー・レコグニション：ケミカル・アンド・バイオケミカル・プロブレンズ、ロバーツ，S. M. 編；ロイヤル・ソサイエティー・オブ・ケミストリー；84-93頁（1989年）に、ホル，W. G. J. 、アルツナイム・ホルシュ、39巻、1016-1018頁（1989年））、およびホル，W. G. J. 、アグニュー・ケミカル・インターナショナル・エディション・イングリッシュ、25巻、767-778頁（1986年）に）例示されている。 40

このように推定 S D I 類似体を直接比較評価する代わりに、スクリーニングアッセイを用いて、かかる分子を同定してもよい。このようなアッセイは、好ましくは、S D I 類似体が細胞増殖または静止に影響を与える能力を活用するものである。別法として、この分子を結合リガンド、例えば、p 53、Rb、サイクリンD等を含有するカラムにかけることができ、カラムに結合する分子の能力を S D I 分子との比較により評価できる。これとは別に、変異化 S D I 分子（D N A 合成の S D I 媒介化阻害を阻害する）をアンタゴニストである疑いのある化合物と共に投与できる。この場合、細胞を追跡して、化合物が D N A 合成の阻害を再興できるかどうかを測定する。

このようなアッセイは、S D I 分子のペプチドまたはオリゴヌクレオチドフラグメント、 50

またはもどき体、またはかかる分子の類似体を同定するのに特に有用である。従って、例えば、オリゴヌクレオチドまたはペプチドSDI類似体（またはフラグメント）およびアンタゴニストである疑いのある化合物のいずれもが存在する中で、細胞をインキュベートできる。細胞を追跡して、化合物が、DNA合成を阻害するSDIオリゴヌクレオチドの能力を減ずることができるかどうかを測定する。上記に示したとおり、カラム競合アッセイを、別法として実施しても良い。こうして、所望のSDI古典およびもどき類似体を様々な方法によって同定することができる。

重要なことに、SDI分子がそれらのDNA合成の阻害を媒介するメカニズムを高く評価することにより、類似体の単離および認識に対する、代替のまたは相補的な手法が提供される。

上記に示したように、サイクリン依存性キナーゼは、細胞DNA合成の過程を統御するのに重要な役割を果たす（ドラエッタ、G.等、レンズ・バイオロジカル・サイエンス、15巻、378-383頁（1990年））。本発明のSDI分子を用いて、このようなキナーゼの役割、およびかかるサイクリンとの関りを詳しく分析することができ、それによって、DNA合成を阻害するために使用できるSDI類似体を同定できる。例えば、D型サイクリン類は、DNA合成のG1期またはS期において役割を果たすと考えられている（キイオン、Y.等、セル、71巻、505-514頁（1992年））。サイクリンD/cyclinタンパク質のレベルは、G1期に増大し、S期およびG2期中に減少し、有糸分裂後最下点に達する（マツシメ、H.等、セル、65巻、701-7139頁（1991年）；クリオカワ、H.等、プロシードィングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ（U.S.A.）、89巻、2444-2447頁（1992年）；キイオン、Y.等、セル、71巻、505-514頁（1992年））。

キイオン、Y.等（セル、71巻、505-514頁（1992年））は、サイクリンD1およびCDK2に結合（アソシエート）する21kdのポリペプチドの存在を報告した。免疫学的沈降法を用い、その際、細胞の放射標識化抽出物を抗サイクリン抗体の存在下でインキュベートした。これらの抗体類に結合するタンパク質を電気泳動にかけ、可視化した。

この21kdのポリペプチドの配列は、現在、決定されており、SDI-1によりコードされることが分かっている。従って、SDI-1コード化分子はDNA合成を阻害するため、本発明は、この21kdのタンパク質の生物学的役割（例えば、細胞のG1期からS期への、およびS期からG2期への移行を統御する）を確認するものである。さらに、SDI-1コード化タンパク質は、サイクリンD1およびCDK2と相互作用するため、本発明は、この相互作用を阻害または低減する成分が、SDI分子の類似体であることを確認するものである。

21kdのポリペプチドとサイクリンD1およびCDK2分子の結合を示すためにキイオン、Y.等（セル、71巻、505-514頁（1992年））により使用された免疫学的沈降法を活用して、他のSDI分子がそれらの阻害作用を媒介することによるメカニズムまたは経路を測定することができ、それによって、他の類似体の同定が可能になる。

例えば、SDI-2またはSDI-3配列を、またはアンチセンス分子をどちらかについて感染させた細胞を分析して、これらが、予めサイクリン分子に結合することが示されている何等かのタンパク質を発現するかどうかを測定できる。これは、処理した細胞の抽出物を抗サイクリン抗体と共にインキュベートした場合に、特定のタンパク質を免疫沈降するかどうかを測定することにより、最も容易に行える。このような方法は、SDI分子が相互作用する分子を同定するので、かかるSDI分子がそれらの阻害作用を媒介することによる経路を確認するものである。この経路を害する、あるいは作用する分子は、かかるSDI分子の類似体である。従って、本発明の方法を用いて、細胞周期の幾つかの調節因子の阻害因子を同定できる。実際にSDI-1タンパク質は、CDK4およびCDK5、並びにCDK2と相互作用することが分かっている。従って、SDI-1タンパク質は、多数のCDKおよびサイクリン分子と相互作用するようである。

それ故に、SDI分子が、サイクリンおよびCDK分子との相互作用を介して細胞増殖の

統御を発揮するという認識により、SDI類似体の同定に対する代替手法が提供される。同様に、他の細胞調節因子が、SDI転写または発現を調節することにより、それらの作用を媒介するという認識により、SDI類似体を同定するまた別の代替法が提供される。例えば、SDI-1遺伝子の転写は、“腫瘍抑制”遺伝子により、また最も顕著には、p53腫瘍抑制遺伝子により調節されることが分かっている。実際に、p53の“腫瘍抑制”能力は、SDI-1発現を誘導し、それによって、腫瘍細胞において細胞静止を誘導する能力から生じるものである。

p53遺伝子は、腫瘍抑制タンパク質をコードすることが予め分かっている（サガー、R.、サイエンス、246巻、1406-1412頁（1989年）；ファインレイ、C.、セル、57巻、1083頁（1989年）；ワインベルグ、R.A.、サイエンティフィック・アメリカン、1988年9月、44-51頁；レーン、D.等、ジーンズ・デベロップメント、4巻、1-8頁（1990年））。p53遺伝子は、フレンド赤白血病ウイルスの形質転換作用に対して保護的な役割を果たすこと（ムンロー、D.等、オンコジーン、2巻、621頁（1988年））、および染色体安定性、分化および静止、および細胞増殖に影響を及ぼすこと（サガー、R.、サイエンス、246巻、1406-1412頁（1989年））も分かっている。野生型p53が電離性放射線後の細胞周期停止に必要であり、野生型p53の構成性発現が、哺乳類細胞をG1期に停どめることが分かっている。細胞周期停止を誘導する能力は、p53の腫瘍抑制機能に関連すると考えられている。p53遺伝子によりコードされるタンパク質は、SV40ラージT抗原およびアデノウイルスE1B55kdタンパク質の双方と安定な複合体を形成する核タンパク質である。あらゆる腫瘍細胞の約50%が、p53発現を減少させるか、または抹消する変異を示す。p53遺伝子は、結腸直腸癌において、ある役割を有するものとして関わりを持つものである（ベーカー、S.J.等、サイエンス、244巻、217-221頁（1989年））。研究は、p53遺伝子座を包含する対立遺伝子欠失が、75%以上の結腸直腸癌で起こることを示している（ベーカー、S.J.等、サイエンス、244巻、217-221頁（1989年））。この領域の欠失は、（良性）腺癌段階から（悪性）癌段階への移行をマークすることが分かった（ホーゲルシュタイン、B.等、ニュー・イングリッシュ・ジャーナル・オブ・メディシン、319巻、525頁（1988年））。

染色体17における同様の欠失が、胸および肺癌を含む広範囲の癌において同定されている（マッケイ、J.等、ランセットii、1384頁（1988年）；ジェームス、C.D.等、キャンサー・リサーチ、48巻、5546頁（1988年）；ヤコタ、J.等、プロシードィングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ（U.S.A.）、84巻、9252頁（1987年）；トグチダ等、キャンサー・リサーチ、48巻、3939頁（1988年））。様々なヒト腫瘍（脳、大腸、胸、肺）が、2つの正常なp53対立遺伝子の内の1つを失い、残りのp53対立遺伝子が点変異を被っている細胞によって特徴付けられている（ニグロ等、ネイチャー、342巻、705-708頁（1989年））。フィーロン等（セル、61巻、759-767頁（1990年））は、p53対立遺伝子における点変異および欠失の双方は、十分に発癌性の表現型に対して欠かせないものであり得ると仮定している。これらの知見は、p53遺伝子が多くの型の癌においてある役割を持ち得ることを示唆している。

最近では、p53遺伝子における変異がリィーフロウメニ症候群、即ち、珍しいヒトの遺伝子異常の原因であり得ることが示唆されている（マルキン、D.等、サイエンス、250巻、1233-1238頁（1990年）；マークス、J.等、サイエンス、250巻、1209頁（1990年）、両方とも本明細書に参照して組み込んである）。この疾患にかかっている個体は、数種の悪性腫瘍 - 胸癌、柔組織肉腫、脳腫瘍、骨肉腫、白血病、および副腎皮質癌を非常に生じ易い。この疾患は、黒色腫、生殖腺胚細胞腫瘍、および、肺、すい臓、および前立腺の癌の高い発病率にも関連する（リィ、F.P.等、アナリティカル・インターナル・メディシン、71巻、747頁（1969年）；バーチ、J.M.等、ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー、8巻、583頁（1990年）；バーチ、J.M.等、ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー、49巻、325

10

20

30

40

50

頁(1984年)；リイ, F. P. 等、キャンサー・リサーチ、48巻、5358頁(1988年)；ウィリアムス, W. R. 等、ファミリアル・キャンサー、ファースト・インターナショナル・リサーチ・カンファレンス、151頁(カルガー、バーゼル、1985年)；ストロング, L. C. 等、ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート、79巻、1213頁(1987年))。

広範囲にわたる先行技術によるp53遺伝子の生物学的役割の特徴付けにもかかわらず、その遺伝子産物がその腫瘍抑制活性を媒介することによるメカニズムは、依然解明されていない。本発明の一実施態様は、このメカニズムがSDI-1に関係するという発見に関連するものである。正常p53タンパク質は、SDI-1の発現を増大し、かかる増大した発現が細胞増殖を抑制する。p53機能を欠く腫瘍細胞では、SDI-1レベルは非常に低く、そのため、細胞増殖を起こすことが出来るのである。

SDI-1の過剰発現による細胞増殖阻害の生理学的重要性は、SDI-1がサイクリン/cdk2複合体のキナーゼ活性を阻害できることを見い出したことにより増強される。GST-SDI-1融合タンパク質を、cdk2抗血清よりヒーラ細胞抽出物から免疫沈降させたサイクリン/cdk2複合体に加えた結果、ヒストンH1キナーゼ活性の最大阻害の半分を阻害した。

従って、p53の腫瘍抑制活性を阻害する分子は、SDI-1のアンタゴニストであり；同様に、p53の腫瘍抑制活性を高める分子は、SDI-1のプロタゴニストであって、これもまた本発明に包含されるものである。

正常ヒト細胞において、SDI-1は、サイクリン、CDK、および増殖細胞核抗原、即ち、“PCNA”(ワガ, S. 等、ネイチャー、369巻、574-578頁(1994年)、本明細書に参照して組み込んである)との複合体として存在することが分かった。PCNAは、細胞が損傷を受けたDNAを修復する除去修復経路に関連する。SDI-1は、PCNAがDNAポリメラーゼを活性化する能力を遮断(ブロック)するように働く。そのため、細胞DNAがS期の前に損傷を受けた場合、p53を導入して、SDI-1遺伝子の転写活性化を導く。発現したSDI-1タンパク質は、CDK/サイクリン媒介化DNA複製物と複合体を形成し、そうして、PCNAに損傷の除去修復を媒介させる。細胞DNAがS期中に損傷を受けた場合、除去修復は、損傷を増大する可能性を導くであろう。従って、損傷がS期に生じるときは、発現したSDI-1タンパク質はPCNAと複合体形成して、複製過程を停止させる。下記(実施例22)に示した通り、23kDaのタンパク質は、SDI-1タンパク質の不活性なリン酸化誘導体の特性を示すことを同定している。この誘導体は、PCNAのSDI-1阻害が完全なDNA修復過程の後に休止されることによるメカニズムに関係し得る。

このようなSDI-1とPCNAとの相互関係の知識を用いて、SDI-1のアンタゴニストまたはもどき体を同定することができる。従って、例えば、SDI-1がS期にある細胞中でPCNAと複合体を形成する能力を阻害する分子は、SDI-1作用のアンタゴニストおよび阻害因子を含む。逆に言えば、S期にある細胞中でSDI-1がPCNAと複合体を形成する能力を高める分子は、SDI-1もどき体を含む。

D. SDI分子のアンタゴニスト

本発明は、従って、SDI分子のアンタゴニストにも関する。このようなアンタゴニストは、SDI機能と競合するまたは阻害するSDI類似体を含み得る。あるいは、このようなアンタゴニストは、SDI分子と相互作用する細胞サイクリンまたはp53のような分子の類似体を含み得る。

任意の変法が、SDI機能を阻害または抑制するポリペプチドまたは非タンパク質性分子の同定に使用できる。このような分子は、それらが正常SDI分子と競合するか否か、または細胞中のその存在がSDI分子の静止状態の誘発能力に影響するか否か測定するため評価できる。例えば、p53分子と競合的に結合する核酸分子は、SDI分子のアンタゴニストである。このような競合因子は、親和性カラム、またはDNAse-フットプリントティング法により容易に同定できる。

SDI配列と相互作用し、活性化できるp53の類似体または他の腫瘍抑制タンパク質は

10

20

30

40

50

、アンタゴニストの別のクラスである。p 5 3 (および他の腫瘍抑制因子)の阻害因子が、同様に S D I 分子のアンタゴニストである。このような分子は、例えば、p 5 3 をコードする c D N A の変異、および S D I - 1 遺伝子配列または S D I - 1 タンパク質に結合する能力を残しているが、他は不活性である p 5 3 変異体の同定により得られ得る。p 5 3 遺伝子の c D N A の配列およびゲノム形は記載されている(全て参考として本明細書に包含する、ペニカ , D . ら、ヴィロロジー、134:477-482(1984) ; ジエンキンス , J . ら、ネイチャー、312:651-654(1984) ; オーレン , M . ら、EMBOジャーナル、2:1633-1639(1983) ; ザフト - ホウリ , R . ら、ネーチャー、306:594-597(1983))。

あるいは、候補となる阻害因子を、受容細胞に提供でき、正常 p 5 3 機能を障害するその能力を確認できる。例えば、このような分子の、p 5 3 が S V 4 0 ラージ T 抗原と複合体を形成するのを阻害する能力を試験できる(デカプリオ , J . A . ら、セル、54:275-283(1988) ; クローフォールド , L . V . 、インターナショナル・レビュー・オブエクスペリメンタル・パロジー、25:1-50(1983) 参照)。

同様に、多くの手段が、D N A 合成の S D I - 媒介化阻害を阻害または抑制する核酸分子の同定のために開発できる。例えば、S D I 核酸配列を変異させることができ、この変異配列は、D N A 合成の阻害を示さず、従って所望の変異 S D I 配列を受容している細胞の同定のために細胞に提供される。更に別の方法において、不死化細胞系の S D I 遺伝子配列は、それらが細胞静止媒介能力を欠失している変異 S D I 遺伝子を含むか否かを測定するために評価できる。このような方法において、ある不死化細胞(約 10 %)は S D I - 1 遺伝子の変異体を持ち、S D I - 1 のアミノ酸残基 3 1 のアルギニンの置換をもたらす(この位置に通常見られるセリン残基の変わり)。このような発見もまた S D I - 1 の残基 3 1 を S D I - 1 の活性部位または構造に関連するものとして包意するものである。12名の正常白人ドナー由来のD N A はこの S D I - 1 置換体を有しないため、A rg₃₁ S D I - 1 変異体が、変異よりむしろ多形現象を反映することはありそうにない。

他の変異 S D I タンパク質は、種々の細胞系の S D I タンパク質のスクリーニングにより同定されている。従って、例えば、アミノ酸残基 5 4 に通常見られるバリンは、アラニンで置換されているか、またはアミノ酸残基 8 0 に通常見られるスレオニンが、メチオニンで置換されているような S D I - 1 変異体が同定されている。

あるいは、このような核酸分子から発現される変異 S D I 配列は、p 5 3 タンパク質、またはrb等のような他の腫瘍抑制遺伝子の遺伝子生産物に結合する能力を評価できる。

更に別の態様において、“三重”核酸分子を使用して、所望の治療を提供し得る。“三重”分子とは、その転写を阻害するのに充分な方法で、2本鎖D N A に結合できる核酸分子である。このようなオリグヌクレオチドは、この目的に充分な任意の長さができる。好ましくは、オリグヌクレオチドは約 10 - 30 ヌクレオチド長、更に好ましくは約 15 - 24 ヌクレオチド長である。三重オリゴヌクレオチドは、ホーギヤン、米国特許第 5 , 176 , 996 号およびバルマラ、米国特許第 5 , 175 , 266 号に記載されている。

三重オリゴヌクレオチドは、好ましくは 20 ヌクレオチド長またはそれ以上であり、約 2 / 3 がプリンであるか、または約 2 / 3 がピリミジンである、いずれかのヌクレオチド配列を有する S D I - 1 遺伝子の領域に結合するように設計されている。三重オリゴヌクレオチドの配列の設計において、オリゴヌクレオチドは標的領域の相補位置が G C 塩基対である場合、G 残基、標的領域の相補位置が A T 塩基対である場合、T 残基を有するように構築される。

S D I - 1 遺伝子配列は、遺伝子構築物が介在非翻訳配列(“イントロン”)を含む場合、c D N A のものと異なる。一つの態様において、ゲノム S D I - 1 配列を得、上記のプリン対ピリミジンの好適な割合に適合する領域の存在を評価する。このようなゲノム配列は、配列番号 1 から選択された配列を有するオリゴヌクレオチドプローブ(例えば、20 - 50 残基長)によるゲノムライブラリーのスクリーニングにより得ることができる。ゲノムライブラリーのスクリーニング法は当分野で既知である。

あるいは、S D I - 1 c D N A 配列は、好適な三重分子の产生に使用できる。介在配列(

10

20

30

40

50

“イントロン”および翻訳配列(“エクソン”)を有する数百の遺伝子の分析により、イントロン-エクソン境界が、同定された上流および下流コンセンサス配列を有することが明らかとなった(本明細書に参考として包含する、マウント, S. M. 、ヌクレオチック・アシックス・リサーチ、10:459-472(1982))。mRNA前駆体分子からのイントロンの切断により、これらのコンセンサス配列のほとんどを除去し、mRNAを融合してmRNAにおける“CAGG”または“AAGG”エクソン-エクソン境界を製造する。このようにSDI-1分子の好適な標的領域は、好ましくは(1)少なくとも20ヌクレオチド長;(2)CAGGまたはAAGG配列を欠く;および(3)約2/3がプリンまたは約2/3がピリミジンである。このような好適なオリゴヌクレオチドは、配列番号1の単なる検査により同定できる(例えば、配列番号1のヌクレオチド位置を参照にして、配列番号1₁₋₂₀、配列番号1₂₁₋₄₀、配列番号1₅₁₋₇₀、配列番号1₈₁₋₁₀₀、配列番号1₁₂₈₋₁₄₇、配列番号1₁₃₁₋₁₅₀、配列番号1₁₅₁₋₁₇₀、配列番号1₂₄₁₋₂₆₀、配列番号1₂₈₈₋₃₀₇、配列番号1₃₀₄₋₃₂₃、配列番号1₃₂₉₋₃₄₈、配列番号1₃₃₄₋₃₅₃、配列番号1₃₆₁₋₃₈₀、配列番号1₃₉₀₋₄₀₉、配列番号1₄₂₁₋₄₄₀、配列番号1₄₉₇₋₅₁₆、配列番号1₅₂₅₋₅₄₄、配列番号1₅₄₁₋₅₆₀等、配列番号1の最初の600ヌクレオチド以内にいくつかの好適な標的部位を含む)。

更に別の態様において、SDI分子の配列は、SDI遺伝子配列の転写または配列を抑制できる“アンチセンスオリゴヌクレオチド”を明らかにするために使用できる。一般に、“アンチセンスオリゴヌクレオチド”は、その配列が、標的mRNA分子(またはその対応する遺伝子)の配列と相補的な核酸(DNAまたはRNAのいずれか)であり、mRNA分子(または遺伝子)と結合またはハイブリダイズし、それによりmRNA分子の遺伝子産物への翻訳を損なう(即ち、減じるかまたは妨げる)能力をもつものである。アンチセンスオリゴヌクレオチドとして働くために、核酸分子は、標的mRNAの翻訳を媒介する標的mRNA分子(または遺伝子)のその部分に結合またはハイブリダイズできなければならぬ。従って、本発明のアンチセンス分子は、SDI核酸分子に結合し、その活性を阻害できる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、全て本明細書に参考として包含する、欧洲特許出願公開第263,740号;第335,451号;および第329,882号およびPCT公開第WO90/00624に記載されている。

本発明は、特に、SDI遺伝子産物をコード化するmRNAまたはcDNA分子と結合またはハイブリダイズできるアンチセンスオリゴヌクレオチド、特にSDI-1、SDI-2またはSDI-3遺伝子のフラグメントに関する。従って、本発明の一つの態様において、SDImRNA転写物の翻訳を特異的に遮断するために設計されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、受容静止細胞におけるDNA合成の阻害の抑制解除に使用できる。

抗SDIアンチセンスオリゴヌクレオチドが、これらの目的を達成し得る一つの方法は、SDImRNAの翻訳開始領域に相補的で、SDI遺伝子のmRNA転写物とハイブリダイズ可能な充分な長さの配列を有することによる。このようなオリゴマーの大きさは、この目的に有効な任意の長さで良い。好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約10-30ヌクレオチド長、より好ましくは約15-24ヌクレオチド長である。

あるいは、生理的、インビオ条件下でSDImRNAと安定にハイブリダイズさせるには短すぎる長さのアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用し得る。このようなオリゴヌクレオチドは、約6-10またはそれ以上長さであり得る。本発明に従って使用するために、このようなオリゴヌクレオチドは、好ましくは、SDIをコードするmRNAの翻訳領域座に結合できるように修飾する。このような修飾分子の例は、一本鎖SDImRNA分子に結合可能な、抗体(または抗体フラグメント)または他のリガンド(例えば、トリメチルソラリン、8-メトキシプロラリン等の二価架橋剤)に結合したオリゴヌクレオチドを含む。

更に別の態様において、SDI-1アンチセンス分子は、SDI-1mRNAの不安定セグメントとハイブリダイズし、安定化するように設計し得る。このような分子は、細胞中のSDI-1の転写および翻訳を促進し、DNA複製阻害の能力の増加を導く。このような分子は、癌または過増殖により特徴付けられる他の疾病的処置に使用し得る。

10

20

20

40

40

50

二価架橋剤(例えば、トリメチルソラリンまたは8-メトキシソラリンのようなソラリン)付加物の一つの反応基に結合した抗SDIアンチセンスオリゴヌクレオチドは、350-420nm UV光による活性化により、SDImRNAと架橋できる。従って、このような光の強度を(UVランプのワット数の変化、細胞とランプの間の距離の増加等により)制御することにより、アンチセンスオリゴヌクレオチドと細胞のmRNAの結合の程度を制御し得る。従って、順次、受容細胞におけるSDI遺伝子発現の減衰の程度を制御できる。一般に、アンチセンスオリゴマーは、SDI遺伝子のヌクレオチド配列に従って製造し、最も好ましくは図5A-5Dに提供されているSDI-1の配列に従う。アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列は、1またはそれ以上の、1個またはそれ以上のヌクレオチドの挿入、置換または欠失を含み得るが、ただし、得られるオリゴヌクレオチドは上記SDImRNA、cDNAまたはSDI遺伝子それ自身のいずれかの翻訳部位と結合またはハイブリダイズ可能である。

本発明のアンチセンスまたは三重オリゴヌクレオチドの合成のために当分野で既知の任意の手段を使用し得る(全て本明細書に参考として包含するザメッチクラ、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ(USA)83:4143(1986);グッドチャイルドら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ(USA)85:5507(1988);ウィックストロームら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ(USA)85:1028;ホルト, J. T. ら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー、8:963(1988);ゲルウィッツ, A. M. ら、サイエンス、242:1303(1988);アンフォッシ, G. ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ(USA)86:3379(1989);ベッカー, D. ら、EMBOジャーナル、8:3679(1989))。自動核酸合成装置をこの目的に使用し得る。加えて、所望の任意の配列のヌクレオチドは、このような慣用分子の任意の商業的供給者から得ることができる。

最も好ましくは、本発明のアンチセンスまたは三重オリゴヌクレオチドは、固相“ホスホルアミダイト合成”を使用して製造し得る。合成は、オリゴヌクレオチドの3'-ヒドロキシル末端になるヌクレオチドで誘導化された固体支持体に結合した伸長ヌクレオチド鎖を用いて行う。方法は、5'-ヒドロキシル基がロック(好ましくは、5'-DMT(ジメトキシトリチル)基で)され、そのアミノ基がベンゾイル基(シトシンおよびアデノシンのアミノ基のための)またはイソブチル基(グアノシンの保護のため)のいずれかでロックされたモノマー単位を使用して、DNAの循環合成を含む。このような誘導体の合成法は、当分野で既知である。

更に別の態様において、リボザイムを、SDI媒介化阻害の阻害因子として使用できる。リボザイム(RNA酵素)は、それがハイブリダイズするRNA標的分子を開裂できる、触媒RNA配列(タンパク質を含まない)である(チェッチ, T. ら、セル、27:487(1981);チェッチ, T. ら、サイエンス、236:1532-1539(1987);チェッチ, T. ら、アニュアル・レビュー・オブ・バイオケミストリー、55:599-630(1986);ジェームス, W. ら、アンチバイラル・ケミストリー・アンド・ケモセラピー、2:191-214(1991))。しばしば、基質はリボザイムそれ自身の一部である。

人工リボザイムは、標的に相補的なフランкиング配列により標的RNAを特異的に開裂するように設計できる(ハースロフ, J. ら、ネーチャー、334:585-591(1988);カーメロン, F. ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ(USA)86:9139-9143(1989);ジェームス, W. ら、アンチバイラル・ケミストリー・アンド・ケモセラピー、2:191-214(1991))。標的RNA内で開裂するために最低限必要なのは、開裂部位の前に好適な3塩基対配列GUC、GUAまたはGUUが位置することである。“ハンマーヘッド”第2構造を特徴とする人工リボザイムは、ハースロフ, J. ら(ネーチャー、334:585-591(1988);ジェフリーズ, A. ら、ヌクレイック・アシッズ・リサーチ、17:1371-1377(1989);グラッチラ、WO特許出願W089/05852(1989);グッドチャイルド, J. ら、アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジクス、28:386-391(1991);ジェームス, W. ら、アンチバイラル・ケミストリー・アンド・ケモセ

10

20

30

40

50

ラピー、2:191-214(1991))により記載されている。

E . S D I 分子のプロタゴニスト

本発明は、従って、S D I 分子のプロタゴニストにも関する。本明細書で使用する限り、S D I の“プロタゴニスト”は S D I 分子の生理活性を促進または増加させる分子である。

p 5 3 が S D I 発現の誘発因子であるため、それまたは p 5 3 をコードする核酸、またはいずれかの生理活性フラグメントは、S D I 発現増加を得るために、S D I 分子と結合して細胞内に提供され得る。

本発明は、天然産生腫瘍抑制タンパク質以外の S D I プロタゴニストをまた提供する。このようなプロタゴニストは、S D I 類似体を含み得るか、または S D I 分子と相互作用する細胞性分子と相互作用する非類似体分子を含み得る。従って、促進された S D I 活性化能力を有する p 5 3 タンパク質の変異形は、S D I プロタゴニストの一例を含む。このような分子は、p 5 3 遺伝子の変異、次いで正常 p 5 3 タンパク質より早いまたは強い S D I - 1 活性の誘発に有効な変異体の選択により製造し得る。

同様に、S D I プロタゴニストを、例えば、候補分子を、S D I 分子と共に、受容細胞に提供し、候補分子の S D I 発現促進の能力を追跡する。上記の、合理的もどき体設計方法は、S D I プロタゴニストを同定するのに使用できる。

F . S D I 分子に対する抗体

本発明の具体例の一つは、S D I タンパク質およびタンパク質フラグメントに対する抗体およびこのような抗体の診断的および治療的使用に関する。

上記 S D I タンパク質およびタンパク質フラグメントは、抗体、一本鎖結合分子、または S D I エピトープに結合できる他のタンパク質の産生の誘発に使用し得る。このような抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであり得、無傷免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの抗原結合部位 (F(ab')₁、F(ab')₂ のような) フラグメント、または例えば、組換え手段により製造可能な一本鎖免疫グロブリンを含み得る。

マウスモノクローナル抗体が特に好ましい。B A L B / c マウスは、この目的に好ましいが、同等の種もまた使用し得る。動物を、好ましくは、好適なアジュバント (TiterMax アジュバント (Vaxel、Norcross、GA) のような) に乳濁されている親和性精製化 S D I タンパク質 (またはそのフラグメント) 約 2 5 μ g で免疫化する。免疫化は、好ましくは、2 筋肉内部位、1 腹腔内および尾根の 2 皮下部位で行う。抗原約 2 5 μ g の更なる i.v. 注射を、好ましくは正常生理食塩水中で、3 週間後にする。2 回目の注射の約 1 1 日後、マウスを採血し、血液を抗 S D I 抗体の存在についてスクリーニングする。好ましくは、直接結合 ELISA をこの目的のために使用する。

最も好ましくは、最も高い抗体価を有するマウスに、3 回目の S D I タンパク質またはフラグメント約 2 5 μ g の i.v. 注射をする。この動物由来の脾白血球を 3 日後に回収し、最も好ましくはポリエチレンギリコールを使用して、好適なミエローマ細胞系 (例えば、P 3X63Ag8.653 ミエローマ細胞系) と融合させる。ハイブリドーマ細胞を、“H A T” (ヒポキサンチン - アミノブテリン - チミン) 選択下で、約 1 週間培養することにより選択する。得られるクローンを、次いで、S D I タンパク質に対するモノクローナル抗体を产生する能力について、好ましくは直接 ELISA によりスクリーニングし得る。

