

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-505631

(P2004-505631A)

(43) 公表日 平成16年2月26日(2004.2.26)

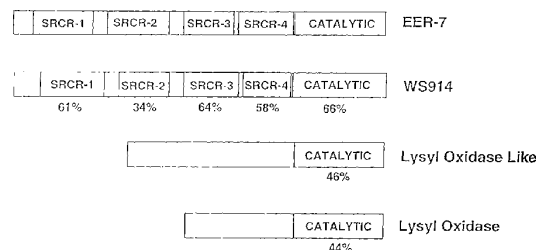
(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 5 O
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 117 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-517761 (P2002-517761)	(71) 出願人	503056919 ワイエス
(86) (22) 出願日	平成13年8月8日 (2001.8.8)		アメリカ合衆国 07940 ニュージャージー州 マディソン ファイヴ ジラルダ ファームズ
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月10日 (2003.2.10)	(74) 代理人	100112335 弁理士 藤本 英介
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/024942	(72) 発明者	エバンス マーク ジェイ. アメリカ合衆国 19087 ペンシルバニア州 ラドナー ツイン ブリッジズドライブ 617
(87) 国際公開番号	W02002/012470	(72) 発明者	スシッチタノ マーシャル エス. アメリカ合衆国 19518 ペンシルバニア州 ダグラスビル メドウクレストレーン 104
(87) 国際公開日	平成14年2月14日 (2002.2.14)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/223,763		
(32) 優先日	平成12年8月8日 (2000.8.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/255,838		
(32) 優先日	平成12年12月15日 (2000.12.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 リシルオキシダーゼ遺伝子ファミリーの新規メンバー

(57) 【要約】

本発明はE E R-7という新規リシルオキシダーゼ遺伝子に関する。本発明はタンパク質およびタンパク質をコードする核酸に関する。本発明はさらにエストロゲンレセプターとの相互作用によりE E R-7タンパク質活性を選択的に変調する化合物を同定するためのアッセイシステムに関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 で表される配列からの少なくとも 10 個の隣接するアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するか、または配列番号 2 と少なくとも 60 % の配列類似性を有する単離された E E R - 7 タンパク質であって、E E R - 7 タンパク質は (i) リシルオキシダーゼ活性を有し、(i i) 配列番号 3、4、5 および 6 からなる群から選択される配列に 80 % を超えて類似する配列を有する S R C R ドメインの 4 個のコピーを含み、(i i i) 配列番号 7 で表される配列を有するリシルオキシダーゼ酵素の保存触媒性ドメインを含む、単離された E E R - 7 タンパク質。

【請求項 2】

10

タンパク質が抗 E E R - 7 抗体と特異的結合活性を有する請求項 1 に記載の E E R - 7 タンパク質。

【請求項 3】

ヒト E E R - 7 タンパク質である請求項 1 に記載の E E R - 7 タンパク質。

【請求項 4】

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有する請求項 3 に記載の E E R - 7 タンパク質。

【請求項 5】

配列番号 1 で表される配列を有する核酸によりコードされる請求項 3 に記載の E E R - 7 タンパク質。

【請求項 6】

20

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有するヒト E E R - 7 タンパク質に少なくとも 60 % の配列同一性を有する請求項 1 に記載の E E R - 7 タンパク質。

【請求項 7】

E E R - 7 タンパク質のポリペプチドフラグメントであって、前記フラグメントが、
a) 配列番号 3、4、5 および 6 からなる群から選択される配列に 80 % を超えて類似する配列を有する S R C R ドメインの 1 から 4 個のコピーを含むことと、
b) 配列番号 7 で表される配列を有するリシルオキシダーゼ酵素の保存触媒性ドメインと、
c) 抗 E E R - 7 抗体との特異的結合活性と、
d) それらのいずれかの組み合わせと、
からなる群から選択される特性を有する E E R - 7 タンパク質のポリペプチドフラグメント。

30

【請求項 8】

請求項 1 に記載の E E R - 7 タンパク質をコードする単離された核酸。

【請求項 9】

c D N A である請求項 8 に記載の核酸。

【請求項 10】

E E R - 7 タンパク質がヒト E E R - 7 タンパク質である請求項 8 に記載の核酸。

【請求項 11】

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有する請求項 10 に記載の E E R - 7 タンパク質。 40

【請求項 12】

配列番号 1 で表されるヌクレオチド配列を含む請求項 8 に記載の核酸。

【請求項 13】

発現制御配列に機能的に作用するように結合した E E R - 7 タンパク質のフラグメントをコードする核酸を含むベクターであって、前記フラグメントが、
a) 配列番号 3、4、5 および 6 からなる群から選択される配列に 80 % を超えて類似する配列を有する S R C R ドメインの 1 から 4 個のコピーを含むことと、
b) 配列番号 7 で表される配列を有するリシルオキシダーゼ酵素の保存触媒性ドメインと、
c) 抗 E E R - 7 抗体との特異的結合活性と、

50

d) それらのいずれかの組み合わせと、
からなる群から選択される特性を有する、前記ベクター。

【請求項 14】

E E R-7 タンパク質のフラグメントが E E R-7 タンパク質全長である請求項 13 に記載のベクター。

【請求項 15】

請求項 14 に記載のベクターでトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項 16】

動物がエストロゲンに応答して検出可能なレベルで E E R-7 タンパク質を発現する、請求項 14 のベクターで形質転換されたヒト以外の動物。

10

【請求項 17】

請求項 15 に記載の宿主細胞により生成された E E R-7 タンパク質を単離することを含む E E R-7 タンパク質を生成する方法であって、ベクターにより E E R-7 タンパク質の発現のために提供される条件下で前記宿主細胞が培養される E E R-7 タンパク質を生成する方法。

【請求項 18】

配列番号 1 で表されるヌクレオチド配列を有する核酸と緊縮性 (s t r i n g e n t) の条件下でハイブリダイズする少なくとも 20 個の塩基の単離された核酸。

【請求項 19】

少なくとも 10 個のヌクレオチドが配列番号 1 で表される核酸配列からの隣接するヌクレオチドである請求項 18 に記載の核酸。

20

【請求項 20】

検出可能に標識された請求項 18 に記載の核酸。

【請求項 21】

請求項 1 に記載の E E R-7 タンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項 22】

E E R-7 タンパク質を含有することが疑われるサンプルにおいて、分子に対する請求項 21 に記載の抗体の結合を検出することを含む E E R-7 タンパク質を検出する方法であって、サンプル中に存在するいずれかの E E R-7 タンパク質と特異的に結合することが可能になる条件下で抗体をサンプルと接触させ、サンプル中の分子に対する抗体の結合が E E R-7 の存在を示す E E R-7 タンパク質を検出する方法。

30

【請求項 23】

E E R-7 の発現が疑われる細胞からのサンプル中において E E R-7 をコードする m R N A を検出することを含む E E R-7 の発現を検出する方法。

【請求項 24】

E E R-7 をコードする m R N A が E E R-7 特異的核酸にハイブリダイズすることにより検出される請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

E E R-7 特異的核酸が少なくとも 10 ヌクレオチドの長さであり、配列番号 1 の同一数の塩基の配列と同一の配列、またはその相補配列を有する請求項 24 に記載の方法。

40

【請求項 26】

異なる機能のエストロゲンレセプターを発現する形質転換細胞を含む選択的エストロゲンレセプターリガンドを同定するアッセイシステムであって、細胞数が E E R-7 をコードする m R N A の検出可能な量を転写するのに十分である前記アッセイシステム。

【請求項 27】

エストロゲンレセプターがヒトエストロゲンレセプターである請求項 26 に記載のアッセイシステム。

【請求項 28】

内皮細胞である請求項 26 に記載のアッセイシステム。

【請求項 29】

50

ヒト臍帯血管細胞である請求項 28 に記載のアッセイシステム。

【請求項 30】

エストロゲンレセプターにより E E R - 7 m R N A 転写を選択的に調節する化合物を同定する方法であって、前記方法は被験化合物と接触させた請求項 26 に記載のアッセイシステムにおいて E E R - 7 m R N A のレベルの差を検出することを含み、E E R - 7 m R N A のレベルの差が、被験化合物が選択的にエストロゲンレセプターを調節することを示す前記方法。

【請求項 31】

被験化合物がエストロゲンまたはエストロゲンアナログである請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

被験化合物がエストロゲンレセプター選択的アゴニストまたはアンタゴニストである請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

エストロゲンレセプターにより発現を調節する被験化合物と接触させると、m R N A レベルが低下する請求項 30 に記載の方法。

【請求項 34】

エストロゲンレセプターにより発現を調節する被験化合物と接触させると、m R N A レベルが上昇する請求項 30 に記載の方法。

【請求項 35】

エストロゲンレセプターがヒトエストロゲンレセプターである請求項 30 に記載の方法。

【請求項 36】

第 1 のエストロゲンレセプターが E R α である請求項 30 に記載の方法。

【請求項 37】

第 2 のエストロゲンレセプターが E R β である請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

細胞が内皮細胞である請求項 30 に記載の方法。

【請求項 39】

細胞がヒト臍帯血管細胞である請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

S R C R ドメインの 4 個のコピーが配列番号 3 から 6 で表される配列を含む請求項 7 に記載のポリペプチドフラグメント。

【請求項 41】

配列番号 7 で表されるアミノ酸配列を有するリシルオキシダーゼ酵素の触媒性ドメインに少なくとも 46 % の配列類似性を有する請求項 7 に記載のポリペプチドフラグメント。

【請求項 42】

形質転換細胞が 2 つの異なる集団を含む請求項 26 に記載のアッセイシステム。

【請求項 43】

1 つの集団が E R α エストロゲンレセプターを発現する請求項 42 に記載のアッセイシステム。

【請求項 44】

もう 1 つの集団が E R β エストロゲンレセプターを発現する請求項 43 に記載のアッセイシステム。

【請求項 45】

内因性 E E R - 7 発現が動物において抑制されるヒト以外の E E R - 7 ノックアウト動物。

【請求項 46】

E E R - 7 発現を調節するタンパク質をコードする核酸を含むベクターで形質転換されているヒト以外の動物であって、前記タンパク質は発現制御配列に機能的に作用するように結合しており、前記動物はエストロゲンに応答して検出可能なレベルで E E R - 7 タンパク質を発現するヒト以外の動物。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、リシルオキシダーゼファミリーの新規メンバーである E E R-7、タンパク質のポリペプチドフラグメント、並びに E E R-7 タンパク質およびフラグメントをコードする核酸に関する。本発明は、また、E E R-7 m R N A 転写を調節する能力に関してエストロゲンレセプター結合化合物を試験するためのアッセイシステムおよび方法にも関する。

【0002】

【従来の技術】

腹部大動脈瘤 (A A A) は米国およびその他の先進国では重要な血管症状であり、過去 30 年間に発生の累進的な増加が観察されている (M i t c h e l l ら、V a s c u l a r S u r g e r y、第 4 版、1032-1060 (1995)) (非特許文献 1 参照。)。大部分の A A A は、55 歳以上の男性に影響を与えるが、発生の着実な増加は女性にも観察されている (C o l e ら、C h r o n i c D i s . C a n a d a 15: S1-S64 (1994); K r u p s k i ら、S e m i n . V a s c . S u r g . 8: 83-167 (1995)) (非特許文献 2 および 3 参照。)。

【0003】

エラスチンおよびコラーゲン (I および I I I 型) は大動脈の主要な構造タンパク質である。これらの細繊維性タンパク質は、拍動性の動脈圧のストレスに継続的にさらされている間、大動脈壁に強度および弾性力の両方を付与する。A A A ではエラスチン濃度の低下並びに弾性薄層板が破砕および分解される組織病理学的変化を呈するので、エラスチンの損失およびその生物物理学的特性が本質的な特徴であると考えられている (C a m p a ら、A r t h e r o s c l e r o s i s 65: 13-21 (1987); W h i t e ら、J . V a s c . S u r g . 17: 371-381 (1993); H a l l o r a n ら、J . S u r g . R e s . 8: 85-92 (1995)) (非特許文献 4、5 および 6 参照。)。たいていの動脈瘤が腎臓下動脈で生じるという事実は、この領域では大動脈エラスチン含量および弾性薄層板の数が共に大動脈のさらに近位の部分よりも通常低いという事実に起因している。従って、腎臓下大動脈は、加速度的なエラスチン分解を引き起こすいずれかの過程により誘発される動脈瘤を生じやすいようである。

【0004】

リシルオキシダーゼ (L O, E . C . 1 . 4 . 3 . 13) はエラスチンおよびコラーゲンの分子ユニット間および内で、これらのタンパク質のペプチジルリシンをペプチジル α -アミノアジピック- δ -セミアルデヒドに酸化することにより共有結合性架橋を開始する。次いでペプチジルアルデヒドは隣接するアミノ基またはペプチジルアルデヒドと縮合して、細繊維性コラーゲンおよびエラスチンで見出される共有結合性架橋を形成することができる (K a g a n、B i o l o g y o f t h e E x t r a c e l l u l a r M a t r i x 321-398 (1986)) (非特許文献 7 参照。)。L O は、酵素活性の最大発現に相関する 32 k D a の精製された酵素のモルあたり 1 モルの強く結合した銅 (I I) コファクターを含む。銅コファクターは、四角形にゆがんだ、八角形に配位したリガンドフィールドで結合する (G a c h e r u ら、J . B i o l . C h e m . 265: 19022-19027 (1990)) (非特許文献 8 参照。)。409 個のアミノ酸 (46 k D a) のタンパク質をコードすると予測される c D N A の全長は、抗ウシリシルオキシダーゼ抗血清を用いて、新生児ラット大動脈 c D N A λ g t 11 発現ライブラリー内において、はじめて同定された。現在、ヒト (H a m a l a i n e n ら、G e n o m i c s 17: 544-548 (1991); M a r i a n i ら、M a t r i x 12: 242-248 (1992))、ニワトリ (W u ら、J . B i o l . C h e m . 267: 24199-24206 (1992)) およびマウス (K e n y o n ら、S c i e n c e 253: 802 (1991)) の L O c D N A は、クローン化され、配列決定され、4 個の予測される L O タンパク質配列の中で保存および分岐配列の両方の存在が示されてい

10

20

30

40

50

る（非特許文献 9、10、11 および 12 参照。）。

【0005】

予測されるリシルオキシダーゼ様（LOL）タンパク質をコードするヒト cDNA 種は、クローン化され、染色体 15q24-q25 にマッピングされている。この LOL 遺伝子の LO に対する相同性は、マウス LO 遺伝子のエクソン 1-2 境界で始まる（Kenyon ら、J. Biol. Chem. 268:18435-18437（1993））（非特許文献 13 参照。）。より最近では、予測されるタンパク質配列が LO および LOL に 48% 相同性を示す新規 cDNA が、老齢ヒト繊維芽細胞で同定されている（Saito ら、J. Biol. Chem. 272:8157-5160（1997））（非特許文献 14 参照。）。この一連の高度に相関する遺伝子の存在は、リシルオキシダーゼ遺伝子ファミリーの存在、すなわちまだ同定されるかもしれない別のメンバーの存在を意味する。しかし、これらの遺伝子の発現されたタンパク質生成物の特性および触媒機能は、結合組織の既知のリシルオキシダーゼ酵素種をコードするものに関してしか文献化されていない。最近の研究では LO 活性がエストロゲンレセプターにより変調され得ることが示されている（Ozasa ら、Endocrinology 109:618-621（1981）；Sanada ら、Biochim. Biophys. Acta. 541:408-413（1978））（非特許文献 15 および 16 参照。）。 10

【0006】

【非特許文献 1】

ミッチェル（Mitchell）ほか著、「血管外科学（Vascular Surgery）」、第 4 版、1995 年、p. 1032-1060 20

【非特許文献 2】

コウル（Cole）ほか著、「クロニック ディス（Chronic Dis.）」、（カナダ）、1994 年、15、p. S1-S64

【非特許文献 3】

クルプスキー（Krupski）ほか著、「セミナー血管外科学（Semin. Vasc. Surg.）」、1995 年、8、p. 83-167

【非特許文献 4】

キャンパ（Campa）ほか著、「関節硬化症（Arthrosclerosis）」、1987 年、65、p. 13-21 30

【非特許文献 5】

ホワイト（White）ほか著、「定期刊行物血管外科学（J. Vasc. Surg.）」、1993 年、17、p. 371-381

【非特許文献 6】

ハロラン（Halloran）ほか著、「定期刊行物外科学研究（J. Surg. Res.）」、1995 年、8、p. 85-92

【非特許文献 7】

カガン（Kagan）著、「細胞外マトリックスの生物学（Biology of the Extracellular Matrix）」、1986 年、p. 321-398

【非特許文献 8】 40

ガチェル（Gacheru）ほか著、「定期刊行物生物化学（J. Biol. Chem.）」、1990 年、265、p. 19022-19027

【非特許文献 9】

ハマライネン（Hamalainen）ほか著、「遺伝子学（Genomics）」、1991 年、17、p. 544-548

【非特許文献 10】

マリアニ（Mariani）ほか著、「マトリックス（Matrix）」、1992 年、12、p. 242-248

【非特許文献 11】

ウー（Wu）ほか著、「定期刊行物生物化学（J. Biol. Chem.）」、1992 50

年、267、p. 24199-24206

【非特許文献12】

ケニオン (Kenyon) ほか著、「科学 (Science)」、1991年、p. 253-802

【非特許文献13】

ケニオン (Kenyon) ほか著、「定期刊行物生物化学 (J. Biol. Chem.)」、1993年、268、p. 18435-18437

【非特許文献14】

サイトウ (Saito) ほか著、「定期刊行物生物化学 (J. Biol. Chem.)」、1997年、272、p. 8157-5160

10

【非特許文献15】

オザサ (Ozasa) ほか著、「内分泌学 (Endocrinology)」、1981年、109、p. 618-621

【非特許文献16】

サナダ (Sanada) ほか著、「生化学、生物物理学、公式記録 (Biochim. Biophys. Acta.)」、1978年、541、p. 408-413

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、EER-7という新規LOタンパク質を提供する。核酸配列、タンパク質配列、核酸およびタンパク質フラグメント、オリゴヌクレオチド、ベクター、形質転換された宿主細胞、および特異的EER-7抗体もまた本発明により企図される。形質転換された宿主細胞からEER-7タンパク質を製造し、サンプル中のEER-7タンパク質を検出する方法もまた企図される。好ましい実施形態では、タンパク質は哺乳動物のものである。更なる実施形態では、タンパク質はヒトである。

20

【0008】

また別の実施形態では、リシルオキシダーゼ保存触媒性ドメインであるSRCRドメインの1から4個のコピーから成るEER-7タンパク質のポリペプチドフラグメントは、抗EER-7抗体またはいずれかのその組み合わせで特異的に認識される。

【0009】

本発明は、また、異なるエストロゲンレセプターを発現する形質転換細胞が存在し、前記細胞数がEER-7 mRNAの検出可能な量を製造するのに十分である選択的エストロゲンレセプターリガンドを同定するためのアッセイシステムも提供する。好ましい実施形態では、形質転換細胞は2つの異なる集団を含む。このアッセイシステムを用いて選択的エストロゲンレセプターリガンドを同定する方法もまた企図される。

30

【0010】

内因性EER-7発現が動物内で抑制されているヒト以外のEER-7ノックアウト動物が本発明により企図される。加えて、さらに本発明は、EER-7発現を調節するタンパク質をコードする核酸を含むベクターで形質転換されたヒト以外の動物を提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】

40

本発明は、発現がエストロゲンにより調節される新規cDNA (EER-7; 配列番号1) の発見に部分的に基づく。ヒト臍帯静脈細胞、すなわちHUVECは、ヒトER発現ベクターで形質転換された。マルチウェルプレート中の形質転換細胞は、エストロゲンまたは被験化合物と反応させ、EER-7 mRNA発現は、ノーザン分析およびリアルタイムPCRで決定した。EER-7 mRNA発現の変調はERおよびリガンドの両方に依存的である。EER-7の核酸配列は既知リシルオキシダーゼ遺伝子に相同性を示す。全ての以前に同定されたリシルオキシダーゼ触媒性ドメインは、EER-7タンパク質に存在する。EER-7タンパク質の触媒性ドメインは、ほぼアミノ酸530からほぼアミノ酸756に位置する。さらに、EER-7は、タンパク質-タンパク質相互作用において役割を果たすと提唱されているスカベンジャー・レセプター・システイン・リッチ (SRCR

50

）ドメイン（SRCR-1からSRCR-4と命名される）の4個のコピーを含む。EER-7のSRCRドメインを定義するアミノ酸は、SRCR-1：約32から約134、SRCR-2：約163から約287、SRCR-3：約311から約411、およびSRCR-4：約421から約529である。EER-7は、LO、LOL、WS914（ワーナー症候群と診断された患者から単離された新規LOLタンパク質）および別の種（例えばウサギ）からの新規EER-7タンパク質と配列同一性を共有する。配列比較により約10%から約51%の全体的な配列同一性が示される。SRCRドメインの比較によりWS914に対して約34%から約64%の配列類似性が示される。ヒトEER-7は、ヒトLOおよびLOLの触媒性ドメインと約45%の触媒ドメインの配列同一性を共有する。

10

【0012】

本発明は、また、EER-7発現に及ぼす被験化合物の影響を評価することによりERの特異的イソ体を選択的に調節する化合物を同定するためのスクリーニングアッセイも提供する。本発明のアッセイシステムは、高速大量処理スクリーニング、例えばアッセイあたり数千の化合物をスクリーニングするのに適している。

【0013】

本発明は、被験化合物と接触したときの、異なるERイソ体でトランスフェクトされた2個の細胞集団のEER-7応答を比較することを企図する。集団の応答における差異は、被験化合物が異なるERイソ体を差別的に作動または拮抗することを示している。そのような化合物は、非雌性化エストロゲン化合物などのERに基づいた治療法のための良好なリードまたは候補物質である。

20

【0014】

従って、本発明は、EER-7のフラグメント、誘導体およびアナログを含むEER-7タンパク質、オリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブを含むEER-7核酸およびEER-7調節配列、EER-7特異的抗体、並びにEER-7タンパク質または核酸、EER-7結合パートナーの存在を検出するためのこれらの物質の使用に関連する方法、およびEER-7のアゴニストおよびアンタゴニストに関するスクリーニングにおけるこれらの物質の使用に関連する方法を有利に提供する。本願の以下のセクションは、標題（太字）および副題（太字イタリック）で記載されており、本発明のこれらの3つの構成要件を包含し、明確にするために提供されるものであって、限定する目的ではない。

30

【0015】

一般的な定義

本明細書で用いる「単離された」という文言は、参照されている物質が通常見出される環境から除去されていることを意味する。従って、単離された生物学的物質は、細胞成分、すなわち物質が見出されるかまたは生成される細胞の成分、から遊離されている。核酸分子の場合、単離された核酸としては、PCR生成物、単離されたmRNA、cDNA、または制限フラグメントなどが挙げられる。別の実施形態では、単離された核酸は、好ましくはそれが見出され得る染色体から切除され、より好ましくは染色体に見出される場合、単離された核酸分子に含まれる遺伝子の上流または下流に位置する非調節、非コード領域、または他の遺伝子にもはや結合しない。さらに別の実施形態では、単離された核酸は、1個またはそれ以上のイントロンを欠く。単離された核酸酸分子としては、プラスミド、コスミド、人工染色体等に挿入された配列が挙げられる。従って、特定の実施形態では組換え核酸は単離された核酸である。単離されたタンパク質は、細胞内で結合する他のタンパク質もしくは核酸、または双方と、またはそれが膜結合タンパク質である場合、細胞膜と結合していてもよい。単離されたオルガネラ、細胞または組織は、生物内で見出される解剖学的部位から除去される。単離された物質は、精製されていてもよいが、精製されている必要はない。

40

【0016】

本明細書で用いる「精製された」という文言は、天然の物質から目標物質を入手する該天然の物質を含む無関係の物質、すなわち混入物の存在を低減または排除する条件下で単離

50

された物質を意味する。例えば、精製されたタンパク質は、好ましくは細胞内でそれが結合するタンパク質または核酸を実質的に含まない。精製された核酸分子は、好ましくは細胞内でそれが共に見出され得るタンパク質または他の無関係の核酸分子を実質的に含まない。本明細書で用いる「実質的に含まない」という文言は、物質の分析試験に関連して操作上用いられる。好ましくは実質的に混入物を含まない精製された物質は、少なくとも純度50%であり、より好ましくは少なくとも純度90%であり、より好ましくはさらに少なくとも純度99%である。クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、イムノアッセイ、組成物分析、生物学的アッセイ、および当該技術で既知の他の方法により純度を評価できる。

【0017】

精製方法は、当該技術でよく知られている。例えば沈殿、クロマトグラフィー（調製用固相クロマトグラフィー、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、および三重らせんクロマトグラフィーを含む）、超遠心およびその他の手段により核酸を精製することができる。調製用ディスクゲル電気泳動、等電点電気泳動、HPLC、逆相HPLC、ゲル濾過、イオン交換および分配クロマトグラフィー、沈殿および塩析クロマトグラフィー、抽出並びに向流分配を含むが、これらに限定されない、種々の方法によりポリペプチドおよびタンパク質を精製することができる。ある目的では、タンパク質が精製を促進する付加配列タグ、ポリヒスチジン配列、またはFLAGおよびGSTなどの抗体に特異的に結合する配列などを含むが、これらに限定されない、組換えシステムでポリペプチドを生成するのが好ましい。次いで適切な固相マトリックスでクロマトグラフィーにより宿主細胞の粗製ライゼートからポリペプチドを精製することができる。また別にタンパク質またはそれから誘導されるペプチドに対して生成された抗体を精製試薬として使用することができる。遠心、マトリックス分離（例えばナイロンウール分離）、パニングおよびその他の免疫選択技術、枯渇（例えば混入細胞の補体枯渇）、および細胞分類（例えば蛍光活性化細胞分類[FACS]）などの種々の技術により細胞を精製することができる。その他の精製方法が可能である。精製された物質は、元来それが結合していた細胞成分を約50%未満、好ましくは約75%未満、最も好ましくは約90%未満含んでいてもよい。「実質的に純粋」というのは、当該技術で既知の通常の精製技術を用いて達成できる最も高度な純度を示す。

【0018】

特定の実施形態では、「約」または「およそ」という文言は、値が規定の値または範囲の、例えば20%以内、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内であるかまたはそのように測定され得る精度に対する規定の値に関する科学的に許容できる誤差範囲内であることを意味する。また別に、特に生物学的系では、用語は規定の値の好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内の大きさの規模以内であることを意味する。

【0019】

本明細書で用いる「サンプル」とは、EER-7タンパク質またはEER-7核酸の存在に関して試験できる生物学的物質をいう。そのようなサンプルは、ヒトおよびヒト以外の動物などの動物対象から入手でき、組織、特に筋肉、生検材料、血液および血液生成物、複数の浸出液、脳脊髄液(CSF)、腹水、並びに細胞培養物から入手できる。

【0020】

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット等の実験動物、イヌおよびネコなどの家庭用動物、並びにヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマおよびウシなどの家畜が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0021】

イタリックの使用は、核酸分子を示し（例えばEER-7 cDNA、遺伝子等）、通常の文字は、ポリペプチドまたはタンパク質を示す。

【0022】

「選択的」という文言は、ERリガンドが異なるERイソ体から異なる応答を引き出す能力をいう。別の言い方をすれば、選択的ERリガンドは、ER α などの1つのERイソ体に対して強力なアゴニストでよいが、例えばER β などのもう1つのERイソ体にはあま

り作動しないか、または全く作動しない。逆に、ある化合物は、強力な E R β アゴニストであり得るが、E R α アゴニストとしては不十分である。同様に、E R リガンドは差別的に E R イソ体を拮抗し得る。本発明によれば、これらの活性を有利に詳細な分析をすることが可能になる。

【0023】

「応答を引き出す能力」という文言は、E R リガンドが E R 活性を作動または拮抗する能力をいう。

【0024】

本明細書で用いる「形質転換細胞」という文言は、エストロゲンレセプターをコードするベクターから発現される機能的なエストロゲンレセプターを発現し、E E R - 7 を発現できる修飾された宿主細胞をいう。いずれかの細胞、好ましくは哺乳動物細胞、より好ましくは内皮細胞を用いることができる。特定の実施形態では、細胞はヒト臍帯静脈細胞である。

10

【0025】

「機能的エストロゲンレセプター」は、エストロゲンまたはエストロゲンアナログに結合し、そのような結合時にシグナルを変換するレセプターである。好ましくは、E R はヒト E R (h E R)、例えば E R α または E R β である。エストロゲンレセプターは、哺乳動物、例えばヒト、ウシ、ブタおよびイヌ、並びに鳥類を含む種々の供給源に由来してよい。

【0026】

本発明の細胞は、特に E E R - 7 m R N A 発現を変調するエストロゲンレセプターリガンドのためのアッセイシステムに適している。「アッセイシステム」は、例えばマイクロウェルプレートまたはいくつかのその他の培養系でのそのような細胞の1つまたはそれ以上の集まりである。細胞に及ぼす被験化合物の影響の評価を可能にするために、単一のアッセイシステムにおける細胞数は、少なくとも最大 E E R - 7 m R N A 発現の条件下で、調節された E E R - 7 m R N A の検出可能量を発現するのに十分である。

20

【0027】

「被験化合物」は、本明細書で記載されているように、E R により E E R - 7 発現を変調するその能力に関して試験され得るエストロゲン化合物などのいずれかの分子である。

【0028】

本明細書で用いる「提供する」という文言は、本発明の化合物または医薬用組成物を動物、好ましくはヒトにいずれかの形態で供給することをいう。例えば化合物のプロドラッグの形態を対象に適用でき、次いでこれは体内で化合物に代謝される。

30

【0029】

E E R - 7

本明細書で定義される E E R - 7 タンパク質は、約 756 アミノ酸を有するポリペプチドをいう。特定の実施形態では、ヒト E E R - 7 は 740 個のアミノ酸を有する。E E R - 7 は、S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定されているように、約 82.6 キロダルトン (k D a) の分子量を有し得る。E E R - 7 遺伝子は、他の L O オキシダーゼ遺伝子と有意な相同性を有する。従って、E E R - 7 は、配列番号 2 に対して約 60 % 以上、好ましくは 80 % を超えて、より好ましくはさらに 90 % を超えて、なおさらに好ましくは 95 % を超えて全体配列同一性を有するタンパク質をいう。特定の実施形態では、E E R - 7 は、配列番号 2 に示めされているアミノ酸配列を有する。E E R - 7 は分泌リーダー配列を含有し、確認される膜貫通領域を含有しないので、E E R - 7 は分泌されたタンパク質であると提唱される。E E R - 7 は、4 個の S R C R ドメインおよび触媒性ドメインを含む。S R C R ドメインは、タンパク質を特異的細胞外標的としている。

40

【0030】

ヒト E E R - 7 タンパク質と他の種からの L O、L O L、W S 914、および E E R - 7 タンパク質との間の配列比較研究により配列類似性が 7 % から 51 % にわたる値であることが示されている (図 1 参照)。ヒト E E R - 7 タンパク質は、ヒト L O タンパク質に対

50

して全体で18%の配列類似性パーセントを共有する。LOは、SRCRドメインを含んでいないので、EER-7（配列番号7）およびLOの触媒性ドメインのみの比較は46%の配列類似性を示す（図2参照）。EER-7の触媒性ドメインはまたヒトLOLおよびWS914の触媒性ドメインに対して各々46%および66%の配列類似性を共有する。EER-7の4個のSRCRドメインの、WS914に存在するこれらのドメインとの比較により、ドメイン間で配列類似性が変化することが示される。EER-7のSRCRドメイン1、3、および4（配列番号3、4および6）はWS914の同一のドメインに対して約60%の配列類似性を共有するが、SRCR-2（配列番号5）は約34%の配列類似性を共有する。

【0031】

EER-7は、銅アミノオキシダーゼのリシルオキシダーゼ酵素クラスの他のメンバーと同様、エラスチンおよびコラーゲンのユニット間およびユニット内で架橋を開始する。EER-7のリシルオキシダーゼ酵素活性の刺激は、AAAおよび心筋梗塞の治療のための目標とすることができる。トロポエラスチンは、リシルオキシダーゼの基質であり、増強されたEER-7リシルオキシダーゼ活性によりエラスチン架橋が増加する。内部の弾性薄層板において増加したエラスチン架橋により動脈瘤の進展が防御される。増強されたEER-7リシルオキシダーゼ酵素活性は、また、コラーゲン架橋の数をも増加させ、従って血管壁の引張強さが増強され、またこれによっても動脈瘤が防御され得る。冠状血管においてプラークを被う繊維性のキャップの破裂を阻止することにより心筋梗塞を阻止することができる。増強されたキャップの引張強さはリシルオキシダーゼ活性の増強に起因し、梗塞の防止を補助し得る。加えて、LO活性の阻害は、繊維症の治療に関係があるとされている。

【0032】

EER-7フラグメント、誘導体およびアナログは、EER-7タンパク質の1つまたはそれ以上の特徴により特徴付けることができる。例えば、EER-7フラグメントは、本明細書ではEER-7ペプチドまたはポリペプチドともいい、リシルオキシダーゼタンパク質の相同性領域に対応するアミノ酸配列、特に配列番号3から7を有するフラグメントの1つを有し得る。特定の実施形態では、特異的C末端およびN末端EER-7抗体を発達させるために、2個の半分のEER-7タンパク質のうちのいずれか、または各半分の抗原性ペプチドに対して抗体を育成することができる。

【0033】

本発明のEER-7のアナログおよび誘導体は、前記に記載したEER-7と同一または相同な特徴を有する。例えば、EER-7の切断型の形態を提供することができる。そのような切断型の形態には、N末端、C末端または内部欠失を有するEER-7が含まれる。特定の実施形態では、誘導体は機能的に活性である、すなわち本発明の野生型EER-7全長に関係づけられる1つまたはそれ以上の機能的活性を呈することができる。そのような機能には、コラーゲンおよび／またはエラスチンにおける共有結合性架橋の形成に加わることが含まれる。また別に、融合タンパク質のEER-7部分が1つまたはそれ以上のEER-7の特徴を有しているEER-7キメラ融合タンパク質を調製することができる。そのような融合タンパク質としては、FLAG、ヒスチジンタグ、mycタグ、またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）などのマーカーポリペプチドとEER-7ポリペプチドとの融合が挙げられる。また別に、EER-7は、酵母α-接合因子、異種性シグナルペプチド、または発現時にEER-7にさらなる安定性を付与するペプチドなどの発現関連ペプチドと融合させることもできる。またEER-7を標識用に特有なリン酸化部位と融合することもできる。別の実施形態では、EER-7は、β-ガラクトシダーゼなどの細菌性タンパク質との融合体として発現させることもできる。

【0034】

EER-7アナログは、機能的に類似する分子、すなわち1つまたはそれ以上のEER-7機能を果たす分子を提供する置換、付加または欠失により核酸配列のコードを変化させることにより作製することができる。特定の実施形態では、EER-7のアナログはEER

10

20

30

40

50

R-7の配列保存変種である。別の実施形態では、EER-7のアナログは、機能保存変種である。さらに別の実施形態では、EER-7のアナログは、別の種のアレレ変種または相同変種である。特定の実施形態では、EER-7のヒト変種が記載される。

【0035】

EER-7誘導体としては、リン酸化EER-7、ミリスチル化EER-7、メチル化EER-7、および、それとは別に、化学的に修飾された他のEER-7タンパク質などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。EER-7誘導体としては、また、標識された変種、例えばヨウ素（または前記で示したようにリン）で放射性標識したもの；ビオチン、金属イオンと複合されたキレート基、発色体もしくは蛍光体、金コロイド、またはラテックスビーズなどの粒子などの検出可能な分子；または水溶性重合体に結合したものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0036】

