

(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2004-533848

(P2004-533848A)

(43) 公表日 平成16年11月11日(2004.11.11)

(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 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00		4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 11/00		4 B O 6 5
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 25/00		4 C O 8 4
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 35/00		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 168 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2003-512404 (P2003-512404)	(71) 出願人	503412148 バイエル・ヘルスケア・アクチェンゲゼル シャフト Bayer HealthCare AG ドイツ連邦共和国51368レーフェルク ーゼン
(86) (22) 出願日	平成14年6月28日 (2002.6.28)	(74) 代理人	100068526 弁理士 田村 恭生
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月13日 (2004.1.13)	(74) 代理人	100103230 弁理士 高山 裕貢
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/007157	(74) 代理人	100087114 弁理士 齋藤 みの里
(87) 国際公開番号	W02003/006646		
(87) 国際公開日	平成15年1月23日 (2003.1.23)		
(31) 優先権主張番号	60/303, 693		
(32) 優先日	平成13年7月10日 (2001.7.10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ヒトアミノペプチダーゼNの調節

(57) 【要約】

ヒトアミノペプチダーゼNを調節する試薬およびヒトアミノペプチダーゼN遺伝子産物に結合する試薬は、がん、CNS障害またはCOPDを含みこれに限定されない機能不全または疾患の予防、改善または是正において役割を果たすことができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

アミノペプチダーゼ N ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、

a)

i . 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 37% 同一なアミノ酸配列 ; および

ii . 配列番号 2 に示すアミノ酸配列

より成る群から選ばれるアミノ酸配列を含むアミノペプチダーゼ N ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド ;

b) 配列番号 1 で示される配列を含むポリヌクレオチド ;

c) (a) および (b) で特定されるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、アミノペプチダーゼ N ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド ;

d) 遺伝コードの縮重のため、その配列が (a) から (c) に明記するポリヌクレオチド配列とは異なり、アミノペプチダーゼ N ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド ; および、

e) (a) から (d) で特定されるポリヌクレオチド配列の断片、誘導体またはアレル変異を表し、アミノペプチダーゼ N ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、より成る群から選ばれるポリヌクレオチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによりコードされている、実質上精製されたアミノペプチダーゼ N ポリペプチド。

【請求項 5】

以下の工程 :

a) 請求項 3 に記載の宿主細胞を、アミノペプチダーゼ N ポリペプチドの発現に好適な条件下で培養し ; そして、

b) アミノペプチダーゼ N ポリペプチドを宿主細胞培養から回収する、を含む、アミノペプチダーゼ N ポリペプチドを調製する方法。

【請求項 6】

以下の工程 :

a) 請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドを生体試料の核酸材料とハイブリダイズさせ、それによりハイブリダイゼーション複合体を形成し ; そして、

b) 該ハイブリダイゼーション複合体を検出する、

を含む、生体試料中の、アミノペプチダーゼ N ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出するための方法。

【請求項 7】

ハイブリダイゼーションの前に、生体試料の核酸材料を増幅させる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

以下の工程 :

a) 生体試料と、アミノペプチダーゼ N ポリヌクレオチドまたはアミノペプチダーゼ N ポリペプチドと特異的に相互作用する試薬とを接触させる工程、

b) 相互作用を検出する工程

を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載のアミノペプチダーゼ N ポリペプチドを検出するための方法。

【請求項 9】

請求項 6 から 8 までのいずれかに記載の方法を実施するための診断キット。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

- a . 被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドによりコードされる任意のアミノペプチダーゼ N ポリペプチドと接触させ；
- b . アミノペプチダーゼ N ポリペプチドに対する被験化合物の結合を検出する工程、を含む、アミノペプチダーゼ N の活性を低下させる物質をスクリーニングする方法であって、該ポリペプチドに結合する被験化合物を、アミノペプチダーゼ N の活性を低下させる可能性ある治療物質として同定する方法。

【請求項 1 1】

アミノペプチダーゼ N の活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、

- a . 被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドによりコードされるアミノペプチダーゼ N ポリペプチドと接触させ；そして、
- b . 該ポリペプチドのアミノペプチダーゼ N 活性を検出する工程、を含む、アミノペプチダーゼ N 活性を増大させる被験化合物を、アミノペプチダーゼ N の活性を増大させる可能性ある治療物質として同定し、そして該ポリペプチドのアミノペプチダーゼ N 活性を低下させる被験化合物を、アミノペプチダーゼ N の活性を低下させる可能性ある治療物質として同定する方法。