ある実施態様においては、抗 S D I - 1 モノクローナル抗体は、上記 S D I - 1 融合体を免疫源として使用して単離し、スクリーニングを促進し得る。従って、例えば、マウスの一群を、フロイント完全アジュバントに乳濁化した G S T - S D I - 1 融合タンパク質 (免疫化当たり約 5 0 μ g の抗原) を使用して免疫化し得る。3 週間間隔で、同量の抗原をフロイント不完全アジュバントに乳濁化し、動物の免疫化に使用する。3 回目の免疫化の 1 0 日後、血清サンプルを取り、抗体の存在を評価する。抗体力価が低ければ、4 回目の追加免疫を用いることができる。S D I - 1 に 1 : 5 0 0 0 希釀で結合できるポリ血清 (polysera) を、この方法を使用して得ることができる。

モノクローナル抗体を得るための好ましい方法において、上記免疫化マウスの脾臓を回収し、分解し、免疫脾細胞をフィコール勾配で単離する。単離脾細胞を、ポリエチレンギリ

10

20

30

40

50

コールを使用して B a l b / c 由来 H G P R T (ヒポキサンチングアミニンホスホリボシリルトランスフェラーゼ)欠損 P3x63xAg8.653 形質細胞腫細胞と融合する。融合細胞を、96 ウエルマイクロタイタープレートに入れ、ハイブリドーマ融合細胞について、ヒポキサンチングアミニオブテリンおよびチミジンを補給した培養培地中での約 2 - 3 週間の成育能力によりスクリーニングする。平均で、融合の対象となった全ての脾細胞で 10^6 脾細胞が有用なハイブリドーマを産生する。典型的な脾臓は、 $5 - 10 \times 10^7$ 脾細胞を産生する。

このようなインキュベーションから発生するハイブリドーマ細胞は、好ましくは、SDI-1 に結合する免疫グロブリンを産生する能力についてスクリーニングする。間接ELISA がこの目的に使用し得る。簡単に、ハイブリドーマの上清を固定化 GST - SDI-1 含有マイクロタイターウェル中でインキュベーションする。洗浄後、結合免疫グロブリンの力値を、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス抗体を使用して測定する。更なる洗浄後、固定化酵素の量を測定する(例えば、色素源基質の使用により)。このようなスクリーニングは、所望のクローンが、非分泌隣接体により過成育しないことを確実にするために、ハイブリドーマ同定後、できるだけ速く行う。望ましくは、融合プレートは、ハイブリドーマ成育速度が変化するため、数回スクリーニングする。好ましい二次的実施態様において、SDI-1 の異なった抗原形を、ハイブリドーマのスクリーニングに使用し得る。従って、例えば、脾細胞を GST - SDI-1 融合体で免疫化するが、得られるハイブリドーマは、配列番号 4 のリーダー配列を有するような [His]₆ 融合体を使用してスクリーニングできる。

下記のように、このような抗体分子またはそれらのフラグメントは、診断または治療目的で使用し得る。抗体が診断目的を意図する場合、例えば、リガンド(例えばビオチン)または検出可能マーカー(例えば蛍光基、放射性同位体または酵素)で誘導体化することが望ましい。

抗体またはそのフラグメントが治療目的を意図する場合、免疫反応を減るために、“ヒト化”するのが望ましい。ヒト化抗体は、例えば、抗体の免疫源部分を、対応するが非免疫源性である部分と置き換えることにより産生し得る(即ち、キメラ抗体)(全て、本明細書に引用して包含する、ロビンソン、R. R. ら、PCT 特許公開 PCT / US 86 / 02269; アキラ、K. ら、欧州特許出願第 184,187 号; タニグチ、M. 、欧州特許出願第 171,496 号; モリソン、S. L. ら、欧州特許出願第 173,494 号; ニューベルガー、M. S. ら、PCT 出願 WO86/01533; カビリー、S. ら、欧州特許出願第 125,023 号; ベター、M. ら、サイエンス、240:1041-1043(1988); リュ、A. Y. ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ(USA) 84:3439-3443(1987); リュ、A. Y. ら、ジャーナル・オブ・イムノロジー、139:3521-3526(1987); サン、L. K. ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ(USA) 84:214-218(1987); ニシムラ、Y. ら、キャンサー・リサーチ、47:999-1005(1987); ウッド、C. R. ら、ネーチャー、314:446-449(1985); ショウラ、ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート、80:1553-1559(1988))。“ヒト化”キメラ抗体の一般的なレビューは、参考として本明細書に包含する、モリソン、S. L. (サイエンス、229:1202-1207(1985))およびオイ、V. T. ら、バイオテクニクス、4:214(1986)に提供されている。

ある治療実施態様においては、抗体が、SDI エピトープ(そのような第 1 F ab 領域を経由して)および“非 SDI エピトープ”(即ち SDI タンパク質以外のタンパク質のエピトープ)(第 2 F ab を経由して)に結合可能であるように、2 つの異なった F ab 領域を有するキメラ二価抗体を使用する。ある実施態様においては、このような“非 SDI エピトープ”は、キメラ分子が、ホルモン受容体、免疫応答受容体等のような細胞性受容体に結合できるように選択する。特に好ましくは、非 SDI 受容体は、白血病(セオンら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ(USA) 80:845(1983); アオタら、キャンサー・リサーチ、43:1093(1983); ロイストンら、トランスプランテーション・プロシーディングス、13:761(1981)); 大腸癌(コプロウスキーラ、米国特許第 4,349,528 号; サカモトら、欧州特許公開第 119556 号; ヘーリンら、

10

20

30

40

50

プロシードィングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ(USA) 76(3):1438(1979); マグナニラ、サイエンス、212:55(1981); 肺癌(チュティッタラ、プロシードィングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ(USA) 78:4951(1981)); 乳癌(コルヒヤーら、プロシードィングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ、78:3199(1981); スッコロムラ、プロシードィングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ(USA) 77:6841(1980))および他の癌(ヘーベルマン編集、ベーシック・クリニカル・テューモア・イムノロジー、1:159-214、ニジョフ、ボストン(1983)中のリロイド、“ヒューマン・テューモア・アンチゲンズ; ディテクション・アンド・キャラクタリゼーション・ウィズ・モノクローナル・アンティボディーズ”参照)に関する抗原のような異常増殖の指標である細胞性抗原を含む。 10

G. S D I 分子の細胞性受容体

本発明の態様の一つは、S D I の標的細胞へのデリバリーを促進するS D I 分子の細胞性受容体、特にS D I - 1 の細胞性受容体に関する。

ある実施態様においては、このようなデリバリーはS D I 分子を、リンホカイン、ホルモン、プロホルモンまたは細胞性受容体または受容体に結合できる細胞表面リガンドを有する他の分子との融合体として発現することにより達成できる。最も好ましくは、これは、S D I 分子(例えば、S D I - 1 c D N A)をコードするポリヌクレオチドを、受容体または細胞表面リガンドを認識し結合するタンパク質とライゲートし、次いで所望の融合タンパク質を組換え手段により発現させることにより達成される。必要な融合タンパク質は、受容体結合分子の完全配列を含まないが、所望の結合を可能にするのに充分なタンパク質の量のみを含み得るものである。 20

ある二次的実施態様においては、受容体結合分子は、関連受容体が、全てまたはほとんどの細胞に存在するように選択する。このような分子の例は、その各々の受容体に結合するほとんどのペプチドホルモン(例えば、成長ホルモン、インシュリン等)、トランスフェリン受容体に結合するトランスフェリン、低密度リポタンパク質(L D L)受容体に結合するApo - B タンパク質等である。あるいは、S D I 融合タンパク質は、分子がある組織型またはサブタイプによってのみ吸着されるように選択し得る。このような特性は、ある細胞集団(例えば、肝臓細胞、白血球、内皮細胞等)上にのみ存在する受容体またはリガンドに結合する分子の使用により得られ得る。このような分子の例は、グルカゴン、ガストリンのようなタンパク質、ある下垂体ホルモン(T S H、F S H等)、エリスロポエイチン、インターロイキン、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、向神経性タンパク質等を含む。更に、C D 4、I C A M - 1、セレクチン、E L A M S、L F A - 1 等の細胞表面タンパク質に結合可能なタンパク質もまた使用し得る。 30

例えば、I C A M - 1(シモンズ、D. ら、ネーチャー、331:624-627(1988); スタントン、D. E. ら、セル、52:925-933(1988); スタントン、D. E. ら、セル、61:243-254(1990))はC D 1 8 / C D 1 1ヘテロダイマー(L F A - 1等のような)を発現する白血球の内皮細胞表面リガンドであるため、I C A M - 1 - S D I 融合分子は、リンパ球のような造血細胞を標的とする。同様に、C D 4 - S D I - 1 融合体は、C D 4⁺ T 細胞を標的とし、S D I をこのようなT細胞にデリバリーするのに使用できる。L F A - 1 - S D I - 1 融合体は、内皮細胞およびある他の細胞型を標的とする。グルカゴン - S D I 融合体は、肝細胞等を標的とするのに使用できる。 40

他の態様において、S D I 分子は細胞性受容体と特異的結合ができる非タンパク質と結合できる。このような分子の例は、エピネフリン、ノルエピネフリンまたはヒスタミン誘導体、プロスタグランジン等である。

更に別の態様において、S D I 分子と結合可能な内因性細胞性受容体は、S D I の標的細胞へのデリバリーの促進に利用し得る。このような受容体分子は、上記S D I タンパク質およびタンパク質フラグメントを使用して得ることができる。S D I 受容体を得るための一つの方法において、好ましくはS D I タンパク質を発現する細胞からD N A(または更に好ましくは、c D N A)ライプラリーを製造する。c D N A フラグメントを、発現プラスミドにクローニングし、それを、次いで不死化または腫瘍細胞に挿入する。細胞を、次い 50

で、標識 S D I - 1 の存在下インキュベーションし、S D I - 1 を細胞表面に吸着し、新しい静止または老化状態を示すクローニングを評価する。細胞性受容体をコードするプラスミドを、次いでこのようなクローニングから回収する。

S D I 受容体タンパク質は、細菌または他の宿主内の c D N A クローニングの発現、次いでこのようなクローニングが S D I - 1 結合可能か否かを測定するにより得ることができる。ある好ましい二次的実施態様においては、c D N A をファージ発現ベクターに挿入する(全て、本明細書に参考として包含する、ローマン, H. B. ら、バイオケミストリー、30:108 32-10838(1991)；マークランド, W. ら、ジーン、109:13-19(1991)；ロバーツ, B. L. ら、プロシードィングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ(USA) 89-2429-2433(1992)；スミス, G. P. ら、サイエンス、228:1315-1317(1985)；スミス, R. P. ら、サイエンス、248:1126-1128(1990))。上記のように、この方法は、所望のタンパク質リガンドがウイルスコートタンパク質(例えば、M 1 3 Gene IIIコートタンパク質またはラムダコートタンパク質)の C - 末端に融合している、融合タンパク質の発現を含む。次いで、ファージベクターを成育させ、異なった融合タンパク質を有するファージのライブラリーを產生させる。このライブラリーを次いで、グルタチオン S - トランスフェラーゼグルタチオン結合配列をそのアミノ末端に有する固定化 S D I - 1 融合タンパク質の存在下インキュベーションする。S D I - 1 の細胞性受容体を示すファージを、固定化 S D I - 1 融合タンパク質により保持し、カラムをグルタチオンで洗浄することにより回収できる。

S D I 受容体を得る別法として、細胞性抽出物を得、S D I - 1 、特にグルタチオン S - トランスフェラーゼグルタチオン結合配列をそのアミノ末端に有する S D I 融合タンパク質の存在下インキュベーションする。S D I - 1 に結合するタンパク質は、細胞性受容体タンパク質を含む。

所望の場合、細胞膜へ受容体をアンカリングする原因であるタンパク質ドメインを切断することにより、受容体分子を可溶化して、可溶性(即ち、膜非結合)受容体分子を形成できる。

I V . 本発明の S D I 分子およびその阻害因子の使用

A . 老化または静止の誘導

S D I 機能阻害可能な分子は、受容細胞に提供した場合、細胞の不死化をもたらし、それにより永久細胞系の確立を可能にする。本発明のアンチセンス、リボザイムおよび他の S D I 阻害分子は、したがって、その他に一過性の増殖能力期を有する有効な細胞系(初期組織培養細胞等)の不死化に使用し得る。それらは、従って、研究に使用するか、器官、組織片または移植片としての多くの細胞の蓄積を可能にするか、促進する。一つの態様において、従って、本発明の試薬は、このような方法を促進するための器官または組織培養法と組み合わせて使用し得る。このような分子は、あるいは、免疫グロブリン産生細胞、または重用な生物学的物、例えばホルモン(インシュリン、成長ホルモン、I G F 等)、免疫系修飾物(例えば、インターフェロン、粘着性分子、リンホカイン等)を産生する細胞の不死化を行うのに使用し得る。

このような阻害性核酸分子は、好ましくは S D I 分子と相補的なヌクレオチド配列を有し、最も好ましくは S D I - 1 遺伝子の複数の領域または全ての配列に相補的である。このようなオリゴヌクレオチドが受容体細胞に与えられると、細胞系の不死化が起きる。あるいは、本発明の抗体は、S D I 活性を阻害(例えば、体液(例えば血液)中において、体液と接触している細胞の静止の伝達から S D I を保護する)のにも使用し得る。

B . 診断的使用

本発明の分子の主な使用は、癌の存在および素養の診断能力にある。S D I - 1 発現が、それを通して p 5 3 依存性癌が、腫瘍形成を媒介する機構であるため、細胞性 S D I - 1 発現は、ヒト癌の存在および重症度の診断に使用できる。例えば、リィ - フロウメニ(Li-Fraumeni)症候群は、p 5 3 遺伝子のエクソン 7 の特異な一連の変異に関する(本明細書に参考として包含する、マーキン, D. ら、サイエンス、250:1233-1238(1990))。リィ - フロウメニ患者の細胞は、検出可能な S D I - 1 m R N A または S D I - 1 タンパク質を産

生できない。従って、これらの疾病的診断は、SDI-1 mRNA またはタンパク質濃度を測定するハイブリダイゼーションアッセイまたは免疫沈降法を使用して行い得る。

示めされるように、約 50% のヒト腫瘍は、正常 p53 タンパク質の発現ができない。従って、生検サンプルにおける p53 活性のアッセイが、腫瘍の存在の評価に使用できる。このようなアッセイは、本発明の SDI 分子、特に SDI-1 遺伝子配列およびそのフラグメントを使用して容易に達成できる。p53 が SDI 発現の誘発因子であるため、生検材料における SDI-1 分子または mRNA の検出は、p53 遺伝子の正常発現の指標となる。

本発明の抗 SDI 抗体は、細胞、組織または体液中の SDI の存在を評価するための免疫アッセイに使用し得る。広範囲に整頓されている任意の免疫アッセイ形式が、この目的に使用し得る(ファックレル、ジャーナル・オブ・クリニカル・イムノアッセイ、8:213-219 (1985); ヨークン, R. H. 、レビューズ・オブ・インフェクシャス・ディジージズ、4: 35(1982); オールターナティブ・イムノアッセイズ、ジョン・ウィリー&サンズ、NY(1985)中のコリンズ, W. P. ; エンザイム・メディエーティッド・イムノアッセイ、プレナム・プレス、NY(1985)中のヌゴ, T. T. ら)。SDI 存在の検出および/または測定の能力は、腫瘍の存在または重症度の評価手段として非常に望まれる。従って、例えば、特定の腫瘍における SDI の欠如は、その腫瘍が SDI 発現腫瘍よりも転移の危険が高いことを示唆する。ある実施態様においては、本発明の抗体は、サンプルの可溶性 SDI 分子の測定に使用される。本発明の方法は、しかしながら、本来の場所で生検サンプル内の SDI 存在の検出および分析を可能にするために使用し得る。

最も単純な免疫アッセイは、単に標的分子を含むことが推定されるサンプルと共に、予め決定した標的分子に結合できる抗体をインキュベーションすることを含む。標的分子の存在は、標的分子に結合した任意の抗体の存在、および濃度の比率により決定できる。標的結合抗体の、最初に存在する非結合抗体からの分離を促進するために、固相が典型的に使用される。従って、例えば、サンプルは固体支持体に受動的に結合し、抗体とのインキュベーションの後、支持体を洗浄して全ての非結合抗体を除去できる。

更に洗練された免疫アッセイでは、標的分子の濃度を、支持体への抗体の結合、次いで支持体を標的分子を含むことが予測されるサンプルと接触させることにより測定する。固定化抗体に結合する標的分子は、任意の種々の方法により検出できる。例えば、支持体は、標的分子の第 2 エピトープに結合できる標識第 2 抗体の存在下でインキュベートできる。支持体上の標識抗体の固定化は、このように標的の存在を必要とし、サンプル中の標識の濃度に比例する。別法として、標的をサンプルおよび既知の濃度の標識標的とインキュベーションする。サンプル内の標的分子の存在すると、抗体結合部位に対して標識標的分子と競合する。従って、抗体と結合できる標識標的分子の量が、サンプル中の標的分子の濃度と逆比例する。

一般に、免疫アッセイ形は、放射活性標識(“RIA”)または酵素標識(“ELISA”)のいずれかを用いる。RIA は、単純性、感度および使用の容易さの利点をもつ。放射活性標識は、相対的に小さい原子寸法のものであり、通常反応速度に影響を及ぼさない。しかしながら、このようなアッセイには、放射性同位性崩壊という不都合な難点があり、試薬は貯蔵寿命が短く、特殊な取扱いおよび廃棄を必要とし、複合体の使用および高価な分析装置を必要とする。RIA は、本明細書に参考として包含する、モレキュラー・バイオロジー、ウォークス, T. S. ら、ノース・ホlland・パブリッシング・カンパニー、NY(1978)中のラボラトリー・テクニクス・アンド・バイオケミストリー内に記載されており、チャード, T. らの“アン・イントロダクション・トゥー・ラディオイミュン・アッセイ・アンド・リレイテッド・テクニクス”と題する章を特に参考とする。

ELISA は、安価な装置を使用し、無数の異なった酵素で行うことができるので多数の検出方法 - - 色素、pH、ガス発生等 - - を定量測定のために使用できる。加えて、酵素試薬は、相対的に長い貯蔵寿命を有し、RIA 使用に伴う放射性混入の危険性はない。ELISA は、本明細書に参考として包含する、イライザ・アンド・アザー・ソリッド・フェーズ・イムノアッセイズ(ケメニー, D. M. ら編集)、ジョン・ウィリー&サンズ、NY(1988)

10

20

30

40

50

に記載されている。

C . 治療的使用

本発明の分子は、また治療的有用性を有する。その使用が、生理的状態を変える場合、治療的であると言う。非治療的使用は、使用者の見かけを変えるものである。本発明の試薬は、例えば、老化による作用、例えば皮膚色調、色、きめ等、またはリンパ球、血管組織(動脈、細小動脈、毛細血管、静脈等)、肝臓、腎臓、心臓および他の筋肉、骨、脾臓等のような細胞、組織または器官の変性に抵抗するため、治療的、または非治療的目的で、局所または全身的に使用し得る。本発明の試薬は、このような細胞、組織または器官の若返りに用い得る。従って、それらは、例えば、好適な溶媒に溶解されたアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその等価物、および親油性担体または添加剤を含み得る、医薬等として使用し得る。このような溶媒は、例えば水 - エタノール混合物(10%から30% v/vまたはそれ以上のエタノールを含む)であり得る。このような製剤は、0.001から1.0%のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み得る。好適な担体、添加剤および溶媒は、下記のものである。

1 . 癌および他の疾患の処置

タンパク質およびポリペプチドおよび類似体をコードしたSDI核酸分子、そのフラグメントは、受容細胞の老化または静止状態の誘発に使用される。このような誘導は、老化関連疾患(マーティン, G. M. 、ゲノム、31:390(1989); 口工, D. A. 、クリニカル・ゲリアトリック・メディカル、6:319(1990); モーラディアン, A. J. 、ジャーナル・オブ・アメリカン・ゲリアトリックス・ソサイエティー、36:831(1988); アルペルト, J. S. 、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジー、65:23j(1990)); アルツハイマー病(テリー, R. D. 、モノグラフ・パソロジー、32:41(1990); コスタル, B. L. 、ファーマコサイキアトリー、123:85(1990)); 無力症および悪液質(ベルデリー, R. B. 、ゲリアトリクス、45:26(1990))または、急性細胞増殖が望ましくない疾患または状態の処置に望ましい。この点で、本発明の試薬は、癌または癌細胞の急性増殖の抑制のための治療に使用できる。従って、特に、本発明の分子は、癌、特に肝臓、脾臓、腎臓、肺、胃、乳、子宮、大腸、皮膚、神経膠、リンパ、前立腺、胆道胆嚢癌および悪性メラノーマの処置に使用し得る。実際、下記のように、SDI-1は、乳、肺、肝および神経膠腫瘍のような腫瘍細胞系の増殖の抑制に広い活性を有する。著しくは、本発明のSDI分子は、癌細胞(特に、悪性メラノーマ細胞)の非癌性細胞への分化を媒介する能力を有する。ある実施態様において、このような処置は、SDI-1タンパク質またはタンパク質フラグメントを腫瘍細胞へ与えることにより達成される。このようなタンパク質は、SDI-1が、直接腫瘍細胞内へ入ることができるように見えるため、直接与え得る。あるいは、SDI-1は、リポソーム、ウイルス鞘または他の媒体中に提供され得る。第2の実施態様において、SDI-1またはSDI-1のフラグメントをコードする遺伝子配列が、癌の遺伝子治療として提供され得る。

メラノーマまたは他の皮膚癌の場合、本発明のSDI分子を、局所的に、皮膚軟化剤等中に提供し得る(好ましくは、p-アミノ安息香酸(PABA)のようなUV吸収化合物と共に製剤する)。

本発明のSDI分子は、特にリポソーム医薬デリバリー媒体中に製剤化された場合、膀胱癌の処置に使用できる。本発明のSDI分子の他の癌適用は、腫瘍の新血管新生の予防のための内皮細胞複製(抗血管発生)の阻害および細胞成育を停止させ、またはアポトーシス誘発のために腫瘍特異的分子を経由する標的化遺伝子デリバリーを含む。

本発明のSDI分子は、単独で、またはそうでなければ、治療効果を達成するのに必要な有効濃度を減少させるために、他の既知の化学療法剤と組み合わせて使用し得る。

実際、本発明のSDIタンパク質および核酸分子は、既知の化学療法剤の添加剤として使用した場合、明白な実用性を有する。ある実施態様において、SDI-1分子を腫瘍細胞に適用し、それにより化学療法剤の効力を促進する。別のまたは相補的な実施態様において、SDI-1分子を、非腫瘍細胞を化学療法剤の細胞毒性効果から隔離するために、準全身的(例えば、局所または特異的器官または組織にまたは局部)に与(または付加的に与)

10

20

30

40

50

える。

化学療法の前提是、癌細胞が、正常細胞より早く成長し、したがって、成長細胞よりも細胞毒性因子に感受性であるということである。化学療法剤の各適用は、多数回投与が一般に腫瘍を完全に除去するのに必要であるように、存在するある程度の腫瘍細胞を殺戮する(W. B. サンダース・カンパニー、フィラデルフィア、3-13頁(1994)“キャンサー・ケモセラピー・アンド・バイオセラピー・ア・リファレンス・ガイド”中のテネンバウム, L.)。

上記のように、一つの態様において、本発明のSDI-1分子は、化学療法剤に対する癌細胞の感受性を増加し、したがって低用量および/または化学療法剤を少ない用量を使用して腫瘍の除去を可能にする。このような、増加した感受性は、例えば、患者に、化学療法剤の投与と組み合わせて、SDI-1タンパク質(またはSDI-1を発現する核酸分子)を提供することにより得ることができる。このような投与は、癌細胞の複製の阻害を助ける(正常細胞の複製もまたSDI-1分子により妨げられるが、このような阻害は、正常細胞が癌細胞より遙かに遅い増殖であるために、ほとんど重要でない)。SDI-1分子を患者に提供した後、このような投与を終えるか、または減少させる。このような一時的または減少した投与の効果は、癌細胞を細胞周期の同じ段階に一致させる(すなわち、例えば、細胞周期のG₁期に細胞を凍結させる)。このようなシンクロナイゼーションは、癌細胞の化学療法剤への感受性を著しく増加させる。

このようなシンクロナイゼーションが、特に投与時の細胞周期の特定の期に細胞の割合を最大限にする手段を提供するため、SDI-1分子の投与は、その効果を細胞周期の特定の期または一連期間にその効果を働かせる化学療法剤の臨床的効力を促進する。例えば、ビンカアルカドイロ(例えばビンクリスティン、ビンプラスチン、ビンデシン等)、ポドフィラム誘導体(例えば、エトポシド、テニポシド等)、タキソイド(例えば、タキソール、ドセタクセル等)のような有糸分裂阻害因子は、細胞周期のM期の間に、有糸分裂紡錘体の形成を妨害することにより働く。腫瘍細胞の一分画のみが任意の時間でM期であるため、このような医薬は、一般に、一回大量よりむしろ反復投与により提供されなければならない。SDI-1分子で細胞を処置することにより、腫瘍細胞を、全て(または大部分)の細胞を、同時にM期になるように、一致させることができある。従って、このようなSDI-1投与は、有糸分裂阻害因子をより有効に使用することを可能にする。

同様の方法において、葉酸アンタゴニスト(例えば、メトトレキサート等)、プリン類似体(例えば、クレアドリビン、フルダラビンホスフェート、ペントスタチン等)、プリンアンタゴニスト(例えば、6-メルカブトプリン、6-チオグアニン等)およびピリミジンアンタゴニスト(例えば、5-フルオロウラシル、5-フルオロデオキシウリジン、シタラビン等)のような抗代謝産物は、細胞のS期に働く。これらの試薬の効力を、SDI-1分子の附加的使用により促進し得る。

このような附加的投与は、細胞周期相非特異的化学療法剤(例えば、抗腫瘍抗体、ヒドロキシウレア、プロカルバジン、ホルモンまたはホルモンアンタゴニスト等)の感受性または効力の改善にまた使用し得る。このような試薬の腫瘍細胞の細胞周期期に関する観察される非特異性にもかかわらず、腫瘍細胞期のシンクロナイゼーションが化学療法の効力を増加することは確かなものと思われる。

第2の実施態様によれば、本発明のSDI-1分子は、正常細胞への損傷を予防または減じるために、準全身的に使用し得る。例えば、既知の癌化学療法の一つの副作用は、毛嚢のような急速成長組織への障害である。この障害は、影響を受けた患者の抜毛(脱毛症)をもたらす。このような損傷の一過性にもかかわらず、癌化学療法に関する精神的障害、不安および抑圧を悪化させる。このような抜毛は、従って、重要な臨床的関心事である。

本発明のSDI-1タンパク質または核酸分子は、毛嚢の障害または死滅を減じまたは予防するために使用し得、従って化学療法または老化に伴う抜毛の処置を提供する。この態様において、SDI-1分子は、局所適用する(例えば、頭皮に局所的、経皮的または内皮的等)。このような適用は、毛嚢成育を阻止し、細胞を、例えばG₁に停止させる。この適用は、従って、続く既知の化学療法剤の投与による障害に対して、毛嚢を脱感受性と

10

20

30

40

50

する。

本発明の S D I 分子は、また化学療法の避けられない副作用として起こる粘膜炎(口腔部潰瘍)の処置に使用し得る。

妊娠癌患者に迅速な化学療法を提供する必要性は、彼らの発展した未来を危険にさらし、従って、現在の医薬法は、このような処置が胎児にもたらす明らかな障害を伴った初期癌処置の利益を注意深く比較検討しなければならない。本発明の S D I - 1 タンパク質または核酸分子は、妊娠中に化学療法を行わなければならない妊婦の成長している胎児への障害を減じまたは予防するために使用し得る。 S D I - 1 タンパク質は、胎児血流中、または胎児が浸かっている羊水に直接注射または点滴により局所提供される。好ましくは、このような局所適用は、母体への化学療法の投与前または同時に進行。 S D I - 1 分子の投与は、胎児を化学療法の細胞毒性から隔離する。 10

多くの癌ではない疾病もまた本発明の S D I 分子で処置できる。 S D I 分子は、皮膚疾患、乾癬の処置に使用し得る。特に、乾癬処置のために局所投与された場合、本発明の S D I 分子の使用は、最少の細胞毒性副作用で、乾癬に関係ある細胞の過剰成長を制限できる。衰弱自己免疫疾患である関節リューマチもまた本発明の S D I - 1 分子で処置し得る。本発明の S D I 分子は、急性傷(例えは、裂傷、刺傷、手術等)または慢性傷(糖尿病潰瘍、静脈潰瘍、床ずれ)の両方の傷処置の介在または促進に使用し得る。

本発明の分子は、血管形成の再狭窄の処置に使用し得る。“狭窄”の語は、排管または管の狭くなることまたは絞窄を意味する。粥状硬化症領域、免疫学的応答、先天性奇形等のような多くの疾病過程は、冠状環動脈の狭窄、従って心筋壊血を導くことができる。その修復のために狭窄血管にバルーンカテーテルを挿入し部分的に膨らます、経皮経管血管形成術(P T C A)が、狭窄の処置に広く使用されている。 P T C A の主な制限は、血管領域の“再狭窄”(即ち、再絞窄)である(本明細書に参考として包含する、ルイ, M. W. ら、サーキュレーション、79:1374-1386(1989))。再狭窄は、手続の 6 カ月以内に 30 から 40 % の血管形成患者で発生することが分かっている(カリフ, R. M. ら、ジャーナル・オブ・アメリカン・カレッジ・オブ・カルディオロジー、17:2B-13B(1991)、マックプライド, W. ら、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン、318:1734-1737(1988))。再狭窄は非常に早く進行するため、傷により誘発される促進された粥状硬化症の形と見なされ得る。高再狭窄の明白さは、患者、血管または領域で再狭窄起きている確実さの高い割合を予想する不確実さの存在により増加する。実際、妨害する血栓症のない P T C A 後 2 日の広範囲の患者の動脈は、カテーテル処置した場所で 4 - 6 カ月後に再狭窄を示す(ルイ, M. W. ら、サーキュレーション、79:1374-1386(1989))。 20

緑内症もまた本発明の S D I 分子で処置できる。“緑内症”は、視野の進行的な損失(即ち、見える範囲にあるものか否かを定義する視覚の固定角度)によりそれぞれ特徴付けられる糖尿病性眼疾患の一群である。視野の損傷は、抑制しなければ、完全なそして回復できない盲目を導く。