EER-7の生物学的に活性な成分または複数の成分の化学的修飾により、成分または複数の成分の安定性および循環時間の増加並びに免疫原性の低減などの、ある環境下でのさらなる利点が提供され得る（米国特許第4179337号、Davisら、1979年12月18日発行を参照；点検のためにはAbuchowskiら、Enzymes as Drugs（J. S. HolcerbergおよびJ. Roberts編）1981年367-383頁参照）。概説文献では、タンパク質修飾および融合タンパク質について記載されている（Franss, Focus on Growth Factor 3: 4-10（1992）、メディスクリプト：マウントビュー・コート、フリーアン・バーネット・レーン、ロンドン N20、OLD、英国）。

【0037】

誘導体化に適した化学基を水溶性重合体の中から選択してもよい。選択された重合体は、それが結合する成分が生理的環境などの水性環境中で沈殿しないように水溶性であるべきである。好ましくは、最終生成調製物を治療用に使用するために、重合体は医薬上許容されるものであるであろう。当業者は、重合体／成分抱合体が治療上使用されるかどうか、そしてその場合望ましい用量、循環時間、タンパク質溶解に対する抵抗性、およびその他の考慮すべき点に基づいて望ましい重合体を選択できるであろう。本発明の成分または複数の成分として、これらは、本明細書で提供されるアッセイを用いて確認できる。

【0038】

水溶性重合体は、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレングリコール／プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオクソラン、ポリ-1,3,6-トリオクサン、エチレン／無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸（ホモ重合体またはランダム共重合体）およびデキストランまたはポリ（n-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモ重合体、ポリプロピレンオキサイド／エチレンオキサイド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール並びにポリビニルアルコールからなる群から選択することができる。水中の安定性によりポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドが製造において有利である。タンパク質PEG化は、インビボで半減期を増すために十分に確立された技術であり、生物学的活性を確実にする。

【0039】

EER-7のクローニングおよび発現

本発明は、EER-7の全長、または天然発生形態を含む機能的または変異体EER-7、およびいずれかの供給源、好ましくはヒトからのいずれかの抗原性フラグメントをコードする遺伝子の分析および単離を企図する。さらに評価、診断、または治療のための機能的または変異体EER-7タンパク質の発現を企図する。

【0040】

本発明によると、当該技術の技術内の通常の分子生物学、微生物学および組換えDNA技術を用いることができる。そのような技術は文献で十分に説明されている。例えば、Sambrook、FritschおよびManiatis、Molecular Cloning

ning: A Laboratory Manual (1989) 第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク (本明細書では「Sambrookら (1989)」という) ; DNA Cloning: A Practical Approach、IおよびII巻 (D. N. Glover編 (1985)) ; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait編 (1984)) ; Nucleic Acid Hybridization [B. D. Hames および S. J. Higgins編 (1985)] ; Transcription And Translation [B. D. Hames および S. J. Higgins編 (1984)] ; Animal Cell Culture [R. I. Freshney編 (1986)] ; Immobilized Cells And Enzymes [IRLプレス (1986)] ; B. Perbal、A Practical Guide To Molecular Cloning (1984) ; F. M. Ausubelら (編)、Current Protocols in Molecular Biology、ジョン・ウィレイ・アンド・サンズ・インコーポレーテッド (1994) 参照。

10

【0041】

分子生物学一定義

本明細書で用いる「DNAの増幅」とは、DNA配列の混合物内で特定のDNA配列の濃度を増加させるためのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の使用を示す。PCRの記載に関しては、Saikiら、Science 239: 487 (1988) 参照。

20

【0042】

本明細書で用いる「配列特異的オリゴヌクレオチド」とは、E E R-7 遺伝子のアレレ変種または変異体を検出するために用いることができる関連するオリゴヌクレオチドのセットをいう。

【0043】

「核酸分子」とは、リボヌクレオシド (アデノシン、グアノシン、ウリジンまたはシチジン ; 「RNA分子」) またはデオキシリボヌクレオシド (デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジンまたはデオキシシチジン ; 「DNA分子」) のリン酸エステル重合体形態、または一本鎖または二本鎖のいずれかのらせん形態のホスホロチオエートおよびチオエステルなどのいずれかのそのリン酸エステルアナログをいう。二本鎖DNA-DNA、DNA-RNAおよびRNA-RNAらせんが可能である。核酸分子、特にDNAまたはRNA分子という文言は、分子の1次および2次構造のみをいい、いずれかの特定の3次形態に限定するものではない。従って、この用語には、特に直鎖状 (例えば制限フラグメント) または環状DNA分子、プラスミドおよび染色体で見出される二本鎖DNAが含まれる。特定の二本鎖DNA分子の構造に関して論じる場合、本明細書では、転写されていないDNA鎖 (すなわちmRNAに相同な配列を有する鎖) に沿って5' から3' の方向の配列のみを与える常法に従って配列を記載できる。「組み替え型DNA分子」は、分子が生物学的に操作されているDNA分子である。

30

【0044】

「ポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド配列」は、DNAおよびRNAの一連のヌクレオチド塩基 (「ヌクレオチド」ともいう) であり、2つまたはそれ以上のヌクレオチドのいずれかの鎖を意味する。典型的にはヌクレオチド配列がタンパク質および酵素を作製するために細胞メカニズムにより用いられる情報を含む遺伝情報を担持する。これらの用語には二本または一本鎖ゲノムおよびcDNA、RNA、いずれかの合成および遺伝的に操作されたポリヌクレオチド、並びにセンスおよびアンチセンスの両方のポリヌクレオチドが含まれる (しかしながら本明細書ではセンス鎖のみを表現する)。これは一本および二本鎖分子、すなわちDNA-DNA、DNA-RNAおよびRNA-RNAハイブリッド、並びにアミノ酸バックボーンに塩基を結合させることにより形成された「タンパク質核酸分子 (PNA)」を含む。これはまた修飾された塩基、例えばチオウラシル、チオグアニンおよびフルオロウラシルなども含む。

40

50

【0045】

本明細書におけるポリヌクレオチドは、天然の調節（発現調節）配列によりフランキングされていてよい、またはプロモーター、内部リボソームエントリー部位（IRES）およびその他のリボソーム結合部位配列、エンハンサー、応答エレメント、サプレッサー、シグナル配列、ポリアデニル化配列、イントロン、5'および3'非コード領域等を含む異種の配列に結合してよい。また当該技術で既知の多くの手段により核酸を修飾することもできる。そのような修飾の非限定例としては、メチル化、「キャップ」、1つまたはそれ以上の天然発生ヌクレオチドのアナログでの置換、および、例えば非電荷結合を有するもの（例えばホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、カルバメート等）、および荷電結合（例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）を有するものなどのヌクレオチド内修飾がある。ポリヌクレオチドは、例えばタンパク質（例えばヌクレアーゼ、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーLーリジン等）、インターカレーター（例えばアクリジン、プソラレン等）、キレーター（例えば金属、放射性金属、鉄、酸化金属等）、およびアルキレーターなどの1つまたはそれ以上の付加的な共有結合部分を含有できる。ポリヌクレオチドは、メチルまたはエチルリン酸トリエステルまたはアルキルホスホラミデート結合の形成により誘導体化することができる。さらに、本明細書におけるポリヌクレオチドは、また直接的または間接的のいずれかで検出可能なシグナルを提供できる標識を用いて修飾することもできる。標識の例としては、放射性アイソトープ、蛍光分子、ビオチン等が挙げられる。

10

【0046】

「宿主細胞」という文言は、細胞による物質の製造のために、例えば細胞による遺伝子、DNAもしくはRNA配列、タンパク質または酵素の発現のために、選択され、修飾され、形質転換され、成長し、またはいずれかの方法で使用もしくは操作されるいずれかの生物のいずれかの細胞を意味する。さらに以下で記載するスクリーニングまたは別のアッセイに宿主細胞を用いることもできる。

20

【0047】

タンパク質および酵素は、遺伝コードに従ってDNAおよびRNAの指令を用いて宿主細胞において作製される。一般に特定のタンパク質または酵素のための指令を有するDNA配列は、対応するRNAの配列に「転写」される。次いでRNA配列がタンパク質または酵素を形成するアミノ酸の配列に「翻訳」される。「アミノ酸配列」は2つまたはそれ以上のアミノ酸のいずれかの鎖である。各々のアミノ酸は、ヌクレオチドの1つまたはそれ以上のトリプレットによりDNAまたはRNAにおいて表される。各トリプレットはアミノ酸に対応するコドン形成する。例えばアミノ酸リジン（Lyn）は、ヌクレオチドトリプレットもしくはコドンAAAにより、またはコдонAAGによりコードされる。（遺伝コードは、いくつかの重複性（縮合ともいう）を有し、たいていのアミノ酸が1つ以上の対応するコドン形成することを意味している。）DNAおよびRNA配列におけるヌクレオチドがタンパク質製造のために3つからなるグループで解読されるので、正確なアミノ酸で配列解読を開始することが重要であり、よって正確なトリプレットが解読される。ヌクレオチド配列がコドンにグループ分けするやり方を「読み枠」という。

30

【0048】

「コード配列」または、RNA、ポリペプチド、タンパク質または酵素などの発現タンパク質を「コード」する配列は、発現された場合、RNA、ポリペプチド、タンパク質、または酵素の生成をもたらす、すなわちヌクレオチド配列はポリペプチド、タンパク質または酵素のためのアミノ酸をコードする。タンパク質のコード配列は、開始コドン（通常ATG）および停止コドンを含む。

40

【0049】

「遺伝子」という文言は、「構造遺伝子」ともいい、1つまたはそれ以上のタンパク質または酵素の全てまたは一部を含むアミノ酸の特定の配列をコードするか、またはこれに対応するDNA配列を意味し、イントロンおよび例えば遺伝子が発現される条件に影響するプロモーター配列などの調節DNA配列、5'非翻訳領域、または3'非翻訳領域を含

50

んでいても含んでいなくてもよい。構造遺伝子ではないいくつかの遺伝子は、DNAからRNAに転写することができるが、アミノ酸配列には翻訳されない。別の遺伝子は、構造遺伝子のレギュレーターまたはDNA転写のレギュレーターとして機能し得る。

【0050】

「プロモーター配列」は、細胞においてRNAポリメラーゼを結合し、下流（3'方向）のコード配列の転写を開始することができるDNA調節領域である。本発明を定義する目的で、プロモーター配列は、転写開始部位によりその3'末端で結合し、上流（5'方向）に伸長して、バックグラウンドを超えて検出され得るレベルで転写を開始するのに必要な最低数の塩基またはエレメントを含む。プロモーター配列内に転写開始部位（便宜的には例えばヌクレアーゼS1でのマッピングにより定義される）、およびRNAポリメラーゼの結合に寄与するタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）が見出される。 10

【0051】

RNAポリメラーゼがコード配列をmRNAに転写し、次いでこれがトランススクリプティング（該コード配列がイントロンを含有する場合）され、mRNAの場合、コード配列によりコードされるタンパク質に翻訳されると、コード配列は、細胞の転写および翻訳制御配列の「制御下」にある、すなわち細胞の転写および翻訳制御配列に「機能的に作用するように結合している」。

【0052】

「発現する」または「発現」という文言は、遺伝子またはDNA配列における情報を明らかにすることを可能にすること、またはこれを引き起こすこと、例えば対応する遺伝子またはDNA配列の転写および翻訳に関する細胞機能を活性化することによりタンパク質を製造することを意味する。DNA配列は、細胞で、または細胞により発現され、タンパク質などの「発現生成物」を形成する。発現生成物自体、例えば生じたタンパク質も、また、細胞により「発現された」ということができる。発現生成物は、細胞内にある、細胞外にあるまたは分泌されるものとして特徴づけすることができる。「細胞内」という文言は、細胞内にある物を意味する。「細胞外」という文言は、細胞外にある物を意味する。物質が細胞外で有意な測定値で現れる場合、細胞上または細胞内のある場所から細胞により「分泌される」。

【0053】

「トランスフェクション」という文言は、外来の核酸の細胞への導入を意味する。「形質転換」という文言は、「外来」（すなわち外部からのまたは細胞外の）遺伝子、DNAまたはRNA配列の宿主細胞への導入を意味し、これにより宿主細胞が導入された遺伝子または配列を発現して、導入された遺伝子または配列によりコードされる望ましい物質、典型的にはタンパク質または酵素を生成する。導入された遺伝子または配列は、また「クローニングされた」または「外来の」遺伝子または配列ともいい、開始、停止、プロモーター、シグナル、分泌、または細胞の遺伝メカニズムにより用いられる他の配列などの調節もしくは制御配列を含んでいてもよい。遺伝子または配列は、非機能的配列または未知の機能を有する配列を含んでいてもよい。導入されたDNAまたはRNAを受け入れるかまたは発現する宿主細胞は、「形質転換されて」おり、「形質転換体」または「クローン」である。宿主細胞に導入されたDNAまたはRNAは、宿主細胞と同一の属または種の細胞、または異なる属または種の細胞を含むいずれかの供給源に由来し得る。 30 40

【0054】

「ベクター」、「クローニングベクター」および「発現ベクター」という文言は、DNAまたはRNA配列（例えば外来遺伝子）を宿主細胞に導入できるビヒクルを意味し、これにより宿主細胞を形質転換し、導入された配列の発現（例えば転写および翻訳）を促進する。ベクターにはプラスミド、ファージ、ウイルス等が含まれ、これらは以下でより詳細に論じる。

【0055】

ベクターは、典型的には伝達の役割を果たすDNAを含み、該DNAに外来DNAが挿入される。DNAの1つのセグメントをDNAの別のセグメントに挿入する一般的な方法は 50

、制限部位という特異的部位（ヌクレオチドの特異的な基）でDNAを切断する制限酵素という酵素の使用に係る。「カセット」とは、定義された制限部位でベクターに挿入できる発現生成物のためにコードするDNAコード配列またはDNAのセグメントをいう。カセット制限部位は、適切なリーディングフレームでカセットを確実に挿入できるように設計されている。一般的に、外来DNAは、ベクターDNAの1つまたはそれ以上の制限部位において挿入され、次いでベクターにより伝達性ベクターDNAと共に宿主細胞に運ばれる。発現ベクターなどの挿入されたまたは付加されたDNAを有するDNAのセグメントまたは配列は、「DNA構築物」ということができる。ベクターの共通の型は、付加的な（外来の）DNAを容易に受け入れることができ、好適な宿主細胞に容易に導入できる、一般的には二本鎖DNAの自己充足分子（self-contained molecule）である、通常細菌起源の「プラスミド」である。プラスミドベクターはしばしばコードDNAおよびプロモーターDNAを含有し、外来DNAの挿入に適した1つまたはそれ以上の制限部位を有する。コードDNAは特定のタンパク質または酵素のための特定のアミノ酸配列をコードするDNA配列である。プロモーターDNAは、コードDNAの発現を開始、調節、またはそうでなければ媒介、または制御するDNA配列である。プロモーターDNAおよびコードDNAは、同一の遺伝子または異なる遺伝子に由来してよく、同一または異なる生物に由来してよい。プラスミドおよび菌類ベクターを含む多くのベクターは、種々の真核および原核細胞宿主における複製および／または発現のために記載されている。非限定例としては、開示されたもしくは本明細書にて引用された、またはそうでなければ当該技術の技術者に既知の方法を用いる、pKKプラスミド（クロンテック）、pUCプラスミド、pETプラスミド（ノバゲン、インコーポレーティッド、マディソン、ウィスコンシン州）、pRSETまたはpREPプラスミド（インビトロゲン、サンディエゴ、カリフォルニア州）、またはpMALプラスミド（ニューイングランド・バイオラボズ、ベバリー、マサチューセッツ州）、および多くの適切な宿主細胞などがある。組換えクローニングベクターは、しばしばクローニングまたは発現のための1つまたはそれ以上の複製システムを含み、宿主における選別のための1つまたはそれ以上のマーカー、例えば抗生物質抵抗性、および1つまたはそれ以上の発現カセットを含む。

10

20

30

40

【0056】

「発現システム」という文言は、例えばベクターにより担持される外来DNAによりコードされ、宿主細胞に導入されるタンパク質を発現するための、好適な条件下での宿主細胞および適合するベクターを意味する。共通の発現システムとしては、大腸菌（E. coli）宿主細胞およびプラスミドベクター、昆虫宿主細胞およびバキュロウイルスベクター、並びに哺乳動物宿主細胞およびベクターが挙げられる。

【0057】

「異種性」という文言は天然発生ではないエレメントの組み合わせをいう。例えば、異種性DNAは、細胞において、または細胞の染色体部位において天然には見出せないDNAをいう。好ましくは、異種性DNAは、細胞に対して外来の遺伝子を含む。異種性発現調節エレメントは、エレメントが天然で機能的に作用するように結合されている遺伝子とは異なる遺伝子に機能的に作用するように結合されるようなエレメントである。本発明に関連して、EER-7遺伝子は、クローニングまたは発現のために該遺伝子が挿入されたベクターDNAに対して異種性であり、該遺伝子が発現される、そのようなベクターを含む宿主細胞、例えばHUVEC細胞に対して異種性である。

【0058】

「変異体」および「変異」という文言は、遺伝物質、例えばDNAにおけるいずれかの検出可能な変化、またはそのような変化のいずれかの過程、メカニズムまたは結果を意味する。これには、遺伝子の構造（例えばDNA配列）が変化している遺伝子変異、変異の過程から生じるいずれかの遺伝子またはDNA、並びに修飾された遺伝子またはDNA配列により発現されるいずれかの発現生成物（例えばタンパク質または酵素）などが含まれる。「変種」という文言は、修飾されたまたは変化した遺伝子、DNA配列、酵素、細胞等、すなわち変異体のいずれかの種類を示すためにも用いることができる。

50

【0059】

ポリヌクレオチド配列の「配列保存変種」は、規定のコドン位置の1つまたはそれ以上のヌクレオチドの変化がその位置においてコードされるアミノ酸の変化をもたらさない変種である。

【0060】

「機能保存変種」は、タンパク質または酵素における規定のアミノ酸残基が、ポリペプチドのコンフォメーションおよび機能全体を変えることなく、類似の特性（例えば極性、水素結合能力、酸性、塩基性、疎水性、芳香性等）を有するアミノ酸でアミノ酸置換をすることなどを含むが、これに限定されないで、変化している変種である。類似の特性を有するアミノ酸は、当該技術でよく知られている。例えばアルギニン、ヒスチジンおよびリジンは親水性アミノ酸であり、互換性がある。同様に、疎水性アミノ酸であるイソロイシンはロイシン、メチオニンまたはバリンで置換できる。このような変化によりタンパク質またはポリペプチドの見かけの分子量または等電点にはほとんどまたは全く影響しないと予測される。保存性として示されるもの以外のアミノ酸は、類似の機能の2つのタンパク質間のタンパク質またはアミノ酸配列類似性パーセントは変化し、例えば、類似性がMEGALIGNアルゴリズムに基づくクラスター法によるアラインメントスキームに従う決定で70%から99%になるようにタンパク質または酵素において変化するかもしれない。

10

「機能保存変種」は、またBLASTまたはFASTAアルゴリズムにより決定された少なくとも60%、好ましくは75%、最も好ましくは少なくとも85%、さらになお好ましくは少なくとも90%のアミノ酸同一性を有し、それが比較される元来のまたは親タンパク質または酵素と同一または実質的に類似する特性または機能を有するポリペプチドまたは酵素も含む。

20

【0061】

本明細書で用いる「相同性」という文言は、全てのその文法的形態およびスペリングの変化において、スーパーファミリーからのタンパク質（例えば免疫グロブリンスーパーファミリー）および異なる種からの相同タンパク質（例えばミオシン軽鎖等）（Reeckら、Cell 50:667（1987））などの「共通の進化の起源」を有するタンパク質間の関係をいう。そのようなタンパク質（およびそのコード遺伝子）は、類似性パーセントまたは保存位置での特異的残基またはモチーフの存在のいずれに関しても、配列類似性に反映するような配列相同性を有する。

30

【0062】

従って、「配列類似性」という文言は、全てのその文法的形態において、共通の進化起源を共有していてもいなくてもよい核酸またはタンパク質のアミノ酸間の同一性または一致の程度をいう（Reeckら、前出参照）。しかしながら、一般的な使用および本願において、「相同の」という文言は、副詞例えば「高度に」で修飾されている場合、配列類似性を意味し、共通の進化起源には関係するかもしれないか、または関係しないかもしれない。

【0063】

特定の実施形態において、BLAST、FASTA、DNAストライダー等の配列比較アルゴリズムによる決定で、DNA配列の規定の長さにわたるヌクレオチド対合が少なくとも約80%、最も好ましくは少なくとも約90または95%である場合、2個のDNA配列は「実施的に相同である」または「実質的に類似する」。そのような配列の例は、本発明の特定のEER-7遺伝子のアレレまたは種変種である。配列データバンクにおいて、または例えば特定のシステムのために定義されるような緊縮な条件下でのサザンハイブリダイゼーションにおいて利用可能な標準的なソフトウェアを用いて配列を比較することにより実質的に相同である配列が同定できる。

40

【0064】

同様に、特定の実施形態では、2個のアミノ酸配列は、80%を超えるアミノ酸が同一であるか、または約90%を超えて類似性がある（機能的に同一である）場合、「実質的に相同である」かまたは「実質的に類似である」。好ましくは、類似のまたは相同な配列は

50

、例えば G C G (ジェネティックス・コンピューター・グループ、G C G パッケージに関するプログラムマニュアル、バージョン 7、マディソン、ウィスコンシン州) パイルアッププログラム、または前記のいずれかのプログラム (B L A S T、F A S T A 等) を用いるアラインメントにより同定される。

【0065】

温度および溶液イオン強度の適切な条件下、核酸分子の一本鎖形態が他の核酸分子にアニーリングできる場合、核酸分子は、c D N A、ゲノム D N A、または R N A などのもう 1 つの核酸分子、に「ハイブリダイズできる」(S a m b r o o k ら、前出参照)。温度およびイオン強度の条件は、ハイブリダイゼーションの「緊縮性」を決定する。相同な核酸のための予備的なスクリーニングを行う場合、55℃の T_m (溶融温度) に相当する低緊縮ハイブリダイゼーション条件、例えば 5 x S S C、0.1% S D S、0.25% ミルク、およびホルムアミド含まない；または 30% ホルムアミド、5 x S S C、0.5% S D S を用いることができる。中程度の緊縮ハイブリダイゼーション条件は、より高温の T_m 、例えば 40% ホルムアミドで、5 x または 6 x S S C に相当する。高度な緊縮ハイブリダイゼーション条件は、最も高温の T_m 、例えば 50% ホルムアミド、5 x または 6 x S S C に相当する。S S C は 0.15 M N a C l、0.015 M クエン酸ナトリウム溶液である。ハイブリダイゼーションには 2 個の核酸が相補的な配列を含むことが必要とされるが、ハイブリダイゼーションの緊縮性に依存して塩基間のミスマッチも起こり得る。核酸をハイブリダイズするのに適切な緊縮性は核酸の長さ、および相補性の程度、当該技術で既知の変動値に依存する。2 個のヌクレオチド配列間の類似性または相同性の程度が大きければ大きいほど、これらの配列を有する核酸のハイブリッドのための T_m の値が大きくなる。核酸ハイブリダイゼーションの相対的な安定性 (より高温の T_m に相当する) は以下の順で低下する：R N A : R N A、D N A : R N A、D N A : D N A。100 を超える長さのヌクレオチドのハイブリッドに関しては、 T_m を算出するための等式が導き出されている (S a m b r o o k ら、前出、9.50-9.51 参照)。より短い核酸、すなわちオリゴヌクレオチドでのハイブリダイゼーションに関しては、ミスマッチの位置がより重要になり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する (S a m b r o o k ら、前出、11.7-11.8 参照)。ハイブリダイズできる核酸の最も短い長さは少なくとも約 10 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約 15 ヌクレオチドであり、より好ましくは、長さは少なくとも約 20 ヌクレオチドである。

【0066】

特定の実施形態では、「標準的なハイブリダイゼーション条件」という文言は、55℃の T_m をいい、前記で示した条件を利用する。好ましい実施形態では、 T_m は 60℃であり、より好ましい実施形態では、 T_m は 65℃である。特定の実施形態では、「高度な緊縮性」とは、0.2 x S S C 中 68℃で、50% ホルムアミドおよび 4 x S S C 中 42℃で、またはこれらの 2 つの条件のいずれかで観察されるレベルに等価なハイブリダイゼーションレベルを維持できる条件下のハイブリダイゼーションおよび／または洗浄条件をいう。

【0067】

本明細書で用いる「オリゴヌクレオチド」という文言は、遺伝子、m R N A、c D N A、またはその他の目的の核酸をコードするゲノム D N A 分子、c D N A 分子、または m R N A 分子にハイブリダイズできる、一般に少なくとも 10、好ましくは少なくとも 15、およびより好ましくは少なくとも 20 ヌクレオチド、好ましくは 100 以下のヌクレオチドの核酸をいう。オリゴヌクレオチドは、例えば³ ² P-ヌクレオチド、または、ビオチンなどの標識が共有結合したヌクレオチドで標識できる。1 つの実施形態では、標識したオリゴヌクレオチドは、プローブとして用いて核酸の存在を検出することができる。オリゴヌクレオチド (標識され得る 1 つまたは双方) は、別の実施形態では、E E R-7 の全長もしくはフラグメントのいずれかをクローニングするためか、または E E R-7 をコードする核酸の存在を検出するために P C R プライマーとして用いることができる。さらなる実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、E E R-7 D N A 分子と三重らせんを

形成できる。一般にオリゴヌクレオチドを合成的に、好ましくは核酸合成器で調製できる。従って、オリゴヌクレオチドは、チオエステル結合等の非天然リン酸エステルアナログ結合で調製することができる。

【0068】

本発明は、アンチセンス核酸（リボザイムを含む）を提供し、これを用いて本発明の E E R-7 の発現を阻害でき、特にコラーゲン架橋に及ぼす E E R-7 影響を抑制することができる。「アンチセンス核酸」は、細胞質条件下で RNA または DNA 分子の相補性塩基とハイブリダイズするときに、後者の役割を阻害する一本鎖核酸分子である。RNA がメセンジャー RNA 転写である場合、アンチセンス核酸は、逆転写体または相補性核酸に干渉する mRNA である。現在用いられる「アンチセンス」は、広く RNA-RNA 相互作用、RNA-DNA 相互作用、リボザイムおよび RNA-アーゼ H に媒介される阻害を含む。アンチセンス核酸分子は、細胞での発現のために組換え遺伝子によりコードすることができる（例えば米国特許第 5814500 号；米国特許第 5811234 号）か、また別に、合成的に調製することができる（例えば米国特許第 5780607 号）。

10

【0069】

本発明で想定される合成オリゴヌクレオチドの具体的に限定しない例としては、ホスホロチオエート、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、短鎖アルキル、またはシクロアルキル糖内結合または短鎖ヘテロ芳香性もしくはヘテロ環式糖内結合を含むオリゴヌクレオチドが挙げられる。最も好ましいのは、 $\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2$ および $\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ バックボーン（ここでリン酸ジエステルは $\text{O}-\text{PO}_2-\text{O}-\text{CH}_2$ である）を有するものである。米国特許第 5677437 号はヘテロ芳香性オリゴヌクレオチド結合について記載している。窒素リンカーまたは窒素を含む基を用いてオリゴヌクレオチド擬似物質を調製することもできる（米国特許第 5792844 号および第 5783682 号）。米国特許第 5637684 号はホスホラミデートおよびホスホロチオアミデートオリゴマー化合物について記載している。モルホリノバックボーン構造を有するオリゴヌクレオチドもまた想定されている（米国特許第 5034506 号）。他の実施形態では、ペプチド核酸（PNA）バックボーンのようなオリゴヌクレオチドのリン酸ジエステルバックボーンをポリアミドバックボーンで置換でき、塩基はポリアミドバックボーンのアザ窒素原子に直接的または間接的に結合している（Nielsen ら、Science 254:1497 (1991)）。他の合成オリゴヌクレオチドは、2' 位置で以下の 1 つを含む、置換された糖部分を含んでもよい：OH、SH、SCH₃、F、OCN、O(CH₂)_nNH₂ もしくは O(CH₂)_nCH₃（ここで n は 1 から約 10 である）；C₁ から C₁₀ 低級アルキル、置換された低級アルキル、アルカールもしくはアラルキル；Cl；Br；CN；CF₃；OCF₃；O-；S-；もしくは N-アルキル；O-、S-、もしくは N-アルケニル；SOCH₃；SO₂CH₃；ONO₂；NO₂；N₃；NH₂；ヘテロシクロアルキル；ヘテロシクロアルカール；アミノアルキルアミノ；ポリアルキルアミノ；置換されたシリル；蛍光部分；RNA 切断基；レポーター基；インターカレーター；オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善するための基；またはオリゴヌクレオチドの薬力学特性を改善するための基および類似の特性を有する別の置換体。オリゴヌクレオチドは、また、糖擬似物質、例えばペントフラノシル基の代わりにシクロブチルまたはその他の炭素環を有してもよい。アデノシン、シチジン、グアノシン、チミジンおよびウリジンとは別のイノシンなどのヌクレオチドを有するヌクレオチドユニットをオリゴヌクレオチド分子において用いてもよい。

20

30

40

【0070】

E E R-7 核酸

E E R-7 をコードする遺伝子は、ゲノム DNA であっても cDNA であっても、いずれかの供給源、特にヒト cDNA またはゲノムライブラリーから単離することができる。E E R-7 遺伝子入手する方法は、前記で記載したように（例えば Sambrook ら、前出 (1989) 参照）当該技術でよく知られている。DNA は、当該技術で既知の標準

50

的な手順によりクローン化されたDNA（例えばDNA「ライブラリー」）から得られ、好ましくは化学的合成により、cDNAクローニングにより、またはゲノムDNAのクローニングにより、タンパク質を高レベルで発現する組織から調製され、望ましい細胞から精製されたcDNAライブラリーから得られる（例えばSambrookら、前出（1989）；Glover, D. M.（編）DNA Cloning: A Practical Approach、MRLプレス・リミテッド、オックスフォード、英国、I、II巻（1985）参照）。ゲノムDNAから誘導されたクローンはコード領域に加えて、調節およびイントロンDNA領域を含んでいてもよい。cDNAから誘導されたクローンはイントロン配列を含まない。どの供給源であっても、遺伝子は遺伝子の増殖に適したベクターに分子的にクローン化されるべきである。望ましいEER-7遺伝子を含む特定のDNAフラグメントの同定は、多くの方法で達成できる。例えば以下で例示するEER-7遺伝子の一部を精製し、標識して標識されたプローブを調製でき、標識したプローブへの核酸ハイブリダイゼーションにより生じたDNAをスクリーニングすることができる（BentonおよびDavis、Science 196:180（1977）；GrunsteinおよびHogness、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72:3961（1975））。別の個体からのアレレ変種などのプローブに対して実質的に相同性を有するこれらのDNAフラグメントをハイブリダイズする。特定の実施形態では、最も高度な緊縮ハイブリダイゼーション条件を用いて相同性EER-7遺伝子を同定する。

【0071】

例えば遺伝子が本明細書で開示するEER-7タンパク質の等電性電気泳動アミノ酸組成物、部分的もしくは完全なアミノ酸配列、抗体結合活性、またはリガンド結合プロファイルを有するタンパク質をコードする場合、遺伝子の特性に基づいてさらなる選別を実施できる。従って、遺伝子の存在をその発現生成物の物理学的、化学的、免疫学的または機能的特性に基づくアッセイにより検出することができる。

【0072】

EER-7遺伝子と実質的に同一のアミノ酸配列をコードする別のDNA配列を本発明の実施において使用することができる。これらには、非限定例としてはアレレ変種、種変種、配列保存変種、および機能的変種などがある。

【0073】

アミノ酸置換体を導入してアミノ酸を特定の好ましい特性と置換することもできる。例えば、Cysは、別のCysを有するジスルフィドブリッジの可能性のある部位に導入することができるが、これらに限定されるものではない。

【0074】

本発明のEER-7誘導体およびアナログをコードする遺伝子を当該技術で既知の種々の方法により製造することができる。これらの製造をもたらす操作を遺伝子またはタンパク質レベルで行うことができる。例えば、当該技術で既知の多くの戦略のいずれかによりクローン化EER-7遺伝子配列を修飾することができる（Sambrookら、前出（1989））。（複数の）制限エンドヌクレアーゼを用いて適切な部位で配列を切断し、続いて望む場合、さらに酵素修飾し、単離、およびインビトロでライゲートすることができる。EER-7の誘導体またはアナログをコードする遺伝子の製造においては、修飾された遺伝子が、望ましい活性がコードされている遺伝子領域において、翻訳停止シグナルにより干渉されずに、EER-7遺伝子と同一の翻訳読み枠内に残っていることを確認するのに注意を払うべきである。

【0075】

加えて、EER-7コード核酸配列がインビトロまたはインビボで変異して翻訳、開始、および／もしくは終止配列を作製または破壊するか、またはコード領域で変種を作製し、および／もしくは新規制限エンドヌクレアーゼ部位を形成するかもしくは先在するものを破壊して、さらなるインビトロ修飾を促進することができる。そのような修飾を作製して制限部位を導入し、EER-7遺伝子を発現ベクターにクローニングするのを促進するこ

とができる。インビトロ位置指定変異誘発 (Hutchinson, C. ら、J. Biol. Chem. 253: 6551 (1978); ZollerおよびSmith、DNA 3: 479-488 (1984); Oliphantら、Gene 44: 177 (1986); Hutchinson, C. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83: 710 (1986))、TAB “リンカー (ファルマシア) の使用等の当該技術で既知のいずれかの変異誘発技術を用いることができるが、これらに限定されるものではない。位置指定変異誘発にはPCR技術が好ましい (Higuchi、「DNAを操作するためのPCRの使用」PCR Technology: Principles and Applications of DNA Amplification、H. Erlich編、ストックホルムプレス、第6章、61-70頁 (1989) 参照)。

10

【0076】

次いで同定および単離された遺伝子は、適切なクローニングベクターに挿入することができる。当該技術で既知の非常に多くのベクター-宿主系を使用することができる。可能なベクターとしては、プラスミドまたは修飾されたウイルスなどが挙げられるが、これらに限定されるものではなく、ベクターシステムは用いる宿主に適合しなければならない。ベクターの例としては、大腸菌 (E. coli)、ラムダ誘導体などのバクテリオファージ、またはpBR322誘導体などのプラスミドまたはpUCプラスミド誘導体、例えばpGEXベクター、pmal-c、pFLAG等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。クローニングベクターへの挿入は、例えば相補的付着末端を有するクローニングベクターにDNAフラグメントをライゲートすることにより達成できる。しかし、DNAフラグメントに用いた相補的な制限部位がクローニングベクターに存在しない場合、DNA分子の末端を酵素を用いて修飾することができる。また別に、ヌクレオチド配列 (リンカー) をDNA末端にライゲートすることにより、いずれかの望ましい部位を作ることができる。これらのライゲートされたリンカーは、制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする特異的な化学合成されたオリゴヌクレオチドを含むことができる。加えて、単純なPCRまたは重複PCRを用いてフラグメントをクローニングベクターに挿入することができる。