10

【請求項 1 2】

アミノペプチダーゼ N の活性を低下させる物質をスクリーニングする方法であって、

- a . 被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドと接触させ、該ポリヌクレオチドに対する被験化合物の結合を検出する工程
- を含み、該ポリヌクレオチドに結合する被験化合物を、アミノペプチダーゼ N の活性を低下させる可能性ある治療物質として同定する方法。

20

【請求項 1 3】

以下の工程を含む、アミノペプチダーゼ N の活性を減少させる方法。

【請求項 1 4】

- a . 細胞を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載の任意のアミノペプチダーゼ N ポリペプチドに特異的に結合する試薬と接触させ、それによりアミノペプチダーゼ N の活性を減少させる工程。

【請求項 1 5】

請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれかに記載の方法によって同定される、アミノペプチダーゼ N ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性を調節する試薬。

30

【請求項 1 6】

配列番号 2 に記載の発現ベクターまたは請求項 1 4 に記載の試薬、および製薬的に許容し得る担体を含む医薬組成物。

【請求項 1 7】

疾患におけるアミノペプチダーゼ N の活性を調節するための医薬の製造のための、配列番号 2 に記載の発現ベクターまたは請求項 1 4 に記載の試薬の使用。

【請求項 1 8】

前記疾患が、癌、CNS 障害または COPD である、請求項 1 6 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、ヒトアミノペプチダーゼ N の調節に関する。

【背景技術】

【0002】

アミノペプチダーゼ N (膜アラニルアミノペプチダーゼ) は、一般的なペプチド分解において機能するペプチダーゼである。本酵素は、小腸膜に存在し、胃および膵臓のプロテアーゼによるタンパク質加水分解によって生じたペプチドの最終的な分解において機能する (Kruse et al., 1988, FEBS Lett. 239: 305-308)。当分野において、調節により治療効果をもたらすことができる関連する酵素を同定する必要性がある。

【発明の開示】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

発明の要旨

本発明の目的は、ヒトアミノペプチダーゼNを調節する試薬および方法を提供することである。本発明のこのおよびその他の目的は、下に記載する1またはそれ以上の態様によって提供される。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明の一つの態様は、

配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも約37%同一なアミノ酸配列；および

配列番号2に示すアミノ酸配列

からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含むアミノペプチダーゼNポリペプチドである。

【0005】

本発明のさらに別の態様は、細胞外マトリックス分解を減少させる試薬をスクリーニングする方法である。被験化合物を、

配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも約37%同一なアミノ酸配列および

配列番号2に示すアミノ酸配列

からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含むアミノペプチダーゼNポリペプチドと接触させる。

【0006】

被験化合物とアミノペプチダーゼNポリペプチドとの結合を検出する。それにより、アミノペプチダーゼNポリペプチドに結合する被験化合物を、細胞外マトリックス分解を減少させる可能性のある試薬として同定する。この試薬はアミノペプチダーゼNの活性を減少させることによって作用し得る。

【0007】

本発明の別の態様は、細胞外マトリックス分解を減少させる物質をスクリーニングする方法である。被験化合物を、

配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%同一なヌクレオチド配列；および

配列番号1に示すヌクレオチド配列

からなる群から選ばれるヌクレオチド配列を含む、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと接触させる。

【0008】

このポリヌクレオチドに対する試験化合物の結合を検出する。このポリヌクレオチドに結合する試験化合物を、細胞外マトリックス分解を増大させる可能性のある試薬として同定する。この試薬は、アミノペプチダーゼNmRNAとの相互作用を介してアミノペプチダーゼNの量を減少させることによって作用し得る。