緑内症は、“水様液”(即ち、血漿と同じ成分を有する目の透明な液)の正常な流れの、目の後室および前室への分裂により特徴付けられる(ジェネラル・オフタモロジー、アブレトン&ランジ、ノールワーク、C T、213-230頁(1992)中のバウグハム, D. ら)。水様液は、まつげの過程により作られ、後部眼室に分泌される。正常な目において、それは、瞳孔を通って、目の前室に行く。水様液は、前室から、“トラベキュラーメッシュワーク(trabecular meshwork)”として知られているコラーゲン-エラスチンフィルター構造に流れ、最後に“シェルムの洞”を通って血管血液供給に行く。水様液のシェルムの洞を横切る能力は、経細胞チャンネルの存在および程度に依存し、流出速度は、眼内圧を決定する。正常な目の平均圧力は、約 14 mmHg である。緑内症では、水様液の流出が分散し、眼内圧が上昇する。障害は、通常約 30 mmHg で始まり、目は約 240 倍の平均圧力値で破裂する。 30

抗有糸分裂物質、5-フルオロウラシルが、緑内症の治療剤として提案されている(サルファラジ, F. 、米国特許第 5,304,561 号)。不幸なことに、5-フルオロウラシルは明白に不利な副作用を有する。本発明の薬剤は、細胞増殖を予防できるため、トラ 50

ベキュラーメッシュワークの細胞の増殖の阻害に使用し得、従って緑内症、特に初期オープンアンダル緑内症の処置を提供する。このような使用のために、眼内手段(例えば、点眼または軟膏)で投与できる S D I - 1 分子を使用するのが望ましい。医薬の角膜を横切る能力は、医薬が親油性および親水性領域の両方を有する場合、促進される。従って、眼内への送達のために、本発明の S D I - 1 分子を、このような領域を有するように修飾することが望ましい。好適な親油性および親水性基は、当分野で既知であり(レミントンズ・ファーマシューティカル・サイエンシズ参照)、芳香族基、脂質等(親油性基)および有機酸、エステル、イオン性基等(親水性基)を含む。このような基は、本発明の S D I - 1 分子に、例えば、好適なアミノ酸の側鎖基を誘導体化することにより容易に加えることができる。

10

システイニル残基をクロロ酢酸またはクロロアセトミドのような - ハロ酢酸(および対応するアミン)と反応させ、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を得られ得る。システイニル残基は、またプロモトリフルオロアセトン、 - プロモ - - (5 - イミドゾイル) - プロピオン酸、クロロアセチルリン酸、N - アルキルマレイミド、3 - ニトロ - 2 - ピリジルジスルフィド、2 - ピリジルジスルフィドメチル、p - クロロメルクリベンゾエート、2 - クロロメルクリ - 4 - ニトロフェノールまたはクロロ - 7 - ニトロベンゾ - 2 - オキサ - 1 , 3 - ジアゾールと反応して誘導体化できる。

ヒスチジル残基は、この薬剤がヒスチジル側鎖に相対的に特異的であるため、ジエチルプロカカルボネートと pH 5 . 5 - 7 . 0 で反応して誘導体化できる。パラプロモフェンアシルプロミドもまた有用である; この反応は、好ましくは pH 6 . 0 で、0 . 1 M ナトリウムコカディレート中で行う。

20

リジニルおよびアミノ末端残基は、コハク酸または他のカルボン酸無水物と反応し得る。これらの薬剤との誘導体化は、リジニル残基の電荷を逆にする作用を有する。 - アミノ酸含有残基の誘導体化に好適な他の試薬は、メチルピコリンイミデートのようなイミドエステル; ピリドキサールホスフェート; ピリドキサール; クロロボロハイロライド; トリニトロベンゼンスルホン酸; O - メチル - イスウレア; 2 , 4 - ペンタンジオン; およびグリオキシレートによるトランスアミナーゼ触媒反応を含む。

アルギニル残基は、1個またはそれ以上の既知の試薬、とりわけ、フェニルグリオキサール、2 , 3 - ブタンジオン、1 , 2 - シクロヘキサンジオンおよびニンヒドリンで修飾し得る。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高い p K_a のため、アルカリ条件下で行うことを必要とする。更に、これらの試薬は、リジンおよびアルギニンイブシロニアミノ基と反応し得る。

30

カルボキシル側基(アスパルチルまたはグルタミル)は、1 - シクロヘキシル - 3 - (2 - モルホリニル - (4 - エチル) - カルボジイミドまたは1 - エチル - 3 - (4 - アゾニア - 4 , 4 - ジメチルベンチル) - カルボジイミドのようなカルボジイミド(R ' - N - C - N - R ')と反応して選択的に修飾し得る。更に、アスパルチルおよびグルタミン残基は、アンモニウムイオンとの反応によりアスパラギニルおよびグルタミニル残基に変換し得る。

2 . 抗ウイルスおよび抗微生物的使用

別の実施態様において、本発明の分子は、インフルエンザ、肝炎(例えば B 型肝炎または C 型肝炎)、イプスタイン - バール、リノウイルス、パピローマウイルス、ポパパウイルス等のウイルスの増殖を阻害する抗ウイルス剤として使用し得る。特に、S D I 分子(特に S D I - 1 およびその類似体)は細胞増殖阻害として働き、レトロウイルスは、活性分化細胞中でのみ選択的に増殖するため、本発明は H I V に対する抗ウイルス治療を提供し、従って A I D S および A R C のような疾病の処置に使用できる。同様に、いぼ(性交性いぼを含む)、咽頭乳頭腫症、進行性マルチフォカル・ロイコエンセファロパシー等のような疾病に対して、S D I 分子の投与は感染細胞増殖を阻害し、従ってこの疾病の症状の処置を提供する。

40

他の実施態様において、本発明の分子は、真菌、酵母、原虫、蠕虫、線虫および他の寄生体感染(例えば、カンジダ症、アスペルギルス症、コクシジオイデス症、リーシュマニア

50

症、アメーバ症、トリコモナス症、白癬(ペディス、クルシス等)、膿瘍口瘡、住血吸虫症およびマラリア)の処置のための抗寄生体剤として使用し得る。

上記と同様の方法において、SDI-1分子の投与は、抗ウイルスまたは抗微生物剤の治療効果を増加できる。SDI-1分子が病原体の複製を阻害するため、続く感染の危険性を予防または減じるために、局所的に皮膚に、または全身的に注射で投与し得る。従って、例えば、本分子を好適な医薬組成物に包含し、感染している可能性のある個体に暴露される前に、局所的に外科医または他の医療実施者の手に適用する。

他の態様において、SDI-1分子は、抗ウイルス剤の添加剤として、任意のウイルス感染細胞の細胞周期を一致させるために、疑わしいまたは実際のウイルス感染の処置に使用し、それにより抗ウイルス剤の治療効果を促進する。同様に、SDI-1分子は、抗寄生体剤の添加剤として、任意の寄生体感染細胞の細胞周期を一致させるために、疑わしいまたは実際の寄生体感染の処置に使用し、それにより抗寄生体剤の治療効果を促進する。このような付加投与は、上記の真菌、酵母、原虫、蠕虫、線虫および他の寄生体感染のような疾病的処置に使用し得る。

3. 他の治療的使用

本発明のアンチセンスおよび他のSDI阻害分子は、ヒトまたは動物における精母細胞の増殖または卵母細胞の成熟の促進に使用し得、それにより受容者の繁殖能力を増加させる。逆に、SDI分子およびその類似体は、雄または雌の生殖源性の阻害に使用でき、従って、雄または雌の不妊誘発の避妊薬として使用できる。このような使用には、またウイルス(例えばHIV等)感染細胞の複製および増殖を減弱する利点があり、従ってウイルス疾患(例えばAIDS等)への罹患の可能性を減らす。

本発明のSDI-1分子は、DNA複製阻害が可能であるため、UV光誘発DNA障害(過剰な日光への暴露により遭遇するような)の予防または減少のために使用し得る。このような障害を修復する正常な能力を欠く個体は、DNA合成のSDI-1媒介阻害により、修復が起こる機会をより多く提供されるであろう。従って、本発明のSDI-1分子は、DNA修復能力を欠く個体(例えば、色素性乾皮症、ルイバール症候群等を有する個体)の処置に使用し得る。

本発明のアンチセンスまたは他の阻害分子は、細胞増殖を刺激する能力を有するため、傷治癒、血管発生、内皮細胞増殖、熱傷または手術後の回復、または萎縮組織の回復等に使用し得る。本発明の抗体は、傷治癒、熱傷、または外傷または手術の後の回復を行うにまた使用し得る。実際、全てのこのような化合物は、一般的な組織再生または血管再生の抑制に使用できる。このような実施化のために、これらの試薬は、抗生物質、抗真菌剤等とともに局所または全身投与用に製剤化される。

本発明の分子は、受容患者の遺伝子治療を提供するために使用し得る。一つの態様において、患者の細胞または組織を患者から回収し、活性成長状態の回復を可能にするのに充分な条件下、本発明の分子で処置し得る。この使用の一つの好ましい態様において、個体(例えば、AIDS患者等のような免疫が傷付けられている個体またはリンパ球のドナーとして働くであろう免疫競合個体)のリンパ球を回収し、アンチセンスSDI核酸で処置できる。これらの分子の投与は、リンパ球の機能を低下させする。投与後、リンパ球は、患者に再導入され、これは増強された対感染戦斗能力を発揮する。

本発明の更に別の実施態様において、本発明の分子をオートロガス(autologous)細胞置換を助長するのに使用できる。この態様において、タンパク質およびポリペプチドをコードする核酸分子、そのフラグメントおよび類似体は、患者のこのような細胞の量または濃度を補給または増加させることから、細胞(骨髄細胞、上皮細胞、筋肉細胞、肝細胞等)をインビトロ増殖させるために使用できる。従って、例えば、骨髄細胞を回収し、このような分子で処置し、次いで、インビトロで細胞が望ましい免疫反応の増強に充分な量となるまで培養し得る。あるいは、肝細胞(肝炎ウイルスのない肝細胞)を患者から回収し、処置し、培養し、次いで肝炎を処置するために、患者に移植して戻すことができる。

ある二次的実施態様においては、このような処置細胞それ自身を患者に直接移植しなおし、そしてインビトロ増殖させ得る。あるいは、示されているように、このような細胞は、イ

10

20

30

40

50

ンビトロで培養することができ、望ましい力価が得られた場合に再導入してもよい。

上記の遺伝子治療の実施態様および二次的実施態様に従い、S D I - 1 c D N A およびアンチセンス配列を、治療効果を所望の部位または組織に限定するために、腫瘍特異的または組織特異的プロモーターと実施可能に結合させ得る。好適な腫瘍特異的プロモーターは、- フェトプロテイン、腫瘍胎児性抗原、アミラーゼ、- グルタミルトランスフェラーゼ等のような腫瘍特異的抗原の転写を指示するものである。好適な組織特異的プロモーターは、フェニルアナリンヒドロキシラーゼプロモーター(ワン, Y. ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、269:9137-9146(1994)；スベンソン, E. ら、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・ヒューマン・ジェネティクス、1:306-313(1993)；コネンツキ, D. S. ら、バイオケミストリー、31:8363-8368(1992))、- 1 - アンチトリプシン(A A T)プロモーター(リ, Y. ら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー、8:4362-4369(1988))；筋肉アクチンプロモーター等を含む。特に関心の対象となるものは、乳、肝臓、肺または大腸組織の発現を指示するプロモーターである。

本発明の分子は、疾病または組織変性の動物モデルの創造および/または研究の使用に特に好適である。従って、本発明の分子は、異常老化または細胞変性により特徴付けられる動物モデルの因子の研究に使用できる。同様に、S D I 分子の投与(例えば、受容体細胞におけるその発現を可能にするために好適な制御配列と架橋した)を、老化または組織変性の動物モデルの創造に使用できる。

D. 医薬成分の送達

S D I - 1 が細胞へ直接入る能力は、医薬成分の受容細胞への送達を達成する手段を提供する。従って、一つの態様において、医薬成分を S D I - 1 と結合させ、受容患者へ提供する。S D I - 1 分子(無傷 S D I - 1 タンパク質または輸送に充分な S D I - 1 のフラグメントであり得る)の存在は、結合した医薬成分を受容細胞へ輸送する。

任意の種々の架橋剤を、医薬成分を S D I - 1 分子に結合するのに使用し得る。あるいは、このような成分を、融合タンパク質として提供できる(上記 G S T - S D I - 1 融合タンパク質として例示される)。このような融合タンパク質は、例えば、このような融合タンパク質をコード化する核酸分子の発現により製造できる。

この方法で細胞に投与し得る医薬成分は、細胞に治療効果を提供する薬剤を含む(抗過増殖、抗炎症、抗不整脈等)。あるいは、医薬成分を、受容細胞に有益に作用させ得る(サイトカイン、毒素等を含むことにより)。

送達されるべき医薬成分が S D I - 1 であることが望まれる場合、これはキメラ結合領域を含み得る本発明の抗 S D I 抗体を使用して達成できる。このようなキメラ抗体の結合領域を選択して、腫瘍抗原に特異的な結合領域を含有させることにより、腫瘍抗原および S D I 分子の両方に結合可能な抗体の産生が可能になる。このような分子は、S D I タンパク質を、腫瘍抗原を発生する任意の細胞に“運ぶ”のに使用できる。運搬される S D I 分子は、腫瘍細胞の静止または老化状態の再開を誘発する。このようなキメラ抗体は、従って抗癌処置を含む。

あるいは、本発明の S D I 分子は、S D I 分子をホルモンまたは所望の一連の受容細胞と結合できる他の分子と融合することにより、細胞に提供し得る。従って、例えば、S D I - 1 を可溶性 C D 4 分子またはインシュリン分子と結合することにより、C D 4 を発生する白血球またはインシュリン受容体を発生する細胞に S D I - 1 投与の的をしぼることができる。このような結合体は種々の方法を使用して製造できるが、このような結合体は、融合タンパク質をコードする核酸分子の発現により産生するのが好ましい。

示唆されるように、G S T - S D I 融合体は、特に好ましい融合体である。ラット G S T の N 末端ドメインは、ヒト遊送阻止因子(M I F)と有意な相同性を示す(本明細書に参考として包含する、デイビッド, J. R. 、パリストロジー・トゥディ、9:315-316(1993)；ミカワマ, T. ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ(USA)90:10056-10060(1993))。従って、S D I の任意の活性とは別に、G S T は M I F および関連分子に結合可能な細胞性受容体への結合の可能性を有する。実際、本発明の一つの実施態様は、G S T 医薬成分融合タンパク質が、細胞性受容体と結合で

10

20

30

40

50

き、標的細胞への医薬成分の送達に有効であるという認識を含む。従って、S D I 以外の分子を、所望の標的細胞への送達を行うために、G S T 配列(上記のような)と融合できる。

E . 準備的使用

本発明の抗 S D I 抗体は、溶液から S D I タンパク質を精製および回収する簡易な手段を提供する。この実施態様において、細胞融解物または抽出物を好ましくは固体支持体上に固定化した抗 S D I 抗体の存在下インキュベーションする。S D I 分子は、抗体に結合し、かつこのようにして純化した形で回収できる。

F . S D I 細胞受容体およびその可溶化誘導体の使用

S D I 細胞受容体およびその可溶化誘導体は、S D I タンパク質含有調製物からの S D I の回収を容易にするために使用できる。この方法において、受容体を偽抗体として使用し得る。受容体は治療的に使用し、細胞発現および S D I タンパク質に対する応答を緩和し得る。従って、受容体分子は、腫瘍細胞に提供できる(リポソームを経由して、またはこのような細胞に、受容体をコードする核酸と共に提供して)。このような分子は、腫瘍細胞の S D I 存在に対する応答の能力を増加し、それにより癌を改善する。

V . 投与方法

本発明の S D I 分子は、医薬的に有用な組成物を調製する知られた方法に従って製剤化でき、該方法により、所望の純度を有するこれらの材料、またはそれらの機能的誘導体が生理学的に許容され得る担体、賦形剤または安定化剤と組み合わせて混和物とされる。このような材料は、用いる用量および濃度で受容体に非毒性である。このような組成物の“ S D I 分子”は、S D I - 1 タンパク質、融合体(例えば G S T 融合体等)または S D I - 1 タンパク質のフラグメントまたはこのような分子のもどき体である。S D I 分子は、S D I - 1 c D N A のセンス、アンチセンスまたは三重オリゴヌクレオチドまたは遺伝子であり得る。組成物は、その投与が受容患者に耐性である場合には、“医薬的に許容され得る”と言う。投与された量が生理的に明白である場合、“治療的有効量”と言う。その存在が、受容患者において生理的に検出可能な変化をもたらす場合、薬剤は生理的に明白である。

適切な媒体、および、他のヒトタンパク質、例えば、ヒト血清アルブミンを含むこれらの製剤は、例えば、レミントンズ・ファーマシューティカル・サイエンシズ(第16版、オソル、A.出版、マック、イーストン、ペンシルバニア(1980年))に記載されている。貯蔵または投与に適した医薬的に許容し得る組成物を形成するために、このような組成物は、有効量の1種またはそれ以上の“ S D I 分子”を含むであろう。

組成物が水溶性である場合、好ましくは pH 約 7 から 8 のリン酸または他の有機酸塩のような緩衝液中で製剤し得る。組成物が、部分的にのみ水溶性である場合、例えば、0 . 0 4 - 0 . 0 5 % (w / v) の用量のトウイン、ブルロニクスまたは P E G 、例えばトウイン 8 0 のような非イオン性界面活性剤と共にマイクロエマルジョンとして製造し得、溶解性を増加させる。“水溶性”の語は、ポリサッカライトおよびポリエチレングリコールに関して用いられた場合、コロイド溶液および分散剤を含む。一般に、セルロース誘導体の溶解性は、エーテル基の置換の割合により測定し、本発明で有用な安定化誘導体は、セルロース鎖のアンヒドログルコース単位当たりに、このようなエーテル基を、誘導体を水溶性にするのに十分な量有するべきである。アンヒドログルコース単位当たり少なくとも 0 . 3 5 エーテル基のエーテル置換の割合が、一般に、十分である。更に、セルロース誘導体は、アルカリ金属塩、例えば L i 、 N a 、 K または C s 塩の形であり得る。

所望により、抗酸化剤、例えばアスコルビン酸；低分子量(約 10 残基以下)ポリペプチド、例えばポリアルギニンまたはトリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸またはアルギニンのようなアミノ酸；モノサッカライド、ジサッカライドおよびセルロースまたはその誘導体、グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物誘導体；EDTA のようなキレート化剤；およびマンニトールまたはソルビトールのような糖アルコールのような他の成分を加え得る。

10

20

20

30

30

40

40

50

更なる製薬方法を用いて、作用の持続期間を制御し得る。組成物のSDI分子(群)を複合(complex)または吸収するポリマーを用いることにより、放出制御製剤を完成できる。放出制御するために、適切な高分子(例えば、ポリエステル類、ポリアミノ酸類、ポリビニル、ピロリドン、エチレンビニルアセテート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、またはプロタミン、サルフェート)と高分子の濃度、同じく組み込み方法を選択することによって、制御された放出を実行できる。

持続放出製剤は、また、マイクロカプセル粒子およびインプラント可能物の形で製造し得、含む。持続放出組成物の製剤のために、組成物のSDI分子は、好ましくは生物分解可能マトリックスまたはマイクロカプセル内に包含される。この目的に好適な材料は、ポリアクチドであるが、ポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸(欧州特許第133,988A号)のようなポリ-(-ヒドロキシカルボン酸)の他のポリマーも使用できる。他の生物分解可能ポリマーは、ポリ(ラクトン)、ポリ(オルトエステル)、ポリアミノ酸、ハイドロゲルまたはポリ(オルトカルボン酸)ポリ(アセタール)である。重合材料は、また、ポリエステル、ポリ(乳酸)、またはエチレンビニルアセテートコポリマーを含み得る。持続放出製剤の例は、米国特許第3,773,919号、欧州特許第58,481A号、米国特許第3,887,699号、欧州特許第158,277A号、カナダ特許第1176565号、U.S.シドマンら、“バイオポリマーズ”22:547[1983]およびR.ランガーら、“ケミカル・ティーチ”12:98[1982]参照。

あるいは、組成物のSDI分子をポリマー粒子中に包含させる代わりに、これらの物質を、例えばコアセルベーション技術、または、界面重合により調製されたマイクロカプセル類、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセル類、およびポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセル類中に、もしくはコロイド状薬剤放出システム、例えば、リポソーム類、アルブミンミクロスフェア類、ミクロエマルジョン類、ナノ粒子類、およびナノカプセル類、またはマイクロエマルジョン類中に封じ込む(encap)ことが可能である。このような技術は、レミントンズ・ファーマシューティカル・サイエンシズ(1980年)に開示されている。

一つの態様において、このような製剤は、その自己細胞内取り込みを媒介できるSDI-1分子(例えば、GST-SDI-1融合等)を含むであろう。好適な方法は、当分野で既知であり、例えば、全て本明細書に参照として包含するビエッセン、E.A.L.ら(PCT出願W094/04545)、フェルグナー、P.L.(PCT特許出願W093/20801)、アキヤマ、K.ら(PCT出願W093/20801)、ブラム、A.ら(PCT出願W093/03709)、ホソカワ、S.ら(米国特許第5,264,221号)、クリス、P.R.ら(米国特許第5,204,112号；米国特許第5,252,263号)、日本特許第4,082,893号、フィリップス、W.T.ら(米国特許第5,158,760号)、ワイナー、N.D.(PCT出願W091/01719)、ホステラー、K.Y.ら(米国特許第5,223,263号)、コバヤシ、Y.ら(欧州特許第335597号)；ワイナー、A.L.ら(PCT出願W089/05151)；ホープ、M.J.ら(PCT出願W087/07530)参照。

第2の態様において、SDI-1分子の細胞内取り込みを可能にするリポソーム製剤および方法を使用する。好適な方法は当分野で既知であり、例えば、全て参考として本明細書に包含するチツ、R.M.ら(PCT出願W094/04557)、ジャイセナ、S.D.ら(PCT出願W093/12234)、ヤロッシュ、D.B(米国特許第5,190,762号)、チャラハン、M.V.ら(米国特許第5,270,052号)およびゴンザレツコ、R.J.(PCT出願91/05771)参照。

治療投与に使用するSDI医薬組成物は、滅菌濾過膜(例えば、0.2ミクロン膜)を通す濾過により滅菌し得る。組成物は、凍結乾燥形または液体形として貯蔵し得る。前記のある種の賦形剤、担体または安定化剤の使用が、SDI分子の塩形をもたらすことは理解されよう。

本発明の組成物は、皮膚または胃腸、腎、口、粘膜等に局所適用できる。局所適用する場合、本組成物のSDI分子は、好適には、担体および/またはアジュバントのような他の成分と結合し得る。医薬的に許容され得、その意図される適用に有効であり、組成物の活

10

20

30

40

50

性成分の活性を分解しない限り、このような他の成分に制限はない。好適な媒体の例は、軟膏、クリーム、ゲルまたは精製コラーゲン有りまたは無しの懸濁液を含む。組成物は、経皮パッチ、プラスターおよびバンドエード内に、好ましくは液体または半液体の形で含まれ得る。

ゲル製剤を得るために、液体組成物に調剤された本組成物の S D I 分子を、有効量の水溶性ポリサッカライドまたはポリエチレングリコールのような合成ポリマーと混合し得、局所に提供するための好適な粘性のゲルを形成する。使用し得るポリサッカライドは、例えば、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロースおよびアルキルヒドロキシアルキルセルロース、例えばメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、およびヒドロキシプロピルセルロースを含むエーテル化セルロース誘導体；澱粉および分画澱粉；寒天；アルギン酸およびアルギネット；アラビアゴム；ブルラン；アガロース；カラゲナン；デキストラン；デキストリン；フルクタン；イヌリン；マンナン；キシラン；アラビナン；キトサン；グリコーゲン；グルカン；および合成バイオポリマーおよびキサンタンガム；およびカラヤガムおよびこれらの誘導体および混合物を含む。この好ましいゲル化剤は、生物系に不活性であり、非毒性であり、製造が簡単であり、さらさらまたは粘性すぎず、その中の S D I 分子を不安定化しないものである。好ましくは、ポリサッカライドはエーテル化セルロース誘導体、更に好ましくは、充分定義され、精製され、U S P に列記されている、例えばメチルセルロースおよびヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースおよびヒドロキシプロピルメチルセルロースのようなヒドロキシアルキルセルロース誘導体である。この中で最も好ましいのはメチルセルロースである。

ゲル化に有用なポリエチレングリコールは、典型的には低および高分子量ポリエチレングリコールの混合物であり、適当な粘性を与える。例えば、分子量 4 0 0 - 6 0 0 のポリエチレングリコールと分子量 1 5 0 0 のは、ペーストを得るために正確な比率で混合した場合、この目的に有効であろう。

本発明の組成物は、注射、迅速な点滴、鼻咽喉吸収(鼻咽喉内に)、皮膚吸収による非経口的投与、または経口投与用製剤とすることも出来る。これに代えて、該組成物を筋肉内投与または静脈内投与してもよい。非経口投与のための組成物は、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁液、および乳液を含んでいる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステル類である。担体、助剤または閉鎖包帯を用いて、組織浸透性を増大させたり、抗原吸収を増強させたり出来る。経口投与のための液体投薬形態は、一般にこの液体投薬形態を含有するリポソーム溶液を含んで成ることもある。懸濁状リポソームに適切な形態は、乳液、懸濁液、溶液、シロップ、およびエリキシルを含み、当技術分野で通常用いられる精製水などの不活性希釈剤を含む。不活性希釈剤の他にも、このような組成物は、湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、または甘味料、香味料、着色料、または芳香料も含み得る。

メチルセルロースをゲルに用いる場合、好ましくは、ゲル約 2 - 5 %、更に好ましくは約 3 %を含み、組成物の S D I 分子は、ゲル ml当たり約 3 0 0 - 1 0 0 0 μ gの量で存在する。用いるべき用量は、上記の因子に依存する。一般的な提案として、組成物の S D I 分子を、有効であるが、過度に毒性でない最大量を組織内で確立し得る用量で製剤し、標的部位または組織に送達させる。

一般に、組成物の有効な量を提供するのに必要な用量は、受容者の年令、状態、性別、および疾病の程度、およびもしあれば、他の可変要因のような因子に依存して変化するが、当業者は容易に調節できる。

本発明の組成物の有効量は、用量または適用当たり、0 . 0 1 - 1 , 0 0 0 mg / ml の範囲で変化するが、より少いかまたは多い用量も使用できる。

S D I - 1 核酸分子を(アンチセンスまたは 3 重リプレッショ n として)用いる場合、“遺伝子治療”の方法を使用する。遺伝子治療の原理は、オルダム，R . K . (プリンシブル

10

20

30

40

50

ズ・オブ・バイオセラピー、レーベン・プレス、N Y、1987中)および類似のテキストに記載されている。遺伝子治療の方法の記載および使用は、すべて、本明細書に参考として包含する、ボッグス、S . S . (インターナショナル・セル・クローニング、8:90-96(1990) ; カールソン、E . M . (バイオロジー・オブ・レブロダクション、42:39-49(1990) ; レドリー、F . D . 、バイオテクノロジー、ア・コンプリヘンシブ・トリアティーズ、7 B巻、ジーン・テクノロジー、V C Hパブリッシャーズ、インコーポレイテッド、N Y、399-458頁(1989))により提供されている。このような遺伝子治療は、現れている症状を処置(即ち、抑制または減じる)ために、受容者に提供でき、または遺伝した遺伝子変異または体細胞変異のために、縁内症の資質を有する個体の予防遺伝子治療を提供できる。

最も好ましくは、ウイルスまたはレトロウイルスベクターを、この目的に使用する。好適なベクターの例は、フレッチャー、F . A . ら(ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディスン、174:837-845(1991))、メケレ、T . P . ら(ジーン、118:239-294(1992))、ポルガドール、A . ら(キャンサー・リサーチ、52:3679-3986(1992))、ヨシムラ、K . ら(スクレイック・アシックス・リサーチ、20:3233-3240(1992))、リム、B . ら(プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・ザイエンシーズ(USA)86:8892-8896(1989))、オイ、S . ら(ジーン、89:279-282(1990))およびルッセル、S . J . ら(ジャーナル・オブ・ビロロジー、66:2821-2828(1992))。

以上、本発明を一般的に記載してきたが、以下の実施例を参考にすることにより、より容易に理解されるであろう。それらの実施例は、特記したものを除き、例示のために提供したものであり、本発明の限定を意図するものではない。

実施例 1

c D N A ライブラリーの創製

c D N A ライブラリーは、細胞系 H C A 2などの正常ヒト新生児包皮纖維芽細胞由来のR N Aを用いて得られた。これを行うためには、細胞を、10 %ウシ胎児血清(G I B C Oまたはハイクローニング)を補った、均衡のとれたアール塩溶液またはハンクス塩溶液のいずれかを含む最小必須成分培地で成育させた。細胞を培養し、それらのイン・ビトロでの寿命を、以下参考として組み込んであるスミス、J . R . 、およびブラウンシュバイゲル、K . I . 、ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー、9 8巻、5 9 7 - 6 0 1頁(1979年)に記載されている条件下で測定した。静止細胞は、細胞が集密的(confluent)になる前に、正常培養培地を、0 . 5 %血清を含む培養培地に変えることにより作成された。該細胞は、低血清培養で3週間まで維持された。

全細胞R N Aをグアニジウムチオシアネート/C s C I法(ガルガー、S . J . 等、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ、1 1 7巻、8 3 5 - 8 4 2頁(1983年))か、またはグアニジウムチオシアネート/フェノール法(コムジンスキー、P . およびサッキ、N . 、アナリティカル・バイオケミストリー、1 6 2巻、1 5 6 - 1 5 9頁(1987年)、R N AゾルB、バイオテックス・ラボラトリ・インコーポレイテッド、テキサス)のいずれかにより分離した。ポリA + R N Aはオリゴ(d T)セルロースカラムクロマトグラフィー(コラボレイティブ・リサーチ、マサチューセッツ)により分離した。

上記したように、老化細胞から得られたポリA + R N A 1 0 μ gは、提供者(B R L 、M A D)の教示に従いR N AーゼH⁻ / M M L V逆転写酵素を用いることにより、二本鎖c D N A群に転換させ、T 4ポリメラーゼ処理により平滑末端にした。二本鎖c D N A調製物群は、アガロースゲル電気泳動によりサイズ画分され、発現ベクターに挿入するために、2 - 4 . 5 kbの画分を分離した。

この目的に用いられる発現ベクターは、3 . 4 kbプラスミドであり、p c D S R と呼称されるものである(図1)。プラスミドp c D S R は、プラスミドp c D S R 2 9 6の誘導体であり、オカヤマ・バーグS V 4 0プロモーターとH T L V - 1由来のL T Rを含む(タケベ、Y . 等、モレキュラー・セル・バイオロジー、8巻、4 6 6 - 4 7 2頁(1988年) ; M . ヨシダ博士(キャンサー・インスティテュート・オブ・ジャパン)により提供された)。プラスミドp c D S R は、p c D S R 2 9 6からP s t 1 - K p n