20

【0077】

遺伝子配列の多くのコピーを作製するように形質転換、トランスフェクション、感染、エレクトロポレーション等により組換え分子を宿主細胞に導入することができる。好ましくは、クローン化された遺伝子は、シャトルベクタープラスミド上に含まれ、望まれる場合、これによりクローニング細胞、例えば大腸菌において伸長され、続いて適切な発現細胞系に挿入するための精製が容易になる。例えば、1を超える生物で複製できるベクターであるシャトルベクターは、大腸菌およびサッカロミセス・セレビジエ (Saccharomyces cerevisiae) の双方における複製のために、大腸菌プラスミドからの配列を酵母2 μ プラスミドからの配列と結合させることにより調製できる。

30

【0078】

EE R-7 調節核酸

EE R-7 開始部位の上流のヒトゲノム領域をスキヤニングすることにより、例えば欠失変異体を作製し、発現を検査することにより、またはTRANSFACアルゴリズムでEE R-7 プロモーターのエLEMENTを同定することができる。約6から約10キロ塩基 (kb) まで、またはEE R-7 開始部位からさらに上流の配列が組織特異的制御ELEMENTを含有できる。

40

【0079】

「EE R-7 プロモーター」という文言は、人工プロモーターを包含する。そのようなプロモーターは、EE R-7 プロモーターの上流の領域からの非必須の介在配列を欠失することにより、またはEE R-7 プロモーターから上流の制御ELEMENTをCMV即時型プロモーターなどの異種性最小プロモーターと結合することにより調製することができる。

【0080】

EE R-7 プロモーターは、例えば構築物におけるレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼお

50

よび緑色蛍光タンパク質はレポーター遺伝子の例である)のための異種性コード配列と機能的に作用するように結合させることができる。この構築物は、E E R-7プロモーターの制御下で異種性コード配列の発現をもたらし、例えば通常の条件下でE E R-7発現を誘発する条件下でレポーター遺伝子を発現することができる。この構築物を以下に記載する、エストロゲンレセプターアゴニストおよびアンタゴニストのためのスクリーニングアッセイにおいて使用することができる。

【0081】

E E R-7ポリペプチドの発現

E E R-7、またはその抗原性フラグメント、誘導体もしくはアナログ、またはキメラタンパク質を含むその機能的に活性な誘導体をコードするヌクレオチド配列は、適切な発現ベクター、すなわち挿入されたタンパク質コード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含有するベクターに挿入することができる。従って、本発明のE E R-7をコードする核酸は、本発明の発現ベクターのプロモーターと機能的に作用するように結合させることができる。c D N Aおよびゲノム配列の双方は、クローン化され、そのような調節配列の制御下で発現させることができる。そのようなベクターを用いて機能的なまたは機能的に不活性化されたE E R-7ポリペプチドを発現することができる。

10

【0082】

必要な転写および翻訳シグナルは、組換え発現ベクター上に提供されるか、またはこれらはE E R-7をコードする元来の遺伝子および/またはそのフランキング領域により供給される。

20

【0083】

可能性のある宿主-ベクター系としては、発現プラスミドでトランスフェクトされたか、またはウイルス(例えばワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス等)で感染された哺乳動物細胞系;ウイルス(例えばバキュロウイルス)で感染された昆虫細胞系;酵母ベクターを含む酵母などの微生物;またはバクテリオファージ、D N A、プラスミドD N A、もしくはコスミドD N Aで形質転換された細菌などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。ベクターの発現エレメントは、その長さおよび特異性において変化する。利用する宿主-ベクター系に依存して、多くの適切な転写および翻訳エレメントのいずれか1つを使用することができる。

【0084】

E E R-7タンパク質の発現は、当該技術で知られているいずれかのプロモーター/エンハンサーエレメントにより制御されるが、これらの調節エレメントは発現のために選択された宿主において機能的でなければならない。E E R-7遺伝子発現を制御するために用いることができるプロモーターとしては、サイトメガロウイルス(C M V)プロモーター(米国特許第5385839号および第5168062号)、S V 40初期プロモーター領域(BenoistおよびChambon, Nature 290:304-310(1981))、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含まれているプロモーター(Yamamotoら, Cell 22:787-797(1980))、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78:1441-1445(1981))、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinsterら, Nature 296:39-42(1982)); β -ラクタマーゼプロモーターなどの原核細胞発現ベクター(Villa-Komaroffら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75:3727-3731(1978))、またはtacプロモーター(DeBoerら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:21-25(1983));また「組換え細菌からの有用なタンパク質」Scientific American 242:74-94(1980)参照;Gal4プロモーターなどの酵母またはその他の菌類からのプロモーターエレメント;ADC(アルコールデヒドロゲナーゼ)プロモーター、PGK(ホスフォグリセロールキナーゼ)プロモーター、アルカリ性ホスファターゼプロモーター;および組織特異性を呈する転写制御領域、特に内皮細胞特異的プロモーターなどが挙げられるが、これらに

30

40

50

限定されるものではない。

【0085】

また別に、タンパク質発現は、転写アクチベーターを提供することにより制御することができる（米国特許第6015709号参照）。アクチベーターを用いて天然発生、またはそうでなければ遺伝的に組み込まれた遺伝子から高レベル転写を誘導することができる。本発明のキメラアクチベーターは、組み込まれた単一のコピー遺伝子の転写を活性化するのに特に有用であり、これは過去には適切なレベルで成功裏にトランス活性化されなかった。

【0086】

タンパク質の可溶性形態は、培養液を収集することによりまたは封入体を可溶化することにより、例えば前記に記載したように界面活性剤で、望まれる場合、超音波処理またはその他の機械的な方法で処理することにより得ることができる。可溶化されたまたは可溶性タンパク質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）、等電点電気泳動、2次元ゲル電気泳動、クロマトグラフィー（例えばイオン交換、アフィニティ、イムノアフィニティ、およびサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、分別溶解性、免疫沈澱を用いて、またはタンパク質の精製のためのいずれかの他の標準的な技術などの種々の技術により単離することができる。

【0087】

ベクター

本発明のDNA配列を発現させるのに広範な宿主／発現ベクターの組み合わせを用いることができる。有用な発現ベクターは例えば染色体、非染色体および合成DNA配列のセグメントから構成されていてよい。適切なベクターとしては、SV40の誘導体および既知の細菌プラスミド、例えば大腸菌プラスミドcolE1、pCR1、pBR322、pMal-C2、pET、pGEX（Smithら、Gene 67:31-40（1988））、pMB9およびその誘導体、RP4などのプラスミド；ファージDNA、例えばファージ1の多くの誘導体、例えばNM989、およびその他のファージDNA、例えばM13および繊維性一本鎖ファージDNA；2μプラスミドまたはその誘導体などの酵母プラスミド；昆虫または哺乳動物細胞において有用なベクターなどの真核細胞で有用なベクター；プラスミドおよびファージDNAの組み合わせから誘導されるベクター、ファージDNAまたはその他の発現制御配列を用いるように修飾されているプラスミド；等が挙げられる。

【0088】

レンチウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシナウイルス、アルファウイルス、バキュロウイルスおよび望ましい細胞親和性を有するその他の組換えウイルスなどのウイルスベクター。従って、その機能的または変異体EER-7タンパク質またはポリペプチドドメインフラグメントをコードする遺伝子は、インビボ、エクソビボ、またはインビトロでウイルスベクターを用いて、またはDNAの直接導入により導入できる。標的にされた組織における発現は、ウイルスベクターまたはレセプターリガンドなどのトランスジェニックベクターを特異的細胞に対して標的にすることにより、または組織特異的プロモーターを用いることにより、またはその双方により行うことができる。目的の遺伝子運搬（delivery）については、1995年10月に公開された国際特許公開WO95/28494に記載されている。

【0089】

インビボまたはエクソビボでの標的化および治療手順に一般に用いられるウイルスベクターは、DNA基盤のベクターおよびレトロウイルスベクターである。ウイルスベクターを構築および使用する方法は当該技術で既知である（例えばMillerおよびRosman、BioTechniques 7:980-990（1992）参照）。好ましくは、ウイルスベクターは、複製欠損であり、すなわち目的の細胞において自発的に複製することができない。一般的に、本発明の範囲内で用いられる複製欠損ウイルスベクターのゲノムは、感染された細胞におけるウイルスの複製に必要な少なくとも1つの領域を欠いて

いる。当業者に知られているいずれかの技術によりこれらの領域を排除するかまたは非機能性を付与することができる。これらの技術には（複製に）必須の領域への1つまたはそれ以上の塩基の、完全な除去、置換（別の配列による、特に挿入された核酸による）、部分的欠失または付加などが含まれる。そのような技術は、インビトロで（単離されたDNA上に）またはインシトゥで、遺伝子操作の技術を用いてまたは変異誘発剤で処理することにより、実施することができる。好ましくは、複製欠損ウイルスは、ウイルス粒子がキャプシッドで包まれるのに必要とされるそのゲノムの配列を保持する。

【0090】

DNAウイルスベクターとしては、ヘルペスシンプレックスウイルス（HSV）、パピローマウイルス、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス（AAV）等の弱毒化または欠損DNAウイルスが挙げられるが、これらに限定されるものではない。全てまたはほとんど全てのウイルス遺伝子を欠失している欠損ウイルスが好ましい。欠損ウイルスは、細胞に導入した後、感染力をもたない。欠損ウイルスベクターを使用することにより、ベクターが他の細胞に感染し得るという懸念なしに特定の局在した部分で細胞に投与することが可能になる。従って、特定の組織は、特異的に標的にすることができる。特定のベクターの例としては、欠損ヘルペスウイルス（HSV1）ベクター（Kaplittrら、Molec. Cell. Neurosci. 2:320-330（1991））、糖タンパク質L遺伝子を欠失する欠損ヘルペスウイルスベクター（特許公開RD371005A）、またはその他の欠損ヘルペスウイルスベクター（1994年9月29日公開の国際特許公開番号WO94/21807；1994年4月2日公開の国際特許公開番号WO92/05263）；Stratford-Perrieraにより記載されたベクターなどの弱毒化されたアデノウイルスベクター（J. Clin. Invest. 90:626-630（1992）；LaSalleら、Science 259:988-990（1993）も参照）；欠損アデノ関連ウイルスベクター（Samulskiら、J. Virol. 61:3096-3101（1987）；Samulskiら、J. Virol. 63:3822-3828（1989）；Lebkowskiら、Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996（1988））；およびシンビディスウイルスベクター（PCT公開番号WO98/06237；米国特許第5091309号）などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0091】

種々の会社が商業用のウイルスベクターを製造しており、限定するものではないが、アビゲン・インコーポレーティッド（アラメダ、カリフォルニア州；AAVベクター）、セル・ジェネシーズ（フォスター・シティ、カリフォルニア州；レトロウイルス、アデノウイルス、AAVベクター、およびレンチウイルスベクター）、クロンテック（レトロウイルスおよびバキュロウイルスベクター）、ゲノボ・インコーポレーティッド（シャロン・ヒル、ペンシルバニア州；アデノウイルスおよびAAVベクター）、ゲンベック（アデノウイルスベクター）、イントロジーン（レイデン、オランダ；アデノウイルスベクター）、モレキュラー・メディスン（レトロウイルス、アデノウイルス、AAVおよびヘルペスウイルスベクター）、ノルゲン（アデノウイルスベクター）、オックスフォード・バイオメディカ（オックスフォード、英国；レンチウイルスベクター）、およびトランスジーン（ストラスボURG、フランス；アデノウイルス、ワクシナ、レトロウイルス、およびレンチウイルスベクター）などがある。

【0092】

好ましくは、インビボ投与用に、ウイルスベクター、例えばアデノウイルスベクターと共に適切な免疫抑制処置を行い、ウイルスベクターおよびトランスフェクトされた細胞の免疫不活性化を避ける。例えば、インターロイキン-12（IL-12）、インターフェロン- γ （IFN- γ ）、または抗CD4抗体などの免疫抑制性サイトカインを提供してウイルスベクターに対する体液性または細胞性免疫応答を遮断することができる（例えばWilson、Nature Medicine（1995）参照）。この点で、最低数の抗原を発現するように操作されているウイルスベクターを用いるのが有利である。

【0093】

別の実施形態では、ベクターを裸のDNAとして、または別のトランスフェクション促進物質（ペプチド、重合体等）と共にリポフェクションによりインビボで導入することができる。合成カチオン性脂質を用いてマーカーをコードする遺伝子をインビボでトランスフェクションするためのリポソームを調製することができる（Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84: 7413-7417 (1987)；FelgnerおよびRingold、Science 337: 387-388 (1989)；Mackeyら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 8027-8031 (1988) Ulmerら、Science 259: 1745-1748 (1993)）。核酸の伝達に有用な脂質化合物および組成物は、国際特許公開WO 95/18863およびWO 96/17823、および米国特許第5459127号に記載されている。標的にする目的で脂質を化学的に他の分子に結合することができる（Mackeyら、前出参照）。標的化ペプチド、例えばホルモンまたは神経伝達物質、およびタンパク質例えば抗体、または非ペプチド分子をリポソームに化学的に結合させることができる。

【0094】

核酸のインビボでのトランスフェクションを促進するための他の分子としては、例えばカチオン性オリゴペプチド（例えば国際特許公開WO 95/21931）、DNA結合タンパク質から誘導されるペプチド（例えば国際特許公開WO 96/25508）、またはカチオン性重合体（例えば国際特許公開WO 95/21931）もまた有用である。

【0095】

また別に、当該技術で既知の方法、例えばエレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈殿、遺伝子ガンの使用（バリスティックトランスフェクション；例えば米国特許第5204253号、米国特許第5853663号、米国特許第5885795号、および米国特許第5702384号並びにSanford、TIB-TECH、6: 299-302 (1988)；Fynanら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 11478-11482 (1993)；およびYangら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87: 1568-9572 (1990)参照）、またはDNAベクタートランスポーターの使用（例えばWuら、J. Biol. Chem. 267: 963-967 (1992)；WuおよびWu、J. Biol. Chem. 263: 14621-14624 (1988)；Hartmutら、1990年3月15日出願のカナダ特許出願第2012311号；Williamsら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88: 2726-2730 (1991)参照）により遺伝子治療用の非ウイルス性DNAベクターを望ましい宿主細胞に導入することができる。レセプター媒介DNA運搬法を用いることもできる（Currielら、Hum. Gene Ther. 3: 147-154 (1992)；WuおよびWu、J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)）。米国特許第5580859号および第5589466号は、哺乳動物においてトランスフェクション促進物質のない外来DNA配列の運搬について開示している。最近では、エレクトロトランスファーという、相対的に低い電圧で効率の高いインビボDNA転移技術について記載されている（Mirら、C. P. Acad. Sci. 321: 893 (1998)；WO 99/01157；WO 99/01158；WO 99/01175）。

【0096】

EE R-7結合パートナーおよび基質

本発明は、さらにEE R-7の生理学的結合パートナーおよび基質の同定を可能にする。4個のSRCRドメインの存在は、EE R-7がタンパク質-タンパク質相互作用により標的にされることを強く示している。EE R-7結合パートナーを評価し、同定するための1つの方法は、酵母2ハイブリッドスクリーニングである。好ましくは、組換えEE R-7で形質転換された酵母と共に内皮細胞ライブラリーを用いて酵母2ハイブリッドスク

リーニングを実施する。また別に、E E R-7を捕捉 (capture) または親和 (affinity) 精製試薬として用いることができる。さらにまた別に、標識 E E R-7を例えば免疫沈澱またはウェスタン分析による結合のためのプローブとして用いることができる。

【0097】

一般に、E E R-7といずれかのその結合パートナーまたは基質との結合相互作用は、細胞外マトリックスで見出される条件に近い条件、すなわち生理的条件のイオン強度、pH および温度において最も強力である。これらの条件の混乱は、結合相互作用の安定性を崩壊する傾向がある。

基質候補物質としては、コラーゲン、エラスチンおよびその他の細胞外マトリックスタンパク質などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。 10

【0098】

E E R-7に対する抗体

E E R-7に対する抗体は、特に以下で示すE E R-7活性の診断および細胞内調節に有用である。本発明によると、組換えによりまたは化学合成により製造されたE E R-7ポリペプチド、およびそのフラグメントまたは融合タンパク質を含む他の誘導体もしくはアナログを免疫原として用いてE E R-7ポリペプチドを認識する抗体を生成することができる。そのような抗体としては、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、一本鎖、Fabフラグメント、およびFab発現ライブラリーなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。そのような抗体はヒトE E R-7に特異的であるのが好ましく、これはE E R-7の変異体または野生型E E R-7のいずれか、または両方を認識できる。 20

【0099】

KyteおよびDoolittle (1982) により論じられているように、あるアミノ酸を類似の疎水性親水性指標を有する他のアミノ酸と置換することができ、なお類似の生物学的活性を保持することが確定されているが、アミノ酸の疎水性親水性指標を用いてエピトープ領域を決定することができる。特に作製されるポリペプチドに望ましい生物学的機能が免疫学的実施形態において使用されることを意図する場合、親水性に基づいて類似のアミノ酸の置換を行うことができる。例えば、その隣接するアミノ酸の親水性により支配される「タンパク質」の最大局所平均親水性は、その免疫原性に相関することを述べている米国特許第4554101号を参照。従って、各アミノ酸に割り当てられた親水性に基づいて置換を行うことができるということが示されている。各アミノ酸に割り当てられた親水性指標または疎水性親水性指標のいずれかの使用において、これらの値が±2であるアミノ酸の置換を導入するのが好ましく、±1が特に好ましく、±0.5内であるのが最も好ましい置換である。 30

【0100】

当該技術で知られている種々の手順は、E E R-7ポリペプチドまたはその誘導体もしくはアナログに対するポリクローナル抗体の製造に用いることができる。抗体の製造に関しては、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ等を含むが、これらに限定されない種々の宿主動物をE E R-7ポリペプチドまたはその誘導体（またはフラグメントまたは融合タンパク質）の注射により免疫できる。1つの実施形態では、E E R-7ポリペプチドまたはそのフラグメントを免疫原性キャリア、例えばウシ血清アルブミン (BSA) またはキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) と抱合させることができる。宿主の種に依存して、フロイント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムなどの鉱物ゲル、リゾレシチンなどの界面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、並びにBCG（カルメット-ゲラン菌 (bacille Calmette-Guérin)）およびコリネバクテリウム パルブム (Corynebacterium parvum) などの有用な可能性のあるヒトアジュバントを含むが、これらに限定されない、種々のアジュバントを用いて免疫学的応答を増強させることができる。 40

【0101】

EE R-7ポリペプチドまたはそのフラグメント、アナログもしくは誘導体を指向するモノクローナル抗体を調製するために、培養における連続細胞系による抗体分子の製造のために提供されるいずれかの技術を用いることができる。これには、K o h l e rおよびM i l l s t e i n (N a t u r e 256:495-497 (1975))により独自に開発されたハイブリドーマ技術、およびトリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (K o z b o rら、I m m u n o l o g y T o d a y 4:72 (1983); C o t e rら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 80:2026-2030 (1983))、並びにヒトモノクローナル抗体を製造するためのEBVハイブリドーマ技術 (C o l e rら、M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s a n d C a n c e r T h e r a p y、アランRリス・インコーポレーティッド、77-96頁 (1985))などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明のさらなる実施形態では、モノクローナル抗体を無菌動物において製造することができる (国際特許公開番号WO89/12690)。実際に、本発明によれば、EE R-7ポリペプチドに特異的なマウス抗体分子からの遺伝子を適切な生物学的活性を有するヒト抗体分子からの遺伝子と一緒にスプライシングすることにより、「キメラ抗体」の製造のために開発された技術 (M o r r i s o nら、J . B a c t e r i o l . 159:870 (1984); N e u b e r g e rら、N a t u r e 312:604-608 (1984); T a k e d aら、N a t u r e 314:452-454 (1985))を用いることができる。そのような抗体は本発明の範囲内である。ヒトのまたはヒト化キメラ抗体は、異種性抗体ほど免疫応答、特にアレギー性応答そのものを誘発する可能性がそれほど高くないので、そのようなヒトのまたはヒト化キメラ抗体をヒト疾患または障害の治療に使用するのが好ましい。

10

20

【0102】

抗体分子のイディオタイプを含有する抗体フラグメントは、既知の技術により生成できる。例えば、そのようなフラグメントとしては、抗体分子のペプシン消化により製造できるF (a b')₂フラグメント、(a b')₂フラグメントのジスルフィドブリッジを還元することにより生成できるF a b'フラグメント、および抗体分子をパパインおよび還元剤で処理することにより生成できるF a bフラグメントなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0103】

本発明によれば、一本鎖抗体の製造のために記載された技術 (米国特許第5476786号、5132405号および米国特許第4946778号)をEE R-7ポリペプチド特異的一本鎖抗体の製造に適合させることができる。本発明のさらなる実施形態は、F a b発現ライブラリーの構築のために記載された技術 (H u s eら、S c i e n c e 246:1275-1281 (1989))を利用して、EE R-7ポリペプチド、またはその誘導体もしくはアナログに望ましい特異性を有するモノクローナルF a bフラグメントの迅速で容易な同定を可能にする。

30

【0104】

抗体の製造および使用において、望ましい抗体のためのスクリーニングまたは望ましい抗体に関する試験は、当該技術で知られている技術、例えばラジオイムノアッセイ、ELISA (酵素結合免疫吸着アッセイ)、「サンドウィッチ」イムノアッセイ、免疫放射定量アッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、インシトゥイムノアッセイ (例えば金コロイド、酵素または放射性同位体標識を用いる)、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ (例えばゲル凝集アッセイ、血球凝集アッセイ)、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイ、および免疫電気泳動アッセイ等により達成することができる。1つの実施形態では、抗体結合を1次抗体の標識を検出することにより検出する。別の実施形態では、2次抗体または試薬の1次抗体への結合を検出することにより1次抗体を検出する。さらなる実施形態では、2次抗体が標識されている。イムノアッセイにおける結合の検出のために多くの手段が当該技術で知られており、本発明の範囲内である。例えば、EE R-7ポリペプチドの特異的エピトープを認識する抗体を選別するために、そのようなエピトープを含有するEE R-7ポリペプチドフラグメントに結合する生

40

50

成物のために作製されたハイブリドーマをアッセイすることができる。特定の種の動物からの E E R-7 ポリペプチドに特異的な抗体を選別するために、その動物種の細胞により発現されたかまたはその細胞から単離された E E R-7 ポリペプチドとの正の (p o s i t i v e) 結合に基づいて選別することができる。

【0105】

前記の抗体は、上記に記載したかまたは当該技術で知られているいずれかの検出技術を用いて、例えばウェスタンブロッティング、E E R-7 ポリペプチドのインシチュウイメージング、適切な生理学的サンプル中のそのレベルの測定等のための E E R-7 ポリペプチドの局在および活性に関する、当該技術で知られている方法において使用できる。例えば、米国特許第 5 6 7 9 5 8 2 号に記載されているように、リガンド結合のためのアッセイにおいて、そのような抗体を用いることができる。一般に、生理的条件、例えば約 7 から 8 の間の p H、および生理的イオン強度の下で抗体結合が最も容易に生じる。バッファー溶液中のキャリアタンパク質の存在がアッセイを安定化する。最適な条件の混乱、例えばイオン強度、温度、もしくは p H の増強または低減、またはデタージェントもしくはカオトロピック塩の添加に対していくらか耐性はあるが、そのような混乱により結合安定性は低下するであろう。

10

【0106】

特定の実施形態では、E E R-7 ポリペプチドの活性を作動または拮抗する抗体を作製することができる。特に細胞内の一本鎖 F v 抗体を用いて E E R-7 を調節 (阻害) することができる (M a r a s c o ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 0 : 7 8 8 4 - 7 8 9 3 (1 9 9 3) ; C h e n . M o l . M e d . T o d a y 3 : 1 6 0 - 1 6 7 (1 9 9 7) ; S p i t z ら、A n t i c a n c e r R e s . 1 6 : 3 4 1 5 - 3 4 2 2 (1 9 9 6) ; I n d o l f i ら、N a t . M e d . 2 : 6 3 4 - 6 3 5 (1 9 9 6) ; K i j i m a ら、P h a r m a c o l . T h e r . 6 8 : 2 4 7 - 2 6 7 (1 9 9 5)) 。そのような抗体は、リガンドを同定するための下記に記載したアッセイを使用して試験することができる。

20

【0107】

スクリーニングおよび化学

本発明によれば、E E R-7 をコードする遺伝子から誘導されるヌクレオチド配列、および E E R-7 から誘導されるペプチド配列は、エストロゲン調節過程に関連する疾患の処置に有効である薬物を同定するための有用な標的である。薬物標的としては、(i) E E R-7 をコードする遺伝子から誘導される単離された核酸；(i i) E E R-7 ポリペプチドから誘導される単離されたペプチドおよびポリペプチド；並びに最も重要な (i i i) E E R-7 発現を選択的に調節する異なるエストロゲンレセプターなどが挙げられるが、これらに限定するものではない。

30

【0108】

特に、例えば天然の供給源から単離できるものよりも大量の E E R-7 発現を可能にすることにより、または細胞のトランスフェクションもしくは形質転換の後に発現される E E R-7 の活性を示すように特別に操作されたインジケーター細胞において、E E R-7 を同定および単離することにより、特に E E R-7 の活性を上方または下方調節する分子の高速大容量スクリーニングのためのスクリーニングアッセイが開発される。従って、本発明は、当該技術で既知の種々のスクリーニングアッセイを用いて、E E R-7 発現を変化させる特異的エストロゲンレセプターリガンドおよび E E R-7 に直接作用する分子を同定するための方法を企図する。

40

【0109】

当該技術で既知のいずれかのスクリーニング技術を用いて E E R-7 アゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができる。本発明は、小型分子リガンドまたはリガンドアナログおよび擬似物質のスクリーニングおよびインビボで結合して E E R-7 発現活性を作動または拮抗する天然リガンドのためのスクリーニングを企図する。例えば、本発明のアッセイを用いて、E E R-7 発現または活性を作動または拮抗する分子のため

50

の天然の生成物ライブラリーをスクリーニングできる。

【0110】

別の研究法では大きなライブラリーを製造するための組換えバクテリオファージを使用する。「ファージ法」(ScottおよびSmith、Science 249:386-390(1990); Cwirllaら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:6378-6382(1990); Davlinら、Science 49:404-406(1990))を用いて、非常に大きなライブラリーを構築することができる(化学物質 10^6-10^8)。第2の方法は、主に化学的方法を用い、Geysen法(Geysenら、Molecular Immunology 23:709-715(1986); Geysenら、J. Immunologic Method 102:259-274(1987); およびFordorらの方法(Science 251:767-773(1991)))がその例である。Furkara(第14回国際生化学学会、第5巻(1988)、アブストラクトFR:013; Furka、Int. J. Peptide Protein Res. 37:487-493(1991))、Houghton(米国特許第4631211号)およびRutter(米国特許第5010175号)は、アゴニストまたはアンタゴニストとして試験できるペプチドの混合物を製造する方法について記載している。

【0111】

別の実施形態では、合成ライブラリー(Needelsら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:10700-10704(1993); Ohlmeyerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:10922-10926(1993); Lamら、PCT公開番号WO92/00252; Kocisら、PCT公開番号WO9428028)等を用いて、本発明によるEER-7を調節するリガンドのためのスクリーニングをすることができる。合成または天然化合物の大きなライブラリーから被験化合物をスクリーニングする。現在、糖類、ペプチドおよび核酸基盤の化合物の無作為の合成および方向性をもった合成のための多くの手段を用いる。合成化合物ライブラリーは、メイブリッジ・ケミカル・カンパニー(トレビレット、コーンウォール、英国)、コムゲネックス(プリンストン、ニュージャージー州)、ブランドンアソシエーツ(メリマック、ニューハンプシャー州)、およびマイクロソース(ニューミルフォード、コネチカット州)から市販により入手可能である。希少化学物質ライブラリーは、アルドリッチ(ミルウォーキー、ウィスコンシン州)より入手可能である。また別に、細菌、菌類、植物および動物抽出物の形態の天然の化合物のライブラリーは、例えばパンラボラトリーズ(ボートル、ワシントン州)またはマイコサーチ(ノースカロライナ州)から入手可能であるか、または容易に製造できる。加えて、天然の、および合成により製造されたライブラリーおよび化合物は、従来の化学的、物理学的および生化学的手段により容易に修飾される(Blondelleら、Tib Tech 14:60(1996))。

【0112】

EER-7の1次配列の知識およびその配列と既知の機能のタンパク質との類似性は、タンパク質のインヒビターまたはアンタゴニストとして最初の手掛かりを提供できる。例えば、X線結晶学、ニュートロン回折、核磁気共鳴分光法、および構造決定のためのその他の技術を用いて、タンパク質の構造上の特徴を決定することによりアンタゴニストの同定およびスクリーニングがさらに容易になる。これらの技術によりアゴニストおよびアンタゴニストが合理的に設計または同定される。

【0113】

インビボスクリーニング法

EER-7をコードする遺伝子を発現する無傷の細胞または動物全体をスクリーニング方法において使用して候補薬物を同定できる。

一連の実施形態では、永久細胞系を確立する。また別に、適当なDNAまたはmRNAの導入によりEER-7遺伝子を発現するように細胞(限定することなく、哺乳動物、昆虫、酵母または細菌細胞を含む)を一時的にプログラムする。いずれかの適当なアッセイ、

限定することなく、(i)被験物質のE E R-7への選択的結合を測定するアッセイ、(i i)測定可能なE E R-7の活性または機能を修飾する(すなわち阻害または増強する)被験化合物の能力を測定するアッセイ、および(i i i)E E R-7遺伝子のプロモーター(すなわち調節)領域から誘導される配列の転写活性を修飾する(すなわち阻害または増強する)化合物の能力を測定するアッセイなどを用いて候補化合物の同定を行うことができる。

【0114】

E E R-7の分子メカニズム、特にヒトE E R-7に誘発されるシグナル発生を評価するためにトランスジェニック哺乳動物を準備できる。そのような哺乳動物は薬物候補物質をスクリーニングまたは試験するための優れたモデルを提供する。従って、ヒト対象で可能なものよりも非常に詳細にこの系の分子生物学を評価するためにヒトタンパク質E E R-7「ノック・イン」哺乳動物を準備できる。例えばE E R-7活性の欠損を補うことができる化合物を同定するために、「ノックアウト」動物において化合物または疾患を評価することも可能である。両方の技術により細胞ゲノムにおける天然の位置で遺伝情報の単独のユニットの操作が可能になり、末端分化生物のバックグラウンドでその操作の結果を試験できる。胚幹細胞の修飾および芽細胞への異核注入を含むが、これらに限定されない、いずれかの方法によりトランスジェニック動物を準備することができる。

10

【0115】

「ノック・イン」哺乳動物は、内因性遺伝子が異種性遺伝子で置換されている哺乳動物である(Roemerら、New Biol. 3:331(1991))。好ましくは、同種遺伝子の発現または機能の評価の対象(この場合、遺伝子はレポーター遺伝子でよい; Elephantyら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95:11897(1998)参照)となる目的の遺伝子座に異種性遺伝子が「ノック・イン」されており、それにより異種性遺伝子発現が適切なプロモーターからの転写に連結される。これは、変異組換え部位(Arakiら、Nucleic Acids Res. 25:868(1997))またはPCR(ZhangおよびHenderson、Biotechniques 25:784(1998))を用いて、同種組換え、トランスポゾン(WestphalおよびLeder、Curr. Biol. 7:530(1997))により達成できる。

20

【0116】

ヒト対象において可能であるよりも非常に詳細にこの欠損の分子病理学を評価するためにE E R-7ノックアウト哺乳動物を準備できる。そのような動物はまた薬物候補物質をスクリーニングするための優れたモデルも提供する。「ノックアウト哺乳動物」は、そのゲノム内に不活性化されている特異的遺伝子を含む哺乳動物(例えばマウス、ウサギ)である。遺伝子に非機能性を付与するかまたは発現されないようにすることができる当該技術で既知の方法を用いることができる。そのような方法の非限定例は、遺伝子標的化(例えば米国特許第5777195号および第5616491号参照)である。ノックアウト動物には、ヘテロ接合体ノックアウト(すなわち1つの欠損アレレおよび1つの野生型アレレ)およびホモ接合体変異体(すなわち2つの欠損アレレ; E E R-7発現の欠損が致命的である場合、ヒトE E R-7などのE E R-7発現のための異種性構築物を挿入してノックアウト動物を生存させることができる)の両方が含まれる。ノックアウト哺乳動物の準備には、第1に特定の遺伝子の発現を抑制するために使用される核酸構築物を胚幹細胞という未分化細胞型に導入することが必要である。次いで、この細胞を哺乳動物胚に注入する。次いで、組み込まれた細胞を有する哺乳動物胚を妊娠期間中の養母に移植する。Zhouら、(Games and Development 9:2623-2634(1995))は、PPCAノックアウトマウスについて記載している。

30

40

【0117】

「ノックアウト」という文言は、細胞における内因性DNA配列によりコードされるタンパク質の少なくとも一部の発現の部分的または完全な抑制を意味する。「ノックアウト構築物」という文言は、細胞における内因性DNA配列によりコードされるタンパク質の発

50

現を低減するかまたは抑制するように設計された核酸配列をいう。ノックアウト構築物として用いられる核酸配列は、典型的には（１）抑制すべき遺伝子のある部分からのDNA（エクソン配列、イントロン配列、および／またはプロモーター配列）および（２）細胞におけるノックアウト構築物の存在を検出するのに用いられるマーカー配列から成る。ノックアウト構築物は、細胞に挿入され、元来のDNA配列の転写を防止または妨害するような位置で細胞のゲノムDNAに組み込まれる。通常、そのような挿入は、同種組換えにより生じる（すなわち、ノックアウト構築物が細胞に挿入されると、内因性DNA配列に相同であるノックアウト構築物の領域が互いにハイブリダイズし、再結合する。ノックアウト構築物が内因性DNAの対応する位置に組み込まれるように）。ノックアウト構築物核酸配列は、（１）抑制すべき遺伝子の１つまたはそれ以上のエクソンおよび／またはイントロンの配列全長または一部、（２）抑制するべき遺伝子のプロモーター配列の全長または一部、または（３）その組み合わせを含んでいてよい。典型的には、通常、同種組換えの方法によりノックアウト構築物を胚幹細胞（ES細胞）に挿入し、ES細胞ゲノムDNAに組み込む。このES細胞を次いで成長中の胚に注入し、それに組み込む。

10

【0118】

「遺伝子の崩壊」および「遺伝子崩壊」という文言は、遺伝子の野生型または天然発生配列に比較して細胞におけるその遺伝子の発現を低減するか防止するように元来のDNA配列の１つの領域（通常１つまたはそれ以上のエクソン）および／または遺伝子のプロモーター領域への核酸配列の挿入をいう。例としては、核酸構築物は、崩壊すべきDNA配列（プロモーターおよび／またはコード領域）に相補的であるDNA配列に挿入される抗生物質抵抗性遺伝子をコードするDNA配列を含めることにより調製できる。次いで、この核酸構築物を細胞にトランスフェクトすると、構築物はゲノムDNAに組み込まれるであろう。従って、今やDNAは抗生物質抵抗性遺伝子により崩壊されているので、細胞の多くの子孫は、少なくともいくつかの細胞では、もはや遺伝子を発現しないか、または低下したレベルで発現する。

20

【0119】

一般に、DNAは、少なくとも約1kbの長さ、好ましくは3から4kbの長さであり、ES細胞のゲノムDNAにノックアウト構築物を導入すると、それにより組換えに十分相補的である配列が提供される（以下で論じる）。

【0120】

2つまたはそれ以上の遺伝子がノックアウトされている哺乳動物は、本発明の範囲内に包含される。各ノックアウト構築物を作製するための本明細書にて前記に記載した手順を繰り返すことにより、または各々が単一のノックアウトされた遺伝子を有している哺乳動物を互いに飼育することにより、および二重のノックアウトゲノタイプを有するものをスクリーニングすることにより、そのような哺乳動物を作製できる。