【0009】

本発明のさらに別の態様は、細胞外マトリックス分解を調節する試薬をスクリーニングする方法である。被験化合物を、

配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも約37%同一なアミノ酸配列；および

配列番号2に示すアミノ酸配列

からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含むアミノペプチダーゼNポリペプチドと接触させる。

【0010】

ポリペプチドのアミノペプチダーゼN活性を検出する。ポリペプチドのアミノペプチダーゼN活性を、試験化合物不在下でのアミノペプチダーゼN活性と比較して増加させる試験化合物は、それにより、細胞外マトリックス分解を増大させる可能性のある試薬として同定する。ポリペプチドのアミノペプチダーゼN活性を、その試験化合物の不在下でのアミノペプチダーゼN活性と比較して減少させる試験化合物は、それにより、細胞外マトリッ

10

20

30

40

50

クス分解を減少させる可能性のある試薬として同定する。

【0011】

本発明のさらに別の態様は、細胞外マトリックス分解を減少させる試薬をスクリーニングする方法である。被験化合物を、

配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%同一なヌクレオチド配列；および

配列番号1に示すヌクレオチド配列

からなる群から選ばれるヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドのアミノペプチダーゼN産物と接触させる。

【0012】

このアミノペプチダーゼN産物に対する試験化合物の結合を検出する。このアミノペプチダーゼN産物と結合する試験化合物を、それにより、細胞外マトリックス分解を減少させる、可能性のある試薬として同定する。

【0013】

本発明のさらに別の態様は、細胞外マトリックス分解を減少させる方法である。細胞を、配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%同一なヌクレオチド配列；および

配列番号1に示すヌクレオチド配列

からなる群から選ばれるヌクレオチド配列を含む、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはそのポリヌクレオチドによってコードされる産物と特異的に結合する試薬と接触させる。

【0014】

細胞中のアミノペプチダーゼN活性は、それにより減少する。

【0015】

このように、本発明は、例えば、そのヒトアミノペプチダーゼNの活性部位でアクチベーターまたはインヒビターとして作用し得る試験化合物を同定するために用いることができるヒトアミノペプチダーゼNを提供する。ヒトアミノペプチダーゼNおよびその断片はまた、そのレセプターをブロックおよび効果的にそのレセプターの活性を減少することができる特異的な抗体を惹起するのに有用でもある。

【0016】

本発明は、以下からなる群から選択される、単離されたポリヌクレオチドに関する：

a) 配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも約37%同一なアミノ酸配列；および

配列番号2に示すアミノ酸配列

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

b) 配列番号1に示す配列を含むポリヌクレオチド；

c) (a)および(b)に示すポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

d) その配列が、遺伝コードの縮重のために(a)~(c)に示したポリヌクレオチド配列とは異なり、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；および

e) (a)~(d)に示すポリヌクレオチド配列の断片、誘導體またはアレル変異を示し、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

【0017】

さらに、本発明者によって、新規なアミノペプチダーゼN、特にヒトアミノペプチダーゼNは、癌、CNS障害またはCOPDを処置するための治療方法に用いることができることが発見された。ヒトアミノペプチダーゼNは、配列番号2に示したアミノ酸配列を含む。ヒトアミノペプチダーゼNのコード配列を配列番号1に示す。この配列は、染色体5q23.1に存在する。関連のEST(BG720834; BG719375; BG208666; BG11371; A1222989; BG623101)は、胎盤および精巢において発現する。

10

20

30

40

50

【0018】

ヒトアミノペプチダーゼNのアミノ酸配列は、942アミノ酸にわたり、swiss | P15144 | AMPN_HUMANアミノペプチダーゼN(配列番号3)(図1)と36%同一である。pfamデータベースに対する検索によってペプチダーゼファミリーM1が同定された。亜鉛金属プロテアーゼとしての本発明の機能を有するタンパク質は、プロサイト解析による亜鉛_プロテアーゼ領域の同定によって支持される。膜貫通領域およびプロサイトの特徴は、図1において下線で示している。金属の結合部位および活性部位の残基は太字で示す。

【0019】

本発明のヒトアミノペプチダーゼNは、これまでに同定されたアミノペプチダーゼN酵素をとして、いくつかの目的に有用であると期待される。ヒトアミノペプチダーゼNは、癌、CNS障害またはCOPD等の障害を処置する治療法に有用であると考えられる。ヒトアミノペプチダーゼNはまた、ヒトアミノペプチダーゼ活性化因子および阻害剤をスクリーニングするのに使用することもできる。