10

20

30

40

50

1 フラグメントの 336 塩基対 (bp) セグメントを除き、それを pUC19 由来の PstI - KpnI 1 フラグメントの 28 塩基対に置き換えることにより形成された。生じたプラスミド (pCDSR-) は、クローニングベクターおよび発現ベクターとして用いられた。

プラスミド pSV2cat (ゴーマン, C. 等、モレキュラー・セル・バイオロジー、2巻、1044-1051頁(1982年)) は、グレッテン・ダーリントン博士 (テキサス・チルドレンズ・ホスピタル) により与えられた。 pCDベクター (オカヤマ, H. およびバーグ, P. 、モレキュラー・セル・バイオロジー、3巻、280-289頁(1983年)) は、H. オカヤマ博士 (日本、大阪大学) により与えられたもので ; 該プラスミドは、SV40 プロモーターと SV40 ポリ A シグナルの間に挿入されたクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ ("CAT") 遺伝子を有する。 pCDSR- - cat は、HindIII-SmaI 消化 SR プロモーターフラグメントの 0.8 kb を HindIII 消化 pSV0cat に、2段階の連結反応を経て、挿入することにより、pCDSR- から構築された。 cDNA ライブライアリの効率良い発現スクリーニングを可能にするためには、非常に強力なプロモーターが望まれていた。数種の哺乳類発現ベクター (若い細胞内にトランスフェクションされた pSV2cat 、 pCD- cat および pCDSR- - cat) の分析から、 SR プロモーターが若いサイクリング細胞における CAT 遺伝子の発現を高効率で推進することが見い出された。これらのプラスミドの相対的な CAT 活性は、各反応に用いられるタンパク質量に対して標準化することにより、計算された。転写効率は、 SV40 初期遺伝子プロモーターを利用する在来の pSV2 プロモーターよりも約 20 倍高かった。 10

pCMV- は、ヒトサイトメガトロウイルス前初期遺伝子 (immediate early gene) プロモーターにより駆動される E. コリ - ガラクトシダーゼ遺伝子を搭載している (マックグレゴール, G. R. およびキャスケイ, C. T. 、ヌクレイック・アシックス・リサーチ、17巻、2365頁(1989年) ; テキサス、ベイラー・カレッジ・オブ・メディシン、グラント・マックグレゴール博士により提供された)。プラスミド p440 は、ヒト - アクチン配列の 443 bp を搭載している (ナカジマ - イイジマ, S. 等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ、82巻、6133-6137頁(1985年) ; 日本、大阪大学、コーネー・マキノ博士により提供された)。プラスミド pHcGAP (ツオ, J. Y. 等、ヌクレイック・アシックス・リサーチ、13巻、2485-2502(1985年)) は、ヒトのグリセルアルデヒド 3 ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH) cDNA の全長を運ぶものであり、メリーランド、ロックビル、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから得られた。 20

cDNA アンチセンス発現のため、 cDNA フラグメントの全長を BamHI 消化により、当初クローニングした pCDSR- ベクターから摘出し、逆向きに、連結させた。

アガロースゲルから回収した cDNA 群を直接、子牛腸アルカリホスファターゼ処理した pCDSR- の SmaI 部位に挿入し、 E. コリ MC1061 または DH-1 に形質転換した。アンピシリン耐性コロニーを無作為に釣り、プラスミドの大きさを測定した。これらの手順は、 2-4.5 kb cDNA の挿入が、試験されたプラスミドの 90 パーセント以上で起こるようになるまで繰り返された。次いで、各 E. コリのコロニーをつま楊枝で釣り、 5 コロニーを集めて 1 つの cDNA プールにした。 400 以上の cDNA プールを調製し、 96 ウェルのミクロタイタープレート内で生育させ、 14% グリセロール中に -70 で保存した。 DNA 分離のために、各 DNA プール由来の E. コリを 200 ml 中に培養し、標準方法のエチジウムプロマイド / CsCl 超遠心分離 (ガルガー, S. J. 等、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション、117巻、835-842頁(1983年)) に 1 回または 2 回かけて処理し、続いて、 TE (10 mM トリス pH 8.0, 1 mM EDTA) 溶液に対して透析した。 40

実施例 2

DEAE- デキストラン媒介トランスフェクションおよび一時的発現スクリーニング若い、サイクリング纖維芽細胞 (cycling fibroblast cells) を、トランスフェクション前 50

18時間に、ウェル当たり $0.9 - 1.2 \times 10^5$ の密度で6ウェル組織培養プレートまたは35mm組織培養皿に接種した。トランスフェクションは、以下に記載のように微修飾して本明細書に参考として組み込んであるクレン、B.R.、ガイド・トウ・モレキュラー・クローニング・テクニクス・メソッズ・イン・エンザイモロジー、S.L.ベルガーおよびA.R.キメル出版、アカデミック・プレス、684-704頁(1987年)；に記載されているようにして行った。

各トランスフェクションのために、pCMV 100ngとcDNAプール400ngを混合し、ホスフェート緩衝化塩水(PBS)溶液190μlに懸濁し、10mg/mlのDEAE-デキストラン(ファルマシア、分子量500,000)10μlを加えた。クローニングベクタープラスミド、pcDSR の400ngを対照として、pCMV と共に用いた。細胞をPBSで1度洗浄した後、DNA溶液を加え、細胞をCO₂インキュベーター内で37度45分間までインキュベートした。次いで、64μMクロロキシン(シグマ、ミズーリ)を含む血清入り細胞培養培地の2mlを直接加え、更に2.5時間インキュベートした。クロロキシン処理後、トランスフェクション混合物を除き、細胞を血清入り細胞培養培地中10%ジメチルスルホキシドで、2分間処理した。細胞をその後、血清入りの新しい細胞培養培地に戻し、インキュベートして、トランスフェクションしたDNAを発現させた。

トランスフェクション後18時間で、³H-チミジン 0.5 μCi/mlを加え、更に48時間インキュベーションを続けた。25%グルタルアルデヒド溶液25μlを培養培地に加えることにより、細胞を固定し、室温で5分間インキュベートし、続いて、PBSで3回洗浄した。洗浄後、直ちに、細胞をX-gal反応混合物(10mM KClを含有する0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)に溶解した1mM MgCl₂、3mM K₄[Fe(CN)₆]、3mM K₃[Fe(CN)₆]、0.1%トリトンX-100、および1mM X-gal)で、20分間まで処理し、細胞を明青色に染色させた。X-gal染色後、細胞を水で洗浄し、乾燥して、コダックNTB核トラックエマルション(Kodak NTB nuclear track emulsion)(コダック、ニューヨーク)を用いるオートラジオグラフィーにかけた。次いで、X-gal陽性細胞におけるDNA合成活性を測定した。DNA合成の阻害パーセントは、式：

対照プラスミドをトランス cDNAプラスミドをトランス

フェクションした — フェクションした

青色細胞中の標識核% 青色細胞中の標識核%

× 100

対照プラスミドをトランスフェクション

した青色細胞中の標識核%

を用いて計算された。

候補となるcDNAプールを個々のcDNA群に分け、特定のDNA合成阻害cDNA配列群を同定するために、更にスクリーニングにかけた。

若いサイクリング細胞の核マイクロインジェクションは、(ランプキン、C.K.等、モレキュラー・セル・バイオロジー、6巻、2990-2993頁(1986年)、参照として本明細書に組み込んである)に記載されているようにして行った。要約すれば、5,000-10,000細胞を35mm組織培養皿の22mm四方のエッチングした格子状カバーガラス(square etched grid coverslips)(ベルコ)上にプレートした。3日または4日後、核マイクロインジェクションを、pCMV + cDNAプラスミドまたはpCMV + pcDSR (対照として働く)のいずれかを用いて、最小300細胞について行った。プラスミドをそれぞれ50ng/μlの濃度で同時マイクロインジェクションした。マイクロインジェクション後18時間で、細胞を³H-チミジンで24時間標識し、固定し、X-galで染色し、オートラジオグラフィーにかけた。DNA合成の阻害パーセントは、上記のように計算した。

総RNAのうち5μgまたはポリA+RNA 1μgのいずれかを用いて、ノーザンプロット分析を行った。該RNAは、ホルムアルデヒド-アガロースゲル上の電気泳動によりサイズ画分され、本明細書に参照として組み込んであるマニアチス、T.等、モレキュラー・

10

20

30

40

50

クローニング：ア・ラボラトリ・マニュアル；コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク(1982年)に記載されているように、ナイロン膜(I C N；バイオトランス、前のポール・バイオダイナ)に移された。放射性活性プローブをランダム・プライマー法により調製し、プロットは、マニアチス、T. 等、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリ・マニュアル；コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク(1982年)に記載されているように、ハイブリダイズした。

ノーザンプロット分析により、SD Iの細胞転写物の大きさはSD I c DNAの大きさに矛盾していないということが明らかにした。このことは、首尾良く発現スクリーニングを行うには、全長c DNAをベクターへ挿入する必要があることから、予想されるものであった。

- アクチンまたはグリセルアルデヒドホスフェートデヒドロゲナーゼ(G A P D H)プローブとの再ハイブリダイゼーションのために、使用説明書に従って、フィルターを標識プローブから繰り返し剥がした。そのデータは、アンビス・ラジオアナリティック・スキャニング・システム(Ambis Radioanalytic Scanning System)により正確に計られた。

C A T活性のアッセイは、以下のように測定された：

若いサイクリング細胞を35mm皿に接種し、上記のようにプラスミド500ngをトランسفェクションした。トランسفェクション後24時間で、細胞を皿からこすり集め、C A Tアッセイをゴーマン(ゴーマン、C.、DNAクローニング、ア・プラクティカル・アプローチ、I R L出版、オックスフォード、イギリス、143-164頁(1985年)、本明細書に参考として組み込んである)により記載されているようにして行った。

実施例3

老化細胞由来のDNA合成阻害因子群(S D I)のc DNAクローニング

二本鎖c DNA群は老化細胞由来ポリA+RNAから合成され、若い細胞において細胞質にマイクロインジェクションした場合、DNA合成を阻害することが示されている(ランプキン、C. K. 等、サイエンス、232巻、393-395頁(1986年))。このc DNA群は、サイズ画分され、p c D S R に挿入された。生じたE.コリクローン群は、小プール群に分けた。高効率トランسفェクションにおいてさえ、実験毎に頻度が変わるため、各プール由来のプラスミドをトランسفェクションマーカープラスミド、p C M Vと共に、同時トランسفェクションし、これにより、特定的にトランسفェクション細胞の標識指標の測定が可能になった。マーカープラスミドのトランسفェクション頻度は、30-90%の範囲であった。約200のc DNAプールをスクリーニングし、5回トランسفェクションを繰り返した後、4プールがDNA合成阻害活性に対して陽性のままであった。候補となるプール群は、次いで、個々のプラスミドに分け、更にスクリーニングした。

3つの別個の陽性プラスミドクローンが得られた。c DNAプールAでは、1つのプラスミド、2番のみが、強力なDNA合成阻害活性を示した。同様に、プールBおよびCでは、1つのc DNAクローンのみが阻害を引き起こした。挿入されたc DNAの大きさは、それぞれ2.1kb、1.2kbおよび2.7kbであった。これらのc DNA配列は、老化細胞由来の阻害因子として、それぞれSD I-1、SD I-2、SD I-3と呼称されている。

SD I-1 c DNAクローン(配列番号1)のヌクレオチド配列、およびSD I-1のアミノ酸配列(配列番号2)が、決定されている。SD I-1について本明細書に表したc DNA配列は、U. S. 特許出願番号07/808,523に記載されているものとは、286位に列挙されていないGを有する点、および1843-1844位の配列がGCではなくCGである点で異なっている。今回開示した配列は、その分離と特徴がU. S. 特許出願番号07/808,523に記載されているp c D S R - SD I-1プラスミドの再配列化により、得られたものである。p c D S R - SD I-1プラスミドで形質転換されたE.コリDH5は、1992年10月1日、アメリカ合衆国、メリーランド、ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託されており、受託番号ATCC 69081が与

10

20

30

40

50

えられている。

配列が、本明細書に記載の S D I - 1 ヌクレオチド配列の一部に対応する核酸分子は、アダムス，M. D. ら(ネーチャー、355:632-634(1992))により報告されている無作為遺伝子配列の中から同定されている。

実施例 4

若いサイクリング細胞への S D I 配列群マイクロインジェクション

S D I 配列群の機能活性を立証するために、マイクロインジェクションを行った。S D I - 1 または S D I - 2 のいずれかを搭載したプラスミドをマーカープラスミドと共に、若いサイクリング細胞の核内へ同時マイクロインジェクションした。生じた青色細胞の標識指数を測定した(表1)。これらのプラスミドは、若い細胞の D N A 合成に強力な阻害活性を示した。対照実験のために、空のベクターを、マーカープラスミドと共に、同時マイクロインジェクションした。これは、標識指数を非インジェクション細胞と比べた場合、わずかに阻害を引き起こしており、トランスフェクション実験では観察される現象でもある。S D I - 3 のマイクロインジェクションは、阻害活性が S D I - 1 および S D I - 2 トランスフェクション実験よりも低かったため、行わなかった。

正常ヒト纖維芽細胞に加えて、S D I - 1 分子は、また幾つかの腫瘍細胞型(メラノーマ、肺腫瘍および乳腫瘍等)および不死化 S V 4 0 形質転換纖維芽細胞および C H O 細胞の D N A 合成阻害が可能であることが分かった。S D I - 1 分子は、また正常ウシ肺動脈平滑筋における D N A 阻害も可能であった。

表1

	インジェクション されたプラスミド	インジェクション された細胞の数	総青色細胞*当たり の標識核の数	標識指数(%)	阻害%
実験 1	pCMV β +				
	pcDSR $\alpha\Delta$ †	335	58/97	59.8	0
	pCMV β +				
30	SDI-1	380	20/89	22.5	62.4
	pCMV β +				
	SDI-2	380	6/82	7.3	87.8
実験 2	pCMV β +				
	pcDSR $\alpha\Delta$ †	423	68/109	62.3	0
	pCMV β +				
40	SDI-1	465	26/98	26.5	57.5
	pCMV β +				
	SDI-2	475	27/118	22.9	63.2

注: †対照; *これは、検出可能なレベルの β -ガラクトシダーゼを発現する細胞の数である。; 各D N A の濃度は、5 0 μ g/mlであった。

実施例 5

アンチセンス D N A トランスフェクション

阻害活性が配列指向特異的であるかどうかを試験するために、S D I - 1 および S D I -

10

20

30

40

50

2配列のアンチセンス発現ベクターを構築した。いずれの配列も BamH I 部位を欠いていたこと、また、BamH I 部位は、cDNA の両方の末端に存在した(図1)ことから、これらの配列は、容易に摘出され、反対方向に再連結された。アンチセンス配列のトランسفエクションは、結果的に若い細胞におけるDNA合成を阻害しなかった(図3)。加えて、何等増大も観察されなかった。その結果は、明らかに、SDI活性の配列指向特異性を示しており、また、cDNA配列群によりコードされる特異的遺伝子産物群の存在を示唆している。

正常ヒト纖維芽細胞および多くの他の細胞は、好適な成長因子の欠損下でDNA合成を止める。SDI-1は、DNA合成開始の重要な陰性制御因子であるため、SDI-1に対するアンチセンスである分子は細胞のS相への移行と原因となることができる。この能力を証明するために、数種の正常ヒト細胞系を単離し、SDI-1アンチセンス分子を提供した(SDI-1 cDNAの、メタロチオネインプロモーターを有するベクター中の発現およびアンチセンス配向)。

この目的のために、アンチセンス発現ベクターを、SDI-1アンチセンス配列の、置換ヒトメタロチオネインプロモーターを含む誘発可能発現ベクターであるPMETへのクローニングにより構築した。PMET中の、メタロチオネインプロモーターは、pM26由来であり、基底(basal)プロモーターに欠損を含み、合成メタル反応因子の3重の添加を有した(マックニール, J.ら、ジーン、76:81-88(1989))。PMETの構築のために、E1A遺伝子12Sおよび13Sイントロン(ヌクレオチド917-1673)を含むアデノウイルス配列を、最初に哺乳類発現ベクターPRC/CMV(インビトロゲン)の、このプラスミドの多重クローニング領域のNot I / Apa I 部位にクローン化し、pRc / CMV - Adを創造した。E1Aの翻訳が起こっておらず、このベクターにSpe Iクローニング部位が産生されていることを確認するために、停止コドンを含むSpe IリンクをCMVプロモーターと、E1A配列の枠内のE1Aスプライス配列の間に挿入した。プラスミドRc / CMV - AdのCMVプロモーターを、次いでpM26プロモーターで置換し、PMETを産生した。これを成し遂げるために、メタロチオニンプロモーターを、Bgl III消化によりpM26から削除し、pBlueScript(pBS;Stratagene)のBamH I部位に挿入した。プロモーターを含むEcoRVおよびNot Iフラグメントを、次いでpBSから充填Bgl III部位およびNot I部位へサブクローン化した。SDI cDNAのアンチセンス配列は、pBSのBamH I部位にクローン化した完全長cDNA由来である。ヌクレオチド127のStu I部位を、Spe Iリンクの挿入によりSpe I部位に変え、SDISPE127を製造した。Spe Iリンクはまたヌクレオチド318のApa I部位に挿入され、SDISPE318を製造した。これらの構築物を、Spe Iで消化し、アンチセンス配向で、PMETのSpe Iクローニング部位に挿入し、このようにしてpMET - AS127およびpMET - AS318を製造した。

SDI-1アンチセンスを発現する細胞系を、細胞がトランسفエクション以後再接種されない以外、チェン, C.ら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー、7:2745-2752(1987)に記載の、BES / CaPO₄方法を使用してカルシウムリン酸トランسفエクションにより得た。PD10のHCA2細胞(3×10^5)を、PMET、pMETAS127、またはpMETAS318DNA20μgでトランسفエクションした。2週間のG418選択の後、コロニーを取り、広げた。挿入配列の誘発および統合性を、100μM ZnCl₂および2μM CdCl₂を加え、続いてRNA分析することにより試験した。安定な形質転換体由来の全細胞RNAのRNA分析は、アダミ, G.ら、EMBOジャーナル、10:3457-3465(1991)に記載のように[³²P]-UTPで内部標識したアンチセンスRNAプローブを使用して、RNAse保護により行った。SDI-1ヌクレオチド444-686を含むプローブpMET + SDI-1を、トランسفエクション遺伝子および内因性mRNAの両方からのSDI-1発現の測定に使用した。EcoNI消化の後、PMETベクター中のSP6プロモーターの転写は、発現発現ベクターおよび内因性SDImRNAの両方とハイブリダイズするアンチセンス標識プロウブをもたらす。これは、挿入構築物およびSDI-1内因性RNA由来の発現の相対的濃度の比較を可能にする。すべての検

10

20

30

40

50

定において、制御 - アクチンmRNAとして測定される。スクレオチド2124-2189を含むアクチンプローブを、pBSのEcoRIと充填BamHI部位の間に挿入する。安定にトランスフェクションされた細胞を、成長因子低濃度(0.5%ウシ胎児血清)を含む培地に7-10日置き、トリチル化チミジンで24時間パルス標識した場合、標識取り込みは5%より少ない。しかしながら、アンチセンスSDI-1を、トリチル化チミジンの添加24時間前にZnCl₂およびCdCl₂の添加により誘発した場合、25%以上の細胞が、標識取り込みにより、新DNAの合成の開始が見られ、したがって増殖の能力を回復していることが分かった。

この実験は、本発明のアンチセンス配列が、このような処置がなければ老化するであろう細胞の不死化に使用できることを示す。

10

実施例6

細胞老化中のSDI mRNAの発現

細胞老化中のSDI mRNA発現における変化を調べるために、若い細胞および老化細胞由来の総RNAを32P-標識SDI cDNAプローブとハイブリダイズさせた。このSDI-1プローブは、2.1kb細胞転写物とハイブリダイズし、SDI-2は1.4kb転写物とハイブリダイズし、SDI-3は2.5kb転写物とハイブリダイズした(表2)。表2は、若い細胞(Y)と老化細胞(S)におけるSDI遺伝子発現の総RNAノーザン定量分析値を与えるものである。若い細胞および老化細胞由来の総RNAの各5μgをSDIプローブとハイブリダイズさせた。フィルターは、繰り返し、放射性活性プローブから剥がして、内部対照としてプローブと再ハイブリダイズさせた。各試料におけるSDI mRNAの相対量は、同じフィルター上に検出されるGAPDH量と、SDI/GAPDHの相対量により標準化された。

20

属性	SDI-1		SDI-2		SDI-3	
	Y	S	Y	S	Y	S
SDIの相対量	1.0	3.3	1.0	0.31	1.0	0.31
GAPDHの相対量	1.0	0.37	1.0	0.36	1.0	0.38
SDI/GAPDHの相対量	1.0	9.3	1.0	0.86	1.0	0.82

30

細胞老化中、SDI-1情報は約3倍増加したが、一方SDI-2およびSDI-3情報は3分の1に減少した。同じフィルターを - アクチンと再ハイブリダイズさせ、次いで内部対照としてGAPDHプローブと再ハイブリダイズさせた。その結果は、いずれの対照遺伝子の発現も細胞老化中に、約3分の1に減少したことを示していた。以前の研究では、細胞老化中 - アクチン発現が2-3分の1に減少することが観察されている(クマザキ, T. 等、イクスピリメンタル・セル・リサーチ、195巻、13-19頁(1991年);セシャドリ, T. およびキャンピシ, J.、サイエンス、247巻、205-209頁(1990年);ファース, J. J.、ジャーナル・オブ・ゲロントロジー、46巻、B122-124頁(1991年))。老化細胞において - アクチンおよびGAPDH遺伝子の発現がいずれも減少したことから、ノーザン分析用にポリA+RNAを使用することになった。ポリA+RNAを、表2で用いられた総細胞RNA調製物から分離し、SDI cDNAとハイブリダイズさせ、続いて - アクチンおよびGAPDHそれぞれとプローブした(表3)。表3は、若い細胞(Y)と老化細胞(S)におけるSDI遺伝子発現のポリA+RNAノーザン分析の結果を示すものである。若い細胞と老化細胞由来のポリA+RNAの各1μgを分析に用いた。各試料におけるSDI mRNAの相対量は表2

40

50

のように計算した。

表3：ノーザン分析の定量値

属性	S D I - 1		S D I - 2		S D I - 3	
	Y	S	Y	S	Y	S
GAPDHの相対量	1.0	0.83	1.0	0.87	1.0	0.87
S D I / GAPDH の相対量	1.0	11.4	1.0	1.0	1.0	1.0

10

20

その結果は、明らかに、- アクチンとGAPDHの両方の発現は、それらをmRNAに基づき比較した場合、以前の観察に一致して、若い細胞と老化細胞とで等しいことを示した。SDI遺伝子発現をmRNAレベルで比較した場合、SDI-1 mRNAは、老化細胞では11倍増加し、それに対し、SDI-2およびSDI-3の発現は、イン・ビトロでの寿命を通して一定に保たれた(表3)。この結果は、SDI-1が老化細胞特異的DNA合成阻害因子であり、それに対し、SDI-2とSDI-3は、細胞サイクル調節に関係するより一般的な阻害因子であることがほぼ間違いないと思われる。

実施例 7

細胞老化中のポリA RNA含量の変化

ポリA+RNAノーザン分析対総RNAノーザン分析の結果が定量的に異なるという観察は、総RNA調製物中のポリA+RNA含量が、細胞老化中に変化したのかも知れないことを示した。この仮説を試験するために、細胞を連続的に培養し、総RNAを異なる集団倍加レベルで集めた。ポリA+RNAは、各試料から分離された。

結果は明らかにポリA+RNA含量が細胞老化中に次第に減少したことを示していた(図4)。図4では、細胞を連続的に培養し、総RNAを集めた。ポリA+RNA：総RNA%を培養齢(イン・ビトロでの寿命終了%)に対してプロットした。老化細胞は、非常に若い細胞と比較した場合、3-4分の1に少ないポリA+RNAを有していた。しかしながら、細胞当たりの総RNA含量を計算した場合、老化細胞は、若い細胞より1.3-1.5倍多く有していた(クリストファロ、V.J.およびクリチエフスキー、D.、メディカル・イクスペリメンス、19巻、313-320頁(1969年)参照)。

SDI-1情報が継代培養中、次第に増加するのかどうか、また、迅速な増加が、イン・ビトロでの寿命の終了する間際に起こるのかどうかを判定するために、異集団倍加での培養物由来のポリA+RNAを³²P標識SDI-1プローブとハイブリダイズさせた。この分析から、SDI-1発現は、培養物が老化するにつれて増加し、最期の数パーセント中に大きく変化することが明らかになった(表4)。表4は、細胞加齢過程中のSDI-1 mRNAの蓄積を示している。異集団倍加の細胞由来のポリA+RNAの各1μgをSDI-1プローブとハイブリダイズさせた。各試料中のSDI-1 mRNA相対量は、表2と同様に計算した。

30

40

表4：寿命終了%の定量値

属性	24%	37%	46%	66%	78%	88%	100%
GAPDHの相対量	1.0	1.6	1.5	1.3	1.4	1.3	0.9
SDI/GAPDHの相対量	1.0	2.2	2.1	4.0	3.5	6.2	20.5

10

静止中のSDI-1発現における変化もまた調べた。若い静止細胞を0.5%ウシ胎児血清(FBS)含有培地中に、3週間まで保持した。総RNAを各週集め、SDI-1プローブとハイブリダイズするRNA量を分析した。SDI-1情報は、細胞静止中顕著に増加した(表5)。表5は、細胞静止中のSDI-1 mRNAの蓄積を示している。0.5%FBS含有培地で1、2、3週間培養した若い細胞から得られた総RNAの各4μgを、SDI-1プローブとハイブリダイズさせた。SDI-1 mRNAの相対量は、表2と同様に計算した(C:10%FBS培地での対照培養)。その結果をGAPDH発現に対して標準化すると、SDI-1発現は、2週間後、10%FBS培地における対照分配培養の値と比較して低血清培地で18倍増加したことが見い出された。

表5：細胞静止中のSDI-1 mRNAの蓄積

属性	C	1週	2週	3週
GAPDHの相対量	1.0	0.72	0.88	0.37
SDI/GAPDHの相対量	1.0	12.2	18.4	14.9

20

mRNA対総RNAの細胞表現(cellular representation)が、細胞老化中に変化することが見い出された事実は、重要である。イン・ビトロでの加齢の過程中に、細胞当たりの総RNAが僅かに増加するにも拘わらず、mRNA含量は、次第に減少することが分かった(図4)。この現象は、細胞加齢の過程中、全遺伝子発現が次第に低下することを示しており、また、ノーザンプロット分析を総RNAで行った場合に、老化細胞において - アクチンとGAPDH遺伝子の発現が低下したことを説明するものである(表2)。しかしながら、若い細胞と老化細胞の間のこれらのハウスキーピング遺伝子(housekeeping genes)の発現レベルは、ノーザンプロット分析をポリA+RNAで行った場合では、ほとんど一定であった(表3)。この分析により、SDI-1情報は、老化細胞において強力に発現し、SDI-2およびSDI-3遺伝子はイン・ビトロでの寿命を通して変化無く発現することが明らかになった。

30

実施例 8

SDI-1遺伝子

40

SDI-1遺伝子は、老化細胞特異的DNA合成阻害因子をコードする。この遺伝子の発現増加は、細胞がそれらの最終の数分裂期に入った時に起こる(表4)。発現動態は、老化細胞の表現型発現とよく相關している。SDI-1遺伝子発現もまた、若い細胞を血清欠乏により静止させ、分裂しないようにした後に、増加することが見い出された。この結果は、老化と同じく細胞静止のDNA合成阻害においてもこの遺伝子が関与することを示している。血清成長因子の欠乏により静止状態にされた細胞が、老化細胞由来の阻害因子と同様の特徴を持つDNA合成阻害因子を生産することが示されている(ペレイラ・スミス, O. M. 等、イクスピリメンタル・セル・リサーチ、160巻、297-306頁(1985年);ステイン, G. H. およびアトキンス, L. 、プロシードィング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・U.S.A.、83巻、9030-9034頁

50

(1986年))。

S D I - 1 発現が老化中および静止中のいずれもで増加するという事実は、それがD N A 合成阻害因子であることを示している(スミス, J. R. 、ジャーナル・オブ・ゲロントロジー、45巻、B 32 - 35頁(1990年); 本明細書に参照して組み込んである)。あるいは、S D I - 1 配列群は、最近マウス細胞からクローン化された成長停止に特異的な遺伝子群と関係があるかも知れない(シュナイダー, C. 等、セル、54巻、787 - 793頁(1988年); マンフィオレッチ, G. 等、モレキュラー・セル・バイオロジー、10巻、2924 - 2930頁(1990年))。

実施例 9

S D I - 1 遺伝子生産物の発現

2種の異なる細菌性発現系において発現されたS D I - 1 c D N Aを、イン・ビトロで転写させ、2種の異なるイン・ビトロ系で翻訳させた。2種の細菌性発現系は、十分量のS D I - 1 タンパク質を得る確率を最大限にするために用いた。第一の発現系では、S D I - 1 タンパク質は、グルタチオンS - トランスフェラーゼ融合タンパク質として、細菌培養物のリットル当たり5 - 10 μ gの収率で発現した。組換えタンパク質をトロンбинで切断し、精製して、数個の余分なアミノ酸を持つS D I - 1 タンパク質を得ることが出来た。G S T 融合体をシストソマ・ジャポニカム(Schistosoma japonicum)G S T - コード化ポリヌクレオチドをB a m H Iで開裂することにより形成し、G S T - コード化配列の1 - 673ヌクレオチドを含む開裂フラグメントを產生した。G S T - D S I 融合タンパク質は、遺伝子融合体の組換え発現により製造した。

第二の発現系では、精製を助けるために6ヒスチジンアミノ末端部(terminal tag)を利用した。この組換えタンパク質は、更に手を加えること無く、使用できる。いずれの系でも、純粋なタンパク質調製物を分離可能であった。

この実験の過程では、イン・ビトロでの転写および翻訳系を用いて、S D I - 1 c D N Aの核酸配列から演繹される転写解読枠(open reading frame)を確認した。S D I - 1 タンパク質の計算による分子量は、約16,000ダルトンである。イン・ビトロで合成されたタンパク質は、S D S P A G Eにより、約21,000ダルトンの相対移動度で移動する。この小さな違いは、S D I - 1 の僅かに異常な電荷またはコンホーメーションが原因であり得る。細菌的に発現したタンパク質の部分的なアミノ酸配列は、転写解読枠を立証するものであった(配列番号2)。