30

【0121】

tetレプレッサー系（米国特許第5654168号参照）またはクレ・ロックス系（米国特許第4959317号および第5801030号参照）などの種々の系を用いて調節されたノックアウト動物を準備できる。

【0122】

別の一連の実施形態では、（i）ヒトEER-7がトランスジェニック動物のゲノムに安定して挿入されていて、かつ／または（ii）内因性EER-7遺伝子が不活性化され、ヒトEER-7遺伝子で置換されているトランスジェニック動物を創る。例えばCoffman、Semin. Nephrol. 17:404（1997）；Estherら、Lab. Invest. 74:953（1996）；Murakamiら、Blood Press. Suppl. 2:36（1996）参照。

40

【0123】

別の実施形態では、内因性EER-7発現を変調する配列が動物のゲノムに安定して挿入されている。例えば、EER-7発現を刺激する（転写因子など）かまたは下方調節因子と相互作用して阻害する配列を使用することができる。

50

【0124】

E R 活性化アッセイ

エストロゲンレセプターイソ体アゴニストおよびアンタゴニストの差別的かつ／または選択的機能活性の算定が可能になるいずれかの細胞アッセイシステムが本発明により定義される。特定の実施形態では、下記で例を示すように、アッセイを用いて E R の特異的イソ体と差別的に相互作用する化合物を同定でき、該化合物は、E E R-7 m R N A 転写を変調する被験化合物と接触させたエストロゲンリガンドの影響を算定することにより評価できる。従って、アッセイシステムを用いて1つのエストロゲンレセプターにより機能的影響を選択的に生み出す化合物を同定できる。E E R-7 m R N A 転写を増強する化合物は、結果的に E E R-7 タンパク質の生成を増加させることができ、腹部大動脈瘤および心筋梗塞の予防における新規の治療薬として有用である。好ましい実施形態では、アッセイシステムは異なるエストロゲンレセプターを発現する細胞の2つの異なる集団からなる。好ましくは、各実験を化合物の複数の異なる希釈で3検体ずつ実施する。

10

【0125】

アンタゴニストスクリーニングは、E E R-7 調節エストロゲンと接触させた場合に宿主細胞によるレポーター遺伝子の発現を検出することを含む。E E R-7 発現が低下した場合、被験化合物は、核ホルモンレセプターシグナル発生のアンタゴニスト候補物質である。レポーター遺伝子の発現に変化がない場合、被験化合物は、有効な E R リガンドではない。

【0126】

記載したアッセイシステムを用いて、異なるエストロゲンレセプターによる被験化合物の影響を比較することができる。異なるエストロゲンレセプターを発現する、形質転換細胞の異なる集団における E E R-7 転写に及ぼす被験化合物の影響を比較して、化合物がエストロゲンレセプターアゴニスト／アンタゴニストのクラスに属するかどうかを評価する（以下を参照）。

20

【0127】

いずれかの都合のよい方法により発現された生成物の検出が可能になる。例えば、本発明は E E R-7 m R N A 生成物を検出するためのノーザンブロット分析を提供する。方法は、アガロースゲル状で全細胞性 R N A を分画化し、R N A を固体支持膜に移し、標識 D N A プローブを有する D N A-R N A 複合体を検出する工程からなり、この場合、サンプル中の D N A プローブおよび R N A 成分間で安定した複合体を形成できる条件下で、D N A プローブは特定の E E R-7 の核酸配列に特異的である。当該技術で既知のいずれかの適切な手段を用いることによりそのような複合体を検出でき、この場合、複合体の検出はサンプル中の E E R-7 の存在を示す。E E R-7 発現制御エレメントの制御下また別のレポーター遺伝子を E R 活性アッセイにおいて使用することができる。

30

【0128】

典型的には、イムノアッセイは、標識抗体または標識抗原成分のいずれかを使用する（例えば、これは抗体との結合に対してサンプル中の抗原と競合する）。適切な標識としては、限定することなく、酵素基盤、蛍光、化学ルミネセンス、放射活性、または色素分子などが挙げられる。プローブからのシグナルを増幅するアッセイもまた既知であり、例えばビオチンおよびアビジンを利用するもの、並びに E L I S A アッセイなどの酵素標識イムノアッセイなどがある。

40

【0129】

本明細書で記載したアッセイシステムは、アゴニストおよびアンタゴニストのための高速大容量1次スクリーニングにおいても使用することができるか、または異なる1次スクリーニング、例えばレセプターと相互作用し、E E R-7 転写に影響を及ぼす化合物を同定する結合アッセイスクリーニングにより同定される候補化合物のための2次機能スクリーニングとして用いることができる。

【0130】

エストロゲン化合物

50

「エストロゲン化合物」は、ステラロイズ・インコーポレーティッドの「S t e r o i d s」第11版、W i l t o n N. H.（参照により本明細書に組み入れる）に記載されているいずれかの構造として定義される。前記の参考文献において記載されている非ステロイドエストロゲンはこの定義に含まれる。この定義に含まれる他のエストロゲン化合物は、エストロゲン誘導体、エストロゲン代謝体、およびエストロゲン前駆体である。エストロゲン選択的レセプターアゴニストアンタゴニスト（E S R A A）は、E R α レセプターでアゴニストとして、およびE R β レセプターではアンタゴニストとして機能するエストロゲン化合物である。E R β レセプターで作動し、E R α レセプターで拮抗するエストロゲン化合物もまたこのアッセイシステムで同定することができる。この文言は、E E R-7転写を調節する、本明細書に記載したエストロゲン効果の特異的に誘発する分子も包含する。1つ以上のエストロゲンまたはエストロゲン化合物の混合物もまた含まれる。そのような混合物の例は、米国特許第5554601号の表I Iに提供される（コラム6参照）。単独または他の物質との組み合わせのいずれかで有用性のあるエストロゲンの例は、例えば米国特許第5554601号において提供されている。

10

【0131】

β エストロゲンはエストロゲン化合物の β 異性体である。 α エストロゲンはエストロゲン成分の α 異性体である。「エストラジオール」という文言は、特記しない場合 α または β エストラジオールのいずれかである。

【0132】

「E 2」という文言は β エストラジオール、17 β エストラジオール、および β -E 2と同義である。 α E 2および α エストラジオールは β E 2エストラジオールの α 異性体である。

20

【0133】

好ましくは、非雌性化エストロゲン化合物を使用する。そのような化合物は、子宮肥大およびその他の望ましくない副作用を引き起こさないという利点を有し、従って、より高い有効量で使用することができる。非雌性化エストロゲンの例としては、ラロキシフェン（エビスタ；イーライ・リリー）、タモキシフェン（ノルバデックス；アストラ・ゼネカ）、およびその他の選択的エストロゲンレセプターモデュレーターなどが挙げられる。

【0134】

加えて、アンドロゲン、テストステロンなどのある化合物は、アロマターゼ酵素を用いる変換によりテストステロンをインビボでエストロゲンに変換できる。アロマターゼ酵素は、限定することなく、脳などのいくつかの領域に存在する。アンドロゲンにはアロマターゼの基質であって、変換できるものと、基質になれないものがある。アロマターゼの基質であるこれらのアンドロゲンをアロマトイズ可能なアンドロゲンといい、アロマターゼの基質でないものをアロマトイズ不可能なアンドロゲンという。例えば、テストステロンはアロマトイズ可能なアンドロゲンであり、ジヒドロテストステロンはアロマトイズ不可能なアンドロゲンである。従って、本発明は、明らかに、アンドロゲンからエストロゲンに変換され、インビボでのアミロイドレベルを低下させる、本明細書に記載された効果を生み出すこれらの化合物にまで（および以下に記載するように、精巣が除去されたかまたは不活性化されている動物を実験動物として使用することまで）拡大される。

30

40

【0135】

高速大量処理スクリーニング

本発明による物質は、限定することなく、細胞基盤アッセイまたは細胞なしのアッセイを含む高速大量処理アッセイでのスクリーニングにより同定できる。異なる型のアッセイを用いて異なる型の物質を検出できることは当業者に理解されよう。自動化されたアッセイのいくつかの方法が近年開発され、短時間で数万の化合物のスクリーニングが可能になった。そのような高速大量処理スクリーニング法が特に好ましい。本発明により提供されるように、大量の精製されたポリペプチドの利用性により、物質を試験するための高速大量処理スクリーニングアッセイの使用が大いに促進される。

【0136】

50

診断方法

本発明によれば、E E R-7の遺伝的変種を検出して、腹部大動脈瘤または心筋梗塞になりやすさの増大などのE E R-7に関連する疾患を診断できる。そのような変種を検出するための種々の方法を本明細書に記載する。変異したアミノ酸配列の結果としてか、すなわち変異体により結果的にトランケートされたタンパク質が発現されるためか、または全く発現されない結果としてそのような変種がE E R-7機能に影響する場合、コラーゲンおよびエラスチン架橋の調節不能をもたらすと予測される。

【0137】

核酸アッセイ

どの細胞供給源からでもDNAを入手できる。当該技術で標準的な多くの方法のいずれかを用いて細胞供給源または体液からDNAが抽出される。DNAを抽出するのに用いられる特定の方法は、供給源の性質に依存することは理解されよう。一般に、本発明で使用するために抽出すべきDNAの最低量は、約25 pgである（ 4×10^9 塩基対のゲノムサイズの約5個の細胞等価物に相当する）。 10

【0138】

また別の代替の実施形態では、グアニジウムチオシアネート・フェノール・クロロホルム抽出などの、当業者によく知られている標準的な方法を用いて生検組織からRNAを単離する（Chomczynskiら、Anal. Biochem. 162:156（1987））。次いで、選択された部位に特異的な特定のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、共役逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応による増幅（RT-PCR）に単離されたRNAを供する。特異的逆転写および増幅を確実にするようにプライマーアニーリングの条件を選択する。従って、増幅産物の出現が特定の遺伝的変種の存在の診断になる。別の実施形態では、RNAを逆転写および増幅し、その後増幅された配列を例えば直接シーケンシングにより同定する。さらに別の実施形態では、RNAから得られたcDNAをクローン化し、シーケンシングして変異体を同定する。 20

【0139】

タンパク質アッセイ

代替の実施形態では、生検組織を対象から入手する。E E R-7に特異的に結合できる抗体は、次いで、組織のサンプルと接触させて、抗体により特定されたE E R-7ポリペプチドの有無を決定する。抗体は、ポリクローナルであってもよいし、またはモノクローナルであってもよく、モノクローナルが好ましい。細胞に結合する特異的抗体の測定は、いずれかの既知の方法、例えば定量用フローサイトメトリー、酵素結合または蛍光結合イムノアッセイ、ウェスタン分析等により行うことができる。 30

【0140】

治療的用途

本発明によれば、E E R-7タンパク質発現の刺激をエストロゲン関連疾病状態の患者における処置選択肢として用いることができる。E E R-7タンパク質発現の刺激は、（i）E E R-7タンパク質をコードする核酸を提供すること、および（ii）E E R-7遺伝子の転写および／または翻訳を刺激する化合物を提供することなどの方法、これらの方法に限定されないが、により刺激することができる。 40

【0141】

遺伝子治療

特定の実施形態では、E E R-7全長を含む、これに限定されないが、タンパク質をコードする配列を含むベクターを提供して、心臓血管機能におけるE E R-7の機能に関連する疾病または障害を治療または予防する。本発明のこの実施形態では、治療用ベクターは本発明のタンパク質を生成する配列をコードする。

【0142】

当該技術で利用可能な遺伝子治療のいずれかの方法を本発明に従って用いることができる。例となる方法を以下に記載する。

【0143】

遺伝子治療の方法の一般的な概説に関しては、Golds pielら、Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); WuおよびWu、Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev、Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan、Science 260:926-932 (1993); 並びにMorganおよびAnderson、Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); May、TIBTECH 11:155-215 (1993) 参照。使用できる組換えDNA技術の当該技術で一般に知られている方法は、Ausubelら(編)、Current Protocols in Molecular Biology (1993)、ジョーン・ウィレイ・アンド・サンズ、ニューヨーク州; Kriegler、Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual (1990)、ストックトン・プレス、ニューヨーク州; およびDracopolisら(編)、Current Protocols in Human Genetics (1994)、第12および13章、ジョーン・ウィレイ・アンド・サンズ、ニューヨーク州に記載されている。遺伝子治療に適したベクターは前記に記載されている。

【0144】

1つの態様では、治療用ベクターは、適切な宿主で本発明のタンパク質を発現する核酸を含む。特に、そのようなベクターは、タンパク質のためのコード配列に機能的に作用するように連結されたプロモーターを有する。プロモーターは、誘導型でも構成型でもよく、任意に、組織特異的であってもよい。別の実施形態では、タンパク質コード配列およびその他の望ましい配列が、ゲノムの望ましい部位で相同組換えを促進する領域によりフランキングされている核酸分子を使用しており、従ってタンパク質の染色体内発現を提供する。(KollerおよびSmithies、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:8932-8935 (1989); Zijlstraら、Nature 342:435-438 (1989))。

【0145】

ベクターの患者への運搬は、直接的、この場合、患者が直接ベクターもしくは分配複合体にさらされる、または間接的、この場合、細胞が最初インビトロでベクターで形質転換され、次いで患者に翻訳される、のいずれかでよい。これらの2つの方法は、各々インビボおよびエクソビボ遺伝子治療として知られている。

【0146】

特定の実施形態では、ベクターはインビボで直接提供され、その場合ベクターは生物の細胞に侵入し、タンパク質の発現を媒介する。これは、適切な発現ベクターの一部としてベクターを構築し、それを投与して細胞内のものになるようにすることにより、例えば欠損または弱毒化レトロウイルスまたはその他のウイルスベクターを用いる感染により(米国特許第4980286号参照)、もしくは裸のDNAの直接注入により、もしくはマイクロ粒子ボンバードメントにより(例えば遺伝子ガン; バイオリスティック、デュポント); または脂質もしくは細胞表面レセプターもしくはトランスフェクト物質、バイオポリマー中へのカプセル化(例えばポリ-S-1-64-N-アセチルグルコサミン多糖類、米国特許第5635493号参照)、リポソーム、マイクロ粒子、またはマイクロカプセル中へのカプセル化、核に侵入することが解っているペプチドまたはその他のリガンドへの連結にそれを投与すること、またはレセプター媒介のエンドサイトーシスに供されるリガンドへの連結にそれを投与すること(例えばWuおよびWu、J. Biol. Chem. 62:4429-4432 (1987) 参照)等、当該技術で知られている多くの方法のいずれかにより達成できる。別の実施形態では、リガンドが融合誘導性ウイルスペプチドを含み、エンドソームを崩壊し、核酸がリソソーム分解を避けることが可能になる核酸リガンド複合体を形成することができる。さらに別の実施形態では、特異的レセプターを標的にすることにより、核酸はインビボで細胞特異的取り込みおよび発現のために標的にされる(例えば、PCT公開番号WO92/06180、WO92/22635、WO92/20316およびWO93/14188参照)。また別に、相同組換えによる発現のた

めに核酸を細胞内に導入し、宿主細胞DNA内に組み入れることができる (K o l l e r および S m i t h i e s、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A. 86: 8932-8935 (1989)、Z i j l s t r a ら、N a t u r e 342: 435-438 (1989))。これらの方法は「ウイルスおよび非ウイルスベクター」に関連して前記に記載したものに加えられる。

【0147】

また別に、例えば M a r a s c o ら (P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A. 90: 7889-7893 (1993)) に記載されたものなどの技術を用いて、例えば標的細胞集団内で一本鎖抗体をコードするヌクレオチド配列を発現することにより抗体分子を投与することもできる。

10

【0148】

使用するために想定される治療用核酸の形態および量は疾病の型および望まれる効果の重篤度、患者の状態等に依存し、当業者により決定され得る。

【0149】

タンパク質合成の刺激

遺伝子転写およびタンパク質翻訳は、外因性化合物の投与により阻害または刺激され得る。外因性化合物は、アデノシン三リン酸、酸化窒素、およびグアノシン三リン酸などの、これらに限定されないが、細胞外および／または細胞内メッセンジャー系と相互作用し、タンパク質合成を調節することができる。この実施形態では、E E R-7 タンパク質合成を刺激する外因性化合物を心筋梗塞および大動脈瘤を含む心臓血管障害の予防および／または治療に使用できる。特定の実施形態では、E E R-7 タンパク質発現を刺激する外因性化合物は、エストロゲンレセプターリガンドである。

20

【0150】

治療用に示唆される化合物は、当該技術で知られている処方で患者に提供され、賦形剤、滑沢剤、希釈剤、着香剤、着色剤、および崩壊剤などの医薬上許容される添加物を含有できる。処方は、錠剤、キャプレット、カプセル、液体または注射などの有用な投与単位で製造することができる。

【0151】

使用するために想定される治療用化合物の形態および量は、疾病のタイプおよび望まれる効果の重篤度、患者の状態等に依存し、当業者により決定され得る。

30

【0152】

実施例

本発明は、限定する目的ではなく例示する目的で提供される以下の実施例を参照することにより、よりよく理解されるであろう。

【0153】

実施例1: E E R-7 の発見

ヒト臍帯血管内皮細胞 (H U V E C) RNA を用いて、ディファレンシャルディスプレイにより E E R-7 を同定した。0 日目に、H U V E C を 150 mm^2 プレートあたり約 3×10^6 セルで維持培地 (10 pg/ml のヒト E G F、 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ のヒドロコルチゾン、 $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ のゲンタマイシン、 50 ng/ml のアンフォテリシン B、 $3\text{ }\mu\text{g/ml}$ のウシ脳抽出物、および 2 (容量/容量) % のウシ胎児血清) を補充した、クロンテック (サンディエゴ、カリフォルニア州) の E B M) にプレートした。1 日目に、2 (容量/容量) % チャコール/デキストラン処理したウシ胎児血清 (ハイクローン; ローガン、ユタ州) を補充し、およそ 300 の感染多重度の複製欠損アデノウイルス発現ヒト E R β (A d 5 E R β) を含有するフェノール・レッドなしの E B M を細胞に供給した。37 °C で 1 時間インキュベートした後、細胞を 2 回洗浄し、E B M / B S A (0.25 (重量/容量) % のウシ血清アルブミン、 10 U/ml のペニシリン G、 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンおよび 25 ng/ml のアンフォテリシン B を補充した E B M) を再供給した。37 °C でおよそ 6 時間のさらなるインキュベーションの後、細胞に 100 nM の 17 β -エストラジオールまたは D M S O ビヒクルのいずれかを含有する E B M / B S A を

40

50

再供給した。およそ16時間のインキュベーションの後、細胞に30 U/mlのIL-1 β および100 nMの17 β -エストラジオールまたはDMSOビヒクルのいずれかを含有するEBM/BSSAを再供給した。37℃で5時間インキュベートした後、トリゾール（ライフテクノロジーズ）を用いて細胞を収穫した。製造者のプロトコルに従ってRNAを調製した。精製された全RNAを37℃で1時間、10 UのデオキシリボヌクレアーゼIと反応させ、Rnイーザー・スピンカラム（キアゲン；チャッツウォース、カリフォルニア州）により再精製した。

【0154】

デオキシリボヌクレアーゼI処理の後、6 μ gの全RNAを1x RTバッファー（25 mMのトリスHCl、pH 8.3、37.6 mMのKCl、3 mMのMgCl₂ および5 mMのDTT、ゲンハンター、ナッシュビル、テネシー州）、20 μ MのdNTP（A、C、GおよびTTP 2'-デオキシヌクレオシド5'トリホスフェート、ギブコ/BRL）、0.2 μ MのHT₁₁C（オリゴヌクレオチド：AAGCTTTT TTT TTT TTT C；配列番号8）と共に最終容量600 μ Lでインキュベートした。この反応混合物を65℃で5分間インキュベートし、2次構造を変性させ、続いて37℃で10分間インキュベートした。次いで、スーパースクリプトII逆転写酵素（200 U/ μ l、ギブコ/BRL）30 μ lを反応物に加え、37℃で1時間インキュベーションを行った。75℃で5分間加熱することにより酵素を不活性化した。次いで、この反応物のアリコートを用いてPCRによる第2鎖合成に用いた。反応物2 μ lに、1x PCRバッファー（10 mMのトリスHCl、pH 8.4、100 mMのKCl、1.5 mMのMgCl₂ および0.001%のゼラチン）、2 μ MのdNTP、15 nMの³²P dATP（NEN）、1単位のアンブリタックDNAポリメラーゼ（パーキン・エルマー）および1 μ Mの任意のプライマー5'-AAGCTTGCCATGG-3'（配列番号9）を全反応物容量20 μ lで添加した。次いで、反応混合物を以下のパラメーターを用いて熱循環に供した。

92℃で2分間、1サイクル

92℃で15秒間、40℃で2分間、72℃で30秒間、40サイクル

72℃で5分間

【0155】

1x TBEバッファー（0.1 Mのトリス、0.09 Mのホウ酸、1 mMのEDTA）中2000ボルトで3時間、6% 変性ポリアクリルアミドゲル（5.7%のポリアクリルアミド、0.3%のビスポリアクリルアミド、42%の尿素および51%のH₂O）でのゲル電気泳動によりPCR産物を分離した。次いで、ゲルを濾紙（シュライッヒャー・アンド・シュエル）に移し、真空下80℃で1時間乾燥し、X線フィルムに24時間さらした。次いで、現像したフィルムを乾燥ゲルに重ね合わせ、目的のバンドを同定した。バンドの隅を22ゲージシリンジ針を用いてマークし、これらの境界内のゲルスライスをかみそりの刃で切除し、H₂O 100 μ lに浸した。サンプルを水浴中で15分間沸騰させ、2分間遠心分離し、上澄溶液を新しいチューブに移した。このサンプルに、10 mg/mlのグリコーゲン5 μ l、3 Mの酢酸ナトリウム10 μ lおよび100%のエタノール450 μ lを添加した。サンプルを混合し、-20℃で一晩沈殿させ、10000 gで10分間遠心分離した。上澄溶液を除去し、ペレットを85%のエタノール200 μ lで洗浄し、H₂O 10 μ lに再懸濁した。1x PCRバッファー、20 μ MのdNTP、0.2 μ Mの任意のプライマーおよび0.2 μ MのオリゴヌクレオチドHT₁₁Cおよび2単位のアンブリタックポリメラーゼの存在下、前記のPCR反応と同一の循環パラメーターを用いて、再増幅PCR反応にこの3 μ lアリコートを使用した。

【0156】

同定された調節されたバンドの中で、およそ320塩基対の大きさの#7が17 β -エストラジオール処理による非常に強力な誘導が示され、これを内皮エストロゲン調節遺伝子（EER-7）と称した。EER-7フラグメントをTAクローニングによりベクターpCRII（インビトロジェン）にクローン化した。ノーザンブロット分析のためにHUV EC細胞からの全RNAを1（重量/容量）%のアガロースゲル上で約200 Vで2時間

の電気泳動により分画化した。毛細管現象により一晩RNAをナイロン膜に移した。オリゴヌクレオチド標識キット（ファルマシア）を用いて、ゲル精製したEER-7の320bpフラグメントから調製した³²P標識EER-7フラグメントcDNAプローブでナイロン膜をハイブリダイズした。ノーザンの結果は、EER-7全長メッセージはおよそ4.0kbであることを示した。

【0157】

BLASTプログラム（NCBI；非冗長およびESTデータベース）を用いた320bp配列の分析は、既知遺伝子に対してなんら相同性を同定しなかったが、相同性を有するEST配列（W42603、W44920、H25237およびAA166620）を表した。これらのESTをリサーチ・ジェネティックスから入手し、その全体をシーケンシングした。およそ1.2kbの得られた配列は、既知の同定された遺伝子に対する相同性を有しなかったが、同定可能なコード領域を含有していた。

10

【0158】

EER-7遺伝子を単離するために、PCRスクリーニング法（オリジーン・ラピッドースクリーン）をヒト胎盤ライブラリーと共に利用した。EER-7の既知配列から誘導されるオリゴプライマー（5'-TTTGTCTCAGCTGAGCTCC-3'および5'-TAAGATAAAGGTAAGGACACTA-3'；各々配列番号10および11）をヒト胎盤全RNAと共に初めてRT-PCR反応で使用した。1.2%のアガロースゲルでの電気泳動の後、予測された340bpバンドが観察された。次いで、これらのオリゴヌクレオチドを用いて、PCRによりオリジーン96ウェルヒト胎盤ライブラリーをスクリーニングした。5個のウェルは、340bpバンドを生じた。これらのウェルに対応するサブプレートオリジーンから得て、PCRの第2ラウンドを実施して各サブプレートから陽性のウェルを同定した。陽性のサブウェルをLB+アンピシリンプレートにプレートして個々のコロニーを得た。³²P標識1kbのEST配列をプローブとして用いて、これらのコロニーをコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした（Sambrookら、Molecular Cloning）。膜を48℃で一晩ハイブリダイズし、次いで室温で2xSSC/0.5% SDSで2回、60℃で0.1xSSC/0.1% SDSで2回洗浄した。陽性コロニーをLB+アンピシリン中で成長させ、プラスミドDNAを得た（キアゲン）。プラスミドをEcoRIおよびSalIで消化させ、cDNAインサートを遊離させた。反応物をコロニーハイブリダイゼーションプロトコルのために記載された電気泳動およびサザン分析に供した。D3E11というクローンは、EER-7クローン全長で予測される大きさのcDNAインサートを生じ、その全てがシーケンシングされた。この配列を用いるBLAST分析により遺伝子のリシロオキシダーゼファミリーの既知のメンバーに対する類似性が同定された（図1および2）。

20

30

【0159】

実施例2：EER-7発現の調節

ヒト臍帯血管細胞（HUVEC）を凍結貯蔵物（クロンテックス、サンディエゴ、カリフォルニア州）として2または3継代で得た。細胞を維持した。10ng/mlのヒトEGF、1mg/mlのヒドロコルチゾン、50mg/mlのゲンタマイシン、50ng/mlのアンフォテリシンB、3mg/mlのウシ脳抽出物および2容量%のウシ胎児血清を補充したEBM培地中で細胞を維持した。4から7継代の実験のための細胞を使用した。

40

【0160】

0日目に、HUVECを150mm²プレートあたり約3×10⁶セルで維持培地にプレートした。細胞を37℃で約24時間インキュベートした。1日目に、2（容量）%チャコール/デキストラン処理したウシ胎児血清（ハイクロン；ローガン、ユタ州）を補充し、およそ300の感染多重度の複製欠損アデノウイルス発現ヒト全長野生型ERα（Ad5ERα）またはERβ（Ad5ERβ）を含有するフェノール・レッドなしのEBM培地を細胞に供給した。感染の後、細胞を洗浄し、2容量%のチャコール/デキストラン

50

で処理したウシ胎児血清を補充したフェノール・レッドなしのEBM培地を再供給した。細胞を約37℃で約20時間インキュベートした。3日目に、シリカゲルカラム（キアゲン；チャッツワース、カリフォルニア州）で細胞から全RNAを抽出した。1%のアガロースゲル上で約150Vで約2時間電気泳動することにより全RNAを分画化した。20xSSCを用いて毛細管移動によりRNAを移動させた。ナイロン膜を³²P標識EER-7 cDNAプローブ（ファルマシアのオリゴラベリングキットを用いて作製）でハイブリダイズした。結果を図3にまとめる。

【0161】

EER-7の配列分析は、タンパク質がLOおよびLOLタンパク質ファミリーに属する他のタンパク質に構造的に類似することを示している（図1参照）。ドメインの比較は、EER-7はLOおよびLOLタンパク質に関連する特徴的な触媒性ドメインを共有し、WS914に存在するSRCRドメインをも含有することを示している。組み合わせて、これは、EER-7タンパク質がSRCRドメインにより媒介されるタンパク質-タンパク質相互作用により細胞性シグナル発経路において重要な役割を果たすことを示している。

10

【0162】

発現研究によりEER-7発現がHUVEC細胞のERαおよびERβの両方により制御されることが示された。原型のエストロゲンアゴニスト17βエストラジオールは、双方のレセプターとの相互作用によりEER-7発現を刺激した。加えて、この効果は、非選択的エストロゲンレセプターアンタゴニストIC182780により遮断された（図3、右のバンドパネル参照）。ERαアゴニストおよびERβアンタゴニストである化合物2および8（図4）は共にERαによるEER-7発現を刺激し、ERβレセプターでの17βエストラジオールの効果を遮断した。これらの研究は、EER-7発現および活性が双方のエストロゲンレセプターにより変調されることを示している。従って、EER-7のエストロゲン媒介変調は、AAAおよび心筋梗塞に対する治療戦略のための新規開発方法を表している。

20

【0163】

本発明は、本明細書にて記載された特定の実施形態により範囲が限定されるものではない。実際に、本明細書において記載されたものに加えて本発明の種々の変更は、前記の記載および添付の図面から当業者に明らかになる。そのような変更は、添付の請求の範囲の範囲内になるように意図されている。

30

【0164】

全ての値は概数であり、記載のために提供されていることはさらに理解される。

【0165】

本明細書で引用された全ての特許、特許出願、出版物およびその他の資料は、その全体として参照により本明細書に組み入れる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

PAM250残基重量表と共にクラスター法を使用した、ウサギEER-7タンパク質フラグメント、EER-7コンセンサスタンパク質、ヒトおよびマウスWS914、ヒトおよびマウスLOL、ヒトおよびマウスLO、並びにヒトおよびマウスESTに関するタンパク質アラインメントの配列対距離。

40

【図2】

EER-7タンパク質とWS914、LOL、およびLOタンパク質との間のSRCRおよび触媒性ドメインの配列類似性の概略的表現。

【図3】

HUVEC細胞におけるERαおよびERβレセプターの活性化後のEER-7およびグリコールアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼRNAレベルを示すノーザンブロット。

【図4】

50

化合物 2 および 8 の構造。

【図 1】

類似性パーセント										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	28.4	14.8	27.7	13.7	43.7	15.9	16.7	63.5	57.0	1
2	13.7	50.9	31.7	19.9	17.2	10.3	10.5	7.1	12.2	2
3	95.1	70.5	35.6	14.1	14.3	14.9	15.1	6.1	11.5	3
4	0.0	43.9	11.0	38.0	69.2	59.2	60.5	59.7	85.2	4
5	100.0	222.0	254.0	161.2	51.1	46.4	49.8	27.0	31.0	5
6	0.0	76.0	85.3	80.6	2.0	64.9	68.2	75.2	79.3	6
7	0.0	178.8	190.7	159.1	87.3	53.4	59.8	91.8	47.2	7
8	0.0	172.2	185.8	151.4	86.3	30.4	14.5	48.0	51.8	8
9	0.0	97.3	67.4	56.6	117.5	117.5	140.9	140.9	92.6	9
10	0.0	56.6	40.8	23.7	72.7	72.7	81.4	84.5	10.8	10

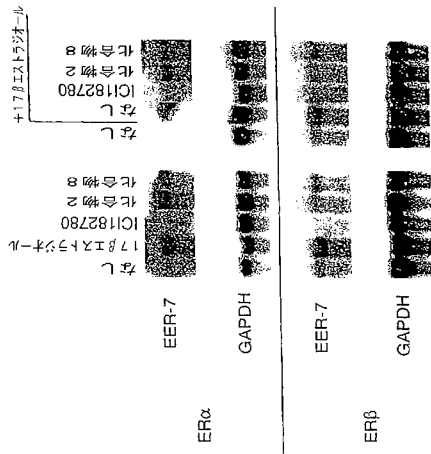
クサギEER-7タンパク質フラグメントPRO
EER-7コンセンサスタンパク質PRO
ヒトWS914タンパク質PRO
マウスWeB14コンティグ1タンパク質PRO
ヒトシリオキシダーゼ様タンパク質PRO
マウスLLOLタンパク質PRO
ヒトシリオキシダーゼタンパク質PRO
マウスシリオキシダーゼタンパク質PRO
ヒトコンティグ2aostタンパク質PRO
マウスコンティグタンパク質PRO

タンパク質

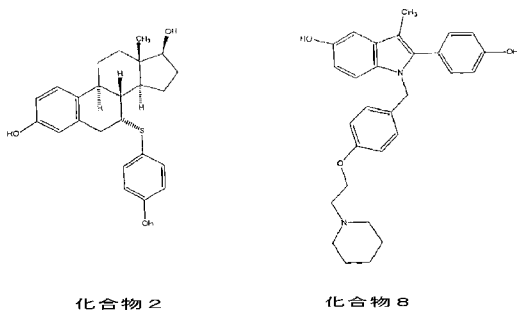
【図 2】

EER-7				
SRCR-1	SRCR-2	SRCR-3	SRCR-4	触媒性
WS914				
SRCR-1	SRCR-2	SRCR-3	SRCR-4	触媒性
61%	34%	64%	58%	66%
リシリオキシダーゼ様				
46%				
リシリオキシダーゼ				
44%				

【図 3】



【図 4】



【国際公開パンフレット】

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

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

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/12470 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 9/00 Wayne, PA 19087 (US). KARATHANASIS, Sotirios, K., 4498 Saline-Waterworks Road, Saline, MS 48176 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/24942
- (22) International Filing Date: 8 August 2001 (08.08.2001)
- (74) Agents: CHOKSI, Neepa, Y. et al.; Darby & Darby P.C., 805 Third Avenue, New York, NY 10022-7513 (US).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/223,763 8 August 2000 (08.08.2000) US
60/255,838 15 December 2000 (15.12.2000) US
- (71) Applicant: AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) Inventors: EVANS, Mark, J., 617 Twin Bridges Drive, Radnor, PA 19087 (US). SCICCHITANO, Marshall, S., 104 Meadowcrest Lane, Douglasville, PA 19518 (US). BAPAT, Ashok, R., 1429 Sullivan Drive, Blue Bell, PA 19422 (US). BEER, Eric, 2 Dolores Avenue #12, Waltham, MA 02452 (US). BHAT, Ramesh, A., 738 Champlain Drive, King of Prussia, PA 19406 (US). FERRIS, Elissa, 4498 Saline-Waterworks Road, Saline, MS 48178 (US). MASTROENI, Robert, 357 Maiden Lane, Plymouth Meeting, PA 19462 (US). ZHANG, Jianzioung, 128 Easton Road,
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/12470 A2

(54) Title: A NOVEL MEMBER OF THE LYSYL OXIDASE GENE FAMILY

(57) Abstract: The present invention relates to a novel lysyl oxidase genes, termed EER-7. The invention relates to the protein and nucleic acids encoding the protein. The invention further relates to an assay system to identify compounds that selectively modulate EER-7 protein activity by interaction with estrogen receptors.

WO 02/12470

PCT/US01/24942

0630/2G703-WO

A NOVEL MEMBER OF THE LYSYL OXIDASE GENE FAMILY

5

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a novel member of the lysyl oxidase family, EER-7, polypeptide fragments of the protein, and nucleic acids encoding the EER-7 protein and fragments. The present invention also relates to an assay system and method for testing estrogen receptor-binding compounds for their ability to regulate EER-7 mRNA transcription.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

Abdominal aortic aneurysms (AAAs) are an important vascular condition in the United States and other developed nations, where a progressive increase in incidence has been observed over the past 30 years (Mitchell *et al.*, Vascular Surgery, 4th edition, 1995, 1032-1060). The majority of AAAs affect men over the age of 55, but a steady rise in incidence has also been observed in women (Cole *et al.*, Chronic Dis. Canada, 1994, 15:S1-S64; Krupski *et al. Semin. Vasc. Surg.*, 1995, 8:83-167).