10

【0020】

ポリペプチド

本発明に係るヒトアミノペプチダーゼNポリペプチドには、配列番号2に示すアミノ酸配列で示されるアミノ酸配列から選択される、少なくとも6、10、15、20、25、50、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、または933個の連続アミノ酸または以下に定義されるその生物学的に活性体変異体が含まれる。したがって、本発明のアミノペプチダーゼNポリペプチドは、アミノペプチダーゼNの一部、完全長のヒトアミノペプチダーゼN、またはアミノペプチダーゼNの全部または一部を含む融合タンパク質であり得る。

20

【0021】

生物学的に活性な変異体

生物学的に活性な、即ちリガンドと結合して生物学的な効果、例えばサイクリックAMP形成、細胞内カルシウムの移動、またはホスホイノシチド代謝、をもたらし能力を保持するアミノペプチダーゼNポリペプチド変異体もまた、アミノペプチダーゼNポリペプチドである。好ましくは、天然または非天然に存在するアミノペプチダーゼNポリペプチド変異体は、配列番号2に示すアミノ酸配列またはその断片と少なくとも約37、40、45、50、好ましくは約55、65、70、75、90、96または98%一致するアミノ酸配列を有する。推定されるアミノペプチダーゼNポリペプチド変異体と配列番号2のアミノ酸配列との一致パーセントは、慣用の方法によって決定する。例えば、Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48:603 (1986)、およびHenikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992)を参照。簡潔には、2つのアミノ酸配列を、ギャップオープニングペナルティ10、ギャップ伸長ペナルティ1、およびHenikoff and Henikoff (i bid.)の「BLOSUM62」スコアリングマトリクスを用いてアライメントスコアが最適になるよう整列させる。当業者は、2つのアミノ酸配列を整列させるために用いることができる確立されたアルゴリズムが多く存在することを理解している。Pearson and Lipmanの「FASTA」類似性検索アルゴリズムは、本明細書に開示されたアミノ酸配列と推定の変異体のアミノ酸配列が共有する同一性のレベルを調べるための適当なタンパク質アライメント法である。FASTAアルゴリズムは、Pearson and Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444(1988)、およびPearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990)に記載されている。簡潔には、FASTAは、最初に、保存的なアミノ酸置換、挿入または欠失を考慮することなく、照会する配列(即ち、配列番号2)および最も高い同一性の密度(k_{tup}変数が1である場合)または同一の対(k_{tup}=2の場合)のいずれかを有する試験配列が共有する領域を同定することによって配列の類似性を特徴付ける。次いで、最も高い同一性の密度を有する10の領域を、アミノ酸置換マトリクスを用いてすべての対のアミノ酸の類似性を比較するこ

30

40

50

とによって再スコア化し、その領域の末端を、最も高いスコア貢献する残基のみを含むように切り取る。「切り捨て (cutoff)」値 (配列の長さ k と k tup 値に基づいて所定の式によって計算された) よりも大きいスコアを有する領域がいくつか存在する場合は、切取った最初の領域を調べ、その領域が連結して gap を有する近似アライメントを形成することができるかどうかを決定する。最後に、2つのアミノ酸配列の最も高いスコアの領域を、アミノ酸挿入および欠失を許容する、Needleman-Wunsch-Sellers アルゴリズム (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444 (1970); Sellers, *SIAM J. Appl. Math.* 26:787 (1974)) を用いて整列させる。FASTA 分析に好ましいパラメーターは、以下のとおりである: k tup=1, ギャップオープニングペナルティ=10, ギャップ伸長ペナルティ=1, および置換マトリクス=BLOSUM62。これらのパラメーターは、Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63 (1990) の別紙 2 において説明されているように、スコアリングマトリクスファイル (「SMATRIX」) に修飾を施して FASTA プログラムに導入することができる。FASTA は、上記の比率を用いて核酸分子の配列同一性を決定するために用いることもできる。ヌクレオチド配列の比較に関して、 k tup 値は、1 ~ 6 の範囲内、好ましくは 3 ~ 6 の範囲、最も好ましくは 3 であってよく、その他のパラメーターは既定値である。