細菌的に発現したタンパク質は、無傷の天然タンパク質に対するポリクローナル抗血清およびモノクローナル抗体を発生させるために用いられた。このような抗体は、S D I - 1 タンパク質およびS D I - 1 タンパク質複合体(complex)の免疫沈降において、合成ペプチドから生産された抗血清よりも効果的であり得る。予備的な免疫細胞化学研究は、1:20,000希釈でのウエスタン・トランスファー(a western transfer)で融合タンパク質と強力に反応する最も高親和性の抗血清(抗血清ナンバー55)を用いて、S D I - 1 タンパク質が、分裂中の若い細胞と比較して老化細胞において相対的に豊富であることを示唆した。老化細胞において、その位置は、核周囲であるように見えるのに対し、若い細胞では、核内に位置した少量のS D I - 1 タンパク質であるように見える。特異的に染色させるには、検出可能なレベルのS D I - 1 m R N Aを発現しない細胞(TE 85)の固定化細胞単層に対する抗血清を前以て吸収する必要があった。当該細胞は、4%パラホルムアルデヒド、次にメタノールで固定した。

通常、低レベルで遺伝子を発現する細胞において引き起こされたS D I - 1 m R N Aの発現から生じる細胞表現型を研究し、アンチセンスS D I - 1 構築物の効果を調べるために、S D I - 1 遺伝子が誘導プロモーターの制御下、安定に調整される細胞ラインを得ることが望ましい。この目標のために、メタロチオニンプロモーターの制御下、S D I - 1を含有する機能的ベクターを構築した。この構築物を若い増殖コンピテント細胞にトランスクレクションした後、100 μ M塩化亜鉛と2 μ M塩化カドミウムの存在下でインキュベーションして、D N A合成の開始を約50%まで阻害した。金属の不存在下では、D N A合成の阻害は無かった。対照ベクター(p c D S R)と共にトランスクレクションし、

10

20

30

40

50

金属の存在下で成長させた細胞は、金属の不存在下で成長させた同じプラスミドと共にトランسفエクションした細胞の約90%のDNA合成能力を有することが見い出されていることから、観察された阻害活性は、金属毒性が原因ではない。

SDI-1で観察された阻害効果が発現を駆動するために用いられた特定のプロモーターの性質に関連していないことを示すために、他のプロモーターから発現された、SDI-1のDNA合成阻害能力を調査した。それ故に、若い増殖性ヒト纖維芽細胞をCMV-galおよびCMV-SDI-1と共に同時トランسفエクションした。CMV-galと細胞のトランسفエクションは、DNA合成にほとんど影響しなかつたが、一方、CMV-SDI-1は、これらの特定の実験におけるpCDRSRベクターでのSDI-1よりも効果的でさえあった。

SV40ラージT抗原は、老化細胞を誘導してDNAを合成させる能力がある。それ故に、SDI-1の阻害作用が、T抗原の発現により克服され得るかどうかを決定することは、興味深いものであった。更に、SDI-1の作用が細胞における一般的な代謝不均衡の誘導のせいではないことを決定することが望まれていた。もし、そうであれば、誰もラージT抗原がその効果と拮抗するとは予想しないであろう。これらの理由により、細胞を、SDI-1cDNA、およびT抗原がその内でCMVプロモーターにより駆動されるベクターと共に同時トランسفエクションした。このような同時トランسفエクション実験により、SDI-1の阻害活性は、SV40ラージT抗原の同時発現により大幅に破壊されることが明らかになった。

一時的トランسفエクションアッセイ(Transient transfection assays)は、追加のヒト正常纖維芽細胞細胞ライン(新生児包皮細胞ライン(CSC303))およびWI38不死細胞ラインを用いて実施し、SDI-1の大部分の阻害効果の普遍性を判定した。いずれの場合でも、かなりの阻害(40-50%)が観察された。更に、SDI-1は、SV40形質転換細胞ラインGM639またはヒーラ細胞(<20%)だけでなくSUSMI(40%)を阻害することが分かった。ここまで得られた結果は、ヒーラ細胞およびSV40ウイルスで形質転換された細胞が老化細胞と融合することによって阻害されないという、ヘテロカリオン実験から得られた以前の結果と一致している。このことは、SDI-1が、老化細胞において以前に検出された阻害因子と同様の挙動をすることの更なる証拠を与えるものである。

実施例10

SDI-1遺伝子のサザン分析

SDI-1の不存在または不活性が不定分裂に対する4種の相補グループのいずれかにおける細胞不死化性の要因なのかどうかを判定するために、染色体DNAとmRNAを4種のグループを代表する細胞ラインから調べた。サザン分析により、Eco RIでの消化後、予想された5および10kbバンドが明らかになった。それ故に、これらの細胞ラインのSDI-1遺伝子中では大きな欠失または転位は全く起っていない。ノーザン分析により、SDI-1mRNAは、相補グループBおよびCに割り当てられている細胞ラインにおいては、少量かまたは存在しないことが測定された。SDI-1は、相補グループAおよびDを代表する細胞ラインにおいては、より高いレベルで存在した。この結果は、細胞ラインが細胞老化をのがれ得るような機構の一部が、活性SDI-1遺伝子の充分なレベルを発現する能力の欠損によることを示唆している。

実施例11

SDI配列の特性検定

機能的スクリーニング法を用いることにより、新規DNA合成阻害遺伝子SDI-1が同定された。この遺伝子は、非増殖性ヒト2倍体纖維芽細胞から高レベルで発現される。正常ヒト細胞培養物をインビトロで加齢させると、SDI-1のメッセージレベルは10~20倍に増加し、発現反応動態は細胞老化の表現型発現と緊密な相関関係を示した。さらに、成長因子妨害により細胞を静止状態にすると、SDI-1メッセージは増加した。

上記結果は、SDI-1が、細胞周期制御に重要な新規生理学的活性遺伝子産物をコードすることを示している。遺伝子発現は、刺激されて細胞周期に入った細胞において、G₀

10

20

30

40

50

期から S 期へ入る間に調整される。さらに、アンチセンス S D I - 1 メッセージの発現によって、細胞が刺激され、成長因子の非存在下で細胞周期に入る。負の成長調節因子 p 5 3 および R b により観察される場合と同様に(レーン、D . P . 等、「ネイチャー」278 : 261 - 263 (1979)、リンツエル、D . I . H . 等、「セル」17 : 43 - 52 (1979)、デ・キャブリオ、J . A . 等、「セル」54 : 275 - 283 (1988))、S V 4 0 T 抗原が S D I - 1 の阻害活性を打ち消し得るという観察結果から、細胞周期の調節におけるこの遺伝子産物の重要性が強調される。

本発明の組換え S D I - 1 タンパク質は、C D K 2 によるヒストン H 1 のリン酸化を阻止する。S D I - 1 が D N A 合成を遮断することから、この発見は、ヒストン H 1 のリン酸化が D N A 合成の開始においてある役割を有することを示している。 10

S D I - 1 遺伝子産物はまた、C D C 2 、C D K 2 およびC D K 4 を含む幾つかのサイクリン依存性キナーゼの強力な阻害物質である。ヒト細胞抽出物を用いた類似実験において、組換え S D I - 1 は、C D K 2 キナーゼ活性を阻害することが見いだされた。これらの結果は、細胞周期の進行に関する様々なタンパク質に関して知られていることを考慮すると特に重要である。G 1 サイクリン類を欠く出芽酵母株を補足する能力により同定された(キシヨング、Y . 等、「セル」65 : 691 - 699 (1991)、ルー、D . J . 等、「セル」65 : 1197 - 1206 (1991)、キシヨング、Y . 等、「カレント・バイオロジー」1 : 362 - 364 (1991)、コフ、A . 等、「セル」66 : 1217 - 1228 (1991))、幾つかのヒト G 1 サイクリン候補(サイクリン C 、D および E)は、調節された細胞周期であることが見いだされており、最大m R N A 発現は G 20 1 における様々な時点で行われていた(ルー、D . J . 等、「セル」65 : 1197 - 1206 (1991))。D 型サイクリン類およびサイクリン E は活性キナーゼ複合体とアソシエートするため(コフ、A . 等、「セル」66 : 1217 - 1228 (1991)、1992 、デュリック、V . 等、「サイエンス」257 : 1958 - 1961 (1992))、マツシメ、H . 等、「セル」65 : 701 - 7139 (1991)、エーベン、M . E . 等、「セル」73 : 487 - 4976 (1993)、カトウ、J . Y . 等、「ジーンズ・デベロップメント」7 : 331 - 342 (1993))、これらのキナーゼ類は、「限定点」での新たな1回の細胞分裂に対する哺乳類細胞の責任(commitment)においてある役割を有すると思われる(パーディー、A . B . 、「サイエンス」246 : 603 - 608 (1989))。事実、最近の報告では、サイクリン E - C D K 2 キナーゼ複合体が G 1 後期および S 期初期において最大活性を有し(デュリック、V . 等、「サイエンス」257 : 1958 - 1961 (1992)、コフ、A . 等、「セル」66 : 1217 - 1228 (1991))、また培養されたヒト細胞(ヒンズ、P . W . 等、「セル」70 : 993 - 1006 (1992))およびインビトロ(エーベン、M . E . 等、「セル」73 : 487 - 4976 (1993))において P B タンパク質をリン酸化する能力を有することが示されている。これは、キナーゼが細胞周期の G 1 から S 期への移行において中軸的役割を演じ得ることを示唆している。 30

S D I - 1 タンパク質のイムノプロットにより、このタンパク質のレベルが、異なる成長状態の細胞においては(すなわち活発に成長中の細胞対静止または老化細胞では)それほど変動するとは思われないことが示された。しかしながら、一貫して高水準量のタンパク質は、増殖中の細胞よりも非分裂細胞に存在する。S D I - 1 が C D K 活性の強力な負の調節因子であることから、これは当然だと思われ、この阻害因子の厳重な調節は、適切な細胞周期調節および進行に不可欠である。阻害因子タンパク質の量が小さく変化しても、それに制御される様々な遺伝子産物には重大な影響がもたらされ得る。少なくとも 2 種の C D K 、すなわち C D C 2 および C D K 2 は、m R N A における細胞周期相依存性変化にもかかわらず、細胞周期を通して比較的一定した定常状態のタンパク質レベルを維持している。S D I - 1 は、S D I - 1 タンパク質のレベルが特定レベルで正確に制御され、S D I - 1 の阻害作用を克服して細胞周期を通して進行を可能にするのに新規 C D K / サイクリン合成および活性化が必要とされる形で、同様に調節され得る。すなわち、要求されるいき値の刺激性遺伝子産物が存在するまで S D I - 1 は細胞周期へ入るのを阻止し、細 40

胞周期の「限定点」を通って細胞分裂を進行させる。活性CDK / サイクリン複合体および阻害因子SDI-1タンパク質間のかかる動的平衡は、アンチセンスSDI-1 mRNA発現に起因するSDI-1タンパク質の定常状態レベルが小さく減少した後に静止細胞で観察されたDNA合成の刺激を説明している。すなわち、SDI-1は、他の細胞増殖阻害因子、例えば腫瘍抑制遺伝子p53およびRbと類似した形で細胞において機能し得、SDI-1遺伝子は様々な腫瘍での突然変異に関する標的であり得る。

老化細胞は、有糸分裂促進物質を加えることにより刺激されてもS期へは入り得ないが、それらは、サイクリン類D1、サイクリンE、CDK2、Rb、p53、c-H-ras、c-myc、c-junおよびjunBを含む多くの細胞周期調節遺伝子に対するmRNAを発現しない。しかしながら、c-fos、ヒストンH3、CDC2、サイクリンA、サイクリンB1およびPCNAを含む、幾つかの他の重要な細胞周期調節遺伝子は、有糸分裂促進物質刺激老化細胞では発現されない。老化細胞における網膜芽腫感受性遺伝子Rbのタンパク質産物のリン酸化の欠如は、老化細胞がDNAを合成し得ない一つの原因で有り得る。しかしながら、サイクリンE-CDK2複合体は、比較的老化細胞に富むが、インビボでRbを潜在的にリン酸化し得るキナーゼ活性を欠いている。

本発明のSDI分子は、活発に細胞分裂している細胞よりも老化細胞での方が高いレベルで発現される。すなわち、SDI-1の調節作用による適切なCDK活性の欠如は、老化細胞がS期へ入り得ないことの主たる理由であり得る。これは、老化細胞が、主としてCDK2の仮定的SDI-1媒介阻害の下流の事象において欠失しているという事実により裏付けされる。

E2F-1、即ち広い範囲の標的遺伝子を有するE2F-1転写因子の一成分の過剰発現により、SDI-1伝達による阻害作用が打ち消され得ることが見いだされた。腫瘍抑制遺伝子Rbおよび関連p107タンパク質がE2F-1と複合体を形成して転写を阻害することは、充分に確立されている。サイクリンAおよびEの過剰発現により、増殖のpRb媒介による抑制は打ち消される。さらに、E2F-1の過剰発現により、静止RELF-52細胞によるDNA合成が誘導され得る。すなわち、E2F-1がSDI-1の負の成長活性を打ち消すという観察結果を考慮に入れると、E2F-1は、p53、SDI-1およびRbにより制御される事象のカスケードにおける最終段階であり得る。

実施例12

細胞腫瘍抑制因子およびSDI配列間の関係

細胞周期停止状態におけるSDI-1に関する役割は、血清排除されたまたは高密度への成長により静止状態にされた正常ヒト細胞では、SDI-1 mRNAレベルが細胞分裂中の細胞の場合と比べて10-20倍に増加したという事実により示されている。しかしながら、血清を加えると、SDI-1 mRNAレベルは、DNA合成の開始直前に低レベルまで急速に減少することが見いだされた。すなわち、SDI-1は、「チェックポイント」として作用し、不利な外部条件の存在下で細胞増殖を阻害すると思われる。多くの不死セルラインは、不充分な成長因子に応じたDNA合成の開始を遮断することができない。しかしながら、本発明によると、様々な不死ヒト細胞においてSDI-1が過剰発現することにより、低下した成長因子に応じた細胞増殖を停止させる能力とは関係なくセルラインの幾つかにおいてDNA合成が阻害される。

SDI-1の過剰発現およびSDI-1の過剰発現による細胞増殖の阻害間の生理学的意義は、SDI-1がサイクリン/cdk2複合体のキナーゼ活性を阻害し得るという発見により強化される。事実、指示された通り、サイクリン/cdk2複合体(cdk2抗血清によりヒーラ細胞抽出物から免疫沈降した)へ250ngの純化GST-SDI-1融合タンパク質を加えると、ヒストンH1キナーゼ活性の半最大阻害が得られた。

SDI-1によるその抗増殖活性の伝達を介している分子機構をさらに調査するため、MDAHO41を含む若干の不死セルラインにおいてSDI-1 RNAの定常状態レベルを評価した。MDAHO41セルラインは、リイ-フロウメニ症候群患者から誘導されたもので、p53を合成しない。これらの細胞は、低血清成長因子の存在下においてDNAを合成し続け得ることが見いだされた。

10

20

30

40

50

ノーザン分析により S D I - 1 レベルを測定し、 G A P D H または β - アクチン m R N A に正規化した。電気穿孔により D N A を導入した。急速に成長している細胞をトリプシン化し、 10 μ g の担体 D N A 、 β - ガラクトシダーゼ遺伝子をコードする p C M V b (マクグレガー、 G . R . 等、「スクレイック・アシックス・リサーチ」 17 : 2365 (1989)) 1 μ g および 1 μ g の p C M V S D I - 1 (S D I - 1 のスクレオチド 1 - 685 を含む) を含むリン酸緩衝食塩水 0.5 m l に 10⁶ 細胞を再懸濁した。プラスミド p C M V b は、外因性 D N A を組み込み、発現し得る細胞を検出するためのマーカーとしての役割を果たした。 250 - 350 ボルトのパルス後、 3 × 10⁵ 細胞を 35 mm 細胞培養皿に播種した。三重水素化チミジン (1 μ C i / m l) を、電気穿孔の 24 - 30 時間後培養地に加え、細胞をさらに 24 時間インキュベーションした。細胞を固定し、 β - ガラクトシダーゼ活性について染色し、オートラジオグラフィーにかけて、三重水素化チミジンの存在下で D N A を合成した β - ガラクトシダーゼ陽性細胞のパーセンテージを測定した。 p C M V ベクターおよび p C M V b によりトランスフェクションされた対照細胞に対する阻害パーセントを測定した。 M D A H 041 細胞の場合にはカルシウムのトランスフェクションを使用した。 S D I - 1 m R N A レベルおよび D N A 合成間の相関関係を表 6 に示す。示されたデータは、少なくとも 2 実験の平均である。

表 6 : S D I - 1 m R N A レベルおよび D N A 合成阻害間の相関関係

セルライン	阻害%	S D I - 1 m R N A レベル	P 53 の状態
MADH 041	95 ± 4	検出可能にあらず	突然変異体
SAOS 2	47	行われず	突然変異体
TE 85	75 ± 7	検出可能にあらず	突然変異体
T 98 G	35 ± 5	検出可能にあらず	突然変異体
ヒーラ	60 ± 5	低い	HPV-18 感染
A 1698	15 ± 3	正常	野生型
U A B C 023	57 ± 6	低い	未知
Ser31 → Arg31 同型接合			
GM 639	78	正常	SV40-形質転換
GM 847 Ser31 → Arg31 異型接合	21	正常	SV40-形質転換
R N 13	阻害無し	正常	未知
P R 282	阻害無し	正常	未知

表 6 に示されている通り、 S D I - 1 m R N A レベルは、同じく野生型 p 53 タンパク質を欠く幾つかのセルラインにおいて非常に低いかまたは検出不可能であることが見いだされた。重大なことに、 S D I - 1 R N A およびタンパク質は、 M D A H 041 細胞か

10

20

30

40

50

らは検出不可能であった。p53 レベルおよびSDI-1 レベル間の相関関係は、p53 が SDI-1 の誘導を通して静止状態を誘導することによりその腫瘍抑制活性を伝達すること、および p53 を欠く細胞は SDI-1 発現を誘導し得ないことから腫瘍形成性であることを示唆していた。

細胞成長制御における、そして転写アクチベーターまたはサプレッサーとしての p53 の充分に確立された役割、およびMDAHO41 細胞が野生型 p53 を発現しないという事実を考えると、それらが同じく SDI-1 発現性を欠くという発見は、これらの細胞へ p53 が導入された結果、SDI-1 発現が誘導され、すなわち成長が停止することを示していた。

p53 の SDI-1 発現誘導能力をさらに立証するため、p53 を MDAH 041 細胞 10 に導入した。前記導入の結果、三重水素化チミジン・オートラジオグラフィーにより測定されたところによると、SDI-1 の発現は増加し、DNA 合成は阻害された。阻害の度合いは、導入されたプラスミドの量に応じて増加した。観察された DNA 合成阻害が、p53 の他の何らかの作用によるのではなく p53 による SDI-1 の誘導に起因する場合、アンチセンス SDI-1 配列の同時トランスフェクション後に阻害活性は失われる。

従って、p53 による SDI-1 の直接誘導を立証するため、上記 SDI-1 およびアンチセンス SDI-1 遺伝子配列を、p53 遺伝子構築物と共に正常ヒト纖維芽細胞へ同時トランスフェクションした。予想通り、アンチセンス構築物は、SDI-1 単独により誘発される DNA 合成阻害の 80% を排除することが見いだされた。4 μg の SDI-1 および増加量の p53 プラスミドを MDAH041 細胞へ共トランスフェクションしたとき、アンチセンス SDI-1 は、p53 単独により誘発される DNA 合成阻害を効果的に除去し得ることが見いだされた。これらの発見は、表 7 で要約されている。この発見は、p53 が DNA 合成阻害を誘発する一方法が、SDI-1 の発現を活性化することによるものであること、および SDI-1 の前記誘導が p53 の DNA 合成阻害活性の一部に関する必要条件であるという結論を証明した。前記活性化は、少なくとも部分的に SDI-1 遺伝子の転写活性化により行われる。発現された SDI-1 タンパク質は、一部分、CDK / サイクリン複合体のキナーゼ活性を阻害することにより作用するため、細胞周期における多数の時点で作用することにより進行を遮断し得る。野生型 p53 活性の喪失の結果、SDI-1 発現が不足することになり、それによって不適当な細胞周期進行がもたらされる。

表 7 : P53 による SDI-1 の誘導

トランスフェクションした P53 DNA の量 (ng)	DNA 合成 (対照のおよその%として)	
	P53 単独	P53 + 抗 SDI-1
0	100	121
10	25	50
30	15	45
100	10	25

p53 タンパク質をコードする遺伝子における突然変異は、ヒト腫瘍ではよくみられることで、腫瘍の約 50% が突然変異体 p53 を発現する。このことから、p53 が負の成長調節因子として作用し、腫瘍抑制遺伝子であるという結論が導かれた。本発明の一態様は、p53 の癌抑制遺伝子活性に関する分子機構の認識に関する。p53 は SDI-1 の転写活性化に必要とされるため、この機能の不活性化により不適当な細胞周期の進行が行われ得る。SDI-1 は、少なくとも一部で CDK / サイクリン複合体のキナーゼ活性を阻害することにより作用する細胞周期増殖の阻害因子であることが見いだされた。それ自体

10

20

20

30

40

50

前記物質は、細胞周期における多数の時点で作用することにより進行を遮断することができる。p53はSDI-1の転写活性化に必要とされるため、この融合体の不活性により、抑制されず不適当な細胞周期の進行が行われ得る。これにより、細胞は細胞周期の状態に関する正常な外部シグナルを無視することになり、その場での増殖が行われ得る。SDI-1はp53の下流であるため、SDI-1は、p53作用のエフェクターであると思われる。さらに、SDI-1からは、突然変異p53をもたない細胞における細胞増殖改变の一助となり得る突然変異が見いだされた。

実施例 13

SDI-1の腫瘍細胞増殖抑制能

上記で示されているところによると、SDI-1は、腫瘍細胞増殖抑制能力を有する。この能力を立証するため、幾つかのヒト腫瘍から誘導された細胞を、グルタチオンS-トランスフェラーゼ-SDI-1融合タンパク質の存在下または非存在下でインキュベーションした。この実験では、 5×10^3 細胞を37℃で一夜培養し（接着細胞の場合のみ）、次いでSDI融合タンパク質とインキュベーションした。37℃で48時間後、24時間細胞にチミジンを適用し、次いで採取した。この実験の結果を表8に示す。未処理細胞によるチミジン取り込みを100%として表した。全ての測定は4回同様に実施した結果であった。

10

表8: S D I - 1 の抗増殖作用

セルライン	相対細胞生存能 (対照の%)	
	50 µg/ml	30 µg/ml
脊髄細胞:		
プロ骨髄球 (H L - 6 0)	1 ± 0	1 ± 0
プロ単核白血球 (M L - 1)	1 ± 0	1 ± 0
骨髄性 (K G - 1)	1 ± 0	1 ± 0
骨髄性 (K G - 1 a)	1 ± 0	1 ± 0
組織球リンパ腫 (U - 9 3 7)	1 ± 0	1 ± 0
プロ単核白血球 (T H P - 1)	1 ± 0	1 ± 0
B細胞リンパ腫		
バーキットリンパ腫 (ダウジ)	1 ± 0	3 ± 0
バーキットリンパ腫 (ラジ)	1 ± 0	1 ± 0
上皮細胞		
胸部 (B T - 2 0)	1 ± 0	1 ± 0
胸部 (B T - 2 0 T N F R)	1 ± 0	1 ± 0
胸部 (S K - B R 3)	1 ± 0	1 ± 0
胸部 (M C F - 7)	1 ± 0	1 ± 0
胸部 (T - 4 7 D)	2 ± 0	2 ± 0
肺腺癌 (A - 5 4 9)	2 5 ± 3	4 0 ± 1
肝細胞性 (H e p G 2)	1 2 ± 2	2 1 ± 3
グリオblastoma細胞		
グリア (U - 2 5 1)	3 5 ± 2	6 6 ± 4
正常細胞		
ヒト臍帯静脈内皮細胞	2 ± 1	5 ± 1
ヒト包皮纖維芽細胞	1 ± 0	為されず
ネズミ腫瘍細胞		
纖維芽細胞 (L - 9 2 9)	4 ± 1	為されず

上記実験は、S D I - 1 により処理された腫瘍細胞がD N A合成の著しい抑制を呈したこ 50

とを示している。

実施例 1 4

腫瘍細胞の増殖に対する S D I - 1 c D N A の効果

S D I - 1 c D N A が腫瘍細胞の増殖を抑制する能力を評価した。S D I - 1 c D N A を、電気穿孔により若干の腫瘍誘導性および他のセルラインへ導入した。1 μ g の C M V - S D I - 1 プラスミドを、C M V プロモーターおよび - ガラクトシダーゼ遺伝子を含むプラスミド 1 μ g と混合した。電気泳動後、細胞を培養し、24 時間後三重水素化チミジンの取り込み能力について検定した。S D I - 1 c D N A により、黒色腫、肺腫瘍および脳腫瘍を含む若干の腫瘍誘導セルラインにおいて D N A 合成の顕著な阻害が誘発された。S D I - 1 c D N A はまた、マウス 3 T 3 細胞および正常ウシ平滑筋細胞において D N A 合成を阻害した。3 種の腫瘍誘導セルライン（肺腫瘍セルライン 1 種および腎臓腫瘍セルライン 2 種）は、S D I - 1 c D N A に反応しなかった。 10

実施例 1 5

正常細胞の増殖に対する S D I - 1 アンチセンス c D N A の作用

また、アンチセンス発現ベクターを用いて D N A 合成に対する S D I - 1 の作用を評価した。 - ガラクトシダーゼ遺伝子を欠くプラスミド p C M V の誘導体であり、S D I - 1 c D N A 配列のヌクレオチド 1 - 6 8 4 を含むプラスミド p C M V S D I 6 8 4 を導入することにより、S D I c D N A を細胞に組み込んだ。変形ヒトメタロチオネインプロモーター（C S I R O、「バイオモレキュラー・エンジニアリング」、ニューサウスウェールズ、オーストラリア）を含む誘導可能な発現ベクター、p M E T へ S D I - 1 アンチセンス配列をクローニングすることにより、アンチセンスベクターを構築した。このプロモーターは、基礎プロモーター中に 1 欠失および 3 反復で合成金属応答元素の付加を含む。p M E T を構築するため、まず、E 1 A 遺伝子 1 2 S および 1 3 S イントロン（すなわち、ヌクレオチド 9 1 7 - 1 6 7 3 ）を含むアデノウイルス配列を、このプラスミドの多重クローニング領域の N o t 1 / A p a 1 部位のところで哺乳類発現ベクター p R c / C M V (インビトロゲン) へクローニングすることにより、p R c / C M V - A d が作製された。E 1 A 配列の翻訳が行われなかったことを確実なものにし、ベクターにおいて S P E I クローニング部位を作るため、停止コドンを含む S P E I リンカーを、C M V プロモーターおよび E I A 配列と枠を形成している E 1 A スプライス配列間に挿入した。次いで、プラスミド R c / C M V - A d の C M V プロモーターを p M 2 6 プロモーターと置き換えることにより、p M E T が作製された。 20

これを達成するため、メタロチオネインプロモーターを、B g I I I 消化により p M 2 6 から切りとり、p B l u e s c r i p t (ストラタジーン) の B a m H I 部位に挿入した。次いで、プロモーターを含む E c o R V および N o t 1 断片を、p B l u e s c r i p t から R c / C M V - a d の補充された B g I I I 部位および N o t 1 部位へサブクローニングした。S D I - 1 c D N A からのアンチセンス配列を、クローン化された完全長 c D N A から p B l u e s c r i p t の B a m H I 部位へ誘導した。ヌクレオチド 1 2 7 にある S t u I 部位を、S p e I リンカーの挿入により S p e I 部位に変換すると、S D I S P E 1 2 7 が得られた。また、S p e I リンカーをヌクレオチド 3 1 9 の A p a I 部位に挿入することにより、S D I S P E 3 1 9 が作製された。これらの構築物を S p e I により消化し、アンチセンス方向で p M E T の S p e I クローニング部位へ挿入することにより、S D I アンチセンス発現ベクター p M E T - A S 1 2 7 (配列番号 1 の S D I - 1 c D N A に対するアンチセンス鎖の最初の 1 2 7 ヌクレオチドを有する、) および p M E T - A S 3 1 8 (配列番号 1 の S D I - 1 c D N A に対するアンチセンス鎖の最初の 3 1 9 ヌクレオチドを有する、) が作製された。S D I - 1 アンチセンスを発現するセルラインは、リン酸カルシウムトランスフェクションにより得られた。細胞集団倍加 1 0 で $3 \times 1 0^5$ の H C A 2 細胞（ヒト包皮細胞）を、2 0 μ g の p M E T 、p M E T A S 1 2 7 または p M E T A S 3 1 8 によりトランスフェクションした。2 週間の G 4 1 8 選択後、コロニーを取り、発展させた。挿入された配列の誘導性および完全性を、1 0 0 マイクロモルの Z n C l₂ および 2 マイクロモルの C D C l₂ を加えることにより安定した形質転換体を用いて測定した後、全細胞 R N A の 40

R N A 分析を行った。この分析は、[³²P] - U T P で内部標識したアンチセンス R N A プローブを用いるリボヌクレアーゼ保護であった。S D I - 1 ヌクレオチド 4 4 4 - 6 8 6 (配列番号 1 の) を含むプローブ p M E T + S D I - 1 を用いて、トランスフェクションした遺伝子および内在性 m R N A の両方からの S D I - 1 の発現を測定した。E c o N I 消化後、p M E T ベクターにおいて S P 6 プロモーターから転写すると、発現ベクターからの両 R N A および内在性 S D I - 1 m R N A とハイブリダイズするアンチセンス標識プローブが得られた。これによって、導入された構築物および S D I - 1 内在性 R N A からの発現の相対レベルの比較が可能となった。対照として、- アクチン m R N A を全てのアッセイで測定した。

D N A 合成の範囲を測定するため、細胞をトリプシン化し、2 4 ウエルプレートにおいて 1 ウエル当たり 1×10^4 細胞を播種した。培養の 4 ~ 6 時間後、細胞をリン酸緩衝食塩水で 3 回洗浄し、この培地を 0.5 % ウシ胎児血清含有培地と交換した。この血清の排除により細胞は静止状態に誘導された。6 ~ 10 日後、培地を取り替え、金属を加えることによりメタロチオネインプロモーターを誘導した。加えられた金属の量を各プラスミドについて最適化した。最適化された量は、p M E T 1 の場合 70 マイクロモルの Z n C 1₂ および 1.4 マイクロモルの C d C 1₂ であり、A S 1 の場合 50 マイクロモルの Z n C 1₂ および 1 マイクロモルの C d C 1₂ であった。20 時間後、新鮮な培地を加えることにより、誘導を推し進めた。[³H] - チミジン (1.5 μ C i / m l) を 4 時間後各培養物に加えた。24 時間後、細胞を固定し、オートラジオグラフィーにより分析した。典型的な実験で得られた結果は表 9 に示されており、本発明のアンチセンス分子が静止細胞の増殖を誘導する能力を立証している。