15

Elastin and collagen (types I and III) are the principal structural proteins of the aorta. These fibrillar proteins impart both strength and resilience to the aortic wall during its continual exposure to the stress of pulsatile arterial pressure. Because AAAs display a decrease in elastin concentration and histopathologic changes in which the elastic lamellae are fragmented and degraded, the loss of elastin and its biophysical properties has been considered an essential feature (Campa, *et al.*, Artherosclerosis, 1987, 65:13-21; White *et al.*, J. Vasc. Surg., 1993, 17:371-381; Halloran, *et al.*, J. Surg. Res., 1995, 8:85-92). The fact that most aneurysms arise in the infrarenal aorta has been attributed to the

20

25

WO 02/12470

PCT/US01/24942

2

fact that aortic elastin content and the number of elastic lamellae are both normally lower in this region than in more proximal parts of the aorta. The infrarenal aorta would therefore appear to be predisposed to aneurysms induced by any process causing accelerated elastin degradation.

5 Lysyl oxidase (LO, E.C. 1.4.3.13) initiates covalent crosslinking between and within the molecular units of elastin and of collagen by oxidizing peptidyl lysine in these proteins to peptidyl α -aminoadipic- δ -semialdehyde. The peptidyl aldehyde can then condense with neighboring amino groups or peptidyl aldehydes to form the covalent crosslinkages found in fibrillar collagen and elastin (Kagan, *Biology of the Extracellular Matrix*, 1986, 321-398). LO contains one mole tightly bound copper (II) cofactor per mole of purified, 32 kDa enzyme which correlates with the maximum expression of enzyme activity. The copper cofactor is bound in a tetragonally distorted, octahedrally coordinated ligand field (Gacheru *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1990, 265:19022-19027). A full length cDNA predicted to encode a protein of 409 amino acids (46 kDa) was first identified within a neonatal rat aorta cDNA λ gt11 expression library using anti-bovine lysyl oxidase antiserum. Human (Hamalainen *et al.*, *Genomics*, 1991, 17:544-548; Mariani *et al.*, *Matrix*, 1992, 12:242-248), chick (Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1992, 267:24199-24206) and mouse (Kenyon *et al.*, *Science*, 1991, 253:802) LO cDNAs have now been cloned and sequenced, revealing the presence of both conserved and divergent sequence elements among the four predicted LO protein sequences.

20 A human cDNA species encoding a predicted lysyl oxidase-like (LOL) protein has been cloned and mapped to chromosome 15q24-q25. The homology of this LOL gene to LO begins at the exon 1-2 boundary in the mouse LO gene (Kenyon *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1993, 268:18435-18437). More recently, a novel cDNA with a predicted protein sequence is 48% homologous to LO and LOL has been identified in senescent human fibroblasts (Saito *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1997, 272:8157-8160). The existence of this series of highly related genes implies the existence of a lysyl oxidase gene family, additional members of which may yet be identified. However, the nature and catalytic function of the expressed protein product of these genes has been documented only for that coding for the known lysyl oxidase enzyme species of connective tissues. Recent studies indicate that LO activity may be modulated by estrogen receptors (Ozasa *et al.*, *Endocrinology*, 1981, 109:618-621; Sanada *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1978,

WO 02/12470

PCT/US01/24942

3

541:408-413).

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a novel LO protein termed EER-7. Nucleic acid sequences, protein sequence, nucleic acid and protein fragments, oligonucleotides, vectors, transformed host cells, and specific EER-7 antibodies are also contemplated by the present invention. Methods of producing the EER-7 protein from transformed host cells and detecting EER-7 protein in a sample are also contemplated. In a preferred embodiment, the protein is mammalian. In a further embodiment the protein is human.

In an alternative embodiment, a polypeptide fragment of an EER-7 protein consists of one to four copies of SRCR domains, a conserved catalytic domain of lysyl oxidase, is specifically recognized with an anti-EER-7 antibody, or any combination thereof.

The present invention also provides for an assay system for identifying selective estrogen receptor ligands, where transformed cells that express different estrogen receptors are present and where the number of cells is sufficient to produce a detectable amount of EER-7 mRNA. In a preferred embodiment, the transformed cells comprise two different populations. A method of identifying selective estrogen receptor ligands using this assay system also is contemplated.

A non-human EER-7 knockout animal, where endogenous EER-7 expression is suppressed in the animal is contemplated by the present invention. Additionally, the present invention further provides for a non-human animal transformed with a vector comprising a nucleic acid encoding a protein that regulates EER-7 expression.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Sequence pair distances of protein alignment, using Clustal method with PAM250 residue weight table, with rabbit EER-7 protein fragments, EER-7 consensus protein, human and mouse WS914, human and mouse LOL, human and mouse LO, and human and mouse EST.

Figure 2. Schematic representation of the sequence similarity of the

WO 02/12470

PCT/US01/24942

4

SRCR and catalytic domains between the EER-7 protein and WS914, LOL, and LO proteins.

Figure 3. Northern blots showing EER-7 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA levels after activation of ER α and ER β receptors in HUVEC cells.

5 **Figure 4.** Structures of compounds 2 and 8.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is based, in part, on discovery of a novel cDNA (EER-7; SEQ ID NO.: 1) whose expression is regulated by estrogen. Human umbilical vein cells, HUVEC, were transformed with a human ER expression vector. Transformed cells in multi-well plates were treated with estrogen or test compounds, and EER-7 mRNA expression was determined with Northern analysis and realtime PCR. Modulation of EER-7 mRNA expression is both ER and ligand dependent. The nucleic acid sequence of EER-7 shows homology to known lysyl oxidase genes. All previously identified lysyl oxidase catalytic domains are present in the EER-7 protein. The catalytic domain of the EER-7 protein is located from about amino acid 530 to about amino acid 756. Furthermore, EER-7 contains four copies of Scavenger Receptor Cysteine Rich (SRCR) domains (named SRCR-1 to SRCR-4), which are proposed to play a role in protein-protein interactions. The amino acids defining the SRCR domains of EER-7 are SRCR-1: about 32 to about 134, SRCR-2: about 163 to about 287, SRCR-3: about 311 to about 411, and SRCR-4: about 421 to about 529. EER-7 shares sequence identity with LO, LOL, WS914 (a novel LOL protein isolated from patient's diagnosed with Warner's Syndrome) and novel EER-7 proteins from other species (*e.g.*, rabbit). Sequence comparison indicates an overall sequence identity from about 10% to about 51%. Comparison of the SRCR domains indicates sequence similarity to WS914 from about 34% to about 64%. Human EER-7 shares about 45% sequence identity of its catalytic domain with the catalytic domains of human LO and LOL.

The present invention also advantageously provides a screening assay for identifying compounds that selectively regulate specific isoforms of the ER by evaluating the effect of test compounds on EER-7 expression. The assay system of the invention is suitable for high throughput screening, *e.g.*, screening thousands of compounds per assay.

The present invention contemplates comparing the EER-7 responses of two

WO 02/12470

PCT/US01/24942

5

cell populations transfected with different ER isoforms when they are contacted with a test compound. A difference in the response of the populations indicates that the test compounds differentially agonize or antagonize different ER isoforms. Such compounds are good leads or candidates for ER-based therapeutics, such as non-feminizing estrogen compounds.

Thus, the present invention advantageously provides EER-7 protein, including fragments, derivatives, and analogs of EER-7; *EER-7* nucleic acids, including oligonucleotide primers and probes, and *EER-7* regulatory sequences; EER-7-specific antibodies; and related methods of using these materials to detect the presence of EER-7 proteins or nucleic acids, EER-7 binding partners, and in screens for agonists and antagonists of EER-7. The following sections of the application, which are delineated by headings (in bold) and sub-headings (in bold italics), which cover these three aspects of the invention, are provided for clarity, and not by way of limitation.

General Definitions

As used herein, the term "isolated" means that the referenced material is removed from the environment in which it is normally found. Thus, an isolated biological material can be free of cellular components, *i.e.*, components of the cells in which the material is found or produced. In the case of nucleic acid molecules, an isolated nucleic acid includes a PCR product, an isolated mRNA, a cDNA, or a restriction fragment. In another embodiment, an isolated nucleic acid is preferably excised from the chromosome in which it may be found, and more preferably is no longer joined to non-regulatory, non-coding regions, or to other genes, located upstream or downstream of the gene contained by the isolated nucleic acid molecule when found in the chromosome. In yet another embodiment, the isolated nucleic acid lacks one or more introns. Isolated nucleic acid molecules include sequences inserted into plasmids, cosmid, artificial chromosomes, and the like. Thus, in a specific embodiment, a recombinant nucleic acid is an isolated nucleic acid. An isolated protein may be associated with other proteins or nucleic acids, or both, with which it associates in the cell, or with cellular membranes if it is a membrane-associated protein. An isolated organelle, cell, or tissue is removed from the anatomical site in which it is found in an organism. An isolated material may be, but need not be, purified.

The term "purified" as used herein refers to material that has been isolated

WO 02/12470

PCT/US01/24942

6

under conditions that reduce or eliminate the presence of unrelated materials, *i.e.*, contaminants, including native materials from which the material is obtained. For example, a purified protein is preferably substantially free of other proteins or nucleic acids with which it is associated in a cell; a purified nucleic acid molecule is preferably substantially free of proteins or other unrelated nucleic acid molecules with which it can be found within a cell. As used herein, the term "substantially free" is used operationally, in the context of analytical testing of the material. Preferably, purified material substantially free of contaminants is at least 50% pure; more preferably, at least 90% pure; and more preferably still at least 99% pure. Purity can be evaluated by chromatography, gel electrophoresis, immunoassay, composition analysis, biological assay, and other methods known in the art.

Methods for purification are well-known in the art. For example, nucleic acids can be purified by precipitation, chromatography (including preparative solid phase chromatography, oligonucleotide hybridization, and triple helix chromatography), ultracentrifugation, and other means. Polypeptides and proteins can be purified by various methods including, without limitation, preparative disc-gel electrophoresis, isoelectric focusing, HPLC, reversed-phase HPLC, gel filtration, ion exchange and partition chromatography, precipitation and salting-out chromatography, extraction, and countercurrent distribution. For some purposes, it is preferable to produce the polypeptide in a recombinant system in which the protein contains an additional sequence tag that facilitates purification, such as, but not limited to, a polyhistidine sequence, or a sequence that specifically binds to an antibody, such as FLAG and GST. The polypeptide can then be purified from a crude lysate of the host cell by chromatography on an appropriate solid-phase matrix. Alternatively, antibodies produced against the protein or against peptides derived therefrom can be used as purification reagents. Cells can be purified by various techniques, including centrifugation, matrix separation (*e.g.*, nylon wool separation), panning and other immunoselection techniques, depletion (*e.g.*, complement depletion of contaminating cells), and cell sorting (*e.g.*, fluorescence activated cell sorting [FACS]). Other purification methods are possible. A purified material may contain less than about 50%, preferably less than about 75%, and most preferably less than about 90%, of the cellular components with which it was originally associated. The "substantially pure" indicates the highest degree of purity which can be achieved using conventional

WO 02/12470

PCT/US01/24942

7

purification techniques known in the art.

In a specific embodiment, the term "about" or "approximately" means within a scientifically acceptable error range for a given value relative to the precision with which the value is or can be measured, *e.g.*, within 20%, preferably within 10%, and more preferably within 5% of a given value or range. Alternatively, particularly with biological systems, the term can mean within an order of magnitude, preferably within 5-fold, and more preferably within 2-fold of a given value.

A "sample" as used herein refers to a biological material which can be tested for the presence of EER-7 protein or *EER-7* nucleic acids. Such samples can be obtained from animal subjects, such as humans and non-human animals, and include tissue, especially muscle, biopsies, blood and blood products; plural effusions; cerebrospinal fluid (CSF); ascites fluid; and cell culture.

Non-human animals include, without limitation, laboratory animals such as mice, rats, rabbits, hamsters, guinea pigs, etc.; domestic animals such as dogs and cats; and, farm animals such as sheep, goats, pigs, horses, and cows.

The use of italics indicates a nucleic acid molecule (*e.g.*, *EER-7* cDNA, gene, etc.); normal text indicates the polypeptide or protein.

The term "selective" refers to the ability of an ER ligand to elicit different responses from different ER isoforms. Stated differently, a selective ER ligand may be a potent agonist for one ER isoform, such as ER α , while agonizing another ER isoform, such as ER β , poorly or not at all. Conversely, a compound can be a potent ER β agonist and a poor ER α agonist. Similarly, ER ligands can differentially antagonize ER isoforms. The present invention advantageously permits dissection of those activities.

The term "ability to elicit a response" refers to the ability of an ER ligand to agonize or antagonize ER activity.

As used herein the term "transformed cell" refers to a modified host cell that expresses a functional estrogen receptor expressed from a vector encoding the estrogen receptor and that can express EER-7. Any cell can be used, preferably a mammalian cell, and more preferably an endothelial cell. In a specific embodiment, the cell is a human umbilical vein cell.

A "functional estrogen receptor" is a receptor that binds estrogen or

WO 02/12470

PCT/US01/24942

8

estrogen analogs and transduces a signal upon such binding. Preferably the ER is a human ER (hER), for example ER α or ER β . Estrogen receptors may be derived from a variety of sources, including mammal, *e.g.*, human, bovine, porcine, and canine; and avian.

The cells of the invention are particularly suitable for an assay system for estrogen receptor ligands that modulate EER-7 mRNA expression. An "assay system" is one or more collections of such cells, *e.g.*, in a microwell plate or some other culture system. To permit evaluation of the effects of a test compound on the cells, the number of cells in a single assay system is sufficient to express a detectable amount of the regulated EER-7 mRNA expression at least under conditions of maximum EER-7 mRNA expression.

A "test compound" is any molecule, such as an estrogen compound, that can be tested for its ability to modulate EER-7 expression through the ER, as set forth herein.

As used herein, the term "provide" refers to supplying the compounds or pharmaceutical compositions of the present invention to an animal, preferably a human, in any form. For example, a prodrug form of the compounds may be provided the subject, which then is metabolized to the compound in the body.

EER-7

EER-7 protein, as defined herein, refers to a polypeptide having about 756 amino acids. In a specific embodiment, human EER-7 has 740 amino acids. EER-7 can have a molecular weight of about 82.6 kilo-Daltons (kDa), as measured by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. EER-7 gene has significant homology with other LO oxidase genes. Thus, EER-7 refers to a protein having greater than about 60%, preferably greater than 80%, more preferably still greater than 90%, and even more preferably greater than 95% overall sequence identity to SEQ ID NO: 2. In a specific embodiment, EER-7 has amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 2. Since EER-7 contains a secretory leader sequence and no identifiable transmembrane regions, EER-7 is proposed to be a secreted protein. EER-7 is comprised of four SRCR domains and a catalytic domain. SRCR domains target proteins to specific extracellular targets.

Sequence comparison studies between human EER-7 protein and LO, LOL,

WO 02/12470

PCT/US01/24942

9

WS914, and EER-7 proteins from other species, indicates values of sequence similarity ranging from 7% and 51% (see Figure 1). Human EER-7 protein shares an overall 18% percent sequence similarity to human LO protein. Since LO does not contain the SRCR domains, comparison of only the catalytic domains of EER-7 (SEQ ID NO: 7) and LO indicates a 46% sequence similarity (See Figure 2). The catalytic domain of EER-7 also shares 46% and 66% sequence similarity to the catalytic domains of human LOL and WS914, respectively. Comparison of the four SRCR domains in EER-7 to those present in WS914, show that sequence similarity varies between domains. SRCR domains 1, 3, and 4 (SEQ ID NOs: 3, 4 and 6) in EER-7 share about 60% sequence similarity to the same domains in WS914, while SRCR-2 (SEQ ID NO: 5) shares about 34% sequence similarity.

EER-7, like other members of the lysyl oxidase enzymes class of copper amino oxidases, initiates cross-linking between and within units of elastin and collagen. Stimulation of lysyl-oxidase enzyme activity of EER-7 can be a target for treatment of AAAs and myocardial infarctions. Tropoelastin is a substrate for lysyl oxidase and increased EER-7 lysyl oxidase activity increases elastin cross-linking. Increased elastin cross-linking in the inner elastic lamina prevents development of aneurysms. Increased EER-7 lysyl oxidase activity also would increase the number of collagen cross linkings and thus increase the tensile strength of the vessel wall, which also may prevent an aneurysm. Myocardial infarctions may be prevented by inhibiting the rupture of the fibrous cap that covers plaque in the coronary vessels. Increased tensile strength of the cap, resulting from increased lysyl oxidase activity, can help prevent the infarctions. Additionally, inhibition of LO activity has been implicated in treatment of fibrotic diseases.

EER-7 fragments, derivatives, and analogs can be characterized by one or more of the characteristics of EER-7 protein. For example, an EER-7 fragment, also termed herein an EER-7 peptide or polypeptide, can have an amino acid sequence corresponding to a homology region of lysyl oxidase protein, and in particular one of the fragments having SEQ ID NOs: 3-7. In a specific embodiment, in order to develop the specific C-terminal and N-terminal EER-7 antibodies, antibodies can be raised against either of the two halves of EER-7 protein, or antigenic peptides of each half.

Analog and derivatives of EER-7 of the invention have the same or

WO 02/12470

PCT/US01/24942

10

homologous characteristics of EER-7 as set forth above. For example, a truncated form of EER-7 can be provided. Such a truncated form includes EER-7 with a either an N-terminal, C-terminal, or internal deletion. In a specific embodiment, the derivative is functionally active, *i.e.*, capable of exhibiting one or more functional activities associated with a full-length, wild-type EER-7 of the invention. Such functions include participating in formulation of covalent cross-links in collagen and/or elastin. Alternatively, an EER-7 chimeric fusion protein can be prepared in which the EER-7 portion of the fusion protein has one or more characteristics of EER-7. Such fusion proteins include fusions of EER-7 polypeptide with a marker polypeptide, such as FLAG, a histidine tag, a myc tag, or glutathione-S-transferase (GST). Alternatively, EER-7 can be fused with an expression-related peptide, such as yeast α -mating factor, a heterogeneous signal peptide, or a peptide that renders EER-7 more stable upon expression. EER-7 can also be fused with a unique phosphorylation site for labeling. In another embodiment, EER-7 can be expressed as a fusion with a bacterial protein, such as β -galactosidase.

EER-7 analogs can be made by altering encoding nucleic acid sequences by substitutions, additions or deletions that provide for functionally similar molecules, *i.e.*, molecules that perform one or more EER-7 functions. In a specific embodiment, an analog of EER-7 is a sequence-conservative variant of EER-7. In another embodiment, an analog of EER-7 is a function-conservative variant. In yet another embodiment, an analog of EER-7 is an allelic variant or a homologous variant from another species. In a specific embodiment, human variants of EER-7 are described.

EER-7 derivatives include, but are by no means limited to, phosphorylated EER-7, myristylated EER-7, methylated EER-7, and other EER-7 proteins that are otherwise chemically modified. EER-7 derivatives also include labeled variants, *e.g.*, radio-labeled with iodine (or, as pointed out above, phosphorous); a detectable molecule, such as but by no means limited to biotin, a chelating group complexed with a metal ion, a chromophore or fluorophore, a gold colloid, or a particle such as a latex bead; or attached to a water soluble polymer.

Chemical modification of biologically active component or components of EER-7 may provide additional advantages under certain circumstances, such as increasing the stability and circulation time of the component or components and decreasing immunogenicity (see U.S. Patent No. 4,179,337, Davis *et al.*, issued December 18, 1979;

WO 02/12470

PCT/US01/24942

11

for a review, see Abuchowski *et al.*, in *Enzymes as Drugs*, J.S. Holcerberg and J. Roberts, eds. 1981, pp. 367-383). A review article describes protein modification and fusion proteins (Francis, 1992, *Focus on Growth Factors 3:4-10*, Mediscript: Mountview Court, Friern Barnet Lane, London N20, OLD, UK).

5 The chemical moieties suitable for derivatization may be selected from among water soluble polymers. The polymer selected should be water soluble so that the component to which it is attached does not precipitate in an aqueous environment, such as a physiological environment. Preferably, for therapeutic use of the end-product preparation, the polymer will be pharmaceutically acceptable. One skilled in the art will
10 be able to select the desired polymer based on such considerations as whether the polymer/component conjugate will be used therapeutically, and if so, the desired dosage, circulation time, resistance to proteolysis, and other considerations. For the present component or components, these may be ascertained using the assays provided herein.

The water soluble polymer may be selected from the group consisting of,
15 for example, polyethylene glycol (PEG), copolymers of ethylene glycol/propylene glycol, carboxymethylcellulose, dextran, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, poly-1,3-dioxolane, poly-1,3,6-trioxane, ethylene/maleic anhydride copolymer, polyaminoacids (either homopolymers or random copolymers), and dextran or poly(n-vinyl pyrrolidone)polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers,
20 polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols and polyvinyl alcohol. Polyethylene glycol propionaldehyde may have advantages in manufacturing due to its stability in water. PEGylation of proteins is a well established technique to increase half-life *in vivo* and ensure biological activity.

Cloning and Expression of EER-7

25 The present invention contemplates analysis and isolation of a gene encoding a functional or mutant EER-7, including a full length, or naturally occurring form of EER-7, and any antigenic fragments thereof from any source, preferably human. It further contemplates expression of functional or mutant EER-7 protein for evaluation, diagnosis, or therapy.

30 In accordance with the present invention there may be employed

WO 02/12470

PCT/US01/24942

12

conventional molecular biology, microbiology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein "Sambrook *et al.*, 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B.Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Molecular Biology - Definitions

"Amplification" of DNA as used herein denotes the use of polymerase chain reaction (PCR) to increase the concentration of a particular DNA sequence within a mixture of DNA sequences. For a description of PCR see Saiki *et al.*, Science, 239:487, 1988.

As used herein, "sequence-specific oligonucleotides" refers to related sets of oligonucleotides that can be used to detect allelic variations or mutations in the EER-7 gene.

A "nucleic acid molecule" refers to the phosphate ester polymeric form of ribonucleosides (adenosine, guanosine, uridine or cytidine; "RNA molecules") or deoxyribonucleosides (deoxyadenosine, deoxyguanosine, deoxythymidine, or deoxycytidine; "DNA molecules"), or any phosphoester analogs thereof, such as phosphorothioates and thioesters, in either single stranded form, or a double-stranded helix. Double stranded DNA-DNA, DNA-RNA and RNA-RNA helices are possible. The term nucleic acid molecule, and in particular DNA or RNA molecule, refers only to the primary and secondary structure of the molecule, and does not limit it to any particular tertiary forms. Thus, this term includes double-stranded DNA found, *inter alia*, in linear (e.g., restriction fragments) or circular DNA molecules, plasmids, and chromosomes. In discussing the structure of particular double-stranded DNA molecules, sequences may be described herein according to the normal convention of giving only the sequence in the 5' to 3' direction along the nontranscribed strand of DNA (*i.e.*, the strand having a sequence

WO 02/12470

PCT/US01/24942

13

homologous to the mRNA). A "recombinant DNA molecule" is a DNA molecule that has undergone a molecular biological manipulation.

A "polynucleotide" or "nucleotide sequence" is a series of nucleotide bases (also called "nucleotides") in DNA and RNA, and means any chain of two or more nucleotides. A nucleotide sequence typically carries genetic information, including the information used by cellular machinery to make proteins and enzymes. These terms include double or single stranded genomic and cDNA, RNA, any synthetic and genetically manipulated polynucleotide, and both sense and anti-sense polynucleotide (although only sense strands are being represented herein). This includes single- and double-stranded molecules, *i.e.*, DNA-DNA, DNA-RNA and RNA-RNA hybrids, as well as "protein nucleic acids" (PNA) formed by conjugating bases to an amino acid backbone. This also includes nucleic acids containing modified bases, for example thio-uracil, thio-guanine and fluoro-uracil.

The polynucleotides herein may be flanked by natural regulatory (expression control) sequences, or may be associated with heterologous sequences, including promoters, internal ribosome entry sites (IRES) and other ribosome binding site sequences, enhancers, response elements, suppressors, signal sequences, polyadenylation sequences, introns, 5'- and 3'- non-coding regions, and the like. The nucleic acids may also be modified by many means known in the art. Non-limiting examples of such modifications include methylation, "caps", substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analog, and internucleotide modifications such as, for example, those with uncharged linkages (*e.g.*, methyl phosphonates, phosphotriesters, phosphoramidates, carbamates, etc.) and with charged linkages (*e.g.*, phosphorothioates, phosphorodithioates, etc.). Polynucleotides may contain one or more additional covalently linked moieties, such as, for example, proteins (*e.g.*, nucleases, toxins, antibodies, signal peptides, poly-L-lysine, etc.), intercalators (*e.g.*, acridine, psoralen, etc.), chelators (*e.g.*, metals, radioactive metals, iron, oxidative metals, etc.), and alkylators. The polynucleotides may be derivatized by formation of a methyl or ethyl phosphotriester or an alkyl phosphoramidate linkage. Furthermore, the polynucleotides herein may also be modified with a label capable of providing a detectable signal, either directly or indirectly. Exemplary labels include radioisotopes, fluorescent molecules, biotin, and the like.

The term "host cell" means any cell of any organism that is selected,

WO 02/12470

PCT/US01/24942

14

modified, transformed, grown, or used or manipulated in any way, for the production of a substance by the cell, for example the expression by the cell of a gene, a DNA or RNA sequence, a protein or an enzyme. Host cells can further be used for screening or other assays, as described *infra*.

5 Proteins and enzymes are made in the host cell using instructions in DNA and RNA, according to the genetic code. Generally, a DNA sequence having instructions for a particular protein or enzyme is "transcribed" into a corresponding sequence of RNA. The RNA sequence in turn is "translated" into the sequence of amino acids which form the protein or enzyme. An "amino acid sequence" is any chain of two or more amino acids.
10 Each amino acid is represented in DNA or RNA by one or more triplets of nucleotides. Each triplet forms a codon, corresponding to an amino acid. For example, the amino acid lysine (Lys) can be coded by the nucleotide triplet or codon AAA or by the codon AAG. (The genetic code has some redundancy, also called degeneracy, meaning that most amino acids have more than one corresponding codon.) Because the nucleotides in DNA and
15 RNA sequences are read in groups of three for protein production, it is important to begin reading the sequence at the correct amino acid, so that the correct triplets are read. The way that a nucleotide sequence is grouped into codons is called the "reading frame."

A "coding sequence" or a sequence "encoding" an expression product, such as a RNA, polypeptide, protein, or enzyme, is a nucleotide sequence that, when expressed,
20 results in the production of that RNA, polypeptide, protein, or enzyme, *i.e.*, the nucleotide sequence encodes an amino acid sequence for that polypeptide, protein or enzyme. A coding sequence for a protein may include a start codon (usually ATG) and a stop codon.

The term "gene", also called a "structural gene" means a DNA sequence that codes for or corresponds to a particular sequence of amino acids which comprise all or
25 part of one or more proteins or enzymes, and may or may not include introns and regulatory DNA sequences, such as promoter sequences, 5'-untranslated region, or 3'-untranslated region which affect for example the conditions under which the gene is expressed. Some genes, which are not structural genes, may be transcribed from DNA to RNA, but are not translated into an amino acid sequence. Other genes may function as
30 regulators of structural genes or as regulators of DNA transcription.

A "promoter sequence" is a DNA regulatory region capable of binding

WO 02/12470

PCT/US01/24942

15

RNA polymerase in a cell and initiating transcription of a downstream (3' direction) coding sequence. For purposes of defining the present invention, the promoter sequence is bounded at its 3' terminus by the transcription initiation site and extends upstream (5' direction) to include the minimum number of bases or elements necessary to initiate transcription at levels detectable above background. Within the promoter sequence will be found a transcription initiation site (conveniently defined for example, by mapping with nuclease S1), as well as protein binding domains (consensus sequences) responsible for the binding of RNA polymerase.

A coding sequence is "under the control of" or "operatively associated with" transcriptional and translational control sequences in a cell when RNA polymerase transcribes the coding sequence into mRNA, which is then trans-RNA spliced (if it contains introns) and translated, in the case of mRNA, into the protein encoded by the coding sequence.

The terms "express" and "expression" mean allowing or causing the information in a gene or DNA sequence to become manifest, for example producing a protein by activating the cellular functions involved in transcription and translation of a corresponding gene or DNA sequence. A DNA sequence is expressed in or by a cell to form an "expression product" such as a protein. The expression product itself, *e.g.* the resulting protein, may also be said to be "expressed" by the cell. An expression product can be characterized as intracellular, extracellular or secreted. The term "intracellular" means something that is inside a cell. The term "extracellular" means something that is outside a cell. A substance is "secreted" by a cell if it appears in significant measure outside the cell, from somewhere on or inside the cell.

The term "transfection" means the introduction of a foreign nucleic acid into a cell. The term "transformation" means the introduction of a "foreign" (*i.e.* extrinsic or extracellular) gene, DNA or RNA sequence to a host cell, so that the host cell will express the introduced gene or sequence to produce a desired substance, typically a protein or enzyme coded by the introduced gene or sequence. The introduced gene or sequence may also be called a "cloned" or "foreign" gene or sequence, may include regulatory or control sequences, such as start, stop, promoter, signal, secretion, or other sequences used by a cell's genetic machinery. The gene or sequence may include nonfunctional sequences or sequences with no known function. A host cell that receives and expresses introduced

WO 02/12470

PCT/US01/24942

16

DNA or RNA has been "transformed" and is a "transformant" or a "clone." The DNA or RNA introduced to a host cell can come from any source, including cells of the same genus or species as the host cell, or cells of a different genus or species.

5 The terms "vector", "cloning vector" and "expression vector" mean the vehicle by which a DNA or RNA sequence (*e.g.* a foreign gene) can be introduced into a host cell, so as to transform the host and promote expression (*e.g.* transcription and translation) of the introduced sequence. Vectors include plasmids, phages, viruses, etc.; they are discussed in greater detail below.

10 Vectors typically comprise the DNA of a transmissible agent, into which foreign DNA is inserted. A common way to insert one segment of DNA into another segment of DNA involves the use of enzymes called restriction enzymes that cleave DNA at specific sites (specific groups of nucleotides) called restriction sites. A "cassette" refers to a DNA coding sequence or segment of DNA that codes for an expression product that can be inserted into a vector at defined restriction sites. The cassette restriction sites are
15 designed to ensure insertion of the cassette in the proper reading frame. Generally, foreign DNA is inserted at one or more restriction sites of the vector DNA, and then is carried by the vector into a host cell along with the transmissible vector DNA. A segment or sequence of DNA having inserted or added DNA, such as an expression vector, can also be called a "DNA construct." A common type of vector is a "plasmid", which generally is
20 a self-contained molecule of double-stranded DNA, usually of bacterial origin, that can readily accept additional (foreign) DNA and which can readily introduced into a suitable host cell. A plasmid vector often contains coding DNA and promoter DNA and has one or more restriction sites suitable for inserting foreign DNA. Coding DNA is a DNA sequence that encodes a particular amino acid sequence for a particular protein or enzyme.
25 Promoter DNA is a DNA sequence which initiates, regulates, or otherwise mediates or controls the expression of the coding DNA. Promoter DNA and coding DNA may be from the same gene or from different genes, and may be from the same or different organisms. A large number of vectors, including plasmid and fungal vectors, have been described for replication and/or expression in a variety of eukaryotic and prokaryotic
30 hosts. Non-limiting examples include pKK plasmids (Clontech), pUC plasmids, pET plasmids (Novagen, Inc., Madison, WI), pRSET or pREP plasmids (Invitrogen, San Diego, CA), or pMAL plasmids (New England Biolabs, Beverly, MA), and many

WO 02/12470

PCT/US01/24942

17

appropriate host cells, using methods disclosed or cited herein or otherwise known to those skilled in the relevant art. Recombinant cloning vectors will often include one or more replication systems for cloning or expression, one or more markers for selection in the host, *e.g.* antibiotic resistance, and one or more expression cassettes.

5 The term "expression system" means a host cell and compatible vector under suitable conditions, *e.g.* for the expression of a protein coded for by foreign DNA carried by the vector and introduced to the host cell. Common expression systems include *E. coli* host cells and plasmid vectors, insect host cells and *Baculovirus* vectors, and mammalian host cells and vectors.

10 The term "heterologous" refers to a combination of elements not naturally occurring. For example, heterologous DNA refers to DNA not naturally located in the cell, or in a chromosomal site of the cell. Preferably, the heterologous DNA includes a gene foreign to the cell. A heterologous expression regulatory element is such an element operatively associated with a different gene than the one it is operatively associated with in
15 nature. In the context of the present invention, an *EER-7* gene is heterologous to the vector DNA in which it is inserted for cloning or expression, and it is heterologous to a host cell containing such a vector, in which it is expressed, *e.g.*, a HUVEC cell.

 The terms "mutant" and "mutation" mean any detectable change in genetic material, *e.g.* DNA, or any process, mechanism, or result of such a change. This includes
20 gene mutations, in which the structure (*e.g.* DNA sequence) of a gene is altered, any gene or DNA arising from any mutation process, and any expression product (*e.g.* protein or enzyme) expressed by a modified gene or DNA sequence. The term "variant" may also be used to indicate a modified or altered gene, DNA sequence, enzyme, cell, etc., *i.e.*, any kind of mutant.

25 "Sequence-conservative variants" of a polynucleotide sequence are those in which a change of one or more nucleotides in a given codon position results in no alteration in the amino acid encoded at that position.

 "Function-conservative variants" are those in which a given amino acid residue in a protein or enzyme has been changed without altering the overall conformation
30 and function of the polypeptide, including, but not limited to, replacement of an amino acid with one having similar properties (such as, for example, polarity, hydrogen bonding potential, acidic, basic, hydrophobic, aromatic, and the like). Amino acids with similar

WO 02/12470

PCT/US01/24942

18

properties are well known in the art. For example, arginine, histidine and lysine are hydrophilic-basic amino acids and may be interchangeable. Similarly, isoleucine, a hydrophobic amino acid, may be replaced with leucine, methionine or valine. Such changes are expected to have little or no effect on the apparent molecular weight or isoelectric point of the protein or polypeptide. Amino acids other than those indicated as conserved may differ in a protein or enzyme so that the percent protein or amino acid sequence similarity between any two proteins of similar function may vary and may be, for example, from 70% to 99% as determined according to an alignment scheme such as by the Cluster Method, wherein similarity is based on the MEGALIGN algorithm. A "function-conservative variant" also includes a polypeptide or enzyme which has at least 60 % amino acid identity as determined by BLAST or FASTA algorithms, preferably at least 75%, most preferably at least 85%, and even more preferably at least 90%, and which has the same or substantially similar properties or functions as the native or parent protein or enzyme to which it is compared.

As used herein, the term "homologous" in all its grammatical forms and spelling variations refers to the relationship between proteins that possess a "common evolutionary origin," including proteins from superfamilies (*e.g.*, the immunoglobulin superfamily) and homologous proteins from different species (*e.g.*, myosin light chain, etc.) (Reeck *et al.*, Cell 50:667, 1987). Such proteins (and their encoding genes) have sequence homology, as reflected by their sequence similarity, whether in terms of percent similarity or the presence of specific residues or motifs at conserved positions.

Accordingly, the term "sequence similarity" in all its grammatical forms refers to the degree of identity or correspondence between nucleic acid or amino acid sequences of proteins that may or may not share a common evolutionary origin (*see* Reeck *et al.*, *supra*). However, in common usage and in the instant application, the term "homologous," when modified with an adverb such as "highly," may refer to sequence similarity and may or may not relate to a common evolutionary origin.