【0022】

同一性の百分率における変化は、例えば、アミノ酸置換、挿入または欠失に起因し得る。アミノ酸置換は 1 対 1 のアミノ酸の置き換えとして定義される。置換されたアミノ酸が類似の構造的および/または化学的性質を有する場合、置換は保存的である。保存的置換の例は、イソロイシンまたはバリンによるロイシンの置換、グルタミン酸塩によるアスパラギン酸塩の置換、またはセリンによるスレオニンの置換である。

【0023】

アミノ酸挿入または欠失は、アミノ酸配列への、またはその内部での変化である。これらは典型的には約 1 ないし 5 アミノ酸の範囲で起こる。アミノペプチダーゼ N ポリペプチドの生物学的または免疫学的活性を廃絶することなく、どのアミノ酸残基が置換、挿入または欠失できるかを決定する際の指針は、当分野で周知のコンピュータプログラム、例えば DNASTAR ソフトウェアを用いて見出すことができる。

【0024】

本発明はさらに、例えばグリコシレーション、アセチル化、リン酸化、アミド化、周知の保護/ブロック基による誘導体化、タンパク質加水分解的開裂、抗体分子またはその他の細胞リガンド等への結合によって、翻訳の間または翻訳後に異なった形で修飾されるアミノペプチダーゼ N ポリペプチドを包含する。数多くの化学的修飾のうちいずれも、臭化シアン、トリプシン、チモトリプシン、パパイン、V8 プロテアーゼ、 NaBH_4 、アセチル化、ホルミル化、酸化、還元、ツニカマイシンの存在下での代謝合成等が含まれるがこれに限定されない周知の技術によって行うことができる。

【0025】

本発明に包含されるさらなる翻訳後修飾には、例えば N 結合または O 結合炭化水素鎖、(N 末端または C 末端のプロセッシング) アミノ酸骨格への化学的部分の結合、N-結合または O-結合炭化水素鎖の化学的修飾、および原核宿主発現の結果としてのメチオニン残基の付加または欠失が含まれる。アミノペプチダーゼ N ポリペプチドはまた、酵素、蛍光、イオン等の検出可能な標識で、またはアフィニティー標識によって修飾して、タンパク質を検出し単離することができる。

【0026】

本発明はさらに、ポリペプチドの溶解性、安定性および循環時間の増大、または免疫原性の減少等 (米国特許第 4 1 7 9 3 3 7 号) のさらなる利点をもたらす、アミノペプチダーゼ N ポリペプチドの化学的に修飾された誘導体を提供する。誘導体化のための化学的部分は、ポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールコポリマー、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等から選択することができる。ポリペプチドは、無作為にまたはその分子内の予め決められた位置で修飾することができる、1、2、3 またはそれ以上の結合した化学的部分を含むことができる。

【0027】

アミノ酸変化またはポリペプチド修飾が生物学的に活性なアミノペプチダーゼNポリペプチドを生じるかどうかは、例えば、Ishii et al. (Int. J. Cancer 92(1) : 4954,2001)に記載されているように、酵素活性を分析することにより容易に決定することができる。

【0028】

融合タンパク質

融合タンパク質は、アミノペプチダーゼNポリペプチドアミノ酸配列に対する抗体の作製に、そして様々な検定系での使用に有用である。例えば、融合タンパク質は、アミノペプチダーゼNポリペプチドの一部と相互作用するタンパク質の同定に使用できる。タンパク質アフィニティークロマトグラフィーまたはタンパク質-タンパク質相互作用のためのライブラリーに基づく検定、例えば酵母ツーハイブリッドまたはファージディスプレイ系をこの目的のために使用できる。このような方法は当分野で周知であり、薬物スクリーニングとしても使用できる。

10

【0029】

アミノペプチダーゼNポリペプチド融合タンパク質は、ペプチド結合により融合した2つのポリペプチドセグメントを含んでいる。第一のポリペプチドセグメントは、配列番号2に示すアミノ酸配列の、少なくとも6、10、15、20、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、または933個の連続アミノ酸、または上記に記載したようなその生物学的に活性な変異体を含む。第一のポリペプチドセグメントはまた、完全長アミノペプチダーゼNを含むことができる。