表 9

セルライン	標識細胞の%	
	金属導入前	金属導入後
成分無し	< 5 %	5 %
ベクター対照	< 5 %	5 %
アンチセンス構築物 I	7 %	49 %
アンチセンス構築物 II	< 5 %	57 %

実施例 1 6

S D I - 1 アンチセンスオリゴヌクレオチドが S D I 伝達による増殖阻害を抑制する能力上記で検討されているところによると、S D I - 1 の発現により D N A 合成は阻害される。場合によって、例えば培養中のヒト細胞を不死化するためには、上記阻害の抑制が望ましいこともある。本発明の S D I - 1 アンチセンス分子は、上記抑制を伝達することができる。

S D I - 1 アンチセンスオリゴヌクレオチドが示す S D I - 1 の D N A 合成阻害作用を抑制する能力を立証するため、下記配列：

配列番号：3 AGCCGGTTCTGACATGGCG

を有するオリゴヌクレオチドを細胞に提供した。

このオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド 75 - 93 が配列番号 1 に対してアンチセンスである。

10 % ウシ胎児血清 (F B S) 含有培地中で細胞を約 1 週間培養し、その時点で培地を 0.5 % F B S 含有培地と取り替えた。細胞を対照細胞および実験細胞に分けた。1 日目、1、2 または 5 マイクロモルの上記オリゴヌクレオチドを実験細胞に提供した。対照細胞

10

20

30

40

50

にはオリゴヌクレオチドを全く与えなかった。3日目、そして再び5日目、全細胞に新鮮な0.5%FBS含有培地を与えた。実験細胞には追加のオリゴヌクレオチド(1、2または5マイクロモル)を与えた。6日目、三重水素化チミジンを培養培地に加え、細胞を7日目に採取した。実験細胞(アンチセンスオリゴヌクレオチドを与えたもの)は、対照細胞に対して、それらのDNA中に取り込まれた三重水素化チミジンの量の増加を呈した。

結果は、SDI-1ヌクレオチド75-93に相補的な領域を含むオリゴヌクレオチドが、SDI-1機能のアンチセンスリプレッサーとして作用し得ることを示していた。

実施例 17

SDI-1の発現に対するDNA損傷および成長停止作用

10

上記実験は、p53がSDI-1発現を誘導すること、およびSDI-1mRNAの製造が接触阻害および血清排除細胞並びに老化ヒト細胞において誘導されることを立証した。SDI-1の誘導が成長停止状態の一般的特徴であるのか否かを測定するため、SDI-1mRNAレベルに対するDNA損傷作用を評価した。

細胞においては、細胞周期のSまたはM期にはいる前にDNA損傷剤に反応して成長停止が行われると考えられている。成長停止により、細胞ではDNA損傷剤により誘発された遺伝子病変があればそれらの修復が行われ得る。前記損傷を修復し損ねると、突然変異が誘発され、細胞死から腫瘍形成に及ぶ過酷な結果に至り得る。すなわち、細胞のDNA損傷に応じた成長停止に耐える能力は、癌の原因論および化学療法に対する癌細胞の応答の両方において非常に重大である。

20

SDImRNA製造に対するDNA損傷剤の影響を評価するため、正常ヒト新生児包皮纖維芽細胞(HCA2株)、不死化セルライン(TE85、アメリカ合衆国、メリーランド、ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手可能)および上記MDAHO41セルラインを使用した。37で5%CO₂中アール塩類+10%ウシ胎児血清を含むイーグルの最少必須培地(ギブコBRL、ガイザーズバーグ、メリーランド、アメリカ合衆国)、または37でハンクス塩類+10%ウシ胎児血清において全細胞を培養した。HCA2細胞は、老化する前に約80細胞集団倍加を達成する。細胞は、細胞集団倍加27またはそれ未満で使用された。

細胞を、ガラス製カバーガラスにおいて 1×10^4 細胞/cm²で培養し、24-48時間50-75%密集度に成長させ、次いで幾つかのDNA損傷源: 線(4Gy)、ブレオマイシン(75μg/ml、4時間)、エトポシド(4%DMSO中400マイクロモル、8時間)、過酸化水素(400マイクロモル、1時間)、UV光線(30J/m²)、メタンスルホン酸メチル('MMS') (100μg/ml、4時間)、マイトマイシンC('MMC') (5μg/ml、30時間)およびCdCl₂(250マイクロモル、1時間)のうちの1つで処理した。UV照射の場合、細胞を150cm²の組織培養皿で培養した。処理の直前、培地を除去し、皿を蓋無しでストラタジーン(ラ・ジョラ、カリフォルニア、アメリカ合衆国)ストラタリンカ-UV架橋装置中に置き、30J/m²の線量で照射した。次いで、新鮮な血清補充培地を加え、細胞を37、5%CO₂でインキュベーションした。線照射は、固定した¹³⁷Cs供給源を用いて、25cm²組織培養フラスコに入れた完全細胞培養培地中の細胞に対して行われた。線量率は4.21Gy/分であった。照射線量は4Gyまでであった。さらに、熱ショック(42、4時間)、オキシ尿素(2ミリモル、24時間)およびプロスタグランジンA₂(0.1%エタノール中10μg/ml、24時間)の影響を評価した。

30

上記各処理の16時間後、三重水素化チミジンを加え、細胞を8時間インキュベーションし、固定し、上記要領でオートラジオグラフィーにかけた。製造会社のプロトコルに従いRNAゾールB(シンナ/バイオテックス、ヒューストン、テキサス)を用いた処理の4または24時間後RNAを採取した。10-20μgのRNAを、20%ホルムアルデヒドを伴う1.2%アガロースゲルにおいて分離し、ジーン・スクリーン・プラス(ボストン)膜へ移し、プロープし、定量した。処理試料を未処理対照と比較することにより、折り返し誘導(fold induction)を測定した。対照は、処理試料の場合と同じ洗浄、培地交

40

50

換、輸送および不注意な温度変動を経験した模擬処理細胞であった。エタノールまたはジメチルスルホキシドに溶かした薬剤成分に関する対照を、同じ濃度の溶媒単独に暴露した。SDI-1 RNA値をGAPDHレベルに正規化した。場合によっては、アクチンRNAに対する正規化も行ったが、折り返し誘導における実質的な差異は示されなかった。この実験の結果を表10に示す。

表10：様々な処理によるSDI-1 mRNAの誘導および成長停止

作用の機構	損傷源	用量	SDI-1レベル*	成長停止%
2本鎖破壊	γ線	4 Gy	2.0	70%
2本鎖破壊	ブレオマイシン	75 µg/ml 4時間	11.8	100%
蛋白質会合 2本鎖破壊	エトボシド	400 µM 8時間	8.0	100%
遊離基	H ₂ O ₂	400 µM 1時間	6.3	95%
巨大付加体(若干の遊離基)	UV光線	30 J/m ²	15.2	60%
アルキル化	MMS	100 µg 4時間	3.27	53%
架橋	マイトマイシンC	5 µg/ml 30時間	2.8	100%
突然変異誘発性金属	CdCl ₂	250 µM 1時間	1.3	0%
一般的ストレス	熱ショック	42°C 4時間	2.3	為されず
dNTP合 成の阻害因子	オキシ尿素	2 mM 24時間	7.9	100%
パラクリン ホルモン	プロスタグラ ンジンA ₂	10 µg/ml 24時間	6.1	100%

*24時間レベルでのSDI-1の折り返し誘導

10

20

30

40

50

予備試験（エル・デイリィ、W.S.等、「セル」、75:817-825（1993））は、WAF1の製造は、UV光線により誘導され得ることを示唆した。上記実験は、SDI-1 mRNAの製造が、正常細胞および野生型p53を欠く細胞の両方においてDNA損傷および他の成長停止処理により誘導されることを立証している。上記実験の結果は、哺乳類細胞で腫瘍形成に至り得るDNA損傷または突然変異の修復におけるSDI-1の役割を示している。

試験された損傷源は全て、1つ例外はあるものの、これらの細胞においてSDI-1 mRNAの増加を誘発することが見いだされた（表10）。使用濃度の塩化カルシウムでは、SDI-1メッセージレベルは高められなかつた。しかしながら、三重水素化チミジン取り込み分析は、塩化カルシウム処理が成長阻止を誘導しない（DNA合成の阻害は無し）ことを示した（表10）。対照的に、三重水素化チミジン取り込みによって測定されたところによると、成長停止は、試験された他の損傷源に応じて本質的に完全であった（表10）。しかしながら、UV照射およびMMS処理の場合、50-60%の阻害しか観察されなかつた。これらの損傷源に応じた成長停止がDNA合成の測定時点ではその最大に到達していなかつたまたは逆に言えば細胞増殖が既に再開していたという可能性がある。塩化カルシウムによる誘導の欠如は、損傷が成長停止を誘発するときのみ、SDI-1メッセージがDNA損傷により高められたことを示している。過酸化水素は、接触阻害により既に成長阻止している細胞ではそれ以上SDI-1 mRNAレベルを上昇させ得なかつたという観察結果がこれを裏付けている。

- 照射および過酸化水素処理によるSDI-1 RNA誘導の速度論は相異なることが見いだされ（図6）、SDI-1遺伝子発現の調節に関する多様な機構についての更なる証拠が提供された。 - 照射によるSDI-1メッセージの誘導は、p53によるこの遺伝子の場合の時間経過に従う。イオン化放射に暴露した後にp53活性が急速に（30分以内）増加し、次いで3時間以内に基線レベルまで低下するということ（リュ、X.等、「セル」75:765-778（1993））が、マウス前立腺細胞において立証された。正常ヒト細胞で観察されるSDI-1 mRNAの誘導は、予想されている通り時間的には僅かに遅れるがこのパターンと類似している。主たる差異は、SDI-1メッセージがp53活性よりもさらにゆっくりと（約30時間にわたって）低下したことであるため、リュ、X.等の観察結果（「セル」75:765-778（1993））を説明している。正常ヒト細胞で観察されるSDI-1 mRNAの誘導は、時間的には僅かに遅れるが、このパターンに類似している。主たる差異は、SDI-1メッセージがp53活性よりもさらにゆっくりと（約30時間にわたって）低下したことである。これは、p53活性低下のずっと後も、イオン化放射誘導による停止が20-30時間続くという、リュ、X.等の観察結果（「セル」75:765-778（1993））を説明している。

過酸化水素によるSDI-1メッセージの誘導（図6）は、非常に異なるパターンを呈した。過酸化水素に暴露すると、p53活性が急速に増加し（ティシュラー、R.B.等、「キャンサー・リサーチ」53:2212-2216（1993））、処理の4時間後までに基線へ戻るということが提案された。対照的に、SDI-1 mRNAレベルは、処理の9時間後までそれほど上昇せず、少なくとも48時間増加し続けた（図6）。過酸化水素処理に対するSDI-1 RNAレベルの緩慢な応答は、上昇したSDI-1 mRNAのレベルが普遍的に成長停止と関連していると思われるが、それが常に停止の最初の原因であるとは限らないことを示している。SDI-1メッセージ上昇の類似パターンは、正常ヒト細胞の血清排除および接触阻害により観察され、mRNA安定化の場合に観察されるものと似ている。また、血清排除および接触阻害に応じたmRNAの緩慢な増加は、GADD遺伝子の場合（フォーネイス、A.J.等、「モレキュラー・セル・バイオロジー」9:4196-4203（1989））にも注目されている。これら全ての場合において、SDI-1は、別の経路により開始された後に成長停止を維持すべく作用し得る。

実施例 1.8

DNA損傷および成長停止に対するSDI-1応答におけるp53の役割

示されているとおり、成長停止を誘発するがDNAを傷つけることはない誘発源（熱ショ

10

20

30

40

50

ック、オキシ尿素およびプロスタグラジンA₂)についても調べると(表10)、SD I-1メッセージレベルの増加を誘発することが見いだされた。熱ショックおよびオキシ尿素処理はSD I-1メッセージを高めたが(表10)、両方ともp53活性を高めないことが示され(リュ、X.等、「セル」75:765-778(1993)、ツアン、Q.等、「モレキュラー・セル・バイオロジー」13:4242-4250(1993))、これらの誘発源がp53依存性機構を通して作動し得ることが示された。

この可能性をさらに調べるため、様々な不死セルラインのp53状態を免疫沈降試験により測定し、同じセルラインでSD I-1 mRNAレベルの定常状態と比較した。この目的のため、セルラインを、75cm²フラスコ中約70%の密集度まで成長させた後、メチオニン不含有修飾ダルベッコのイーグル培地で1時間培養し、次いで10%透析ウシ胎児血清を含むメチオニン不含有培地および100μCi/ml L-[³⁵S]メチオニン(TRAN35SLABEL、ICN)中で標識した。1免疫沈降に対し1本のフラスコを使用した。この標識培地中で3時間インキュベーション後、細胞を氷上に置き、氷冷リン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄し、溶菌緩衝液(20ミリモルのトリス、pH7.4、150ミリモルのNaCl、0.5%NP-40、1ミリモルのEDTA、50μg/mlのロイペチン、30μg/mlのアプロチニン)中で採取した。リゼイトをマイクロフュージ管中にすり落とし、25ゲージ針に通すことにより3回せん断した。フェニルメチルスルホニルフルオリドを加えて1ミリモルの最終濃度とし、リゼイトをエッペンドルフ・マイクロフュージ中4で45分間14000rpmの遠心分離にかけた。上清容量を調節することにより細胞数に対して正規化し、次いで30分間4で45分間事前に浄化した。上清容量を調節することにより細胞数に対して正規化し、次に、ウサギ抗マウスIgG(ICN)および2種のマウスIgG2a黒色腫蛋白混合物(ICN)により逐次被覆しておいた約40μl充填容量のプロテインA-アガロース(ファルマシア)と共に回転盤において30分間4で事前に浄化した。次いで、リゼイトをマイクロフュージし、生成した各上清を、4μgの適当なp53特異抗体または同じ種類およびその下位分類に属する非特異抗体で被覆しておいた50μl充填容量のプロテインG PLUS/プロテインA-アガロース(オンコジーン・サイエンス)とインキュベーションした。特異抗体は、P53の野生型および突然変異形態の両方と結合するPAb421、突然変異形態のサブセットを認識するPAb240、および野生型p53を特異的に認識するPAb1620であった。p53抗体は全て、オンコジーン・サイエンスから入手された。使用された非特異抗体は、エシェリヒア・コリのアントラニレート合成タンパク質に対する非特異IgG₁抗体または2種のIgG₂黒色腫タンパク質の混合物であった。回転盤において4で2時間インキュベーションを行った。試料をマイクロフュージし、沈澱物を、氷冷洗浄緩衝液(20ミリモルのトリス、pH7.5、150ミリモルのNaCl、0.5%NP-40および0.1%SDS)で4回、次いでPBSにより2回洗浄した。試料を2×ローディング緩衝液(4%SDS-ポリアクリルアミドゲル、pH8.8)に再懸濁した。ゲルを固定し、アンブリファイ(アマーシャム)で処理し、乾燥し、80で20-28時間コダックX-ARフィルムに感光させた。

p53がSD I-1 mRNA転写の唯一の調節因子であったとすると、野生型p53が存在しない場合、SD I-1発現レベルは低いものとなり、機能的p53が存在する場合、それに応じてSD I-1発現レベルはより高いものとなつたはずである。

SD I-1発現の調節のp53依存性機構についての証拠は、機能的p53を欠くTE85およびMDAHO41細胞を、SD I-1メッセージレベルの変化を決定する表10記載の誘発源の多くにさらすことにより得られた。TE85は、免疫沈降により突然変異体p53のみを発現することが見いだされた骨肉腫誘導ラインである。G₁停止にwt p53を必要とする(クエルビツ、S.J.等、「プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ」89:7491-7495(1989))。照射を除き、試験された処理は全て、セルラインTE85においてSD I-1メッセージを増加させることができた(表11)。SD I-1 RNAレベルのp53非依存性調節向上は、過酸化水素およびオキシ尿素処理後

のMDA H 0 4 1細胞において確認された(表11)。従って、SDI-1 mRNA蓄積パターンは、GADD45の場合と類似している。この遺伝子はまた、照射によるものであって、大部分の他の誘発源によるものではない誘導に関して機能的p53を必要とする(ツアン、Q.等、「モレキュラー・セル・バイオロジー」13:4242-4250(1993))。GADD45は、成長停止およびDNA損傷の両方による誘導性に基づいて同定された遺伝子群の一員である(フォーネス、A.J.等、「モレキュラー・セル・バイオロジー」9:4196-4203(1989))。これらの発見は、P53がSDI-1の唯一の調節因子ではないこと、そしてSDI-1の追加的調節因子が存在することを示している。上記方法を用いることにより、それら追加的調節因子を同定することができる。

10

表11

誘発源	TE85	MDA H 0 4 1
対照	1	1
γ線	1.3	1.1
エトポシド	2.6	
H ₂ O ₂	4.0	3.3
UV光線	3.0	
MMS	4.4	
MMC	2.5	
オキシ尿素	7.5	2.5

20

要約すると、上記結果は、1)DNAを損傷するものを含め成長停止を誘導する広い範囲の誘発源によって、SDI-1メッセージレベルが高められ、2)機能的P53の非存在下でこれを達成し得る誘発源もあり、そして3)この上昇は2つの相異なる時間的パターンに従うことを立証している。1つ目では、p53活性が上昇すると、SDI-1 mRNAも平行して増加する。これが充分早くに生ずるため、停止の誘因となり得る。2つ目のパターンでは、成長阻害因子は、p53に完全に依存しているわけでもない機構によって停止を誘発する。この停止に伴ってSDI-1 mRNAが漸進的に蓄積しており、これはおそらくメッセージ安定性の増加に起因するものと思われる。

30

実施例 19

SDI-1融合タンパク質に対するモノクローナル抗体の製造

上記に従い、適当なハイブリドーマ用のスクリーンにおいて免疫原としてGST-SDI-1融合体を用い、配列番号4のリーダー配列を有する[His]₆融合体を用いて、抗SDI-1モノクローナル抗体を単離した。抗体の全ては、GST-SDI-1融合タンパク質に加えて細胞および組換えSDI-1タンパク質の両方についても免疫沈降させ得た。ヒト組織の免疫組織化学的評価においてモノクローナル抗体を使用した。4種のハイブリドーマライン(18A10、C6B6、8A8、2G12)およびマウスIgG_{2b}対照からの抗体(10μg/ml)を、4で一夜ニート上清とインキュベーションした。抗体は、色素原としてのDABと共にベクター・スタンダードABCキットを用いて検出された。ヒト扁桃(リンパ様および上皮細胞成分の両方を含む)、成人皮膚(結合組織および上皮細胞成分の両方を含む)または成人結腸(結合組織および腺上皮細胞成分を含む)からの組織を評価した。染色性を定性的+/-尺度で評価した。対照抗体はどの組織におい

40

50

ても染色性を示し得なかった。

モノクローナル抗体 18A10

扁桃 全上皮細胞層、全リンパ球および全ストロマ成分は着色しなかった。

皮膚 全上層およびことによると基底細胞層が、痕跡～1+拡散細胞質染色性を示した。結合組織成分は着色しなかった。

結腸 上皮細胞は着色しなかった。腺内の粘液が痕跡～1+染色性を呈した。結合組織成分は着色しなかった。

モノクローナル抗体 C6B6

扁桃 全上皮細胞層、全リンパ球および全ストロマ成分は着色しなかった。

皮膚 基底細胞上皮細胞が、+/-~痕跡+拡散細胞質染色性を有していた。結合組織成分は着色しなかった。 10

結腸 上皮細胞間の個々の細胞が、3+核/細胞質染色性を示した。腺内の粘液は着色しなかった。結合組織成分は着色しなかった。

モノクローナル抗体 8A8

扁桃 全上層、上皮細胞層およびことによると基底細胞が、+/-~痕跡+拡散細胞質染色性を示した。リンパ球および全ストロマ成分は免疫反応性を示さなかった。

皮膚 全上部上皮細胞が、+/-~1+拡散細胞質染色性を示した。結合組織成分は着色しなかった。 20

結腸 上皮細胞領域が、3+核/細胞質染色性を示した。粘液が+/-染色性を示した。結合組織成分は着色しなかった。

モノクローナル抗体 2G12

扁桃 基底細胞上皮層が痕跡～1+染色性を示した。全リンパ球の中には痕跡膜染色性を呈するものもあった。ストロマ成分は着色しなかった。

皮膚 基底細胞層が、痕跡～1+拡散細胞質染色性を示した。上部細胞層は着色するとは思えなかった。

結腸 顕著な褐色沈澱物質が目につき、管上皮細胞の中には強い核着色を呈しているものもあることを示唆していた。腺内の粘液は着色しなかった。結合組織成分は着色しなかった。

この実験は、モノクローナル抗体が、SDI-1を発現する組織型およびSDI-1を発現しない組織型間を識別し得ることを示していた。さらに、異なる細胞型において他と異なる染色パターンを識別することが可能だった。免疫組織化学的評価は生検組織において遂行され得た。腫瘍塊内の細胞の非染色性フォーカスの検出は、もはやSDI-1を発現することのない、従ってより攻撃的な抗腫瘍および抗転移療法を保証する細胞の指標となる。 30

実施例 20

標的細胞へのSDI-1のデリバリー

細胞への薬剤デリバリー能力は、治療プロトコルを明確にする際の一般的問題となっている。SDI-1の細胞取り込み促進におけるGST部分の役割を評価するために、2種のGST-SDI-1構築物の薬剤デリバリー能力を評価した。

第1GST-SDI-1融合体の構築

これらの融合体の第1は、標的細胞に入り得るものとして最初に認識された特に好みしいシストソーマ・ジャポニカムGST-SDI-1融合体（上記で検討）であった。しかしながら、注目すべきことに、この融合体の構造における僅かな修飾でも、標的細胞によって取り込まれる能力を実質的に破壊することが見いだされた。すなわち、初めに記載されたシストソーマ・ジャポニカムGST-SDI-1融合体は、以前に充分には認識されていなかった固有の他と区別される特徴をもっていた。

特に好みしいシストソーマ・ジャポニカムGST-SDI-1融合体は、プラスミドpCDSR-SDI-1をAcy1およびEcoRIで開裂し、SDI-1コード化フラグメントを遊離させることにより形成された。Acy1は、SDI-1開始コドンの後のプラスミド4ヌクレオチドを開裂する。EcoRIは配列番号1の1010付近で分子を 40

開裂する。次いで、フラグメントをプラスミド p B S の S m a 1 および E c o R I 部位間でクローン化した。次に、この構築物を B a m H I および E c o R I で開裂することにより、S D I - 1 A T G 開始コドンの直後にヌクレオチド：G G A T C C C C C G C C (配列番号 7) を含む S D I - 1 コード化フラグメントが放出された。分子の遠位末端は、配列番号 1 のほぼ 1 0 1 0 位にあった。

シストソーマ・ジャポニカム G S T - コード化配列を含むプラスミド p G E X 2 T を、B a m H I および E c o R I で開裂した。B a m H I 酵素は、分子のヌクレオチド 6 6 2 - 6 6 7 (分子のコドン 2 2 6 付近) に位置する部位でシストソーマ・ジャポニカム G S T - コード化配列を開裂する。E c o R I 酵素は、G S T - コード化配列の外側でプラスミドを開裂する。2 酵素開裂によりプラスミドの再連結反応が阻止され、S D I - 1 配列が 10 適切な配向で導入されるのを確実なものにする。

B a m H I - E c o R I 処理 p G E X 2 T D N A を、S D I - 1 A T G 開始コドンの直後にヌクレオチド：G G A T C C C C C G C C (配列番号 7) を 1 端に含み、他端に E c o R I 開裂部位を含む上記 S D I - 1 コード化フラグメントとインキュベーションした。2 分子の連結反応により、S D I - 1 コード化配列が G S T コード化配列からの枠外の 1 ヌクレオチドと融合しているプラスミドが製造された。読み枠を修復するために、プラスミドを B a m H I で開裂し、スタッガード末端をクレノウ D N A ポリメラーゼを用いて補充し、次いで配列：C C C T C G A G G G (配列番号 8) を有する 1 0 塩基対 X h o l リンカー (プロメガ) にライゲートした。すなわち、最終構築物は、S D I - 1 の A T G 開始コドンおよび S D I - 1 コード化配列の残りに融合した A s p - P r o - P r o - A 20 1 a (配列番号 9 の残基 4 - 7) をコードする B a m H I 補充リンカー (配列番号 7) に融合した P r o - A r g - G l y (配列番号 9 の残基 1 - 3) をコードする 9 残基フラグメントに融合した G S T のアミノ酸 1 - 2 2 6 をコードする配列を含んでいた。完全遺伝子融合体のヌクレオチド配列は、配列番号 1 0 に与えられている。この遺伝子融合体によりコードされるアミノ酸配列は、配列番号 1 1 に与えられている。上記の第 1 G S T - S D I - 1 遺伝子融合体を含むプラスミド p A G 2 0 により形質転換されたエシェリヒア・コリ株は、微生物寄託を管理するブダペスト条約の合意のもとアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ロックビル、メリーランド、アメリカ合衆国) に寄託された。この寄託は 1 9 9 4 年 4 月 5 日に為され、寄託番号 A T C C 6 9 5 9 7 が付された。

第 2 G S T - S D I - 1 融合体の構築

第 2 S D I 融合体は、ポリメラーゼ連鎖反応および下記配列を有するプライマーを用いて、プラスミド p c D S R - S D I - 1 の S D I - 1 コード化領域を増幅することにより得られた。

プライマー 1 2 6 1 4 (配列番号 1 2)

GGAGGATCCATGTCAGAACCGGCT

プライマー 1 2 6 1 5 (配列番号 1 3)

GCAGAACCTCTGTGGCGGGATTAG

これらのプライマーは、配列番号 1 の残基 7 7 - 5 8 7 を含むポリヌクレオチドを増幅する。プライマー 1 2 6 1 4 は、A T G 翻訳開始部位の上流に隣接して B a m H I 部位を有する。プライマー 1 2 6 1 5 は、翻訳停止部位の下流に 1 4 ヌクレオチドを含み、部分的 E c o R I 部位を含む。

増幅生成物を B a m H I および E c o R I により開裂し、上記 B a m H I / E c o R I 処理 p G E X 2 T プラスミドへクローン化した。生成したプラスミドは、G S T 配列のコドン 2 2 6 を S D I - 1 のコドン 1 に連結する枠内融合を含んでいた。

すなわち、2 種のタンパク質融合体は、第 1 融合体がアミノ酸：
配列番号 9 Pro-Arg-Gly-Asp-Pro-Pro-Ala

から成る「ヒンジ領域」を含み、第 2 融合体がヒンジ領域を全く含まないという点のみ異

20

30

40

50

なる。

第1および第2GST-SDI-1融合体を若い細胞に供すると、第1融合タンパク質は、細胞内で検出され得ることが見いだされ、第2融合タンパク質は細胞内からは検出されなかつた。これらの観察結果は、第1GST-SDI-1融合体が細胞に結合し、受容細胞に組み込まれる能力を有し、第2GST-SDI-1融合体がこの能力を欠くことを示した。これらの観察結果と一致して、第1タンパク質融合体または第2タンパク質融合体に曝された若い細胞の中で、第1タンパク質融合体に曝された細胞のみが老化を呈した。

実施例21

SDI-1タンパク質の欠失分析

SDI-1タンパク質の機能的ドメインを調べるため、CMVプロモーターを用いることによりSDI-1cDNA配列のフラグメントの転写が促される幾つかの遺伝子構築物を製造した。

具体的には、次のアミノ酸のコドンを欠くSDI-1ポリヌクレオチド、すなわち24-29(SDI-1_{1-23;25-164}と称す)、30-35(SDI-1_{1-29;36-164}と称す)、42-47(SDI-1_{1-41;48-164}と称す)、53-58(SDI-1_{1-52;59-164}と称す)、66-71(SDI-1_{1-65;72-164}と称す)、72-164(SDI-1₁₋₇₁と称す)を欠くものが構築された。さらに、コドン16-52を含むStu-Tthフラグメント(SDI-1_{Stu-Tth}と称す)が除去処理されたSDI-1ポリヌクレオチドが構築された。これらの構築物および無傷のSDI-1コード化構築物(SDI-1₁₋₁₆₄と称す)およびCMV対照ベクターを、CMVプロモーターに駆られてガラクトシダーゼを発現するベクターを随伴するMDAHO41細胞中に共トランスフェクションした。CMV-_{g al}およびCMVベクターと共にトランスフェクションされた細胞に対して成長阻害パーセントを測定した。実験は同様にして3回行われた。各SDI-1ポリヌクレオチドについて得られた阻害パーセントを表12に示す。

表12

構築物	検出されたアミノ酸	阻害パーセント			
		実験1	実験2	実験3	平均
CMV-ベクター	なし	98	100	98	99
SDI-1 _{1-23;25-164}	24-29	93	93	92	93
SDI-1 _{1-29;36-164}	30-35	93	91	83	89
SDI-1 _{1-41;48-164}	42-47	66	76	75	72
SDI-1 _{1-52;59-164}	53-58	40	46	57	48
SDI-1 _{1-65;72-164}	66-71	88	81	88	86
SDI-1 _{Stu-Tth}	Stu-Tth	11	36	13	20
SDI-1 ₁₋₁₆₄	72-164	90	98	98	95

これらの結果は、アミノ酸42-47の欠失により、阻害効率および範囲の減少が誘発されたことを示している。アミノ酸53-58の欠失により、阻害効率および範囲の重大な減少が示された。SDI-1分子のカルボキシ末端部分(アミノ酸72-164)の欠失は、阻害範囲にあまり影響を及ぼさなかつた。すなわち、SDI-1の活性ドメインは、アミノ酸1-71を含むペプチドフラグメント内に存在し、アミノ酸42-47および53-58は活性SDI-1ドメインを含む。要約すると、SDI-1の活性ドメインは、SDI-1タンパク質のアミノ酸42-58間に含まれる

実施例22

免疫反応性23kDタンパク質の同定

予想された通り、上記モノクローナルおよびポリクローナル抗体は全て、SDI-1に対応する21kDタンパク質(「p21」)を免疫沈降させ得ることが見いだされた。これ

10

20

30

40

50

らの抗体により免疫沈降したタンパク質の分析は、予想に反して、これらの抗体が細胞抽出物中に存在する 23 kD タンパク質を沈殿させることを示した。試験された抗 SDI-1 抗体の全てがこの 23 kD タンパク質（「p23」）を沈殿させたという事実は、SDI-1 および 23 kD タンパク質は構造的に関連性があり、多数の抗原決定基を共有することを示す。上記 cDNA ベクターから発現された 21 kD の SDI-1 タンパク質が生物活性であるという事実は、23 kD タンパク質が活性 21 kD SDI-1 タンパク質の不活性リン酸化前駆体の特徴を呈することを示している。