In a specific embodiment, two DNA sequences are "substantially homologous" or "substantially similar" when at least about 80%, and most preferably at least about 90 or 95% of the nucleotides match over the defined length of the DNA sequences, as determined by sequence comparison algorithms, such as BLAST, FASTA, DNA Strider, etc. An example of such a sequence is an allelic or species variant of the

WO 02/12470

PCT/US01/24942

19

specific *EER-7* gene of the invention. Sequences that are substantially homologous can be identified by comparing the sequences using standard software available in sequence data banks, or in a Southern hybridization experiment under, for example, stringent conditions as defined for that particular system.

5 Similarly, in a particular embodiment, two amino acid sequences are "substantially homologous" or "substantially similar" when greater than 80% of the amino acids are identical, or greater than about 90% are similar (functionally identical). Preferably, the similar or homologous sequences are identified by alignment using, for example, the GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin) pileup program, or any of the programs described above
10 (BLAST, FASTA, etc.).

A nucleic acid molecule is "hybridizable" to another nucleic acid molecule, such as a cDNA, genomic DNA, or RNA, when a single stranded form of the nucleic acid molecule can anneal to the other nucleic acid molecule under the appropriate conditions of
15 temperature and solution ionic strength (*see* Sambrook *et al.*, *supra*). The conditions of temperature and ionic strength determine the "stringency" of the hybridization. For preliminary screening for homologous nucleic acids, low stringency hybridization conditions, corresponding to a T_m (melting temperature) of 55°C, can be used, *e.g.*, 5x SSC, 0.1% SDS, 0.25% milk, and no formamide; or 30% formamide, 5x SSC, 0.5% SDS.
20 Moderate stringency hybridization conditions correspond to a higher T_m , *e.g.*, 40% formamide, with 5x or 6x SSC. High stringency hybridization conditions correspond to the highest T_m , *e.g.*, 50% formamide, 5x or 6x SSC. SSC is a 0.15M NaCl, 0.015M Na-citrate solution. Hybridization requires that the two nucleic acids contain complementary sequences, although depending on the stringency of the hybridization,
25 mismatches between bases are possible. The appropriate stringency for hybridizing nucleic acids depends on the length of the nucleic acids and the degree of complementation, variables well known in the art. The greater the degree of similarity or homology between two nucleotide sequences, the greater the value of T_m for hybrids of nucleic acids having those sequences. The relative stability (corresponding to higher T_m)
30 of nucleic acid hybridizations decreases in the following order: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. For hybrids of greater than 100 nucleotides in length, equations for calculating T_m have been derived (*see* Sambrook *et al.*, *supra*, 9.50-9.51). For

WO 02/12470

PCT/US01/24942

20

hybridization with shorter nucleic acids, *i.e.*, oligonucleotides, the position of mismatches becomes more important, and the length of the oligonucleotide determines its specificity (*see* Sambrook *et al.*, *supra*, 11.7-11.8). A minimum length for a hybridizable nucleic acid is at least about 10 nucleotides; preferably at least about 15 nucleotides; and more preferably the length is at least about 20 nucleotides.

In a specific embodiment, the term "standard hybridization conditions" refers to a T_m of 55°C, and utilizes conditions as set forth above. In a preferred embodiment, the T_m is 60°C; in a more preferred embodiment, the T_m is 65°C. In a specific embodiment, "high stringency" refers to hybridization and/or washing conditions at 68°C in 0.2x SSC, at 42°C in 50% formamide, 4xSSC, or under conditions that afford levels of hybridization equivalent to those observed under either of these two conditions.

As used herein, the term "oligonucleotide" refers to a nucleic acid, generally of at least 10, preferably at least 15, and more preferably at least 20 nucleotides, preferably no more than 100 nucleotides, that is hybridizable to a genomic DNA molecule, a cDNA molecule, or an mRNA molecule encoding a gene, mRNA, cDNA, or other nucleic acid of interest. Oligonucleotides can be labeled, *e.g.*, with ^{32}P -nucleotides or nucleotides to which a label, such as biotin, has been covalently conjugated. In one embodiment, a labeled oligonucleotide can be used as a probe to detect the presence of a nucleic acid. In another embodiment, oligonucleotides (one or both of which may be labeled) can be used as PCR primers, either for cloning full length or a fragment of EER-7, or to detect the presence of nucleic acids encoding EER-7. In a further embodiment, an oligonucleotide of the invention can form a triple helix with a EER-7 DNA molecule. Generally, oligonucleotides are prepared synthetically, preferably on a nucleic acid synthesizer. Accordingly, oligonucleotides can be prepared with non-naturally occurring phosphoester analog bonds, such as thioester bonds, etc.

The present invention provides antisense nucleic acids (including ribozymes), which may be used to inhibit expression of EER-7 of the invention, particularly to suppress EER-7 effects on collagen cross-linking. An "antisense nucleic acid" is a single stranded nucleic acid molecule which, on hybridizing under cytoplasmic conditions with complementary bases in an RNA or DNA molecule, inhibits the latter's role. If the RNA is a messenger RNA transcript, the antisense nucleic acid is a countertranscript or mRNA-interfering complementary nucleic acid. As presently used,

WO 02/12470

PCT/US01/24942

21

"antisense" broadly includes RNA-RNA interactions, RNA-DNA interactions, ribozymes and RNase-H mediated arrest. Antisense nucleic acid molecules can be encoded by a recombinant gene for expression in a cell (*e.g.*, U.S. Patent No. 5,814,500; U.S. Patent No. 5,811,234), or alternatively they can be prepared synthetically (*e.g.*, U.S. Patent No. 5,780,607).

Specific non-limiting examples of synthetic oligonucleotides envisioned for this invention include oligonucleotides that contain phosphorothioates, phosphotriesters, methyl phosphonates, short chain alkyl, or cycloalkyl intersugar linkages or short chain heteroatomic or heterocyclic intersugar linkages. Most preferred are those with $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2$ and $\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2$ backbones (where phosphodiester is $\text{O-PO}_2\text{-O-CH}_2$). U.S. Patent No. 5,677,437 describes heteroaromatic oligonucleoside linkages. Nitrogen linkers or groups containing nitrogen can also be used to prepare oligonucleotide mimics (U.S. Patents No. 5,792,844 and No. 5,783,682). U.S. Patent No. 5,637,684 describes phosphoramidate and phosphorothioamidate oligomeric compounds. Also envisioned are oligonucleotides having morpholino backbone structures (U.S. Patent No. 5,034,506). In other embodiments, such as the peptide-nucleic acid (PNA) backbone, the phosphodiester backbone of the oligonucleotide may be replaced with a polyamide backbone, the bases being bound directly or indirectly to the aza nitrogen atoms of the polyamide backbone (Nielsen *et al.*, Science 254:1497, 1991). Other synthetic oligonucleotides may contain substituted sugar moieties comprising one of the following at the 2' position: OH, SH, SCH_3 , F, OCN, $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{NH}_2$ or $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$ where n is from 1 to about 10; C_1 to C_{10} lower alkyl, substituted lower alkyl, alkaryl or aralkyl; Cl; Br; CN; CF_3 ; OCF_3 ; O-; S-; or N-alkyl; O-, S-, or N-alkenyl; SOCH_3 ; SO_2CH_3 ; ONO_2 ; NO_2 ; N_3 ; NH_2 ; heterocycloalkyl; heterocycloalkaryl; aminoalkylamino; polyalkylamino; substituted silyl; a fluorescein moiety; an RNA cleaving group; a reporter group; an intercalator; a group for improving the pharmacokinetic properties of an oligonucleotide; or a group for improving the pharmacodynamic properties of an oligonucleotide, and other substituents having similar properties. Oligonucleotides may also have sugar mimetics such as cyclobutyls or other carbocyclics in place of the pentofuranosyl group. Nucleotide units having nucleosides

other than adenosine, cytidine, guanosine, thymidine and uridine, such as inosine, may be

WO 02/12470

PCT/US01/24942

22

used in an oligonucleotide molecule.

EER-7 Nucleic Acids

A gene encoding EER-7, whether genomic DNA or cDNA, can be isolated from any source, particularly from a human cDNA or genomic library. Methods for obtaining EER-7 gene are well known in the art, as described above (see, e.g., Sambrook *et al.*, 1989, *supra*). The DNA may be obtained by standard procedures known in the art from cloned DNA (e.g., a DNA "library"), and preferably is obtained from a cDNA library prepared from tissues with high level expression of the protein, by chemical synthesis, by cDNA cloning, or by the cloning of genomic DNA, or fragments thereof, purified from the desired cell (See, for example, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*; Glover, D.M. (ed.), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II). Clones derived from genomic DNA may contain regulatory and intron DNA regions in addition to coding regions; clones derived from cDNA will not contain intron sequences. Whatever the source, the gene should be molecularly cloned into a suitable vector for propagation of the gene. Identification of the specific DNA fragment containing the desired EER-7 gene may be accomplished in a number of ways. For example, a portion of an EER-7 gene exemplified *infra* can be purified and labeled to prepare a labeled probe, and the generated DNA may be screened by nucleic acid hybridization to the labeled probe (Benton and Davis, Science 196:180, 1977; Grunstein and Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3961, 1975). Those DNA fragments with substantial homology to the probe, such as an allelic variant from another individual, will hybridize. In a specific embodiment, highest stringency hybridization conditions are used to identify a homologous EER-7 gene.

Further selection can be carried out on the basis of the properties of the gene, e.g., if the gene encodes a protein product having the isoelectric, electrophoretic, amino acid composition, partial or complete amino acid sequence, antibody binding activity, or ligand binding profile of EER-7 protein as disclosed herein. Thus, the presence of the gene may be detected by assays based on the physical, chemical, immunological, or functional properties of its expressed product.

Other DNA sequences which encode substantially the same amino acid sequence as an EER-7 gene may be used in the practice of the present invention. These

WO 02/12470

PCT/US01/24942

23

include but are not limited to allelic variants, species variants, sequence conservative variants, and functional variants.

Amino acid substitutions may also be introduced to substitute an amino acid with a particularly preferable property. For example, a Cys may be introduced a potential site for disulfide bridges with another Cys.

The genes encoding *EER-7* derivatives and analogs of the invention can be produced by various methods known in the art. The manipulations which result in their production can occur at the gene or protein level. For example, the cloned *EER-7* gene sequence can be modified by any of numerous strategies known in the art (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*). The sequence can be cleaved at appropriate sites with restriction endonuclease(s), followed by further enzymatic modification if desired, isolated, and ligated *in vitro*. In the production of the gene encoding a derivative or analog of *EER-7*, care should be taken to ensure that the modified gene remains within the same translational reading frame as the *EER-7* gene, uninterrupted by translational stop signals, in the gene region where the desired activity is encoded.

Additionally, the *EER-7*-encoding nucleic acid sequence can be mutated *in vitro* or *in vivo*, to create and/or destroy translation, initiation, and/or termination sequences, or to create variations in coding regions and/or form new restriction endonuclease sites or destroy preexisting ones, to facilitate further *in vitro* modification. Such modifications can be made to introduce restriction sites and facilitate cloning the *EER-7* gene into an expression vector. Any technique for mutagenesis known in the art can be used, including but not limited to, *in vitro* site-directed mutagenesis (Hutchinson, C., *et al.*, J. Biol. Chem. 253:6551, 1978; Zoller and Smith, DNA 3:479-488, 1984; Oliphant *et al.*, Gene 44:177, 1986; Hutchinson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:710, 1986), use of TAB[®] linkers (Pharmacia), etc. PCR techniques are preferred for site directed mutagenesis (see Higuchi, 1989, "Using PCR to Engineer DNA", in *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H. Erlich, ed., Stockton Press, Chapter 6, pp. 61-70).

The identified and isolated gene can then be inserted into an appropriate cloning vector. A large number of vector-host systems known in the art may be used. Possible vectors include, but are not limited to, plasmids or modified viruses, but the vector system must be compatible with the host cell used. Examples of vectors include,

WO 02/12470

PCT/US01/24942

24

but are not limited to, *E. coli*, bacteriophages such as lambda derivatives, or plasmids such as pBR322 derivatives or pUC plasmid derivatives, e.g., pGEX vectors, pnal-c, pFLAG, etc. The insertion into a cloning vector can, for example, be accomplished by ligating the DNA fragment into a cloning vector which has complementary cohesive termini.

5 However, if the complementary restriction sites used to fragment the DNA are not present in the cloning vector, the ends of the DNA molecules may be enzymatically modified. Alternatively, any site desired may be produced by ligating nucleotide sequences (linkers) onto the DNA termini; these ligated linkers may comprise specific chemically synthesized oligonucleotides encoding restriction endonuclease recognition sequences. In addition, 10 simple PCR or overlapping PCR may be used to insert a fragment into a cloning vector.

Recombinant molecules can be introduced into host cells via transformation, transfection, infection, electroporation, etc., so that many copies of the gene sequence are generated. Preferably, the cloned gene is contained on a shuttle vector plasmid, which provides for expansion in a cloning cell, e.g., *E. coli*, and facile 15 purification for subsequent insertion into an appropriate expression cell line, if such is desired. For example, a shuttle vector, which is a vector that can replicate in more than one type of organism, can be prepared for replication in both *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by linking sequences from an *E. coli* plasmid with sequences from the yeast 2μ plasmid.

EER-7 Regulatory Nucleic Acids

20 Elements of the *EER-7* promoter can be identified by scanning the human genomic region upstream of the *EER-7* start site, e.g., by creating deletion mutants and checking for expression, or with the TRANSFAC algorithm. Sequences up to about 6 to about 10 kilobases (kb) or more upstream from the *EER-7* start site can contain 25 tissue-specific regulatory elements.

The term "*EER-7* promoter" encompasses artificial promoters. Such promoters can be prepared by deleting nonessential intervening sequences from the upstream region of the *EER-7* promoter, or by joining upstream regulatory elements from the *EER-7* promoter with a heterologous minimal promoter, such as the CMV immediate 30 early promoter.

An *EER-7* promoter can be operably associated with a heterogenous coding sequence, e.g., for reporter gene (luciferase and green fluorescent proteins are examples of

WO 02/12470

PCT/US01/24942

25

reporter genes) in a construct. This construct will result in expression of the heterologous coding sequence under control the *EER-7* promoter, *e.g.*, a reporter gene can be expressed, under conditions that under normal conditions cause *EER-7* expression. This construct can be used in screening assays, described below, for estrogen receptor agonists and

5

antagonists.

Expression of EER-7 Polypeptides

The nucleotide sequence coding for *EER-7*, or antigenic fragment, derivative or analog thereof, or a functionally active derivative, including a chimeric protein, thereof, can be inserted into an appropriate expression vector, *i.e.*, a vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted protein-coding sequence. Thus, a nucleic acid encoding *EER-7* of the invention can be operationally associated with a promoter in an expression vector of the invention. Both cDNA and genomic sequences can be cloned and expressed under control of such regulatory sequences. Such vectors can be used to express functional or functionally inactivated *EER-7* polypeptides.

10

15

The necessary transcriptional and translational signals can be provided on a recombinant expression vector, or they may be supplied by the native gene encoding *EER-7* and/or its flanking regions.

Potential host-vector systems include but are not limited to mammalian cell systems transfected with expression plasmids or infected with virus (*e.g.*, vaccinia virus, adenovirus, adeno-associated virus, herpes virus, etc.); insect cell systems infected with virus (*e.g.*, baculovirus); microorganisms such as yeast containing yeast vectors; or bacteria transformed with bacteriophage, DNA, plasmid DNA, or cosmid DNA. The expression elements of vectors vary in their strengths and specificities. Depending on the host-vector system utilized, any one of a number of suitable transcription and translation elements may be used.

20

25

Expression of *EER-7* protein may be controlled by any promoter/enhancer element known in the art, but these regulatory elements must be functional in the host selected for expression. Promoters which may be used to control *EER-7* gene expression include, but are not limited to, cytomegalovirus (CMV) promoter (U.S. Patent Nos. 5,385,839 and 5,168,062), the SV40 early promoter region (Benoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310), the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous

30

WO 02/12470

PCT/US01/24942

26

sarcoma virus (Yamamoto, *et al.*, Cell 22:787-797, 1980), the herpes thymidine kinase promoter (Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445, 1981), the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster *et al.*, Nature 296:39-42, 1982); prokaryotic expression vectors such as the β -lactamase promoter (Villa-Komaroff, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731, 1978), or the *tac* promoter (DeBoer, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25, 1983); see also "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 242:74-94, 1980; promoter elements from yeast or other fungi such as the Gal 4 promoter, the ADC (alcohol dehydrogenase) promoter, PGK (phosphoglycerol kinase) promoter, alkaline phosphatase promoter; and transcriptional control regions that exhibit tissue specificity, particularly endothelial cell-specific promoters.

Alternatively, protein expression may be controlled by providing a transcriptional activator (see U.S. Patent 6,015,709). The activators can be used to drive high levels of transcription from naturally-occurring, or otherwise genomically-integrated genes. The chimeric activators of the invention are particularly useful for activating transcription of integrated single copy genes, which in the past have not successfully transactivated at appreciable levels.

Soluble forms of the protein can be obtained by collecting culture fluid, or solubilizing inclusion bodies, *e.g.*, by treatment with detergent, and if desired sonication or other mechanical processes, as described above. The solubilized or soluble protein can be isolated using various techniques, such as polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), isoelectric focusing, 2-dimensional gel electrophoresis, chromatography (*e.g.*, ion exchange, affinity, immunoaffinity, and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, immunoprecipitation, or by any other standard technique for the purification of proteins.

Vectors

A wide variety of host/expression vector combinations may be employed in expressing the DNA sequences of this invention. Useful expression vectors, for example, may consist of segments of chromosomal, non-chromosomal and synthetic DNA sequences. Suitable vectors include derivatives of SV40 and known bacterial plasmids, *e.g.*, *E. coli* plasmids col El, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX (Smith *et al.*, Gene 67:31-40, 1988), pMB9 and their derivatives, plasmids such as RP4; phage DNAs, *e.g.*,

WO 02/12470

PCT/US01/24942

27

the numerous derivatives of phage λ , *e.g.*, NM989, and other phage DNA, *e.g.*, M13 and filamentous single stranded phage DNA; yeast plasmids such as the 2μ plasmid or derivatives thereof; vectors useful in eukaryotic cells, such as vectors useful in insect or mammalian cells; vectors derived from combinations of plasmids and phage DNAs, such as plasmids that have been modified to employ phage DNA or other expression control sequences; and the like.

Viral vectors, such as lentiviruses, retroviruses, herpes viruses, adenoviruses, adeno-associated viruses, vaccinia virus, alphavirus, baculovirus, and other recombinant viruses with desirable cellular tropism. Thus, a gene encoding a functional or mutant EER-7 protein or polypeptide domain fragment thereof can be introduced *in vivo*, *ex vivo*, or *in vitro* using a viral vector or through direct introduction of DNA. Expression in targeted tissues can be effected by targeting the transgenic vector to specific cells, such as with a viral vector or a receptor ligand, or by using a tissue-specific promoter, or both. Targeted gene delivery is described in International Patent Publication WO 95/28494, published October 1995.

Viral vectors commonly used for *in vivo* or *ex vivo* targeting and therapy procedures are DNA-based vectors and retroviral vectors. Methods for constructing and using viral vectors are known in the art (*see, e.g.*, Miller and Rosman, *BioTechniques*, 7:980-990, 1992). Preferably, the viral vectors are replication defective, that is, they are unable to replicate autonomously in the target cell. In general, the genome of the replication defective viral vectors which are used within the scope of the present invention lack at least one region which is necessary for the replication of the virus in the infected cell. These regions can either be eliminated (in whole or in part) or be rendered non-functional by any technique known to a person skilled in the art. These techniques include the total removal, substitution (by other sequences, in particular by the inserted nucleic acid), partial deletion or addition of one or more bases to an essential (for replication) region. Such techniques may be performed *in vitro* (on the isolated DNA) or *in situ*, using the techniques of genetic manipulation or by treatment with mutagenic agents. Preferably, the replication defective virus retains the sequences of its genome which are necessary for encapsidating the viral particles.

DNA viral vectors include an attenuated or defective DNA virus, such as but not limited to herpes simplex virus (HSV), papillomavirus, Epstein Barr virus (EBV),

WO 02/12470

PCT/US01/24942

28

adenovirus, adeno-associated virus (AAV), and the like. Defective viruses, which entirely or almost entirely lack viral genes, are preferred. Defective virus is not infective after introduction into a cell. Use of defective viral vectors allows for administration to cells in a specific, localized area, without concern that the vector can infect other cells. Thus, a specific tissue can be specifically targeted. Examples of particular vectors include, but are not limited to, a defective herpes virus 1 (HSV1) vector (Kaplit *et al.*, *Molec. Cell. Neurosci.* 2:320-330, 1991), defective herpes virus vector lacking a glyco-protein L gene (Patent Publication RD 371005 A), or other defective herpes virus vectors (International Patent Publication No. WO 94/21807, published September 29, 1994; International Patent Publication No. WO 92/05263, published April 2, 1994); an attenuated adenovirus vector, such as the vector described by Stratford-Perricaudet *et al.* (*J. Clin. Invest.* 90:626-630, 1992; see also La Salle *et al.*, *Science* 259:988-990, 1993); a defective adeno-associated virus vector (Samulski *et al.*, *J. Virol.* 61:3096-3101, 1987; Samulski *et al.*, *J. Virol.* 63:3822-3828, 1989; Lebkowski *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 8:3988-3996, 1988); and a Sinbis virus vector (PCT Publication No. WO 98/06237; U.S. Patent No. 5,091,309).

Various companies produce viral vectors commercially, including but by no means limited to Avigen, Inc. (Alameda, CA; AAV vectors), Cell Genesys (Foster City, CA; retroviral, adenoviral, AAV vectors, and lentiviral vectors), Clontech (retroviral and baculoviral vectors), Genovo, Inc. (Sharon Hill, PA; adenoviral and AAV vectors), Genvec (adenoviral vectors), IntroGene (Leiden, Netherlands; adenoviral vectors), Molecular Medicine (retroviral, adenoviral, AAV, and herpes viral vectors), Norgen (adenoviral vectors), Oxford BioMedica (Oxford, United Kingdom; lentiviral vectors), and Transgene (Strasbourg, France; adenoviral, vaccinia, retroviral, and lentiviral vectors).

Preferably, for *in vivo* administration, an appropriate immunosuppressive treatment is employed in conjunction with the viral vector, *e.g.*, adenovirus vector, to avoid immuno-deactivation of the viral vector and transfected cells. For example, immunosuppressive cytokines, such as interleukin-12 (IL-12), interferon- γ (IFN- γ), or anti-CD4 antibody, can be provided to block humoral or cellular immune responses to the viral vectors (see, *e.g.*, Wilson, *Nature Medicine*, 1995). In that regard, it is advantageous to employ a viral vector that is engineered to express a minimal number of antigens.

In another embodiment, the vector can be introduced *in vivo* by lipofection, as naked DNA, or with other transfection facilitating agents (peptides, polymers, etc.).

WO 02/12470

PCT/US01/24942

29

Synthetic cationic lipids can be used to prepare liposomes for *in vivo* transfection of a gene encoding a marker (Felgner, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413-7417, 1987; Felgner and Ringold, Science 337:387-388, 1989; see Mackey, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8027-8031, 1988; Ulmer, *et al.*, Science 259:1745-1748, 1993). Useful lipid compounds and compositions for transfer of nucleic acids are described in International Patent Publications WO 95/18863 and WO 96/17823, and in U.S. Patent No. 5,459,127. Lipids may be chemically coupled to other molecules for the purpose of targeting (see Mackey, *et al.*, *supra*). Targeted peptides, *e.g.*, hormones or neurotransmitters, and proteins such as antibodies, or non-peptide molecules could be coupled to liposomes chemically.

Other molecules are also useful for facilitating transfection of a nucleic acid *in vivo*, such as a cationic oligopeptide (*e.g.*, International Patent Publication WO 95/21931), peptides derived from DNA binding proteins (*e.g.*, International Patent Publication WO 96/25508), or a cationic polymer (*e.g.*, International Patent Publication WO95/21931).

Alternatively, non-viral DNA vectors for gene therapy can be introduced into the desired host cells by methods known in the art, *e.g.*, electroporation, microinjection, cell fusion, DEAE dextran, calcium phosphate precipitation, use of a gene gun (ballistic transfection; see, *e.g.*, U.S. Pat. No. 5,204,253, U.S. Pat. No. 5,853,663, U.S. Pat. No. 5,885,795, and U.S. Pat. No. 5,702,384 and see Sanford, TIB-TECH, 6:299-302, 1988; Fynan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:11478-11482, 1993; and Yang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:1568-9572, 1990), or use of a DNA vector transporter (see, *e.g.*, Wu, *et al.*, J. Biol. Chem. 267:963-967, 1992; Wu and Wu, J. Biol. Chem. 263:14621-14624, 1988; Hartmut, *et al.*, Canadian Patent Application No. 2,012,311, filed March 15, 1990; Williams, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-2730, 1991). Receptor-mediated DNA delivery approaches can also be used (Curiel, *et al.*, Hum. Gene Ther. 3:147-154, 1992; Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 1987). U.S. Patent Nos. 5,580,859 and 5,589,466 disclose delivery of exogenous DNA sequences, free of transfection facilitating agents, in a mammal. Recently, a relatively low voltage, high efficiency *in vivo* DNA transfer technique, termed electrotransfer, has been described (Mir, *et al.*, C.P. Acad. Sci., 321:893, 1998; WO 99/01157; WO 99/01158; WO 99/01175).

WO 02/12470

PCT/US01/24942

30

EER-7 Binding Partners and Substrates

The present invention further permits identification of physiological binding partners and substrates of EER-7. The presence of the four SRCR domains strongly indicates that EER-7 is targeted by protein-protein interactions. One method for evaluating and identifying EER-7 binding partners is the yeast two-hybrid screen. Preferably, the yeast two-hybrid screen is performed using an endothelial cell library with yeast that are transformed with recombinant EER-7. Alternatively, EER-7 can be used as a capture or affinity purification reagent. In another alternative, labeled EER-7 can be used as a probe for binding, *e.g.*, by immunoprecipitation or Western analysis.

Generally, binding interactions between EER-7 and any of its binding partners or substrates will be strongest under conditions approximating those found in the extracellular matrix, *i.e.*, physiological conditions of ionic strength, pH and temperature. Perturbation of these conditions will tend to disrupt the stability of a binding interaction.

Substrate candidates include, but are by no means limited to, collagen, elastin, and other extracellular matrix proteins.

Antibodies to EER-7

Antibodies to EER-7 are useful, *inter alia*, for diagnostics and intracellular regulation of EER-7 activity, as set forth below. According to the invention, a EER-7 polypeptide produced recombinantly or by chemical synthesis, and fragments or other derivatives or analogs thereof, including fusion proteins, may be used as an immunogen to generate antibodies that recognize the EER-7 polypeptide. Such antibodies include but are not limited to polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, and an Fab expression library. Such an antibody is preferably specific for human EER-7 and it may recognize either a mutant form of EER-7 or wild-type EER-7, or both.

One can use the hydropathic index of amino acids, as discussed by Kyte and Doolittle (1982), wherein it was determined that certain amino acids may be substituted for other amino acids having similar hydropathic indices and still retain a similar biological activity; to determine epitope regions. Substitution of like amino acids may be made on the basis of hydrophilicity, particularly where the biological function desired in the polypeptide to be generated is intended for use in immunological embodiments. See, for example, U.S. Patent 4,554,101, which states that the greatest local

average hydrophilicity of a "protein," as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with its immunogenicity. Accordingly, it is noted that substitutions can be made based on the hydrophilicity assigned to each amino acid. In using either the hydrophilicity index or hydropathic index, which assigns values to each amino acid, it is preferred to introduce substitutions of amino acids where these values are ± 2 , with ± 1 being particularly preferred, and those within ± 0.5 being the most preferred substitutions.

Various procedures known in the art may be used for the production of polyclonal antibodies to EER-7 polypeptide or derivative or analog thereof. For the production of antibody, various host animals can be immunized by injection with the EER-7 polypeptide, or a derivative (e.g., fragment or fusion protein) thereof, including but not limited to rabbits, mice, rats, sheep, goats, etc. In one embodiment, the EER-7 polypeptide or fragment thereof can be conjugated to an immunogenic carrier, e.g., bovine serum albumin (BSA) or keyhole limpet hemocyanin (KLH). Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, including but not limited to Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanins, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (*bacille Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum*.

For preparation of monoclonal antibodies directed toward the EER-7 polypeptide, or fragment, analog, or derivative thereof, any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture may be used. These include but are not limited to the hybridoma technique originally developed by Kohler and Milstein (Nature, 1975, 256:495-497), as well as the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor *et al.*, Immunology Today 1983, 4:72; Cote *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1983, 80:2026-2030), and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole *et al.*, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 1985, pp. 77-96). In an additional embodiment of the invention, monoclonal antibodies can be produced in germ-free animals (International Patent Publication No. WO 89/12690). In fact, according to the invention, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Morrison *et al.*, J. Bacteriol., 1984, 159:870; Neuberger *et al.*, Nature, 1984, 312:604-608; Takeda *et al.*, Nature, 1985, 314:452-454) by splicing the genes from a mouse antibody molecule specific for an EER-7 polypeptide

WO 02/12470

PCT/US01/24942

32

together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used; such antibodies are within the scope of this invention. Such human or humanized chimeric antibodies are preferred for use in therapy of human diseases or disorders (described *infra*), since the human or humanized antibodies are much less likely than xenogenic antibodies to induce an immune response, in particular an allergic response, themselves.

Antibody fragments which contain the idiotype of the antibody molecule can be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited to: the F(ab')₂ fragment which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule; the Fab' fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragment, and the Fab fragments which can be generated by treating the antibody molecule with papain and a reducing agent.

According to the invention, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Patent Nos. 5,476,786, 5,132,405, and U.S. Patent 4,946,778) can be adapted to produce EER-7 polypeptide-specific single chain antibodies. An additional embodiment of the invention utilizes the techniques described for the construction of Fab expression libraries (Huse *et al.*, Science, 1989, 246:1275-1281) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for an EER-7 polypeptide, or its derivatives, or analogs.

In the production and use of antibodies, screening for or testing with the desired antibody can be accomplished by techniques known in the art, *e.g.*, radioimmunoassay, ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay), "sandwich" immunoassays, immunoradiometric assays, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, *in situ* immunoassays (using colloidal gold, enzyme or radioisotope labels, for example), western blots, precipitation reactions, agglutination assays (*e.g.*, gel agglutination assays, hemagglutination assays), complement fixation assays, immunofluorescence assays, protein A assays, and immunoelectrophoresis assays, etc. In one embodiment, antibody binding is detected by detecting a label on the primary antibody. In another embodiment, the primary antibody is detected by detecting binding of a secondary antibody or reagent to the primary antibody. In a further embodiment, the secondary antibody is labeled. Many means are known in the art for detecting binding in an immunoassay and are within the scope of the present invention. For example, to select

WO 02/12470

PCT/US01/24942

33

antibodies which recognize a specific epitope of an EER-7 polypeptide, one may assay generated hybridomas for a product which binds to an EER-7 polypeptide fragment containing such epitope. For selection of an antibody specific to an EER-7 polypeptide from a particular species of animal, one can select on the basis of positive binding with EER-7 polypeptide expressed by or isolated from cells of that species of animal.

The foregoing antibodies can be used in methods known in the art relating to the localization and activity of the EER-7 polypeptide, *e.g.*, for Western blotting, imaging EER-7 polypeptide *in situ*, measuring levels thereof in appropriate physiological samples, etc. using any of the detection techniques mentioned above or known in the art. Such antibodies can also be used in assays for ligand binding, *e.g.*, as described in U.S. Patent No. 5,679,582. Antibody binding generally occurs most readily under physiological conditions, *e.g.*, pH of between about 7 and 8, and physiological ionic strength. The presence of a carrier protein in the buffer solutions stabilizes the assays. While there is some tolerance of perturbation of optimal conditions, *e.g.*, increasing or decreasing ionic strength, temperature, or pH, or adding detergents or chaotropic salts, such perturbations will decrease binding stability.

In a specific embodiment, antibodies that agonize or antagonize the activity of EER-7 polypeptide can be generated. In particular, intracellular single chain Fv antibodies can be used to regulate (inhibit) EER-7 (Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993, 90:7884-7893; Chen., Mol. Med. Today 1997, 3:160-167; Spitz *et al.*, Anticancer Res. 1996, 16:3415-22; Indolfi *et al.*, Nat. Med. 1996, 2:634-635; Kijima *et al.*, Pharmacol. Ther. 1995, 68:247-267). Such antibodies can be tested using the assays described *infra* for identifying ligands.

Screening and Chemistry

According to the present invention, nucleotide sequences derived from the gene encoding EER-7, and peptide sequences derived from EER-7, are useful targets to identify drugs that are effective in treating disorders associated with estrogen-regulated processes. Drug targets include without limitation (i) isolated nucleic acids derived from the gene encoding EER-7; (ii) isolated peptides and polypeptides derived from EER-7 polypeptides; and, most importantly, (iii) different estrogen receptors that selectively regulate EER-7 expression.

In particular, identification and isolation of EER-7 provides for development of screening assays, particularly for high throughput screening of molecules that up- or down-regulate the activity of EER-7, *e.g.*, by permitting expression of EER-7 in quantities greater than can be isolated from natural sources, or in indicator cells that are specially engineered to indicate the activity of EER-7 expressed after transfection or transformation of the cells. Accordingly, the present invention contemplates methods for identifying specific estrogen receptor ligands that alter EER-7 expression, as well as molecules that act directly on EER-7, using various screening assays known in the art.

Any screening technique known in the art can be used to screen for EER-7 agonists or antagonists. The present invention contemplates screens for small molecule ligands or ligand analogs and mimics, as well as screens for natural ligands that bind to and agonize or antagonize EER-7 expression activity *in vivo*. For example, natural products libraries can be screened using assays of the invention for molecules that agonize or antagonize EER-7 expression or activity.

Another approach uses recombinant bacteriophage to produce large libraries. Using the "phage method" (Scott and Smith, *Science* 1990, 249:386-390; Cwirla, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1990, 87:6378-6382; Devlin *et al.*, *Science* 1990, 49:404-406), very large libraries can be constructed (10^6 - 10^8 chemical entities). A second approach uses primarily chemical methods, of which the Geysen method (Geysen *et al.*, *Molecular Immunology* 1986, 23:709-715; Geysen *et al.* *J. Immunologic Method* 1987 102:259-274; and the method of Fodor *et al.* (*Science* 1991, 251:767-773) are examples. Furka *et al.* (14th International Congress of Biochemistry, Volume #5 1988, Abstract FR:013; Furka, *Int. J. Peptide Protein Res.* 1991, 37:487-493), Houghton (U.S. Patent No. 4,631,211) and Rutter (U.S. Patent No. 5,010,175) describe methods to produce a mixture of peptides that can be tested as agonists or antagonists.

In another aspect, synthetic libraries (Needels *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90:10700-4; Ohlmeyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90:10922-10926; Lam *et al.*, PCT Publication No. WO 92/00252; Kocis *et al.*, PCT Publication No. WO 9428028) and the like can be used to screen for ligands that regulate EER-7 according to the present invention. Test compounds are screened from large libraries of synthetic or natural compounds. Numerous means are currently used for random and directed synthesis of saccharide, peptide, and nucleic acid based compounds. Synthetic compound

libraries are commercially available from Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH), and Microsource (New Milford, CT). A rare chemical library is available from Aldrich (Milwaukee, WI). Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant and animal extracts are available from *e.g.* Pan Laboratories (Bothell, WA) or MycoSearch (NC), or are readily producible. Additionally, natural and synthetically produced libraries and compounds are readily modified through conventional chemical, physical, and biochemical means (Blondelle *et al.*, Tib Tech 1996, 14:60).