20

【0030】

第二のポリペプチドセグメントは、完全長タンパク質またはタンパク質断片であってよい。融合タンパク質の組み立てに一般的に使用するタンパク質は、
- ガラクトシダーゼ、
- グルクロニダーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、自己蛍光タンパク質(青色蛍光タンパク質(BFP)を包含する)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、ルシフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)を包含する。さらに、融合タンパク質の組み立てには、ヒスチジン(His)標識、FLAG標識、インフルエンザヘマグルチニン(HA)標識、Myc標識、VSV-G標識、およびチオレドキシニン(Trx)標識を包含するエピトープ標識を使用する。その他の融合組み立て物は、マルトース結合タンパク質(MBP)、S-標識、Lexa DNA結合ドメイン(DBD)融合物、GAL4 DNA結合ドメイン融合物、および単純ヘルペスウイルス(HSV)BP16タンパク質融合物を包含する。融合タンパク質はさらに、このアミノペプチダーゼNポリペプチドが開裂して、ヘテロローガス部分から精製することができるように、アミノペプチダーゼNポリペプチドコード配列とヘテロローガスタンパク質配列の間に位置する開裂部位を含むよう組み立てることができる。

30

【0031】

融合タンパク質は当分野で周知のように化学合成できる。好ましくは、融合タンパク質は2つのポリペプチドセグメントを共有結合で連結することにより、または分子生物学分野で標準的な方法により調製する。例えば、当分野で知られているように、第二のポリペプチドセグメントをコードするヌクレオチドを有する適切なリーディングフレームに配列番号1から選ばれるコード配列を含む、DNA組み立て物を作製し、このDNA組み立て物を宿主細胞で発現させることによる組換えDNA法を用いて、融合タンパク質を調製することができる。融合タンパク質を組み立てるための多くのキットが、Promega Corporation(Madison, WI)、Stratagene(La Jolla, CA)、CLONTECH(Mountain View, CA)、Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)、MBL international Corporation(MIC; Watertown, MA)、およびQuantum Biotechnologies(Montreal, Canada; 1-888-DNA-KITS)といった企業

40

50

から入手できる。

【0032】

種相同体の同定

アミノペプチダーゼNポリペプチドのポリヌクレオチド(下記)を使用して他の種、例えばマウス、サル、または酵母由来のcDNA発現ライブラリーをスクリーニングするために好適なプローブまたはプライマーを作製し、アミノペプチダーゼNポリペプチドの相同体をコードするcDNAを同定し、そして当分野で周知のようにこのcDNAを発現させて、ヒトアミノペプチダーゼNポリペプチドの種相同体を得ることができる。

【0033】

ポリヌクレオチド

アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドは一本鎖または二本鎖であってよく、アミノペプチダーゼNポリペプチドのコード配列またはこのコード配列の相補体を含んでいる。アミノペプチダーゼNのコード配列は配列番号1に示す。

【0034】

ヒトアミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする縮重ヌクレオチド配列、および、配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50、55、60、65、70%、好ましくは約75、90、96、98もしくは99%一致するホモローガスなヌクレオチド配列またはこれらの相補物もまた、アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドである。二つのポリヌクレオチド配列間の配列一致パーセントは、ALIGNのようなコンピュータプログラムを用いて決定するが、これは、ギャップオープンペナルティー - 12およびギャップエクステンションペナルティー - 2によるアフィンギャップ検索を用いるFASTAアルゴリズムを使用するものである。相補的DNA(cDNA)分子、種相同体および生物学的に活性なアミノペプチダーゼNポリペプチドをコードするアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドの変異体もやはりアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドである。

配列番号1に示すアミノ酸配列の、少なくとも8、9、10、11、12、15、20または25個の連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチド断片またはその相補物もまたアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドである。これらの断片は、例えば、ハイブリダイゼーションプローブまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いることができる。

【0035】

ポリヌクレオチド変異体および相同体の同定

上記のアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドの変異体および相同体もまたアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドである。典型的には、ホモローガスなアミノペプチダーゼNポリヌクレオチド配列は、当分野で周知のように、ストリンジェントな条件下で候補ポリヌクレオチドを既知のアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドにハイブリダイズすることにより同定できる。例えば、以下の洗浄条件 -- 2X SSC(0.3M NaCl、0.03Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.1%SDS、室温2回、各々30分間；次いで2X SSC、0.1%SDS、50℃1回、30分間；次いで2X SSC、室温2回、各々10分間 -- を使用して、最大でも約25~30%の塩基対ミスマッチを含むホモローガス配列を同定できる。より好ましくは、ホモローガス核酸鎖は15~25%の塩基対ミスマッチを、さらに好ましくは5~15%の塩基対ミスマッチを含む。