かかる前駆体をもつ場合、SDI-1 は、110 - 114 kD の分子量を有する多重リン酸化状態を呈することが見いだされた Rb-タンパク質に類似している。脱リン酸化形態は、110 kD の分子量を有する（リー、W.H. 等、「チューマー・サプレッサー・ジーンズ」中、クレイン、G.（編）、マーセル・デッカー、ニューヨーク、インコーポレイテッド、169 - 200 頁（1990））。

SDI-1 の不活性リン酸化形態の同定結果は、SDI-1 の生物活性に対し、転写の p53 誘導により正の調節が為されるとともに、細胞キナーゼにより負の調節が為されることを示している。上記キナーゼ（複数も可）の同定は、発現時、脱リン酸化 p21 SDI-1 のリン酸化を促進し得るタンパク質を製造する構成成分について cDNA ライブライアリーリーをスクリーニングすることにより容易に決定され得る。上記変換は、p21 - p23 免疫沈降タンパク質のウエスタン・プロットを行うことにより分析され得る。それらの酵素は p21 SDI-1 を不活性化するため、それらは細胞に増殖能力を付与し、SDI-1 誘導による老化を克服する分子として同定され得る。上記分子は、SDI-1 アンチセンス核酸と同様にして使用され得る。同様に、p23 タンパク質を脱リン酸化する酵素は、発現時、p23 形態を p21 形態に変換し得るタンパク質を形成するポリヌクレオチドについてスクリーニングすることにより同定され得る。ウエスタン・プロット方法を用いることにより、上記分子が同定され得る。上記酵素は p23 分子を活性 p21 形態に変換するため、それらの酵素は、細胞に静止または抗増殖能力を付与する。上記分子は、SDI-1 または SDI-1 コード化核酸と同様にして使用され得る。

実施例 2 3

SDI-1 フラグメントの特性検定

上記検討によると、酵母からヒトまでの真核生物における細胞増殖の制御には、サイクリン依存性キナーゼ類（Cdk5）と呼ばれるタンパク質キナーゼの調節性サブユニットとして作用する 1 群のサイクリン類の調節された合成、活性化および分解がある。cdk5 は、S 期および有糸分裂の開始に必要である。タンパク質 SDI-1 による DNA 合成の阻害機構には、一連の Cdk5 キナーゼ活性（例、cdk1 - cdk6）の阻害が含まれる。事実、インビボ SDI-1 タンパク質は、様々なサイクリン抗体に対する抗体を用いた免疫沈降により、これらの cdk5 - サイクリン複合体の幾つかに伴うことが見いだされた（キショング、H. 等、「セル」71:505 - 514（1992）参照）。これらの複合体は、何らかの DNA 腫瘍ウイルスによる細胞の形質転換時に破壊され（PCT 特許出願 WO 94-09135、ワガ、S. 等、「ネイチャ」369:574 - 578（1994））、発癌性タンパク質が形質転換細胞の細胞周期を変更する上述の機構が確認された。さらに、最近の報告は SDI-1 および p53 間の上記関係を確認しており、野生型 p53 が SDI-1 を直接トランス活性化することを示したため（ハーパー、J.W. 等、「セル」75:805 - 816（1993）、エル・デイリー、W.S. 等、「セル」75:817 - 825（1993）、キショング、Y. 等、「ネイチャ」366:701 - 704（1994）、デュリック、V. 等、「セル」76:1013 - 1023（1994））、それが p53 の下流エフェクターであることが確認された。これらの結果により、SDI-1 が、正常な細胞増殖中には負の調節因子であるだけでなく、発癌中には腫瘍サプレッサー因子でもあることが確認される。

DNA 合成阻害に必要とされる SDI-1 分子の領域（複数も可）を決定するため、CMV プロモーターから発現された様々な SDI-1 cDNA が、コード化領域の 3' 末端から漸進的に先端切除された一連のプラスミドを構築した。欠失突然変異体がキナーゼ活

10

20

30

40

50

性および／またはDNA合成を阻害する能力を、一時的発現アッセイおよびcdk2との結合アッセイを用いて評価した。

Not1でプラスミドpCMV₁を消化して、エシェリヒア・コリ - ガラクトシダーゼ遺伝子を除去することにより、プラスミドを構築した。この部位をクレノウにより平滑にし、Spe1リーンカーを挿入することによりpCMVSpelを作製した。完全長SDI-1 cDNAをBamHIおよびDra1で消化し、pBluescriptベクターにクローニングした。Spe1リーンカーをこのベクターのHincII部位へライゲートさせることにより、SDII cDNAのヌクレオチド1-686に関してSpe1末端が作製された[プラスミドpBSSdil(1-686)Spel]。次いで、このベクターからのSDI-1のSpe1結合フラグメントをpCMVSpelベクターへライゲートさせることにより、野生型SDI-1 cDNA配列に関する完全164アミノ酸コード化領域(配列番号2)を含むpCMVsdil(1-686)が作製された。SDI-1のカルボキシ末端先端切除バージョンをコードする一連の突然変異体を、SDI-1コード化配列内に非反復部位を有する制限酵素を用いることにより生成した。

HCA2、すなわち新生児包皮から誘導された上記の正常ヒト2倍体線維芽細胞を、突然変異分析で使用した。これらの細胞は、老化期にはいる前に80集団倍加(PD)を達成し、全実験において20-30のPDで使用された。HCA2へのトランスフェクション時にDNA合成開始阻害能力について各構築物を試験した。トランスフェクション後、抗HAモノクローナル抗体(12CA5、バブコから得られる)を用いる免疫蛍光法によりタンパク質製造について欠失構築物を試験した。

完全長SDI-1コード化領域をトランスフェクションすると、三重水素化チミジンを取り込んだ細胞のパーセンテージが90%減少した。アミノ末端71アミノ酸のみをコードする先端切除SDI-1は、S期へ入るのを遮断する場合に完全長164アミノ酸タンパク質と同程度に有効だったが、最初の52アミノ酸のみをコードするより厳密な先端切除形態は完全に不活性であった(表13)。これは、DNA合成阻害活性に関する重要な領域がアミノ酸52および71間に位置することを示している。すなわち、アミノ酸残基52-71を有するSDI-1のペプチドフラグメントは、SDI-1タンパク質のもどき体を含む。同様に、SDI-1₅₂₋₇₁の反応性側鎖基を模倣する分子は、SDI-1のもどき体を含む。またアミノ酸16-52に欠失を伴う構築物(プラスミド「1-164(16-52)」)がDNA合成阻害活性を全て失ったことが見いだされたとき、S期へ入るのを阻害する場合におけるタンパク質のアミノ末端部分の役割はさらに明確化された。

表13

SDI-1タンパク質フラグメントに存在するアミノ酸残基	対照に対するDNA合成の阻害%
1-164	88%
1-123	90%
1-82	92%
1-71	85%
1-52	0%
1-16	0%
1-164 (Δ16-52)	0%

分子のDNA合成阻害領域をさらに細かくマッピングするため、小さな内部欠失(4~6アミノ酸のみが除去され、3アミノ酸(Pro-Arg-Gly)が置換された)を、(大きな欠失構築物が示したところでは)阻害活性に必要である分子のアミノ末端部分に導入した。6アミノ酸の欠失体を、SDI-1 cDNAにおけるアミノ酸24-29、30-35、42-47、53-58および66-71のところで構築した。これらの構築物を、赤血球凝集素(HA)分子の一部分をコードするDNAと枠内融合することにより、完全長SDI-1タンパク質のC-末端に枠内赤血球凝集素(HA)標識が付された。HA標識により免疫染色用の唯一の抗原が得られ、タンパク質産物が発現されるか否かおよびそれらが細胞内のどこに位置しているかの決定が可能となった。確実に、HA標識がSDI-1のDNA合成阻害活性に干渉することのないようにするために、完全長(164アミノ酸)または先端切除(アミノ酸1-71)類をコードするcDNAを、同じくカルボキシ末端のところでHA配列に融合した。HA標識配列は、プライマー:

配列番号14: TCTAGGCCTGTACGGAAAGTG

(pCMVベクターにおけるスプライス部位)

配列番号15: TAGGAATTCACTAGTCTAAGCGTAATCTGG
AACATCGTATGGGTAGGGCTTCCTCTTGGA

を用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により導入された。これらのcDNAの阻害活性は、HA標識をもたない構築物の同活性と同じであった。別の対照構築物はアミノ酸16-52が欠失され、標識されている場合もされていない場合も阻害活性を全くもたなかつた。興味深いことに、そして成長阻害における分子のアミノ末端領域が無傷な状態であることの重要性のさらなる証拠立てにおいて、アミノ末端がHAにより標識されたcDNAは成長阻害活性を全くもつていなかつた。

次いで、欠失体を、PCRによりプラスミドpCMVsd1(1-686)HAにおけるSDI-1 cDNAのタンパク質コード化領域へ導入した。この標識によって、野生型および突然変異タンパク質が様々な構築物によりトランスフェクションされた細胞において発現されることを確認し、また突然変異タンパク質の局在性を決定することが可能となつた。

下記のプライマーセットを用いることにより、示された欠失体を導入した(表14)。

10

20

30

40

50

表14

検出されたアミノ酸	配列番号	ヌクレオチド配列
24-29	16	TTCGGCCCTCGAGGCTGAGCCGCGACTGT
	17	GCTCAGGCTCGAGGGCGAAGAGGGCGCG
30-35	18	TTAGCGCGCTCGAGGCTGCTCGCTGTOCAC
	19	CGAGCAGCTCGAGGGCGCGCTAATGGCGGGCG
42-47	20	GGCTGCGCTCGAGGCGCGATGGAACCTCGAC
	21	CCATCGGCTCGAGGGCAGCCCGOCATTAG
49-53	22	CGTGAGCGACCCCGGGCGTCACCGAGACACCACTG
	23	CTGGTGACGCCCGGGCTGCTCAOGGGCGCTCTG
53-58	24	TTCGACCCCTCGAGGCTGGAGGGTGACTTC
	25	CTCCAGGCCTCGAGGGTCAAGTTCCATCG
58-61	26	ACCGAGACATCCCGGGCGACTTCGCGCTGGGAGCGT
	27	GGCGAAGTCGGCCCGGGATGTCTCGGTGACAAAGTC
61-66	28	CCACTGGAGCCCCGGGCGGTGTGGGGCGCTGGC
	29	CGGCACACGGCCCGGGGCTCAGTGGTGTCTGGT
66-71	30	GGCTGGCTCGAGGCGGGCTGCGCAAGCTC
	31	CAGGCGCGCTCGAGGCCAGGCGAAGTCACC
72-77	32	GGGGGCGCTTCCCCGGGCGCTTCCACGGGCGCGCGAGG
	33	CGTGGGAAGGCGCCCGGGGAAGGCGCGCACACGCTCCAG

10

20

30

各プライマーをベクター内でハイブリダイゼーションするプライマーと共に用いることにより、SDI-1プラスミドの一部分を増幅し、2つの反応からの増幅物質をプールし、アニーリングを行わせた。1本鎖領域をポリメラーゼと共に充填し、次いでフラグメントと一緒にライゲートさせることにより、所望の共有結合性閉環状ベクターが製造された。配列番号26-27を用いて、SDI-1アミノ酸58-61をトリペプチド「Ser-Arg-Ala」により置換した。すなわち、先端切除構築物は、アミノ酸123、82、71、52および16までのタンパク質のアミノ末端を各々コードした。全構築物について配列決定することにより、所望の欠失が為されたこと、HA標識の完全性が無傷であることを証明し、追加の突然変異が構築物へ全く導入されなかったことを確認した。

HCA2およびMDAHO41細胞を、リン酸カルシウム沈澱を用いてpCMV-galおよび上記SDI-1突然変異DNAをもつプラスミドと共にトランスフェクションした。MDAHO41セルラインはリィ-フロウメニ症候群患者から誘導されたもので、フレームシフト突然変異がp53分子のアミノ末端領域において時期尚早の終止を誘発することからp53を合成しない。MDAHO41は、検出可能なレベルのSDI-1を発現しないため、これらのトランスフェクションに関して特に適した細胞であった。従って、それらは、これらの極微検出された欠失突然変異構築物の場合に予想され得るDNA合成阻害活性における小さな変化についてより感度の高いアッセイを提供した。

1 μCi/mlの三重水素化チミジンを、トランスフェクションの24時間後に培養培地に加え、細胞をさらに36時間インキュベーションした。細胞を固定し、-ガラクトシダーゼ活性について染色し、オートラジオグラフィーにかけることにより、DNAを合成

40

50

した - ガラクトシダーゼ陽性細胞のパーセンテージを測定した。pCMVベクターおよびpCMVB-galにより共トランスフェクションした対照細胞に対して阻害パーセントを測定した。

アミノ酸 53 - 58 の欠失は、DNA合成阻害活性の最大の喪失（完全長 cDNA の場合の約 50 % である）をもたらすことが見いだされた。また、2 つの他の欠失（配列番号 2 のアミノ酸 42 - 47 およびアミノ酸 66 - 71 の）は、範囲はより小さいが、活性の減少を誘発した。大量のDNAがトランスフェクションされると、実際に極微阻害性である特定構築物がより大きな阻害性を呈し得るという可能性が存在するため、プラスミドDNAの量を 1 トランスフェクション当たり 200 ng に低減させた。この低減量のDNAを用いるトランスフェクション実験の結果から、配列番号 2 のアミノ酸 42 - 47 および 66 - 71 の欠失は実際に阻害活性の喪失をもたらし、そして配列番号 2 のアミノ酸 53 - 58 の欠失はDNA合成阻害能力の顕著な喪失をもたらすことが確認された。欠失 24 - 29、30 - 35 は、両DNA濃度での野生型の場合と類似した活性を有していた。これらの結果は、SDI-1 のタンパク質産物の重要な領域がアミノ酸 42 および 71 間に存在しなければならないことを示す。従って、それらは、配列番号 2₄₂₋₇₁ の配列を有するペプチドおよび配列番号 2₄₂₋₇₁ の反応性側鎖基を模倣する非ペプチド分子が SDI-1 のもどき体を構成するという結論を裏付ける。特に、好ましいもどき体は配列番号 2₄₉₋₇₇ のアミノ酸配列を有する。特に好ましいペプチドもどき体は、配列：WNDFXXXXPLEGXXXW XXVXXXXLPXXY（配列番号 34）を有する。上記もどき体は、上記方法および下記配列を有するプライマーを用いて形成され得る。

配列番号 35 : CAGAACATCACAAAGCCACTCGAGGGTAAG
TACGAGTGGGAGCGTGTGCGGGGCCTT

10

20

配列番号 36 : CTTACCCTCGAGTGGCTTGTGATT
CTGAAAGTCGAAGTTCCATCGCTC

好ましい非ペプチドもどき体は、配列番号 34 の反応性側鎖基を模倣する残基を有する。これらの突然変異体により誘発されるDNA合成阻害が cdk キナーゼの阻害を通して行われているか否かを決定するため、精製 cdk 2 タンパク質とインビトロ翻訳欠失突然変異タンパク質の結合を調べた。すなわち、SDI-1 の様々な欠失突然変異体は、T7 RNA ポリメラーゼ用の転写録型として pBluescript に基づくプラスミドを用いることにより網状赤血球リゼイト（プロメガ）中で翻訳された。インビトロ結合の場合、45 μl の翻訳産物を、バキュロウイルス発現系から精製された 1 μg の cdk 2 タンパク質を含む 500 μl 結合緩衝液（50 ミリモルのトリス / HCl、pH 7.5、120 ミリモルの NaCl、2 ミリモルの EDTA、0.1% NP-40、1 ミリモルの NaF、0.1 ミリモルのナトリウムバニデート、5 μg / ml のロイペプチド、5 μg / ml の大豆トリプシン阻害因子、5 μg / ml のアブロチニン）に加えた。混合物を 4 度 1 時間静かに振動させ、次いで 7.5 μg の抗 cdk 2 ウサギポリクローナル抗体を加えた。混合を 4 度 1 時間続行した。2 時間 40 μl のプロテイン G + A ビーズとインキュベーションすることにより、免疫複合体を吸収させた。次いで、電気泳動およびオートラジオグラフィーの前にマトリックスを 0.5 ml の結合緩衝液により 3 回洗浄した。

突然変異構築物は全て、約 23 kD の分子量を有するタンパク質を製造した。タンパク質が実際に欠失した SDI-1 生成物であることを証明するため、CA5 (HA 標識配列に対するモノクローナル抗体) を用いてそれらを免疫沈降させると、どの場合も抗体の沈澱に成功した。野生型タンパク質 SDI-1 および 3 欠失体 24 - 29、30 - 35、72 - 77 は cdk 2 タンパク質と効果的に結合し、これらの構築物のDNA合成阻害活性が cdk 2 への結合の結果であることを示唆していた。対照的に、阻害活性を減らした突然変異体 42 - 47、53 - 58 および 66 - 71 は、cdk 2 と結合しなかった。

30

40

50

免疫組織化学

S D I - 1 の細胞内局在性は核であると報告されており、遺伝子のコード化領域の 3' 末端には核転座シグナルが存在すると推定される。しかしながら、上記で示されているところによると、この推定的核転座シグナルを欠く C - 末端先端切除タンパク質 (S D I - 1₁₋₇₁) は、野生型タンパク質と同じ阻害活性を有することが見いだされた (表 13) 。 M D A H 041 細胞へのトランスフェクション後に S D I - 1 の様々な欠失突然変異構築物のタンパク質産物の局在性を決定するため、 H A 標識の免疫染色を行った。

免疫染色をするため、細胞を約 50% の密集度でガラス製カバーガラスに播種し、トランスフェクション前に一夜接着させた。トランスフェクション後、細胞を 37 度 24 時間インキュベーションし、次いでリン酸緩衝食塩水 (P B S) により 2 回洗浄し、調製したばかりのホルムアルデヒド溶液 [P B S 中 4% (重量 / 容量) のパラホルムアルデヒド] に室温で 15 分間固定した。次いで、固定した細胞を P B S 中で洗浄し、室温で 10 分間 P B S 中 50 ミリモルのグリシン中でインキュベーションした。細胞を P B S により再洗浄し、室温で 10 分間 P B S 中 0.2% トリトン - X 100 でインキュベーションすることにより浸透させた。 P B S による追加洗浄後、 A B C キット (供給源) の使用説明書に従い、免疫染色を遂行した。1 次抗体 (12 C A 5) を、キットで利用可能な緩衝液中で 1 : 1000 に希釈した。

欠失されたが依然として成長阻害性のタンパク質は、核に局在していることが見いだされ、高いパーセンテージの不活性または活性の劣る突然変異タンパク質を発現する細胞は細胞質着色を呈した。これらのデータは、 c d k 結合結果に加えて、核への S D I - 1 の転座は S D I - 1 サイクリン - c d k 複合体の構成に左右されることを強く示している。

すなわち、 S D I - 1 の C 末端領域の先端切除は、配列番号 2 のアミノ酸 1 - 71 を有する S D I - 1 分子が、完全長 S D I - 1 タンパク質 (配列番号 2) とほぼ同じ D N A 合成阻害能力を呈することを示した。精巧な欠失分析は、配列番号 2 の領域 42 - 71 におけるアミノ酸がキナーゼ阻害および D N A 合成阻害の両方にとって非常に重要であることを示した。この結果はまた、配列番号 2 の領域 42 - 71 にアミノ酸の欠失を有する S D I - 1 分子が結合活性を全く呈しないことを示す結果により確認された。

免疫組織化学分析から、活性突然変異タンパク質の大部分が核に局在していることが見いだされた。対照的に、活性を欠く S D I - 1 突然変異体は、細胞質に局在していることが見いだされ、核への S D I - 1 の転座が、主として S D I - 1 タンパク質の C - 末端における核転座様配列の存在ではなく c d k - サイクリンとの複合体形成能力に左右されることを示した。キナーゼ阻害および D N A 合成阻害にとって配列番号 2 の領域 42 - 71 が重要であることから、この領域を非常に詳細に試験した。この分析は、相同領域 (配列番号 2 の 49 - 53 および 58 - 61) により、 c d k 阻害因子間に新たな阻害モチーフが与えられることを明白に示した (例えば S D I - 1 および p 27) 。

上記結果は、明らかに D N A 合成阻害に関与する領域として S D I - 1 タンパク質のアミノ末端領域をとらえている。微細なマッピング試験は、遺伝子の負の成長作用にとって非常に重大なものとしてアミノ酸 48 - 65 間の領域をとらえている。これらのデータはまた、遺伝子産物が活性阻害に関与するとき、それは細胞核に局在しており、タンパク質の不活性形態は細胞質に残存していることを立証している。この後の方の観察については、推定的核局在性シグナルがタンパク質のカルボキシ末端領域に存在することに注目すると興味深い。それにもかかわらず、このシグナル配列を排除するアミノ酸 72 - 164 の欠失により、 D N A 合成は充分に阻害され得、核において発現される。これは、何らかの他の分子 (複数も可) 、おそらくは S D I - 1 が会合するサイクリン、 c d k および P C N A の複合体が S D I - 1 タンパク質を核へ輸送することを示している。

本発明をその実施態様と結び付けて記載したが、さらに修飾が加えられ得ること、およびこの出願が、総じて本発明の原理に従い、本発明が関係する技術分野内における既知または慣例的実践の範囲内から生まれ、上記の本質的特徴に適用され得、後記請求の範囲に従う、本開示から出発したものを含め、本発明の変形、用途または適応を全て包含するものであることは言うまでもない。

配列表

- (1) 一般的情報 :
- (i) 特許出願人 : ベイラー・カレッジ・オブ・メディシンスミス、ジェームス・アール
- (iii) 発明の名称 : 老化細胞由来 D N A 合成阻害因子
- (iii) 配列の数 : 3 6
- (iv) 連絡先 :
- (A) 名宛人 : ホーレイ・アンド・サイモン
- (B) 通り : エヌ・ダブリュー、ペンシルバニア・アベニュー 1 2 2 9 番
- (C) 市 : ワシントン 10
- (D) 州 : ディー・シー
- (E) 国 : アメリカ合衆国
- (F) Z I P : 2 0 0 0 4
- (v) コンピューター解読書式 :
- (A) 媒体型 : フロッピー・ディスク
- (B) コンピューター : I B M P C コンパティブル
- (C) オペレーティング・システム : P C - D O S / M S - D O S
- (D) ソフトウェア : PatentIn Release #1 . 0、Version #1 . 2 5
- (vi) 本出願のデータ :
- (A) 出願番号 : U S 20
- (B) 出願日 :
- (C) 分類 :
- (vii) 優先権出願データ
- (A) 出願番号 : US 07 / 808,523
- (B) 出願日 : 1 9 9 1 年 1 2 月 1 6 日
- (vii) 優先権出願データ
- (A) 出願番号 : US 07 / 970,462
- (B) 出願日 : 1 9 9 2 年 1 1 月 2 日
- (vii) 優先権出願データ
- (A) 出願番号 : US 08 / 113,372 30
- (B) 出願日 : 1 9 9 3 年 8 月 3 0 日
- (vii) 優先権出願データ
- (A) 出願番号 : US 08 / 153,564
- (B) 出願日 : 1 9 9 3 年 1 1 月 1 7 日
- (vii) 優先権出願データ
- (A) 出願番号 : US 08 / 203,535
- (B) 出願日 : 1 9 9 4 年 2 月 2 5 日
- (vii) 優先権出願データ
- (A) 出願番号 : US 08 / 229,420
- (B) 出願日 : 1 9 9 4 年 4 月 1 5 日 40
- (vii) 優先権出願データ
- (A) 出願番号 : US 08 / 274,535
- (B) 出願日 : 1 9 9 4 年 7 月 1 3 日
- (viii) 弁理士 / 代理人情報 :
- (A) 氏名 : オイエルバッハ、ジェフリー・アイ
- (B) 登録番号 : 3 2 , 6 8 0
- (C) 参照 / 整理番号 : 2 2 5 - 1 0 2 - C I P 7 - P C T
- (ix) 電話連絡先情報 :
- (A) 電話番号 : (2 0 2) 3 8 3 - 7 4 5 1
- (B) ファックス番号 : (2 0 2) 3 8 3 - 6 6 1 0 50

(2) 配列番号 1 の情報 :

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 2106 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : c D N A

(iii) ハイポセティカル : N O

(iv) アンチセンス : N O

(vi) 起源 :

(A) 生物名 : 人モ・サピエンス

(B) 細胞の種類 : 老化ヒト細胞

(vii) 直接の起源 :

(A) ライブラリー名 : 老化細胞由来 c D N A ライブラリー

(B) クローン名 : S D I - 1

(xi) 配列 : 配列番号 1 :

CCTGCCGAAG	TCAGTTCCCTT	GTGGAGCCGG	AGCTGGGCGC	GGATTGCCG	AGGCACCGAG	60
GCACTCAGAG	GAGGCGCCAT	GTCAGAACCG	GCTGGGGATG	TCCGTCAGAA	CCCATGCGGC	120
AGCAAGGCCT	CCCCCGCCCT	CTTCGGCCCA	GTGGACAGCG	ACGAGCTGAG	CCGGGACTGT	180
GATGCGCTAA	TGGCGGGCTG	CATCCAGGAG	GCCCGTGAGC	GATGGAACCT	CGACTTTGTC	240
ACCGAGACAC	CACTGGAGGG	TGACTTCGCC	TGGGACCGTG	TGGGGGCCCT	TGGCCTGCC	300
AAGCTCTACC	TTCCCACGGG	GCCCCGGCGA	GGCCGGGATG	AGTTGGGAGG	AGGCAGGCGG	360
CCTGGCACCT	CACCTGCTCT	GCTGCAGGGG	ACAGCAGAGG	AAGACCATGT	GGACCTGTCA	420
CTGTCTTGT	CCCTTGTGCC	TCGCTCAGGG	GAGCAGGCTG	AAGGGTCCCC	AGGTGGACCT	480
GGAGACTCTC	AGGGTCGAAA	ACGGCGGCAG	ACCGCATGA	CAGATTCTA	CCACTCCAAA	540
CGCCGGCTGA	TCTTCTCCAA	GAGGAAGCCC	TAATCCGCC	ACAGGAAGCC	TGCAGTCCTG	600
GAAGCGCGAG	GGCCTCAAAG	GCCCCCTCTA	CATCTCTGC	CTTAGTCTCA	GTTTGTGTGT	660
CTTAATTATT	ATTTGTGT	TAATTTAAC	ACCTCCTCAT	GTACATAACCC	TGGCCGCC	720
CTGCCCCCCTA	GCCTCTGGCA	TTAGAATTAT	TTAAACAAAA	ACTAGGCAGT	TGAATGAGAG	780
GTTCCTAAGA	GTGCTGGCA	TTTTTATTTT	ATGAAATACT	ATTTAAAGCC	TCCTCATCCC	840
GTGTTCTCT	TTTCCTCTCT	CCCGGAGGTT	GGGTGGGCCG	GCTTCATGCC	AGCTACTTCC	900
TCCTCCCCAC	TTGTCCGCTG	GGTGGTACCC	TCTGGAGGGG	TGTTGGCTCT	TCCCATCGCT	960
GTCACAGGCG	GTATGAAAT	TCACCCCCCT	TCCTGGACAC	TCAGACCTGA	ATTCCTTTTC	1020
ATTTGAGAAG	TAAACAGATG	GCACTTTGAA	GGGGCCTCAC	CGAGTGGGGG	CATCATCAA	1080
AACTTTGGAG	TCCCCTCACC	TCCTCTAAGG	TTGGGCAGGG	TGACCCCTGAA	GTGAGCACAG	1140
CCTAGGGCTG	AGCTGGGGAC	CTGGTACCCCT	CCTGGCTCTT	GATACCCCCC	TCTGTCTTGT	1200
GAAGGCAGGG	GGAAAGGTGGG	GTCCTGGAGC	AGACCACCCC	GCCTGCCCTC	ATGGCCCTC	1260

TGACCTGCAC	TGGGGAGCCC	GTCTCAGTGT	TGAGCCTTTT	CCCTCTTGG	CTCCCTGTA	1320
CCCTTTGAGG	AGCCCCAGCT	ACCCCTCTTC	TCCAGCTGGG	CTCTGCAATT	CCCTCTGCT	1380
GCTGTCCCTC	CCCCTTGTCC	TTTCCCTTCA	GTACCCCTCTC	AGCTCCAGGT	GGCTCTGAGG	1440
TGCCCTGTCCC	ACCCCCACCC	CCAGCTCAAT	GGACTGGAAG	GGGAACGGAC	ACACAAGAAG	1500
AAGGGCACCC	TAGTTCTACC	TCAGGCAGCT	CAAGCAGCGA	CCGCCCCCTC	CTCTAGCTGT	1560
GGGGGTGAGG	GTCCCCATGTG	GTGGCACAGG	CCCCCTTGAG	TGGGGTTATC	TCTGTGTTAG	1620
GGGTATATGA	TGGGGGAGTA	GATCTTCTA	GGAGGGAGAC	ACTGGCCCT	CAAATCGTCC	1680
ACCGACCTTC	CTCATCCACC	CCATCCCCTCC	CCAGTTICATT	GCACTTGAT	TAGCAGCGGA	1740
ACAAGGAGTC	AGACATTTTA	AGATGGTGGC	AGTAGAGGCT	ATGGACAGGG	CATGCCACGT	1800
GGGCTCATAT	GGGGCTGGGA	GTAGTTGTCT	TTCCCTGGCAC	TAACGTTGAG	CCCCCTGGAGG	1860
CACTGAAGTG	CTTAGTGTAC	TTGGAGTATT	GGGGTCTGAC	CCCAAACACC	TTCCAGCTCC	1920
TGTAACATAC	TGGCCTGGAC	TGTTTCTCT	CGGCTCCCCA	TGTGTCTGG	TTCCCGTTTC	1980
TCCACCTAGA	CTGTAAACCT	CTCGAGGGCA	GGGACCACAC	CCTGTACTGT	TCTGTGTCTT	2040
TCACAGCTCC	TCCCACAATG	CTGATATACA	GCAGGTGCTC	AATAAACGAT	TCTTAGTGAA	2100
AAAAAA						2106

(2) 配列番号 2 の情報 :

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 164 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(iii) ハイポセティカル : NO

(iv) アンチセンス : NO

(vi) 起源 :

(A) 生物名 : ホモ・サピエンス

(B) ストレイン : S D I - 1

(vii) 直接の起源 :

(A) ライブラリー名 : 老化細胞由来 cDNA ライブラリー

(xi) 配列 : 配列番号 2 :