Knowledge of the primary sequence of EER-7, and the similarity of that sequence with proteins of known function, can provide an initial clue as the inhibitors or antagonists of the protein. Identification and screening of antagonists is further facilitated by determining structural features of the protein, *e.g.*, using X-ray crystallography, neutron diffraction, nuclear magnetic resonance spectrometry, and other techniques for structure determination. These techniques provide for the rational design or identification of agonists and antagonists.

In vivo screening methods

Intact cells or whole animals expressing a gene encoding EER-7 can be used in screening methods to identify candidate drugs.

In one series of embodiments, a permanent cell line is established.

Alternatively, cells (including without limitation mammalian, insect, yeast, or bacterial cells) are transiently programmed to express an *EER-7* gene by introduction of appropriate DNA or mRNA. Identification of candidate compounds can be achieved using any suitable assay, including without limitation (i) assays that measure selective binding of test compounds to EER-7 (ii) assays that measure the ability of a test compound to modify (*i.e.*, inhibit or enhance) a measurable activity or function of EER-7 and (iii) assays that measure the ability of a compound to modify (*i.e.*, inhibit or enhance) the transcriptional activity of sequences derived from the promoter (*i.e.*, regulatory) regions of the *EER-7* gene.

Transgenic mammals can be prepared for evaluating the molecular mechanisms of EER-7, and particularly human EER-7-induced signaling. Such mammals provide excellent models for screening or testing drug candidates. Thus, human protein EER-7 "knock-in" mammals can be prepared for evaluating the molecular biology of this

WO 02/12470

PCT/US01/24942

36

system in greater detail than is possible with human subjects. It is also possible to evaluate compounds or diseases on "knockout" animals, *e.g.*, to identify a compound that can compensate for a defect in EER-7 activity. Both technologies permit manipulation of single units of genetic information in their natural position in a cell genome and to

5 examine the results of that manipulation in the background of a terminally differentiated organism. Transgenic mammals can be prepared by any method, including but not limited to modification of embryonic stem (ES) cells and heteronuclear injection into blast cells.

A "knock-in" mammal is a mammal in which an endogenous gene is substituted with a heterologous gene (Roemer *et al.*, New Biol. 1991, 3:331). Preferably,

10 the heterologous gene is "knocked-in" to a locus of interest, either the subject of evaluation (in which case the gene may be a reporter gene; *see* Elefanty *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95:11897) of expression or function of a homologous gene, thereby linking the heterologous gene expression to transcription from the appropriate promoter. This can be achieved by homologous recombination, transposon (Westphal and Leder,

15 Curr Biol 1997, 7:530), using mutant recombination sites (Araki *et al.*, Nucleic Acids Res 1997, 25:868) or PCR (Zhang and Henderson, Biotechniques 1998, 25:784).

EER-7 knockout mammals can be prepared for evaluating the molecular pathology of this defect in greater detail than is possible with human subjects. Such animals also provide excellent models for screening drug candidates. A "knockout

20 mammal" is a mammal (*e.g.*, mouse, rabbit) that contains within its genome a specific gene that has been inactivated. Any method known in the art that may render the gene non-functional or not expressed may be used. A non-limiting example of such a method is gene targeting (*see, e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,777,195 and 5,616,491). A knockout mammal includes both a heterozygote knockout (*i.e.*, one defective allele and one wild-type allele)

25 and a homozygous mutant (*i.e.*, two defective alleles; a heterologous construct for expression of an EER-7, such as a human EER-7, could be inserted to permit the knockout mammal to live if the lack of EER-7 expression is lethal). Preparation of a knockout mammal requires first introducing a nucleic acid construct that will be used to suppress expression of a particular gene into an undifferentiated cell type termed an embryonic stem

30 cell. This cell is then injected into a mammalian embryo. A mammalian embryo with an integrated cell is then implanted into a foster mother for the duration of gestation. Zhou, *et al.* (Genes and Development 1995, 9:2623-34) describes PPCA knock-out mice.

WO 02/12470

PCT/US01/24942

37

The term "knockout" refers to partial or complete suppression of the expression of at least a portion of a protein encoded by an endogenous DNA sequence in a cell. The term "knockout construct" refers to a nucleic acid sequence that is designed to decrease or suppress expression of a protein encoded by endogenous DNA sequences in a cell. The nucleic acid sequence used as the knockout construct is typically comprised of (1) DNA from some portion of the gene (exon sequence, intron sequence, and/or promoter sequence) to be suppressed and (2) a marker sequence used to detect the presence of the knockout construct in the cell. The knockout construct is inserted into a cell, and integrates with the genomic DNA of the cell in such a position so as to prevent or interrupt transcription of the native DNA sequence. Such insertion usually occurs by homologous recombination (*i.e.*, regions of the knockout construct that are homologous to endogenous DNA sequences hybridize to each other when the knockout construct is inserted into the cell and recombine so that the knockout construct is incorporated into the corresponding position of the endogenous DNA). The knockout construct nucleic acid sequence may comprise (1) a full or partial sequence of one or more exons and/or introns of the gene to be suppressed, (2) a full or partial promoter sequence of the gene to be suppressed, or (3) combinations thereof. Typically, the knockout construct is inserted into an embryonic stem cell (ES cell) and is integrated into the ES cell genomic DNA, usually by the process of homologous recombination. This ES cell is then injected into, and integrates with, the developing embryo.

The phrases "disruption of the gene" and "gene disruption" refer to insertion of a nucleic acid sequence into one region of the native DNA sequence (usually one or more exons) and/or the promoter region of a gene so as to decrease or prevent expression of that gene in the cell as compared to the wild-type or naturally occurring sequence of the gene. By way of example, a nucleic acid construct can be prepared containing a DNA sequence encoding an antibiotic resistance gene which is inserted into the DNA sequence that is complementary to the DNA sequence (promoter and/or coding region) to be disrupted. When this nucleic acid construct is then transfected into a cell, the construct will integrate into the genomic DNA. Thus, many progeny of the cell will no longer express the gene at least in some cells, or will express it at a decreased level, as the DNA is now disrupted by the antibiotic resistance gene.

WO 02/12470

PCT/US01/24942

38

Generally, the DNA will be at least about 1 kb in length and preferably 3-4 kb in length, thereby providing sufficient complementary sequence for recombination when the knockout construct is introduced into the genomic DNA of the ES cell (discussed below).

5 Included within the scope of this invention is a mammal in which two or more genes have been knocked out. Such mammals can be generated by repeating the procedures set forth herein for generating each knockout construct, or by breeding to mammals, each with a single gene knocked out, to each other, and screening for those with the double knockout genotype.

10 Regulated knockout animals can be prepared using various systems, such as the tet-repressor system (*see* U.S. Patent No. 5,654,168) or the Cre-Lox system (*see* U.S. Patent Nos. 4,959,317 and 5,801,030).

In another series of embodiments, transgenic animals are created in which (i) a human EER-7 is stably inserted into the genome of the transgenic animal; and/or (ii) the endogenous EER-7 genes are inactivated and replaced with human EER-7 genes. See, 15 *e.g.*, Coffman, Semin. Nephrol. 1997, 17:404; Esther *et al.*, Lab. Invest. 1996, 74:953; Murakami *et al.*, Blood Press. Suppl. 1996, 2:36.

In another embodiment, sequences that modulate endogenous EER-7 expression are stably inserted into the genome of the animal. For example, sequences that 20 stimulate EER-7 expression (such as transcription factors) or that interact with and inhibit downregulatory factors may be used.

ER Activation Assay

Any cell assay system that allows for assessment of differential and/or selective functional activity of estrogen receptor isoform agonists and antagonists is 25 defined by the present invention. In a specific embodiment, exemplified *infra*, the assay can be used to identify compounds that differentially interact with specific isoforms of the ER, which can be evaluated by assessing the effects of estrogen ligands cells contacted with a test compound, which modulates EER-7 mRNA transcription. The assay system can thus be used to identify compounds that selectively produce a functional effect through 30 one estrogen receptor. Compounds that increase EER-7 mRNA transcription may result in increased EER-7 protein production and may be useful as novel therapeutics in the prevention of abdominal aortic aneurysms and myocardial infarctions. In a preferred

WO 02/12470

PCT/US01/24942

39

embodiment, the assay system is comprised of two different populations of cells that express different estrogen receptors. Preferably, each experiment is performed in triplicate at multiple different dilutions of compound.

5 An antagonist screen involves detecting expression of the reporter gene by the host cell when contacted with an EER-7 regulatory estrogen. If EER-7 expression is decreased, the test compound is a candidate antagonist of nuclear hormone receptor signaling. If there is no change in expression of the reporter gene, the test compound is not an effective ER ligand.

10 The assay system described may be used to compare effects of a test compound through different estrogen receptors. Test compound effects on EER-7 transcription in different populations of transformed cells, that express different estrogen receptors, are compared to evaluate if the compounds belong to the class of estrogen receptor agonists/antagonists (see below).

15 Any convenient method permits detection of the expressed product. For example, the invention provides Northern blot analysis for detecting EER-7 mRNA product. The methods comprise the steps of fractionating total cellular RNA on an agarose gel, transferring RNA to a solid support membrane, and detecting a DNA-RNA complex with a labeled DNA probe, wherein the DNA probe is specific for a particular nucleic acid sequence of EER-7 under conditions in which a stable complex can form between the
20 DNA probe and RNA components in the sample. Such complexes may be detected by using any suitable means known in the art, wherein the detection of a complex indicates the presence of EER-7 in the sample. Alternative a reporter gene under control of EER-7 expression control elements can be used in an ER activity assay.

25 Typically, immunoassays use either a labeled antibody or a labeled antigenic component (*e.g.*, that competes with the antigen in the sample for binding to the antibody). Suitable labels include without limitation enzyme-based, fluorescent, chemiluminescent, radioactive, or dye molecules. Assays that amplify the signals from the probe are also known, such as, for example, those that utilize biotin and avidin, and enzyme-labelled immunoassays, such as ELISA assays.

30 The assay system described here also may be used in a high-throughput primary screen for agonists and antagonists, or it may be used as a secondary functional screen for candidate compounds identified by a different primary screen, *e.g.*, a binding

WO 02/12470

PCT/US01/24942

40

assay screen that identifies compounds that interact with the receptor and affect EER-7 transcription.

Estrogen Compounds

5 An "estrogen compound" is defined as any of the structures described in the 11th edition of "Steroids" from Steraloids Inc., Wilton N. H., here incorporated by reference. Included in this definition are non-steroidal estrogens described in the
10 aforementioned reference. Other estrogen compounds included in this definition are estrogen derivatives, estrogen metabolites, and estrogen precursors. Estrogen selective receptor agonists antagonists (ESRAAs) are estrogen compounds that function as agonists at ER α receptors and antagonists at ER β receptors. Estrogen compounds that are agonists at ER β receptors and antagonists at ER α receptors also may be identified with this assay system. The term also encompasses molecules that specifically trigger the estrogen effect described herein of regulating EER-7 transcription. Also included are mixtures of more
15 than one estrogen or estrogen compound. Examples of such mixtures are provided in Table II of U.S. Patent No. 5,554,601 (see column 6). Examples of estrogens having utility either alone or in combination with other agents are provided, *e.g.*, in U.S. Patent No. 5,554,601.

β -estrogen is the β -isomer of estrogen compounds. α -estrogen is the α -isomer of estrogen components. The term "estradiol" is either α - or β -estradiol unless
20 specifically identified.

The term "E2" is synonymous with β -estradiol, 17 β -estradiol, and β -E2. α E2 and α -estradiol is the α isomer of β E2 estradiol.

Preferably, a non-feminizing estrogen compound is used. Such a compound has the advantage of not causing uterine hypertrophy and other undesirable side effects,
25 and thus, can be used at a higher effective dosage. Examples of non-feminizing estrogen include Raloxifene (Evista; Eli Lilly), Tamoxifen (Nolvadex; Astra Zeneca), and other selective estrogen receptor modulators.

In addition, certain compounds, such as the androgen testosterone, can be converted to estrogens *in vivo* by conversion with the aromatase enzyme. The aromatase
30 enzyme is present in several regions including, but not limited to, the brain. Some androgens are substrates for aromatase and can be converted and some can not be a substrate. Those androgens that are substrates for aromatase are termed aromatizable

WO 02/12470

PCT/US01/24942

41

androgens and those that are not substrates for aromatase are termed non-aromatizable androgens. Testosterone is, for example, an aromatizable androgen and dihydrotestosterone is, for example, a non-aromatizable androgen. Thus, the invention clearly extends to those compounds (and, as described *infra*, to using as test animals, animals in which the testes are removed or inactivated) that are converted from an androgen to an estrogen and that produces the effect described herein of decreasing the level of amyloid *in vivo*

High-Throughput Screen

Agents according to the invention may be identified by screening in high-throughput assays, including without limitation cell-based or cell-free assays. It will be appreciated by those skilled in the art that different types of assays can be used to detect different types of agents. Several methods of automated assays have been developed in recent years so as to permit screening of tens of thousands of compounds in a short period of time. Such high-throughput screening methods are particularly preferred. The use of high-throughput screening assays to test for agents is greatly facilitated by the availability of large amounts of purified polypeptides, as provided by the invention.

Methods of Diagnosis

According to the present invention, genetic variants of EER-7 can be detected to diagnose an EER-7 associated disease, such as increased susceptibility to abdominal aortic aneurism or myocardial infarction. The various methods for detecting such variants are described herein. Where such variants impact EER-7 function, either as a result of a mutated amino acid sequence or because the mutation results in expression of a truncated protein, or no expression at all, they are expected to result in dysregulation of collagen and elastin cross-linking.

Nucleic Acid Assays

The DNA may be obtained from any cell source. DNA is extracted from the cell source or body fluid using any of the numerous methods that are standard in the art. It will be understood that the particular method used to extract DNA will depend on the nature of the source. Generally, the minimum amount of DNA to be extracted for use in the present invention is about 25 pg (corresponding to about 5 cell equivalents of a genome size of 4×10^9 base pairs).

WO 02/12470

PCT/US01/24942

42

In another alternate embodiment, RNA is isolated from biopsy tissue using standard methods well known to those of ordinary skill in the art such as guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction (Chomczynski *et al.*, Anal. Biochem., 162:156, 1987). The isolated RNA is then subjected to coupled reverse transcription and amplification by polymerase chain reaction (RT-PCR), using specific oligonucleotide primers that are specific for a selected site. Conditions for primer annealing are chosen to ensure specific reverse transcription and amplification; thus, the appearance of an amplification product is diagnostic of the presence of a particular genetic variation. In another embodiment, RNA is reverse-transcribed and amplified, after which the amplified sequences are identified by, *e.g.*, direct sequencing. In still another embodiment, cDNA obtained from the RNA can be cloned and sequenced to identify a mutation.

Protein Assays

In an alternate embodiment, biopsy tissue is obtained from a subject. Antibodies that are capable of specifically binding to EER-7 are then contacted with samples of the tissue to determine the presence or absence of a EER-7 polypeptide specified by the antibody. The antibodies may be polyclonal or monoclonal, preferably monoclonal. Measurement of specific antibody binding to cells may be accomplished by any known method, *e.g.*, quantitative flow cytometry, enzyme-linked or fluorescence-linked immunoassay, Western analysis, etc.

Therapeutic Uses

According to the present invention, stimulation of EER-7 protein expression may be used as a treatment option in patients with estrogen-related disease states. Stimulation of EER-7 protein expression may be stimulated by methods, such as, but not limited to, (i) providing nucleic acids that encode the EER-7 protein and (ii) providing compounds that stimulate transcription and/or translation of EER-7 gene.

Gene Therapy

In a specific embodiment, vectors comprising a sequence encoding a protein, including, but not limited to, full-length EER-7, are provided to treat or prevent a disease or disorder associated with the function of EER-7 in cardiovascular functions. In this embodiment of the invention, the therapeutic vector encodes a sequence that produces the protein of the invention.

Any of the methods for gene therapy available in the art can be used according to the present invention. Exemplary methods are described below.

For general reviews of the methods of gene therapy, see, Goldspiel *et al.*, Clinical Pharmacy, 1993, 12:488-505; Wu and Wu, Biotherapy, 1991, 3:87-95; 5 Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1993, 32:573-596; Mulligan, Science, 1993, 260:926-932; and Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem., 1993, 62:191-217; May, TIBTECH, 1993, 11:155-215. Methods commonly known in the art of recombinant DNA technology that can be used are described in Ausubel *et al.*, (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and 10 Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; and in Chapters 12 and 13, Dracopoli *et al.*, (eds.), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY. Vectors suitable for gene therapy are described above.

In one aspect, the therapeutic vector comprises a nucleic acid that expresses a protein of the invention in a suitable host. In particular, such a vector has a promoter 15 operationally linked to the coding sequence for the protein. The promoter can be inducible or constitutive and, optionally, tissue-specific. In another embodiment, a nucleic acid molecule is used in which the protein coding sequences and any other desired sequences are flanked by regions that promote homologous recombination at a desired site in the genome, thus providing for intrachromosomal expression of the protein (Koller and 20 Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1989, 86:8932-8935; Zijlstra *et al.*, Nature, 1989, 342:435-438).

Delivery of the vector into a patient may be either direct, in which case the patient is directly exposed to the vector or a delivery complex, or indirect, in which case, 25 cells are first transformed with the vector *in vitro* then transplanted into the patient. These two approaches are known, respectively, as *in vivo* and *ex vivo* gene therapy.

In a specific embodiment, the vector is directly provided *in vivo*, where it enters the cells of the organism and mediates expression of the protein. This can be accomplished by any of numerous methods known in the art, by constructing it as part of an appropriate expression vector and administering it so that it becomes intracellular, *e.g.*, 30 by infection using a defective or attenuated retroviral or other viral vector (*see*, U.S. Patent No. 4,980,286), or by direct injection of naked DNA, or by use of microparticle bombardment (*e.g.*, a gene gun; Biolistic, Dupont); or coating with lipids or cell-surface

WO 02/12470

PCT/US01/24942

44

receptors or transfecting agents, encapsulation in biopolymers (e.g., poly-S-I-64-N-acetylglucosamine polysaccharide; *see*, U.S. Patent No. 5,635,493), encapsulation in liposomes, microparticles, or microcapsules; by administering it in linkage to a peptide or other ligand known to enter the nucleus; or by administering it in linkage to a ligand subject to receptor-mediated endocytosis (*see*, e.g., Wu and Wu, J. Biol. Chem., 1987, 62:4429-4432), etc. In another embodiment, a nucleic acid ligand complex can be formed in which the ligand comprises a fusogenic viral peptide to disrupt endosomes, allowing the nucleic acid to avoid lysosomal degradation. In yet another embodiment, the nucleic acid can be targeted *in vivo* for cell specific uptake and expression, by targeting a specific receptor (*see*, e.g., PCT Publication Nos. WO 92/06180, WO 92/22635, WO 92/20316 and WO 93/14188). Alternatively, the nucleic acid can be introduced intracellularly and incorporated within host cell DNA for expression by homologous recombination (Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:8932-8935; Zijlstra, *et al.*, Nature, 1989, 342:435-438). These methods are in addition to those discussed above in conjunction with "Viral and Non-viral Vectors".

Alternatively, antibody molecules can also be administered, for example, by expressing nucleotide sequences encoding single-chain antibodies within the target cell population by utilizing, for example, techniques such as those described in Marasco *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90:7889-7893).

The form and amount of therapeutic nucleic acid envisioned for use depends on the type of disease and the severity of the desired effect, patient state, etc., and can be determined by one skilled in the art.

Stimulation of protein synthesis

Gene transcription and protein translation may be inhibited or stimulated by administration of exogenous compounds. Exogenous compounds may interact with extracellular and/or intracellular messenger systems, such as, but not limited to, adenosine triphosphate, nitric oxide, and guanosine triphosphate; to regulate protein synthesis. In this embodiment, exogenous compounds that stimulate EER-7 protein synthesis may be used in the prevention and/or treatment of cardiovascular disorders including myocardial infarctions and aortic aneurysms. In a specific embodiment, the exogenous compound that stimulates EER-7 protein expression is an estrogen receptor ligand.

WO 02/12470

PCT/US01/24942

45

Therapeutically suggested compounds may be provided to the patient in formulations that are known in the art and may include any pharmaceutically acceptable additives, such as excipients, lubricants, diluents, flavorants, colorants, and disintegrants. The formulations may be produced in useful dosage units such as tablet, caplet, capsule, liquid, or injection.

The form and amount of therapeutic compound envisioned for use depends on the type of disease and the severity of the desired effect, patient state, etc., and can be determined by one skilled in the art.

EXAMPLES

The present invention will be better understood by reference to the following Examples, which are provided by way of exemplification and not by way of limitation.

EXAMPLE 1: Discovery of EER-7

EER-7 was identified by differential display using human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) RNA. On day 0, HUVEC were plated in maintenance media (EBM from Clonetics (San Diego, CA) supplemented with 10 pg/ml human EGF, 1 µg/ml hydrocortisone, 50 µg/ml gentamicin, 50 ng/ml amphotericin-B, 3 µg/ml bovine brain extract, and 2% (v/v) fetal bovine serum) at about 3×10^6 cells per 150 mm² plate. On day 1, the cells were fed phenol red-free EBM supplemented with 2% (v/v) charcoal/dextran treated fetal bovine serum (HyClone; Logan, UT) and containing replication-defective adenovirus expressing human ERβ (Ad5ERβ) at an approximate MOI of 300. After incubation at 37 °C for 1 hour, the cells were washed twice and refed EBM/BSA (EBM supplemented with 0.25% (w/v) bovine serum albumin, 10 U/ml penicillin G, 10 µg/ml streptomycin, and 25 ng/ml amphotericin B). After approximately 6 hours additional incubation at 37 °C, the cells were refed EBM/BSA containing either 100 nM 17β-estradiol or DMSO vehicle. After incubation for approximately 16 hours, the cells were refed EBM/BSA containing 30 U/ml IL-1β and either 100 nM 17β-estradiol or DMSO vehicle. After 5 hours incubation at 37 °C, the cells were harvested using Trizol (Life Technologies). RNA was prepared according to the manufacturer's protocol. The purified

WO 02/12470

PCT/US01/24942

46

total RNA was treated with 10 U Dnase I (Life Technologies) at 37 °C for 1 hour and repurified by Rneasy spin columns (Qiagen; Chatsworth, CA).

Following DNase I treatment, six micrograms total RNA was incubated with 1x RT buffer (25 mM Tris-Cl, pH 8.3, 37.6 mM KCl, 3 mM MgCl₂ and 5 mM DTT, from Genhunter, Nashville TN), 20 µM dNTP's (A, C, G and TTP 2'- deoxynucleoside 5' triphosphates, Gibco/BRL), 0.2 µM HT₁₁C (oligonucleotide: AAGCTTTTTTTTTC; SEQ ID NO: 8) in a final volume of 600 µL. This reaction mixture was incubated at 65 °C for five minutes to denature secondary structures, followed by a ten minute incubation at 37 °C. 30 µl Superscript II reverse transcriptase (200U/µl, Gibco/BRL) was then added to the reaction and incubation proceeded for 1 hr at 37 °C. The enzyme was inactivated by heating at 75 °C for five minutes. An aliquot of this reaction was then used for the second strand synthesis by PCR. To 2µl of the reaction was added, 1x PCR buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.4, 100 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 0.001% gelatin), 2 µM dNTP's, 15 mM ³²P dATP (NEN), 1 unit AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer) and 1µM arbitrary primer 5'-AAGCTTGCCATGG-3' (SEQ ID NO: 9) for a total reaction volume of 20µl. This reaction mixture was then thermocycled using the following parameters:

92 °C for 2 min, 1 cycle,

92 °C for 15 sec, 40 °C for 2 min, 72 °C for 30 sec, 40 cycles

72 °C for 5 min

PCR products were separated by gel electrophoresis on a 6% denaturing polyacrylamide gel (5.7% acrylamide, 0.3% bisacrylamide, 42% urea and 51% H₂O) in 1x TBE buffer (0.1 M Tris, 0.09 M Boric Acid, 1 mM EDTA) for three hours at 2000 volts. The gel was then transferred to filter paper (Schleicher & Schuell), dried under vacuum at 80 °C for one hour and exposed to X-ray film for 24 hours. The developed film was then superimposed over the dried gel and the band of interest identified. Band corners were marked using a 22 gauge syringe needle and the gel slice within these boundaries excised with a razor blade and immersed in 100 µl H₂O. The sample was boiled in a water bath for fifteen minutes, centrifuged for two minutes and the supernatant solution transferred to a new tube. Added to this sample was 5 µl of 10 mg/ml glycogen, 10µl of 3 M sodium acetate and 450 µl of 100% ethanol. The sample was mixed, allowed to precipitate overnight at -20 °C and centrifuged for ten minutes at 10,000g. The supernatant solution was removed, the pellet washed with 200 µl of 85% ethanol, dried and resuspended in 10

WO 02/12470

PCT/US01/24942

47

μl H_2O . A 3 μl aliquot of this was used in a reamplification PCR reaction in the presence of 1x PCR buffer, 20 μM dNTP's, 0.2 μM arbitrary primer and 0.2 μM oligonucleotide HT_{11}C and 2 units AmpliTaq polymerase using the same cycling parameters as the PCR reaction above.

5 Of the regulated bands identified, one band, #7, of approximately 320 bp in size, showed a very strong induction by 17β -estradiol treatment and was designated as endothelial estrogen regulated gene-7 (EER-7). The EER-7 fragment was cloned by TA cloning into the vector pCRII (InVitrogen). For Northern blot analysis, total RNA from HUVEC cells was fractionated by electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel at about 200
10 V for about 2 hours. The RNA was transferred to nylon membranes by capillary action overnight. The nylon membranes were hybridized with ^{32}P -labeled EER-7 fragment cDNA probes prepared from gel purified EER-7 320 bp fragment using an oligonucleotide labeling kit (Pharmacia). The Northern results indicated that the full length EER-7 message was approximately 4.0 kb.

15 Analysis of the 320 bp sequence using the BLAST program (NCBI; non-redundant and EST databases) did not identify any homology to known genes but did reveal EST sequences (W42603, W44920, H25237 and AA166620) with homology. These ESTs were obtained from Research Genetics and sequenced in their entirety. The resulting sequence of approximately 1.2 kb did not have homology to known identified genes and did
20 contain an identifiable coding region.

To isolate the EER-7 gene, a PCR screening approach (OriGene Rapid-Screen) was utilized with a human placenta library. Oligo primers derived from the known sequence of EER-7 (5'-TTTGCTCAGCTGAGCTCCT-3' and 5'-TAAGATAAAGGTAAGGACACTA-3'; SEQ ID NOS: 10 and 11, respectively) were first used in an RT-PCR reaction with human
25 placenta total RNA. The predicted 340 bp band was observed following electrophoresis on a 1.2% agarose gel. The Origene 96-well human placenta library was then screened by PCR using these oligonucleotides. Five wells gave a 340 bp band. Sub-plates corresponding to these wells were obtained from Origene and a second round of PCR was performed to identify positive wells from each sub-plate. Positive subwells were plated onto LB + ampicillin plates
30 to obtain individual colonies. These colonies were screened by colony hybridization (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning) using ^{32}P -labeled 1 kb EST sequence as a probe. The membranes were hybridized overnight at 48 °C and then washed twice at room temperature

WO 02/12470

PCT/US01/24942

48

with 2xSSC/0.5%SDS and twice at 60 °C with 0.1xSSC/0.1%SDS. Positive colonies were grown in LB + ampicillin and plasmid DNA was obtained (Qiagen). Plasmids were digested with EcoRI and SalI to release cDNA inserts. The reactions were subject to electrophoresis and Southern analysis as described for the colony hybridization protocol. The clone designated as D3E11 gave a cDNA insert of the expected size for a full length EER-7 clone and was sequenced in its entirety. BLAST analysis with this sequence identified similarity to known members of the lysyl oxidase family of genes (Figures 1 and 2).

EXAMPLE 2: Regulation of EER-7 Expression

Human umbilical vein cells (HUVEC) were obtained as frozen stocks (Clonetics, San Diego, CA) at passage 2 or 3. Cells were maintained. The cells were maintained in EBM medium supplemented with 10 ng/ml human BGF, 1 mg/ml hydrocortisone, 50 mg/ml gentamicin, 50 ng/ml amphotericin-B, 3 mg/ml bovine brain extract, and 2%, by volume, fetal bovine serum. The cells were used for experiments between passages 4 and 7.

On day 0, HUVEC were plated in maintenance media at about 3×10^6 cells per 150 mm² plate. Cells were incubated at about 37° C for about 24 hours. On day 1, cells were fed phenol red-free EBM media supplemented with 2%, by volume, charcoal/dextran treated fetal bovine serum (HyClone; Logan, UT) and containing replication-defective adenovirus expressing human full length wild-type ER α (Ad5ER α) or ER β (Ad5ER β) at an approximate MOI of 300. Following infection, the cells were washed and refed with phenol red-free EBM media supplemented with 2%, by volume, charcoal/dextran treated fetal bovine serum. Cells were incubated at about 37° C for about 20 hours. On day 3, total RNA was extracted from cells with silica gel columns (Qiagen, Chatsworth, CA). Total RNA was fractionated by electrophoresis on a 1% agarose gel at about 150 V for about 2 hours. RNA was transferred by capillary transfer using 20x SSC. Nylon membranes were hybridized with ³²P-labeled EER-7 cDNA probes (generated using Pharmacia's Oligolabelling kit). Results are summarized in Figure 3.

Sequence analysis of EER-7 indicated that the protein was structurally similar to other proteins that belong to the LO and LOL protein family (see Figure 1). Comparison of the domains indicates that EER-7 shares the characteristic catalytic domain associated with LO and LOL proteins and also contains four SRCR domains, which are

WO 02/12470

PCT/US01/24942

49

present in WS914. Combined, this indicates that EER-7 protein may play a role in cellular signalling pathways through protein-protein interactions mediated by the SRCR domains.

Expression studies indicated that EER-7 expression was regulated by both the ER α and ER β receptors in HUVEC cells. The prototypical estrogen agonist 17 β -estradiol stimulated EER-7 expression through interaction with both receptors.

Additionally, this effect was blocked by the non-selective estrogen receptor antagonist IC182780 (see Figure 3, right hand panels). The ER α agonists and ER β antagonists, Compounds 2 and 8 (Figure 4) both stimulated EER-7 expression through the ER α and blocked the effects of 17 β -estradiol at the ER β receptor. These studies indicate that the EER-7 expression and activity are modulated by both estrogen receptors. Therefore, estrogen mediated modulation of EER-7 may represent a new avenue of development for therapeutic strategies for AAAs and myocardial infarctions.

* * * * *

The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and the accompanying figures. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

It is further to be understood that all values are approximate, and are provided for description.

All patents, patent applications, publications, and other materials cited herein are hereby incorporated herein reference in their entireties.

WO 02/12470

PCT/US01/24942

50

WHAT IS CLAIMED IS:

- 1 1. An isolated EER-7 protein having an amino acid sequence
2 comprising at least 10 contiguous amino acids from the sequence depicted in SEQ ID
3 NO:2 or which has at least 60% sequence similarity with SEQ ID NO:2, which EER-7
4 protein has (i) lysyl oxidase activity; (ii) comprises four copies of a SRCR domain having
5 a sequence greater than 80% similar to a sequence selected from the group consisting of
6 SEQ ID NOs: 3, 4, 5, and 6; and (iii) comprises a conserved catalytic domain of lysyl
7 oxidase enzymes having a sequence as depicted in SEQ ID NO: 7.
- 1 2. The EER-7 protein of claim 1, wherein the protein has specific
2 binding activity with an anti-EER-7 antibody.
- 1 3. The EER-7 protein of claim 1 which is a human EER-7 protein.
- 1 4. The EER-7 protein of claim 3 which has an amino acid sequence as
2 depicted in SEQ ID NO: 2.
- 1 5. The EER-7 protein of claim 3 which is encoded by a nucleic acid
2 having a sequence as depicted in SEQ ID NO: 1.
- 1 6. The EER-7 protein of claim 1 having at least 60% sequence identity
2 to human EER-7 protein having an amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 2.
- 1 7. A polypeptide fragment of an EER-7 protein, wherein the fragment
2 has a property selected from the group consisting of:
3 a) comprising from one to four copies of a SRCR domain having a
4 sequence greater than 80% similar to a sequence selected from the group consisting of
5 SEQ ID Nos: 3, 4, 5, and 6;
6 b) a conserved catalytic domains of lysyl oxidase enzymes having a
7 sequence as depicted in SEQ ID NO: 7;

WO 02/12470

PCT/US01/24942

51

- 8 c) specific binding activity with an anti-EER-7 antibody; and
9 d) any combination thereof.
- 1 8. An isolated nucleic acid encoding the EER-7 protein of claim 1.
- 1 9. The nucleic acid of claim 8 which is a cDNA.
- 1 10. The nucleic acid of claim 8, wherein the EER-7 protein is a human
2 EER-7 protein.
- 1 11. The EER-7 protein of claim 10 which has an amino acid sequence
2 as depicted in SEQ ID NO: 2.
- 1 12. The nucleic acid of claim 8 which comprises a nucleotide sequence
2 as depicted in SEQ ID NO: 1.
- 1 13. A vector comprising a nucleic acid encoding a fragment of an EER-
2 7 protein operatively associated with an expression control sequence, wherein the
3 fragment has a property selected from the group consisting of:
4 a) comprising from one to four copies of a SRCR domain having a
5 sequence greater than 80% similar to a sequence selected from the group consisting of
6 SEQ ID Nos: 3, 4, 5, and 6;
7 b) a conserved catalytic domains of lysyl oxidase enzymes having a
8 sequence as depicted in SEQ ID NO: 7;
9 c) specific binding activity with an anti-EER-7 antibody; and
10 d) any combination thereof.
- 1 14. The vector according to claim 13, wherein the fragment of an EER-
2 7 protein is a full length EER-7 protein.
- 1 15. A host cell transfected with the vector of claim 14.

WO 02/12470

PCT/US01/24942

52

- 1 16. A non-human animal transformed with the vector of claim 14,
2 wherein the animal expresses an EER-7 protein at a detectable level in response to
3 estrogen.
- 1 17. A method for producing EER-7 protein, which method comprises
2 isolating EER-7 protein produced by the host cells of claim 15, wherein the host cells have
3 been cultured under conditions that provide for expression of the EER-7 protein by the
4 vector.
- 1 18. An isolated nucleic acid of at least 20 bases that hybridizes under
2 stringent conditions with a nucleic acid having a nucleotide sequence as depicted in SEQ
3 ID NO: 1.
- 1 19. The nucleic acid of claim 18, wherein at least ten nucleotides are
2 contiguous nucleotides from the nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 1.
- 1 20. The nucleic acid of claim 18 which is detectably labeled.
- 1 21. An antibody that specifically binds to the EER-7 protein of claim 1.
- 1 22. A method for detecting an EER-7 protein, which method comprises
2 detecting binding of the antibody of claim 21 to a molecule in a sample suspected of
3 containing an EER-7 protein, wherein the antibody is contacted with the sample under
4 conditions that permit specific binding with any EER-7 protein present in the sample and
5 binding of the antibody to the molecule in the sample indicates the presence of EER-7.
- 1 23. A method for detecting expression of *EER-7*, which method
2 comprises detecting mRNA encoding *EER-7* in a sample from a cell suspected of
3 expressing *EER-7*.
- 1 24. The method according to claim 23 wherein mRNA encoding *EER-7*
2 is detected by hybridization to an *EER-7*-specific nucleic acid.

WO 02/12470

PCT/US01/24942

53

1 25. The method according to claim 24 wherein the *EER-7*-specific
2 nucleic acid is at least 10 nucleotides in length and has a sequence identical to a sequence
3 of the same number of bases in SEQ ID NO: 1, or the complementary sequence thereof.

1 26. An assay system for identifying selective estrogen receptor ligands,
2 comprising transformed cells that express different functional estrogen receptors, wherein
3 the number of cells is sufficient to transcribe a detectable amount of mRNA encoding
4 EER-7.

1 27. The assay system of claim 26, wherein the estrogen receptor is a
2 human estrogen receptor.

1 28. The assay system of claim 26 which is an endothelial cell.

1 29. The assay system of claim 28 which is a human umbilical vein cell.

1 30. A method for identifying a compound that selectively regulates
2 *EER-7* mRNA transcription through an estrogen receptor, which method comprises
3 detecting a difference in the level of *EER-7* mRNA in an assay system of claim 26
4 contacted with a test compound, wherein a difference in the level of *EER-7* mRNA
5 indicates that the test compound selectively regulates the estrogen receptor.

1 31. The method according to claim 30, wherein the test compound is an
2 estrogen or an estrogen analog.

1 32. The method according to claim 31, wherein the test compound is an
2 estrogen receptor selective agonist or antagonist.

1 33. The method according to claim 30, wherein the level of mRNA
2 decreases when contacted with a test compound that regulates expression through the
3 estrogen receptor.

WO 02/12470

PCT/US01/24942

54

- 1 34. The method according to claim 30, wherein the level of mRNA
2 increases when contacted with a test compound that regulates expression through the
3 estrogen receptor.
- 1 35. The method according to claim 30, wherein the estrogen receptor is
2 a human estrogen receptor.
- 1 36. The method according to claim 30, wherein the first estrogen
2 receptor is an ER α .
- 1 37. The method according to claim 36, wherein the second estrogen
2 receptor is an ER β .
- 1 38. The method according to claim 30, wherein the cell is an endothelial
2 cell.
- 1 39. The method according to claim 38, wherein the cell is a human
2 umbilical vein cell.
- 1 40. The polypeptide fragment of claim 7, wherein the four copies of
2 SRCR domains comprise the sequences as depicted in SEQ ID NOS: 3-6.
- 1 41. The polypeptide fragment of claim 7, having at least 46% sequence
2 similarity to the catalytic domain of lysyl oxidase enzyme having an amino acid sequence
3 as depicted as SEQ ID NO: 7.
- 1 42. The assay system of claim 26, wherein the transformed cells
2 comprise two different populations.
- 1 43. The assay system of claim 42, wherein one population expresses the
2 ER α estrogen receptor.

WO 02/12470

PCT/US01/24942

55

- 1 44. The assay system of claim 43, wherein the other population
2 expresses the ER β estrogen receptor.
- 1 45. A non-human EER-7 knockout animal, wherein endogenous EER-7
2 expression is suppressed in the animal.
- 1 46. A non-human animal transformed with a vector comprising a
2 nucleic acid encoding a protein that regulates EER-7 expression, wherein the protein is
3 operatively associated with an expression control sequence; wherein the animal expresses
4 an EER-7 protein at a detectable level in response to estrogen.

Percent Similarity											Q
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	100	28.4	14.8	27.7	13.7	43.7	15.9	16.7	63.5	57.0	1 rabbit EER-7 protein frags.pro
2	13.7	100	50.9	31.7	19.9	17.2	18.3	18.5	7.1	12.2	2 EER-7 consensus protein.PRO
3	95.1	70.5	100	38.6	14.1	14.3	14.9	15.1	6.1	11.5	3 human was914 protein.PRO
4	0	43.9	11.0	100	38.0	69.2	59.2	60.5	59.7	65.2	4 mouse was914 contig1 protein.PRO
5	100	222.0	254.0	161.2	100	51.1	49.4	49.8	27.0	31.0	5 human lysyl oxidase like protein.PRO
6	0	75.0	85.3	80.6	2.0	100	84.9	86.2	75.2	79.3	6 mouse LOL protein.PRO
7	0	178.8	190.7	159.1	87.3	33.4	100	91.8	47.2	51.1	7 human lysyl oxidase protein.PRO
8	0	172.2	185.8	151.4	86.3	30.4	14.5	100	48.0	51.8	8 mouse lysyl oxidase protein.PRO
9	0	97.3	67.4	56.6	117.5	117.5	140.9	100	92.6	9 human contig2 est protein.PRO	
10	0	56.6	40.8	23.7	72.7	72.7	81.4	84.5	10.8	10.8	10 mouse contig2 protein.PRO
Percent Divergence											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

Figure 1

WO 02/12470

2/4

PCT/US01/24942

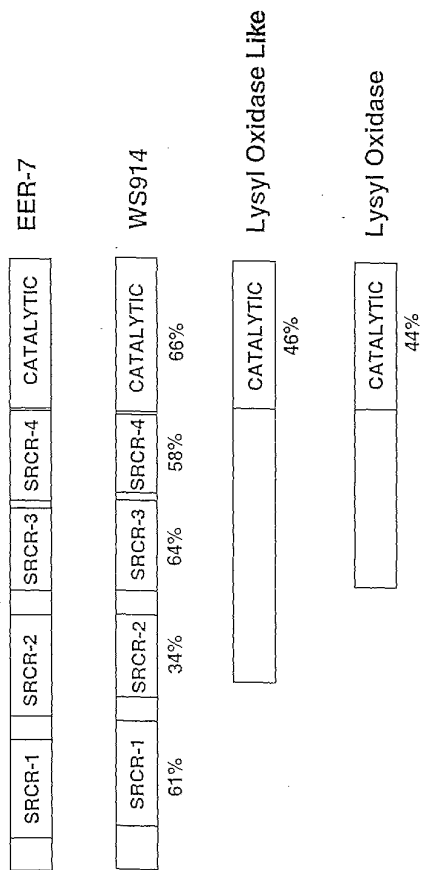


Figure 2

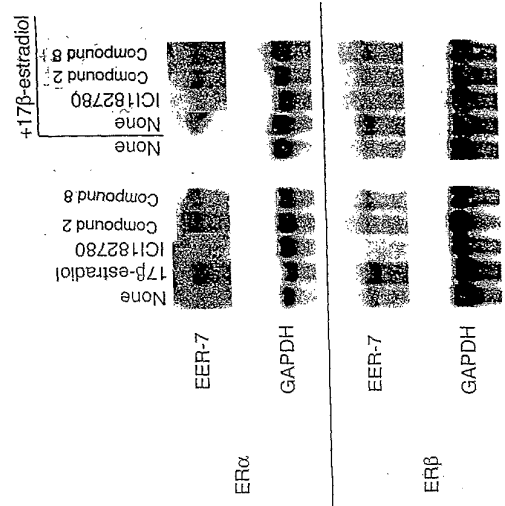
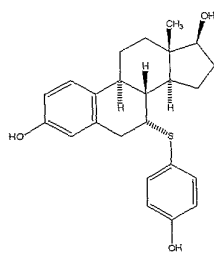


Figure 3

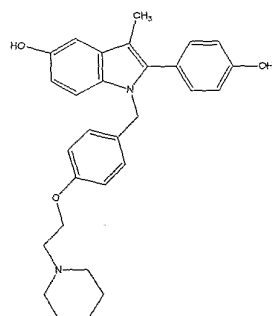
WO 02/12470

4/4

PCT/US01/24942



Compound 2



Compound 8

Figure 4

WO 02/12470

1

PCT/US01/24942

SEQUENCE LISTING

<110> American Home Products Corporation
 Evans, Mark
 Scicchitano, Marshall
 Bapat, Ashok
 Beer, Eric
 Bhat, Ramesh
 Ferris, Elissa
 Mastroeni, Rob
 Zhang, Jianxiong
 Karathanasis, Sotirios K.

<120> A Novel Member of the Lysyl Oxidase Gene Family

<130> 0630/1G703-US2

<140> TBA

<141> Concurrently Herewith

<150> 60/223,763

<151> 2000-08-08

<150> 60/255,838

<151> 2000-12-15

<160> 11

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 3616

<212> DNA

<213> Human

<400> 1
 gattatgttg gggggtcggc gtgtgacaga aacaccgaag ggaagggggc agaagacttc 60
 aagccccctc ttctctagcc tggacaggta tcttggectc agctgtcctt gaagtcacca 120
 tggcgtggtc cccaccagcc accctcttcc tgttctctgt gctgctagcc cagccccctc 180
 ccagcaggcc acagtccactg ggcaccacta agctccggct ggtggggcca gagagcaagc 240
 cagaggaggc ccgcctggag gtgctgcacc agggccagtg gggcacctg tgtgatgaca 300
 actttgctat ccaggaggcc acagtggctt gccgccagct gggcttcgaa gctgccttga 360
 cctggggcca cagtgcacaag tacggccaag gggagggacc catctggctg gacaatgtgc 420
 gctgtgtggg cacagagagc tccttggacc agtgccgggtc taatggcttg ggagtcagtg 480
 actgcagtca ctcagaagac gtagggggtga tatgccacc ccggcgccat cgtggctacc 540
 ttctgaaac tgtctcaat gcccttgggc cccagggccg gcggctggag gaggtgcggc 600
 tcaagcccat ccttgccagt gccaaagcagc atagccagtg gaccgaggga gccgtggagg 660
 tgaagtatga gggccacttg cggcagggtg gtgaccaggg ctggaccatg aacaacagca 720
 ggggtggtgtg cgggatgctg ggcttcccca gcgaggtgcc tgtcgacagc cactactaca 780

WO 02/12470

2

PCT/US01/24942

```

ggaaagtctg ggaatcgaag atgagggacc ctaagtctag gctgaagagc ctgacgaata 840
agaaactcct ctggaatccac caggtcacct gctgggggac agagcccccac atggccaact 900
gccaggtgca ggtggtccca gccgggggca agctgcggcc agcctgccca ggtggcatgc 960
atgctgtggt cagctgtgtg gccagggcctc acttccggcc accgaagaca aagccacaac 1020
gcaaaagggtc ctgggcagag gagccgaggg tgcgcctgcg ctccggggcc caggtgggcg 1080
agggccgggt ggaagtgtctc atgaaccgct agtggggcac ggtctgtgac cacagtgga 1140
acctcatctc tgcagtgctc gtgtgtcttc agctgggctt tggctctgct cgggaggccc 1200
tctttgggco cggctgggco caagggttag ggccatcca cctgagtgag gtgcgtgca 1260
ggggatataa ggggacccctc agcgactgct ctgcccgtga aggtgccag aatggttgcc 1320
aacatgagaa tgcgtgtgct gtccagtgca atgtccctaa catgggtttt cagaatcagg 1380
tgccgttgcc tgggtggcgt atccctgagg aggggtctatt ggaggtgcag gtggagtgga 1440
acgggttccc acgctggggg agcgtgtgca gtgaaaactg ggggctcacc gaagccatgg 1500
tggcctgcgc acagctcggc ctgggttttg ccatccatgc ctacaaggaa acctggttct 1560
ggtcggggac gccaaaggcc caggaggtgg tgatgagtg ggtgcgctgc tcaggcacag 1620
agctggccct gcagcagtcg cagaggcacg ggccggtgca ctgctccacc ggtggcggcg 1680
gottcctggc tggagtctcc tgcattgaca gtgcaccaga cctggtgatg aacgccagc 1740
tagtcagga gacggcctac ttggaggacc gcccgctcag ccagctgtat tgtgccacg 1800
aggagaactg cctctccagc tctcgggatc acatgagctg gccctacgga taccccgcc 1860
tattgcgctt ctccacacag atctacaatc tgggcccggc tgactttctg ccaaaagctg 1920
gacggatag ctgggttttg caccagtgcc acaggcatta ccacagcatt gaggtctta 1980
ccactacga cctcctcact ctcaatggct ccaagggtgc tgaggggcac aaggccagct 2040
tctgtctgga ggacacaaac tgcgccacag gactgcagcg gccctacgca tgtgccact 2100
ttggagaaca gggagtgaat gtaggctgct gggacaccta ccgcatgac tattgattgcc 2160
agtgggtgga tatcacagat gtgggcctcg ggaattatat cttccaggtg attgtgaacc 2220
ccactatga agtggcagag tcagatttct ccaacaatat gctgcagtcg cgtgcaagt 2280
atgatgggca ccgggtctgct ctgcacaaat gccacacagg gaattoatc ccagccaatg 2340
cagaactctc cctggagcag gaacagctc tcaggaaaca ootcatctga agotgtoact 2400
gcacactcct agctgtgccc gatacaccag atacctcagc ttattggagc catgcccctc 2460
acagactccc aactcagagg aaaagggcca gtgccaaggg goaccaagaa cctgtoagg 2520
aaqccttttg atggcaagat ccccaatcca gatggtattg ctccctcagg atggctotgg 2580
gcctgcctct aaggccctgt ggcctatgga atatgtctc caggctttgc tcagctgagc 2640
tctctctctg taaggaaacc cagtcactcc tgaatcttgc cacagagatc cgggattcag 2700
gagctctcag tttcttaggg atggactatg gccagtcctc ocatctaagt ggtgctttgc 2760
aaatgtcttg gaggagtata ggacagaggc ccaaaatca cagcaggtag tgttagctct 2820
ctgctaggag ctcaaaagca cacaacttgt atcaaatca caactggcag agaagctggt 2880
ggatccaatc cttttctcat ctgttgttat ttagaactca cctctacac tctgttcttt 2940
agtgtcctta cctttatctt accacacaca tgggtgttto tattatcctt ggaagcacag 3000
acctcggaac tcccttattt gctgtatggg ccaacaccaa cagttacgga gtgcttgaga 3060
agggccaaat ttacacgaaa tggccagata gggcctctct acagagcagc aagagtaggc 3120
caagcagaaa gactgtgag gtacacaggc cccagccccc tctcagggcc tctgccagg 3180
aaataatag gacctttac ctggcaggca gtctgtctc totcaggatc accacgcatc 3240
tcaggattgg tctaaacttc aagtctcaac caagtgtctg aagtgaactt tgcattgaat 3300
aaatttttgc catggaagaa acatcaaaaca agccactcat ctctacagag ataagaaaac 3360
aagtttggca gacaaagaga cagaagaccg tggagaanta agaaggggga acagtcagtt 3420
tagttaagga tggaacctgg gaaaggccac cattcctgct tgatggggct ctgatttct 3480
ctgtctcaag tggaataaaa cccatggctc ttcttgacat gattcttgat cttttctcca 3540
ctgagacaca cttaagtgat gatccttaca ggaactgacac cctaagtgca ataaaagtgg 3600
ctcattatgg actgct 3616

```

<210> 2

WO 02/12470

3

PCT/US01/24942

<211> 756
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 2
 Met Ala Trp Ser Pro Pro Ala Thr Leu Phe Leu Phe Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Gly Gln Pro Pro Pro Ser Arg Pro Gln Ser Leu Gly Thr Thr Lys Leu
 20 25 30
 Arg Leu Val Gly Pro Glu Ser Lys Pro Glu Glu Gly Arg Leu Glu Val
 35 40 45
 Leu His Gln Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Asn Phe Ala Ile
 50 55 60
 Gln Glu Ala Thr Val Ala Cys Arg Gln Leu Gly Phe Glu Ala Ala Leu
 65 70 75 80
 Thr Trp Ala His Ser Ala Lys Tyr Gly Gln Gly Glu Gly Pro Ile Trp
 85 90 95
 Leu Asp Asn Val Arg Cys Val Gly Thr Glu Ser Ser Leu Asp Gln Cys
 100 105 110
 Gly Ser Asn Gly Trp Gly Val Ser Asp Cys Ser His Ser Glu Asp Val
 115 120 125
 Gly Val Ile Cys His Pro Arg Arg His Arg Gly Tyr Leu Ser Glu Thr
 130 135 140
 Val Ser Asn Ala Leu Gly Pro Gln Gly Arg Arg Leu Glu Glu Val Arg
 145 150 155 160
 Leu Lys Pro Ile Leu Ala Ser Ala Lys Gln His Ser Pro Val Thr Glu
 165 170 175
 Gly Ala Val Glu Val Lys Tyr Glu Gly His Trp Arg Gln Val Cys Asp
 180 185 190
 Gln Gly Trp Thr Met Asn Asn Ser Arg Val Val Cys Gly Met Leu Gly
 195 200 205
 Phe Pro Ser Glu Val Pro Val Asp Ser His Tyr Tyr Arg Lys Val Trp
 210 215 220
 Asp Leu Lys Met Arg Asp Pro Lys Ser Arg Leu Lys Ser Leu Thr Asn
 225 230 235 240
 Lys Asn Ser Phe Trp Ile His Gln Val Thr Cys Leu Gly Thr Glu Pro
 245 250 255
 His Met Ala Asn Cys Gln Val Gln Val Ala Pro Ala Arg Gly Lys Leu
 260 265 270
 Arg Pro Ala Cys Pro Gly Gly Met His Ala Val Val Ser Cys Val Ala
 275 280 285
 Gly Pro His Phe Arg Pro Pro Lys Thr Lys Pro Gln Arg Lys Gly Ser
 290 295 300
 Trp Ala Glu Glu Pro Arg Val Arg Leu Arg Ser Gly Ala Gln Val Gly
 305 310 315 320
 Glu Gly Arg Val Glu Val Leu Met Asn Arg Gln Trp Gly Thr Val Cys
 325 330 335
 Asp His Arg Trp Asn Leu Ile Ser Ala Ser Val Val Cys Arg Gln Leu
 340 345 350
 Gly Phe Gly Ser Ala Arg Glu Ala Leu Phe Gly Ala Arg Leu Gly Gln

WO 02/12470

4

PCT/US01/24942

```

      355      360      365
Gly Leu Gly Pro Ile His Leu Ser Glu Val Arg Cys Arg Gly Tyr Glu
370      375      380
Arg Thr Leu Ser Asp Cys Pro Ala Leu Glu Gly Ser Gln Asn Gly Cys
385      390      395      400
Gln His Glu Asn Ala Ala Val Arg Cys Asn Val Pro Asn Met Gly
      405      410      415
Phe Gln Asn Gln Val Arg Leu Ala Gly Gly Arg Ile Pro Glu Glu Gly
      420      425      430
Leu Leu Glu Val Gln Val Glu Val Asn Gly Val Pro Arg Trp Gly Ser
      435      440      445
Val Cys Ser Glu Asn Trp Gly Leu Thr Glu Ala Met Val Ala Cys Arg
      450      455      460
Gln Leu Gly Leu Gly Phe Ala Ile His Ala Tyr Lys Glu Thr Trp Phe
      465      470      475      480
Trp Ser Gly Thr Pro Arg Ala Gln Glu Val Val Met Ser Gly Val Arg
      485      490      495
Cys Ser Gly Thr Glu Leu Ala Leu Gln Gln Cys Gln Arg His Gly Pro
      500      505      510
Val His Cys Ser His Gly Gly Gly Arg Phe Leu Ala Gly Val Ser Cys
      515      520      525
Met Asp Ser Ala Pro Asp Leu Val Met Asn Ala Gln Leu Val Gln Glu
      530      535      540
Thr Ala Tyr Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Gln Leu Tyr Cys Ala His
      545      550      555      560
Glu Glu Asn Cys Leu Ser Lys Ser Ala Asp His Met Asp Trp Pro Tyr
      565      570      575
Gly Tyr Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Thr Gln Ile Tyr Asn Leu Gly
      580      585      590
Arg Thr Asp Phe Arg Pro Lys Thr Gly Arg Asp Ser Trp Val Trp His
      595      600      605
Gln Cys His Arg His Tyr His Ser Ile Glu Val Phe Thr His Tyr Asp
      610      615      620
Leu Leu Thr Leu Asn Gly Ser Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser
      625      630      635      640
Phe Cys Leu Glu Asp Thr Asn Cys Pro Thr Gly Leu Gln Arg Arg Tyr
      645      650      655
Ala Cys Ala Asn Phe Gly Glu Gln Gly Val Thr Val Gly Cys Trp Asp
      660      665      670
Thr Tyr Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp Val
      675      680      685
Gly Pro Gly Asn Tyr Ile Phe Gln Val Ile Val Asn Pro His Tyr Glu
      690      695      700
Val Ala Glu Ser Asp Phe Ser Asn Asn Met Leu Gln Cys Arg Cys Lys
      705      710      715      720
Tyr Asp Gly His Arg Val Trp Leu His Asn Cys His Thr Gly Asn Ser
      725      730      735
Tyr Pro Ala Asn Ala Glu Leu Ser Leu Glu Gln Glu Gln Arg Leu Arg
      740      745      750
Asn Asn Leu Ile

```

WO 02/12470

5

PCT/US01/24942

755

<210> 3
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 3
 Leu Arg Leu Val Gly Pro Glu Ser Lys Pro Glu Glu Gly Arg Leu Glu
 1 5 10 15
 Val Leu His Gln Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Asn Phe Ala
 20 25 30
 Ile Gln Glu Ala Thr Val Ala Cys Arg Gln Leu Gly Phe Glu Ala Ala
 35 40 45
 Leu Thr Trp Ala His Ser Ala Lys Tyr Gly Gln Gly Glu Gly Pro Ile
 50 55 60
 Trp Leu Asp Asn Val Arg Cys Val Gly Thr Glu Ser Ser Leu Asp Gln
 65 70 75 80
 Cys Gly Ser Asn Gly Trp Gly Val Ser Asp Cys Ser His Ser Glu Asp
 85 90 95
 Val Gly Val Ile Cys His Pro
 100

<210> 4
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 4
 Pro Ile Leu Ala Ser Ala Lys Gln His Ser Pro Val Thr Glu Gly Ala
 1 5 10 15
 Val Glu Val Lys Tyr Glu Gly His Trp Arg Gln Val Cys Asp Gln Gly
 20 25 30
 Trp Thr Met Asn Asn Ser Arg Val Val Cys Gly Met Leu Gly Phe Pro
 35 40 45
 Ser Glu Val Pro Val Asp Ser His Tyr Tyr Arg Lys Val Trp Asp Leu
 50 55 60
 Lys Met Arg Asp Pro Lys Ser Arg Leu Lys Ser Leu Thr Asn Lys Asn
 65 70 75 80
 Ser Phe Trp Ile His Gln Val Thr Cys Leu Gly Thr Glu Pro His Met
 85 90 95
 Ala Asn Cys Gln Val Gln Val Ala Pro Ala Arg Gly Lys Leu Arg Pro
 100 105 110
 Ala Cys Pro Gly Gly Met His Ala Val Val Ser Cys Val
 115 120 125

<210> 5
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Human

WO 02/12470

6

PCT/US01/24942

<400> 5
 Val Arg Leu Arg Ser Gly Ala Gln Val Gly Glu Gly Arg Val Glu Val
 1 5 10 15
 Leu Met Asn Arg Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp His Arg Trp Asn Leu
 20 25 30
 Ile Ser Ala Ser Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Phe Gly Ser Ala Arg
 35 40 45
 Glu Ala Leu Phe Gly Ala Arg Leu Gly Gln Gly Leu Gly Pro Ile His
 50 55 60
 Leu Ser Glu Val Arg Cys Arg Gly Tyr Glu Arg Thr Leu Ser Asp Cys
 65 70 75 80
 Pro Ala Leu Glu Gly Ser Gln Asn Gly Cys Gln His Glu Asn Ala Ala
 85 90 95
 Ala Val Arg Cys Asn
 100

<210> 6
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 6
 Val Arg Leu Ala Gly Gly Arg Ile Pro Glu Gly Leu Leu Glu Val
 1 5 10 15
 Gln Val Glu Val Asn Gly Val Pro Arg Trp Gly Ser Val Cys Ser Glu
 20 25 30
 Asn Trp Gly Leu Thr Glu Ala Met Val Ala Cys Arg Gln Leu Gly Leu
 35 40 45
 Gly Phe Ala Ile His Ala Tyr Lys Glu Thr Trp Phe Trp Ser Gly Thr
 50 55 60
 Pro Arg Ala Gln Glu Val Val Met Ser Gly Val Arg Cys Ser Gly Thr
 65 70 75 80
 Glu Leu Ala Leu Gln Gln Cys Gln Arg His Gly Pro Val His Cys Ser
 85 90 95
 His Gly Gly Gly Arg Phe Leu Ala Gly Val Ser Cys Met
 100 105

<210> 7
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 7
 Asp Ser Ala Pro Asp Leu Val Met Asn Ala Gln Leu Val Gln Glu Thr
 1 5 10 15
 Ala Tyr Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Gln Leu Tyr Cys Ala His Glu
 20 25 30
 Glu Asn Cys Leu Ser Lys Ser Ala Asp His Met Asp Trp Pro Tyr Gly
 35 40 45
 Tyr Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Thr Gln Ile Tyr Asn Leu Gly Arg

WO 02/12470

7

PCT/US01/24942

```

      50              55              60
Thr Asp Phe Arg Pro Lys Thr Gly Arg Asp Ser Trp Val Trp His Gln
65      70      75      80
Cys His Arg His Tyr His Ser Ile Glu Val Phe Thr His Tyr Asp Leu
      85      90      95
Leu Thr Leu Asn Gly Ser Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe
      100      105      110
Cys Leu Glu Asp Thr Asn Cys Pro Thr Gly Leu Gln Arg Arg Tyr Ala
      115      120      125
Cys Ala Asn Phe Gly Glu Gln Gly Val Thr Val Gly Cys Trp Asp Thr
      130      135      140
Tyr Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp Val Gly
145      150      155      160
Pro Gly Asn Tyr Ile Phe Gln Val Ile Val Asn Pro His Tyr Glu Val
      165      170      175
Ala Glu Ser Asp Phe Ser Asn Asn Met Leu Gln Cys Arg Cys Lys Tyr
      180      185      190
Asp Gly His Arg Val Trp Leu His Asn Cys His Thr Gly Asn Ser Tyr
      195      200      205
Pro Ala Asn Ala Glu Leu Ser Leu Glu Gln Glu Gln Arg Leu Arg Asn
210      215      220
Asn Leu Ile
225

```

```

<210> 8
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Oligonucleotide

```

```

<400> 8
agcttttttt ttttc 15

```

```

<210> 9
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Arbitrary Primer

```

```

<400> 9
aagcttgcca tgg 13

```

```

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

WO 02/12470

8

PCT/US01/24942

<220>

<223> Oligo primer

<400> 10

tttgctcagc tgagctcct

19

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artifical Sequence

<220>

<223> Oligo primer

<400> 11

taagataaag gtaaggacac ta

22

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

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

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/012470 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/53,
9006, C01N 33/573, 33/566, A01K 67/027, C07K 16/40,
C12Q 1/68, C12N 5/10 // C07K 14/705Wayne, PA 19087 (US). KARATHANASIS, Sotirios, K.,
4496 Saline-Waterworks Road, Saline, MS 48176 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/24942

(74) Agents: CHOKSI, Neepa, Y. et al.; Durby & Durby P.C.,
805 Third Avenue, New York, NY 10022-7513 (US).

(22) International Filing Date: 8 August 2001 (08.08.2001)

(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/223,763 8 August 2000 (08.08.2000) US
60/255,838 15 December 2000 (15.12.2000) US(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).(71) Applicant: WYETH [US/US]; Five Giralda Farms, Madi-
son, NJ 07940 (US).Published:
with international search report(72) Inventors: EVANS, Mark, J., 617 Twin Bridges Drive,
Radnor, PA 19087 (US). SCICCHITANO, Marshall, S.,
104 Meadowcrest Lane, Douglassville, PA 19518 (US). BA-
PAT, Ashok, R., 1429 Sullivan Drive, Blue Bell, PA 19422
(US). BEER, Eric, 2 Dskoxes Avenue #12, Waltham, MA
02452 (US). BHAT, Ramesh, A., 738 Champlain Drive,
King of Prussia, PA 19406 (US). FERRIS, Elissa, 4498
Saline-Waterworks Road, Saline, MS 48178 (US). MAS-
TROENI, Robert, 357 Maiden Lane, Plymouth Meeting,
PA 19462 (US). ZHANG, Jianzong, 128 Easton Road,(88) Date of publication of the international search report:
28 August 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: A MEMBER OF THE LYSYL OXIDASE GENE FAMILY

SRCR-1 SRCR-2 SRCR-3 SRCR-4 CATALYTIC EER-7

SRCR-1 SRCR-2 SRCR-3 SRCR-4 CATALYTIC WS914
61% 34% 64% 58% 66%CATALYTIC Lysyl Oxidase Like
46%CATALYTIC Lysyl Oxidase
44%(57) Abstract: The present invention relates to a novel lysyl oxidase genes, termed EER-7. The invention relates to the protein and
nucleic acids encoding the protein. The invention further relates to an assay system to identify compounds that selectively modulate
EER-7 protein activity by interaction with estrogen receptors.

WO 02/012470 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		National Application No. PCT/US 01/24942
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/53 C12N9/06 G01N33/573 G01N33/566 A01K67/027 C07K16/40 C12Q1/68 C12N5/10 //C07K14/705		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
BIOSIS, EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LANGENAU D M ET AL: "The upregulation of messenger ribonucleic acids during 17alpha, 20beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one-induced ovulation in the perch ovary." JOURNAL OF MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 23, no. 2, October 1999 (1999-10), pages 137-152, XP002211806 ISSN: 0952-5041	1-25,40, 41,45,46
Y	page 144, right-hand column, paragraph 3 -page 147, left-hand column, paragraph 1; figures 4,5 -- -- -/-	26-39, 42-44
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *C* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 September 2002		11/10/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Madruga, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/24942
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAITO H ET AL: "Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 272, no. 13, 28 March 1997 (1997-03-28), pages 8157-8160, XP002187526 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	1-25, 40, 41, 45, 46
X	DATABASE EMBL 'Online!' 12 February 2000 (2000-02-12) Database accession no. AL139241 XP002211809 abstract	18-20
X	MORALES D E ET AL: "ESTROGEN PROMOTES ANGIOGENIC ACTIVITY IN HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS IN VITRO AND IN A MURINE MODEL" CIRCULATION, AMERICAN HEART ASSOCIATION, DALLAS, TX, US, vol. 91, no. 3, 1 February 1995 (1995-02-01), pages 755-763, XP000574264 ISSN: 0009-7322 the whole document	26-29, 42-44
X	DAVIS VICKI L ET AL: "Aberrant reproductive phenotypes evident in transgenic mice expressing the wild-type mouse estrogen receptor." ENDOCRINOLOGY, vol. 135, no. 1, 1994, pages 379-386, XP008008475 ISSN: 0013-7227 page 380, right-hand column, paragraph 3 -page 381, right-hand column, paragraph 4	46
E	WO 01 92495 A (MEYERS RACHEL ;MILLENNIUM PHARM INC (US)) 6 December 2001 (2001-12-06) SEQ ID NO: 2 claims; figures; examples	1-25, 40, 41, 45, 46
E	WO 01 83702 A (KIM YOUNGHO ;UNIV HAWAII (US); BOYD CHARLES D (US); CSISZAR KATALI) 8 November 2001 (2001-11-08) SEQ ID NO: 10 (LOXL4) claims; figures; examples -/-	1-25, 40, 41, 45, 46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/24942
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 00 61774 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC.; NI JIAN (US); ROSEN CRAIG A (US); RUBEN) 19 October 2000 (2000-10-19) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 7 page 15 -page 16 -----	1-15, 17-25, 40,41
Y	WO 00 37681 A (BHAT RAMESH A.; HARRIS HEATHER (US); AMERICAN HOME PROD (US)) 29 June 2000 (2000-06-29) claims -----	26-39, 42-44
X	SANADA H ET AL: "CHANGES IN COLLAGEN CROSS LINKING AND LYSYL OXIDASE BY ESTROGEN" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 541, no. 3, 1978, pages 408-413, XP008007649 EN ISSN: 0006-3002 cited in the application the whole document -----	1-46
X	OZASA H ET AL: "LYSYL OXIDASE ACTIVITY IN THE MOUSE UTERINE CERVIX IS PHYSIOLOGICALLY REGULATED BY ESTROGEN" ENDOCRINOLOGY, vol. 109, no. 2, 1981, pages 618-621, XP008007638 ISSN: 0013-7227 cited in the application the whole document -----	1-46
P,X	ITO HIROMU ET AL: "Molecular cloning and biological activity of a novel lysyl oxidase-related gene expressed in cartilage" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 276, no. 26, 29 June 2001 (2001-06-29), pages 24023-24029, XP002199860 ISSN: 0021-9258 the whole document -----	1-25,40, 41
A	US 5 945 279 A (POWER RONAN F ET AL) 31 August 1999 (1999-08-31) the whole document -----	1-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 national application No.
PCT/US 01/24942
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 01 24942

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claim 46 relates to an extremely large number of possible compounds. In fact, the claims contain so many options, that a lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear, namely those referring to estrogen receptor, recited in the examples.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/24942

107/00-07/2002

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0192495	A	06-12-2001	AU	6516201 A	11-12-2001
			WO	0192495 A2	06-12-2001
			US	2002068322 A1	06-06-2002
WO 0183702	A	08-11-2001	AU	6119401 A	12-11-2001
			WO	0183702 A2	08-11-2001
WO 0061774	A	19-10-2000	AU	4073600 A	14-11-2000
			AU	4081000 A	14-11-2000
			AU	4451300 A	14-11-2000
			EP	1198474 A1	24-04-2002
			EP	1175440 A1	30-01-2002
			WO	0061625 A1	19-10-2000
			WO	0061774 A2	19-10-2000
			WO	0061614 A2	19-10-2000
			AU	5457000 A	02-01-2001
			EP	1189917 A1	27-03-2002
			WO	0077021 A1	21-12-2000
WO 0037681	A	29-06-2000	AU	2187900 A	12-07-2000
			CN	1352699 T	05-06-2002
			EP	1141405 A1	10-10-2001
			NO	20012999 A	15-08-2001
			WO	0037681 A1	29-06-2000
US 5945279	A	31-08-1999	US	5834213 A	10-11-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/40	C 0 7 K 16/40	4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/06	B
C 1 2 N 9/06	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A

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

(72)発明者 ババット アショク アール.

アメリカ合衆国 1 9 4 2 2 ペンシルバニア州 ブルー ベル サリバン ドライブ 1 4 2 9

(72)発明者 ビーア エリック

アメリカ合衆国 0 2 4 5 2 マサチューセッツ州 ウォルサム ドロレス アベニュー 2 ナンバー 1 2

(72)発明者 バート ラメシュ エイ.

アメリカ合衆国 1 9 4 0 6 ペンシルバニア州 キング オブ プルシア チャンプレイン ドライブ 7 3 8

(72)発明者 フェリス エリッサ

アメリカ合衆国 4 8 1 7 8 ミシシッピ州 サリン サリン-ウォーターワークス ロード 4 4 9 8

(72)発明者 マストロエニ ロバート

アメリカ合衆国 1 9 4 6 2 ペンシルバニア州 プリマス ミーティング メイドンレーン 3 5 7

(72)発明者 ザング ジアンジオング

アメリカ合衆国 1 9 0 8 7 ペンシルバニア州 ウェイン イーストン ロード 1 2 8

(72)発明者 カラサナシス ソティリオス ケイ.

アメリカ合衆国 4 8 1 7 6 ミシシッピ州 サリン サリン-ウォーターワークス ロード 4 4 9 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA08 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA02

EA04 GA11 HA12 HA15

4B050 CC03 DD07 LL01 LL03

4B063 QA19 QA20 QQ08 QQ13 QQ53 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34
QX02

4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA28 CA44 CA46

4C084 AA13 CA29 NA14 ZA36 ZC11 ZC80

4C086 EA16 NA20 ZA36 ZC11 ZC54

4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72 FA74