10

20

30

Met Ser Glu Pro Ala Gly Asp Val Arg Gln Asn Pro Cys Gly Ser Lys
 1 5 10 15

Ala Cys Arg Arg Leu Phe Gly Pro Val Asp Ser Glu Gln Leu Ser Arg
 20 25 30

Asp Cys Asp Ala Leu Met Ala Gly Cys Ile Gln Glu Ala Arg Glu Arg
 35 40 45

Trp Asn Phe Asp Phe Val Thr Glu Thr Pro Leu Glu Gly Asp Phe Ala
 50 55 60

Trp Glu Arg Val Arg Gly Leu Gly Leu Pro Lys Leu Tyr Leu Pro Thr
 65 70 75 80 10

Gly Pro Arg Arg Gly Arg Asp Glu Leu Gly Gly Arg Arg Pro Gly
 85 90 95

Thr Ser Pro Ala Leu Leu Gln Gly Thr Ala Glu Glu Asp His Val Asp
 100 105 110

Leu Ser Leu Ser Cys Thr Leu Val Pro Arg Ser Gly Glu Gln Ala Glu
 115 120 125

Gly Ser Pro Gly Gly Pro Gly Asp Ser Gln Gly Arg Lys Arg Arg Gln
 130 135 140 20

Thr Ser Met Thr Asp Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg Leu Ile Phe Ser
 145 150 155 160

Lys Arg Lys Pro

(2) 配列番号 3 の情報 :

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 19 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状 30

(ii) 配列の種類 : c D N A

(iii) ハイポセティカル : N O

(iv) アンチセンス : Y E S

(vi) 起源 :

(A) 生物名 : ホモ・サピエンス

(xi) 配列 : 配列番号 3 :

AGCCGGTTCT GACATGGCG 19

(2) 配列番号 4 の情報 :

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 12 アミノ酸 40

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(iii) ハイポセティカル : N O

(v) フラグメント型 : N 末端

(vii) 直接の起源 :

(B) クローン名 : [His] 6 リーダーペプチド

(xi) 配列 : 配列番号 4 :

Met Arg Gly Ser His His His His His Gly Ala

1 5 10 50

(2) 配列番号 5 の情報 :

- (i) 配列の特徴
- (A) 長さ : 6 9 9 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 配列の種類 : c D N A
- (iii) ハイポセティカル : N O
- (iv) アンチセンス : N O
- (vi) 起源 :

(A) 生物名 : シストソーマ・ジャポニカム

(vii) 直接の起源 :

(B) クローン名 : G S T

(xi) 配列 : 配列番号 5 :

ATGTCCTCTA TACTAGTTA TTGGAAAATT AAGGGCCTTG TGCAACCCAC TCGACTTCCTT	60
TTGGAATATC TTGAAGAAAA ATATGAAGAG CATTGTATG AGCGCGATGA AGGTGATAAA	120
TGGCGAAACA AAAAGTTGTA ATTGGGTTTG GAGTTTCCCA ATCTTCCTTA TTATATTGAT	180
GGTGATGTTA AATTAACACA GTCTATGCC ATCATACTGTT ATATAGCTGA CAAGCACAAAC	240
ATGTTGGGTG GTTGTCCAAA AGAGCGTCCA GAGATTTCAA TGCTTGAAGG AGCGGTTTG	300
GATATTAGAT ACGGTGTTTC GAGAATTGCA TATAGTAAAG ACTTTGAAAC TCTCAAAGTT	360
GATTTTCTTA GCAAGCTACC TGAAATGCTG AAAATGTTCG AAGATCGTTT ATGTCATAAA	420
ACATATTTAA ATGGTGATCA TGTAACCCAT CCTGACTTCA TGTTGTATGA CGCTCTTGAT	480
GTGTGTTTAT ACATGGACCC AATGTGCCTG GATGCGTTCC CAAAATTAGT TTGTTTTAAA	540
AAACGTATTG AAGCTATCCC ACAAAATTGAT AAGTACTTGA AATCCAGCAA GTATATAGCA	600
TGGCCCTTGC AGGGCTGGCA AGCCACGTTT GGTGGTGGCG ACCATCCTCC AAAATCGGAT	660
CTGGTTCCGC GTGGATCCCC GGGAAATCCAT CGTGACTGA	699

(2) 配列番号 6 の情報 :

- (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ : 2 3 2 アミノ酸
 - (B) 型 : アミノ酸
 - (D) トポロジー : 直鎖状
 - (ii) 配列の種類 : タンパク質
 - (iii) ハイポセティカル : N O
 - (vi) 起源 :
- (A) 生物名 : シストソーマ・ジャポニカム
- (vii) 直接の起源 :
- (B) クローン名 : G S T
- (xi) 配列 : 配列番号 6 :

(vii) 直接の起源 :

(B) クローン名 : G S T

(xi) 配列 : 配列番号 6 :

10

20

30

40

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
 20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
 35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65 70 75 80 10

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
 85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
 100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
 115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
 130 135 140 20

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205 30

Thr Phe Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
 210 215 220

Gly Ser Pro Gly Ile His Arg Asp
 225 230

(2) 配列番号 7 の情報 :

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 13 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状 40

(ii) 配列の種類 : cDNA

(iii) ハイポセティカル : NO

(iv) アンチセンス : NO

(vii) 直接の起源 :

(B) クローン名 : GST - SDI - 1 遺伝子融合体のリンクーフラグメント

(xi) 配列 : 配列番号 7 :
GGATCCCCCCC GCC 13

(2) 配列番号 8 の情報 :

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 10 塩基対 50

- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎮の数 : 一本鎮
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 配列の種類 : c D N A
- (iii) ハイポセティカル : N O
- (iv) アンチセンス : N O
- (vii) 直接の起源 :
- (B) クローン名 : GST - SDI - 1 遺伝子融合体のリンクーフラグメント
- (xi) 配列 : 配列番号 8 :

CCCTCGAGGG

10

10

- (2) 配列番号 9 の情報 :
- (i) 配列の特徴
- (A) 長さ : 7 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 配列の種類 : ペプチド
- (iii) ハイポセティカル : N O
- (v) フラグメント型 : 中間部
- (vii) 直接の起源 :
- (B) クローン名 : G S T - S D I - 1 遺伝子融合体のヒンジ領域
- (xi) 配列 : 配列番号 9 :

Pro Arg Gly Asp Pro Pro Ala

1

5

20

- (2) 配列番号 10 の情報 :
- (i) 配列の特徴
- (A) 長さ : 1 1 9 4 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎮の数 : 一本鎮
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 配列の種類 : c D N A
- (iii) ハイポセティカル : N O
- (iv) アンチセンス : N O
- (vii) 直接の起源 :
- (B) クローン名 : G S T - S D I - 1 遺伝子融合
- (xi) 配列 : 配列番号 10 :

30

ATGTCCCCCTA TACTAGGTAA TTGGAAAATT AAGGGCCTTG TGCAACCCAC TCGACTTCCTT	60
TTGGAATATC TTGAAGAAAA ATATGAAGAG CATTGTATG AGCGCGATGA AGGTGATAAA	120
TGGCGAAACA AAAAGTTGA ATTGGGTTTG GAGTTTCCCA ATCTTCCTTA TTATATTGAT	180
GGTGATGTTA AATTAACACA GTCTATGGCC ATCATACTGT ATATAGCTGA CAAGCACAAAC	240
ATGTTGGGTG GTTGTCCAAA AGAGCGTGCA GAGATTTCAA TGCTTGAAGG AGCGGTTTG	300
GATATTAGAT ACGGTGTTC GAGAAATTGCA TATAGTAAAG ACTTTGAAAC TCTCAAAGTT	360
GATTTCTTA GCAAGCTACC TGAAATGCTG AAAATGTTG AAGATCGTTT ATGTCATAAA	420
ACATATTTAA ATGGTGTATCA TGTAACCCAT CCTGACTTCGA TGTTGTATGA CGCTCTTGAT	480
GTIGTTTAT ACATGGACCC AATGTGCCTG GATGCGTTCC CAAAATTAGT TTGTTTAAA	540
AAACGTATTG AAGCTATCCC ACAAAATTGAT AAGTACTTGA AATCCAGCAA GTATATAGCA	600
TGGCCTTGC AGGGCTGGCA AGCCACGTTT GGTGGTGGCG ACCATCCTCC AAAATCGGAT	660
CTGGTTCCGC GTGGATCCCC TCGAGGGGAT CCCCCCGCCA TGTCAGAACCGGAT	720
GTCCGTCAGA ACCCATGGGG CACCAAGGCC TGCCGCCGCC TCTTGGGCC AGTGGACAGC	780
GAGCAGCTGA GCCCGGACTG TGATGCGCTA ATGGCGGGCT GCATCCAGGA GGCCCGTGAG	840
CGATGGAAC TCGACTTTGT CACCGAGACA CCACTGGAGG GTGACTTCGC CTGGAGCGT	900
GTGCGGGGCC TTGGCCTGCC CAAGCTCTAC CTTCCCACGG GGCCCCGGCG AGGCCGGGAT	960
GAGTTGGGAG GAGGCAGGGC GCCTGGCACC TCACCTGCTC TGCTGCAGGG GACAGCAGAG	1020
GAAGACCATG TGGACCTGTC ACTGTCTTGT ACCCTTGTGC CTGGCTCAGG GGAGCAGGCT	1080
GAAGGGTCCC CAGGTGGACC TGGAGACTCT CAGGGTCGAA AACGGCGCA GACCAGCATG	1140
ACAGATTTCT ACCACTCCAA ACGCCGGCTG ATCTTCTCCA AGAGGAAGCC CTAA	1194

(2) 配列番号 11 の情報 :

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 397 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(iii) 配列の種類 : タンパク質

(iii) ハイポセティカル : NO

(vii) 直接の起源 :

(B) クローン名 : GST - S D I - 1 融合タンパク質

(xi) 配列 : 配列番号 11 :

10

20

30

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

Thr Phe Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
 210 215 220

Gly Ser Pro Arg Gly Asp Pro Pro Ala Met Ser Glu Pro Ala Gly Asp
 225 230 235 240

Val Arg Gln Asn Pro Cys Gly Ser Lys Ala Cys Arg Arg Leu Phe Gly
 245 250 255

Pro Val Asp Ser Glu Gln Leu Ser Arg Asp Cys Asp Ala Leu Met Ala
 260 265 270

Gly Cys Ile Gln Glu Ala Arg Glu Arg Trp Asn Phe Asp Phe Val Thr 10
 275 280 285

Glu Thr Pro Leu Glu Gly Asp Phe Ala Trp Glu Arg Val Arg Gly Leu
 290 295 300

Gly Leu Pro Lys Leu Tyr Leu Pro Thr Gly Pro Arg Arg Gly Arg Asp
 305 310 315 320

Glu Leu Gly Gly Arg Arg Pro Gly Thr Ser Pro Ala Leu Leu Gln
 325 330 335

Gly Thr Ala Glu Glu Asp His Val Asp Leu Ser Leu Ser Cys Thr Leu
 340 345 350

Val Pro Arg Ser Gly Glu Gln Ala Glu Gly Ser Pro Gly Gly Pro Gly
 355 360 365

Asp Ser Gln Gly Arg Lys Arg Arg Gln Thr Ser Met Thr Asp Phe Tyr
 370 375 380

His Ser Lys Arg Arg Leu Ile Phe Ser Lys Arg Lys Pro
 385 390 395

(2) 配列番号 1 2 の情報 :

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 24 塩基対 30

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA

(iii) ハイポセティカル : NO

(iv) アンチセンス : NO

(vii) 直接の起源 :

(B) クローン名 : プライマー 1 2 6 1 4

(xi) 配列 : 配列番号 1 2 :

GGAGGATCCA TGTCAAGAACCGGCT 24 40

(2) 配列番号 1 3 の情報 :

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 24 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA

(iii) ハイポセティカル : NO

(iv) アンチセンス : NO

(vii) 直接の起源 : 50

(B) クローン名：プライマー 1 2 6 1 5

(xi) 配列：配列番号 1 3 :

GCAGAATTCC TGTGGCGGA TTAG

24

(2) 配列番号 1 4 の情報：

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：20 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

10

(iii) ハイポセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(vii) 直接の起源：

(B) クローン名：プライマー

(xi) 配列：配列番号 1 4 :

TCTAGGCCTG TACGGAAAGTG

20

(2) 配列番号 1 5 の情報：

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：60 塩基対

20

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(iii) ハイポセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(vii) 直接の起源：

(B) クローン名：プライマー

(xi) 配列：配列番号 1 5 :

TAGGAATTCA CTAGTCTAAG CGTAATCTGG AACATCGTAT GGGTAGGGCT TCCTCTTGGA

60

30

(2) 配列番号 1 6 の情報：

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：30 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(iii) ハイポセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

40

(vii) 直接の起源：

(B) クローン名：プライマー

(xi) 配列：配列番号 1 6 :

TTCGGCCCTC GAGGCCTGAG CCGCGACTGT

30

(2) 配列番号 1 7 の情報：

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：30 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

50

- (iii) 配列の種類: cDNA
 - (iii) ハイポセティカル: NO
 - (iv) アンチセンス: NO
 - (vii) 直接の起源:
 - (B) クローン名: プライマー
 - (xi) 配列: 配列番号 17:
- GCTCAGGCCCT CGAGGGCCGA AGAACGGCG**

30

- (2) 配列番号 18 の情報:
 - (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ: 31 塩基対
 - (B) 型: 核酸
 - (C) 鎖の数: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状
 - (ii) 配列の種類: cDNA
 - (iii) ハイポセティカル: NO
 - (iv) アンチセンス: NO
 - (vii) 直接の起源:
 - (B) クローン名: プライマー
 - (xi) 配列: 配列番号 18:
- TTAGCGCGCC TCGAGGCTGC TCGCTGTCCA C**

31

10

- (2) 配列番号 19 の情報:
 - (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ: 31 塩基対
 - (B) 型: 核酸
 - (C) 鎖の数: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状
 - (ii) 配列の種類: cDNA
 - (iii) ハイポセティカル: NO
 - (iv) アンチセンス: NO
 - (vii) 直接の起源:
 - (B) クローン名: プライマー
 - (xi) 配列: 配列番号 19:
- CGACCAAGCCCT CGAGGCCGCGC TAATGGCGGG C**

31

20

- (2) 配列番号 20 の情報:
 - (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ: 30 塩基対
 - (B) 型: 核酸
 - (C) 鎖の数: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状
 - (ii) 配列の種類: cDNA
 - (iii) ハイポセティカル: NO
 - (iv) アンチセンス: NO
 - (vii) 直接の起源:
 - (B) クローン名: プライマー
 - (xi) 配列: 配列番号 20:
- GGCTGCCCTC GAGGCCGATG GAACITCGAC**

30

30

- (2) 配列番号 21 の情報:
- (i) 配列の特徴

50

- (A) 長さ : 30 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 配列の種類 : cDNA
- (iii) ハイポセティカル : NO
- (iv) アンチセンス : NO
- (vii) 直接の起源 :
- (B) クローン名 : プライマー
- (xi) 配列 : 配列番号 21 :

CCATCGGCCT CGAGGGCAGC CGGCCATTAG

10

30

- (2) 配列番号 22 の情報 :
- (i) 配列の特徴
- (A) 長さ : 36 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 配列の種類 : cDNA
- (iii) ハイポセティカル : NO
- (iv) アンチセンス : NO
- (vii) 直接の起源 :
- (B) クローン名 : プライマー
- (xi) 配列 : 配列番号 22 :

CGTGAGCGAC CCCGGGGCGT CACCGAGACA CCACTG

20

36

- (2) 配列番号 23 の情報 :
- (i) 配列の特徴
- (A) 長さ : 36 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 配列の種類 : cDNA
- (iii) ハイポセティカル : NO
- (iv) アンチセンス : NO
- (vii) 直接の起源 :
- (B) クローン名 : プライマー
- (xi) 配列 : 配列番号 23 :

CTCGGTGACG CCCCGGGGTC GCTCACGGGC CTCCCTG

30

36

- (2) 配列番号 24 の情報 :
- (i) 配列の特徴
- (A) 長さ : 30 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 配列の種類 : cDNA
- (iii) ハイポセティカル : NO
- (iv) アンチセンス : NO
- (vii) 直接の起源 :

40

50

(B) クローン名：プライマー

(xi) 配列：配列番号 2 4 :

~~TTCGACCCCTC GAGGCCTGGA GGGTGACTTC~~

30

(2) 配列番号 2 5 の情報 :

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：30 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(iii) ハイポセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(vii) 直接の起源：

(B) クローン名：プライマー

(xi) 配列：配列番号 2 5 :

~~CTCCAGGGCT CGAGGGTCGA AGTTCCATCG~~

10

30

(2) 配列番号 2 6 の情報 :

(i) 配列の特徴

20

(A) 長さ：36 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(iii) ハイポセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(vii) 直接の起源：

(B) クローン名：プライマー

(xi) 配列：配列番号 2 6 :

~~ACCGAGACAT CCCGGGGCGA CTTCGCTGG GAGCGT~~

30

36

(2) 配列番号 2 7 の情報 :

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：36 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(iii) ハイポセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(vii) 直接の起源：

(B) クローン名：プライマー

(xi) 配列：配列番号 2 7 :

~~GGCGAAGTCG GCCCCGGATG TCTCGGTGAC AAAGTC~~

40

36

(2) 配列番号 2 8 の情報 :

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：36 塩基対

(B) 型：核酸

50

- (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：c DNA
 (iii) ハイポセティカル：NO
 (iv) アンチセンス：NO
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン名：プライマー
 (xi) 配列：配列番号 2 8：
CCACTGGAGC CCCGGGGCCG TGTGCGGGGC CTTGGC

36

- (2) 配列番号 2 9 の情報：
 (i) 配列の特徴
 (A) 長さ：36 塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：c DNA
 (iii) ハイポセティカル：NO
 (iv) アンチセンス：NO
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン名：プライマー
 (xi) 配列：配列番号 2 9：
CCGCACACGG CCCCGGGGCT CCAGTGGTGT CTGGT

10

20

36

- (2) 配列番号 3 0 の情報：
 (i) 配列の特徴
 (A) 長さ：30 塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：c DNA
 (iii) ハイポセティカル：NO
 (iv) アンチセンス：NO
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン名：プライマー
 (xi) 配列：配列番号 3 0：
GCCTGGCCTC GAGGCGGCCT GCCCAAGCTC

30

30

- (2) 配列番号 3 1 の情報：
 (i) 配列の特徴
 (A) 長さ：30 塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：c DNA
 (iii) ハイポセティカル：NO
 (iv) アンチセンス：NO
 (vii) 直接の起源：
 (B) クローン名：プライマー
 (xi) 配列：配列番号 3 1：
CAGGCCGCCT CGAGGCCAGG CGAAGTCACC

40

30

- (2) 配列番号 3 2 の情報：

50

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：41 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(iii) ハイポセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(vii) 直接の起源：

(B) クローン名：プライマー

(xi) 配列：配列番号32：

CGGGGCCTTC CCGGGGCGT TCCCCACGGGG CCCCCGGCGAG G

10

41

(2) 配列番号33の情報：

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：40 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(iii) ハイポセティカル：NO

20

(iv) アンチセンス：NO

(vii) 直接の起源：

(B) クローン名：プライマー

(xi) 配列：配列番号33：

CGTGGGAAGG CCCCCGGGAA GGCCCCGCAC ACGCTCCCAG

40

(2) 配列番号34の情報：

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：29アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

30

(ii) 配列の種類：ペプチド

(iii) ハイポセティカル：NO

(v) フラグメント型：中間部

(vii) 直接の起源：

(B) クローン名：ペプチドもどき体フラグメント

(xi) 配列：配列番号34：

Trp Asn Phe Asp Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Leu Glu Gly Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Trp Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Pro Xaa Xaa Tyr
20 25

40

(2) 配列番号35の情報：

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：54 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(iii) ハイポセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(vii) 直接の起源：

50

(B) クローン名：プライマー

(xi) 配列：配列番号 35：

CAGAATCACA AGCCACTCGA GGGTAAGTAC GAGTGGGAGC GTGTGGGGG CCTT

54

(2) 配列番号 36 の情報：

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：48 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

10

(iii) ハイポセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(vii) 直接の起源：

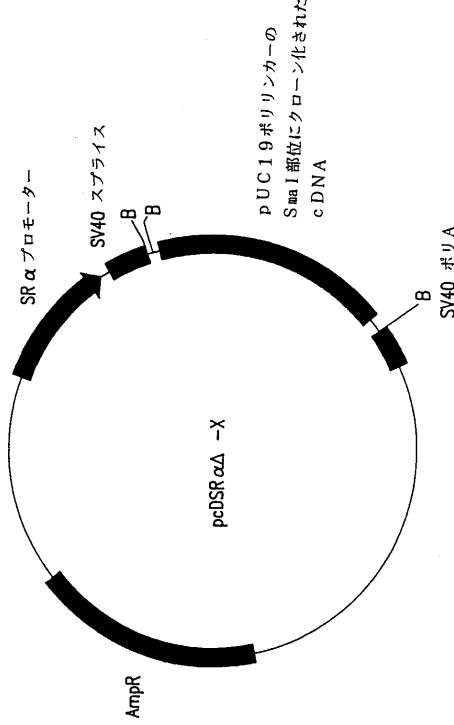
(B) クローン名：プライマー

(xi) 配列：配列番号 36：

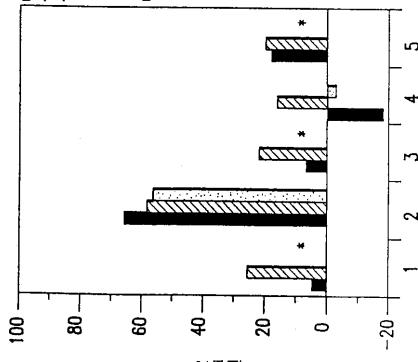
CTTACCCCTCG AGTGGCTTGT GATTCTGAAA GTCGAAGTTC CATCGCTC

48

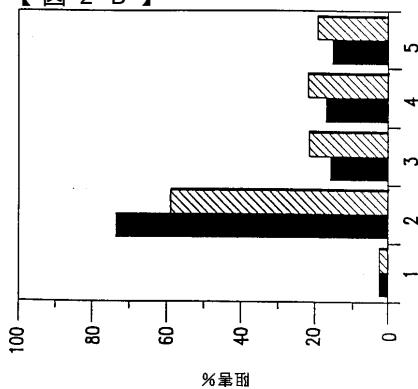
【図1】

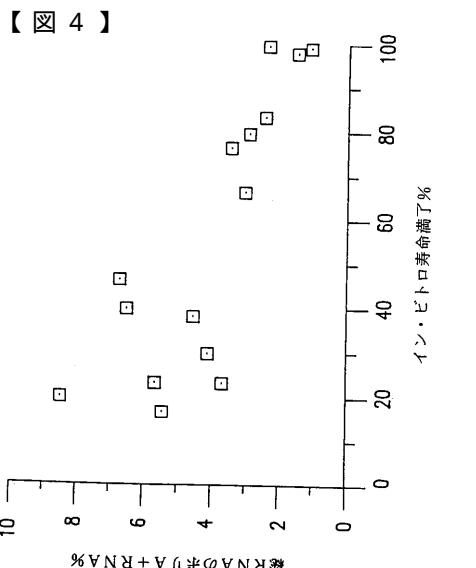
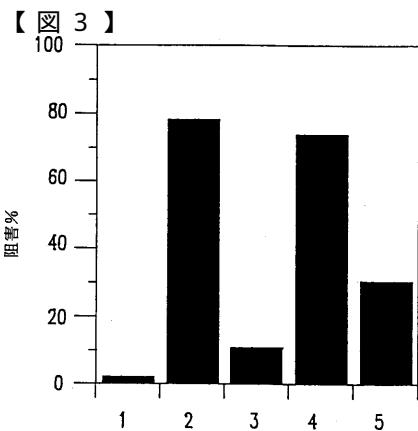
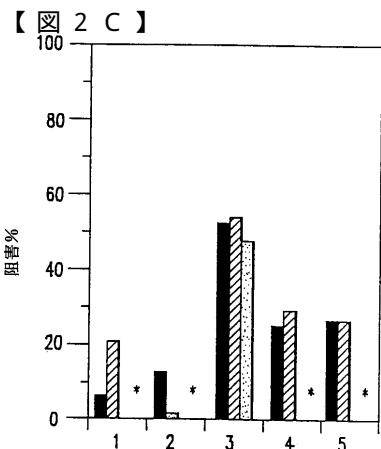


【図2 A】



【図2 B】





【図5 A】

1: cct gcc gaa gtc agt tcc ttg tgg agc cgg agc tgg gcg cgg att
 46: cgc cga ggc acc gag gca ctc aca gga ggc gcc atg tca gaa ccg
 91: gct ggg gat gtc cgt cag aac cca tgc ggc agc aag gcc tgc cgc
 136: cgc ctc ttc ggc cca gtg gac agc gag cag ctc agc cgc gac tgg
 181: gat gcg cta atg gcg ggc tgc atc cag gag gcc cgt gag cga tgg
 226: aac ttc gac ttt gtc acc gag aca cca ctc gag ggt gac ttc gcc
 271: tgg ggg cgt gtg cgg ggc ctt ggc ctc ccc aag ctc tac ctt ccc
 316: acg ggg ccc cgg cga ggc cgg gat gag ttg gga gga ggc aag cgg
 361: cct ggc acc tca cct gct ctc cgt cag ggg aca gca gag gaa gac
 406: cat gtg gac ctc tca ctc tct tgg acc ctt gtg cct cgc tca ggg

【図5 B】

451: gag cag gct gaa ggg tcc cca ggt gga cct gga gac tct cog ggt
 496: cga aca cgg cgg cag acc aca atg aca gat ttc tac cac tcc aca
 541: cgc cgg ctc atc ttc tcc aag agg aag ccc taa tcc gcc cac agg
 586: aag cct gca gtc ctc gaa ggg cgg cct cca agg ccc gct cta
 631: cat ctt ctg ctc tag tct cag ttt gtg tgt ctt aat tat tat ttg
 676: tgt ttt aat tta aac acc tcc tca tgt aca tac cct ggc cgc ccc
 721: ctc ccc ccc agc ctc tgg cat tag aat tat tta aac aaa aac tag
 766: gcg gtt gaa tga gag gtt cct aag agt gct ggg cat ttt tat ttt
 811: atg aca tac tat tta aag cct cct cat ccc gtg ttc tcc ttt tcc
 856: tct ctc ccc gag gtt ggg tgg gcc ggc ttc atg cca gct act tcc
 901: tcc tcc cca ctt gtc cgc tgg gtg gta ccc tct gga ggg gtg tgg
 946: ctc ctt ccc atc gct gtc aca ggc ggt tat gaa att cac ccc ctt
 991: tcc tgg aca ctc aca cct gaa ttc ttt tcc att tga gaa gta aac

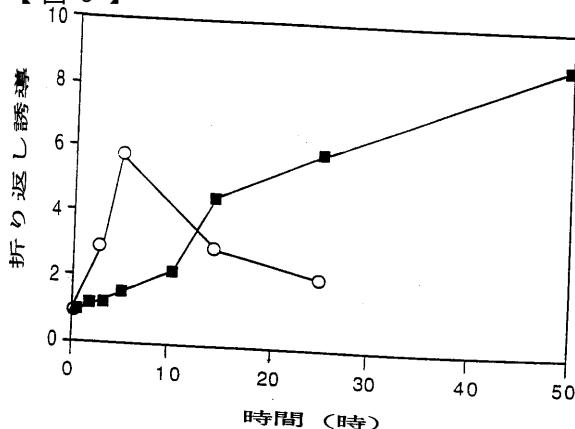
【図 5 C】

1036: aga tgg cac ttt gaa ggg gcc tca ccg aat ggg ggc atc atc aaa
 1081: aac ttt gga gtc ccc tca cct cct cta agg ttg ggc agg gtg acc
 1126: ctg aag tga gca cag cct agg gct gag ctg ggg acc tgg tac cct
 1171: cct ggc tct tga tac ccc cct ctg tct tgt gaa ggc agg ggg aag
 1216: gtg ggg tcc tgg agc aga cca ccc cgc ctg ccc tca tgg ccc ctc
 1261: tga cct gca ctg egg agc ccc tct cag tgt tga gcc ttt tcc ctc
 1306: ttt ggc tcc cct gta cct ttt gag gag ccc cag cta ccc ttc ttc
 1351: tcc agc tgg gct ctg caa ttc ccc tct gct gct gtc cct ccc cct
 1396: tgt cct ttc cct tca gta ccc tct cag ctc cag gtg gct ctg agg
 1441: tgc ctg tcc cac ccc cac ccc cag ctc aat gga ctg gaa ggg gaa
 1486: ggg aca cac aag aag aag ggc acc cta gtt cta cct cag gca gct
 1531: caa gca gcg acc gcc ccc tcc tct agc tgt ggg ggt gag ggt ccc
 1576: atg tgg tgg cac agg ccc cct tga gtg ggg tta tct ctg tgt tag
 1621: ggg tat atg atg ggg gag tag atc ttt cta gga ggg aga cac tgg
 1666: ccc ctc aaa tcg tcc agc gac ctt cct cat cca ccc cat ccc tcc

【図 5 D】

1711: cca gtt cat tgc act ttg att agc agc gga aca agg agt cag aca
 1756: ttt taa gat ggt ggc agt aga ggc tat gga cag ggc atg cca cgt
 1801: ggg ctc ata tgg ggc tag tag ttg tct ttc ctg gca cta acg
 1846: ttg agc ccc tgg agg cac tga agt gct tag tgt act tgg agt att
 1891: ggg gtc tga ccc caa aca cct tcc agc tcc tgt aac ata ctg gcc
 1936: tgg act gtt ttc tct cgg ctc ccc atg tgt cct ggt tcc cgt ttc
 1981: tcc acc tag act gta aac ctc tgg agg gca ggg acc aca ccc tgt
 2026: act gtt ctg tgt ctt tca cag ctc ctc cca caa tgc tga tat aca
 2071: gca ggt gct caa taa acg att ctt agt gaa aaa aaa

【図 6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	B
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 R	1/91	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
			C 1 2 P	21/02	C
			C 1 2 R	1:91	

- (31)優先権主張番号 08/160,814
 (32)優先日 平成6年1月3日(1994.1.3)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 08/203,535
 (32)優先日 平成6年2月25日(1994.2.25)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 08/229,420
 (32)優先日 平成6年4月15日(1994.4.15)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 08/268,439
 (32)優先日 平成6年6月30日(1994.6.30)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 08/274,535
 (32)優先日 平成6年7月13日(1994.7.13)
 (33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC 69597

- (72)発明者 野田 朝男
 兵庫県神戸市北区小倉台2-10-52
 (72)発明者 アダミ、ガイ
 アメリカ合衆国60513 1703イリノイ州ブルックフィールド、ロックフェラー・アベニュー
 -8513番

審査官 光本 美奈子

- (56)参考文献 国際公開第93/012251 (WO, A1)
 Exp Cell Res 211 p.90-98 (1994)
 Cell 75 p.817-825 (1993)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N 15/00 - 15/90
 MEDLINE(STN)