【0036】

本明細書に開示するアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドの種相同体は、適当なプローブまたはプライマーを作製し、他の種、例えばマウス、サル、または酵母由来のcDNA発現ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することもできる。アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドのヒト変異体は、例えばヒトcDNA発現ライブラリーをスクリーニングすることにより同定できる。二本鎖DNAの T_m は相同性が1%低下する毎に1~1.5℃低下することがよく知られている(Bonner et al., J.Mol.Biol. 81,123(1973))。故にヒトアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドの変異体または他の種のアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドは、推定のホモローガスアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドを、配列番号1のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたはその相補物

10

20

30

40

50

とハイブリダイズさせて被験ハイブリッドを形成させることによって同定できる。被験ハイブリッドの融解温度を、完全に相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含むハイブリッドの融解温度と比較し、被験ハイブリッドの中の塩基対ミスマッチのパーセント数を算出する。

【0037】

ストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件に従いアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドまたはその相補物とハイブリダイズするヌクレオチド配列もまたアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドである。ストリンジェントな洗浄条件は当分野で周知且つ理解されており、例えばSambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed., 1989, 9.50-9.51頁に開示されている。

10

【0038】

典型的には、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件のためには、温度と塩濃度の組み合わせを、検討中のハイブリッドの理論的 T_m よりおよそ12~20低くなるよう選択すべきである。配列番号1に示すヌクレオチド配列を有するアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドまたはその相同体と、それらのヌクレオチド配列のいずれか1つと少なくとも約50、好ましくは約75、90、96、または98%一致するポリヌクレオチド配列とのハイブリッドの T_m は、例えば、Bolton and McCarthy, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48, 1390 (1962)の式：

$$T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [N a^+]) + 0.41 (\% G + C) - 0.63 (\% \text{ホルムアミド}) - 600 / l)$$

20

[式中、 l = 塩基対で表したハイブリッドの長さ]

を用いて算出できる。

【0039】

ストリンジェントな洗浄条件としては例えば、4X SSC (65)、または50%ホルムアミド、4X SSC (42)、または0.5X SSC、0.1% SDS (65)が挙げられる。高度にストリンジェントな洗浄条件は、例えば0.2X SSC (65)などである。

【0040】

ポリヌクレオチドの調製

アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドは、膜構成成分、タンパク質および脂質といった他の細胞成分を含まないよう単離できる。ポリヌクレオチドは細胞から調製でき、標準的核酸精製技術を用いて単離、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のような増幅技術を用いて合成、もしくは自動合成機を用いることによって調製できる。ポリヌクレオチドを単離する方法は常套的であり、当分野で知られている。ポリヌクレオチドを取得するためこのような任意の技術を用いて、単離されたアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドを得ることができる。例えば、制限酵素およびプローブを用いてアミノペプチダーゼNヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド断片を単離できる。単離したポリヌクレオチドは、他の分子を少なくとも70、80、または90%含まない調製物である。

30

【0041】

ヒトアミノペプチダーゼN cDNA分子は、アミノペプチダーゼN mRNAを鋳型に用いて標準的分子生物学技術にて調製できる。次いで、ヒトアミノペプチダーゼN cDNA分子を、当分野で周知でありSambrook et al. (1989)のようなマニュアルに開示される分子生物学技術を用いて複製することができる。ヒトゲノムDNAまたはcDNAを鋳型に使用して本発明に係るポリヌクレオチドのさらなるコピーを得るため、PCRのような増幅技術を用いることができる。

40

【0042】

別法として、合成化学技術を用いてアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドを合成することもできる。遺伝コードの縮重は、例えば配列番号1に示すアミノ酸配列を有するアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドまたはその生物学的に活性な変異体をコードする、別のヌクレオチド配列の合成を可能にする。

50

【0043】

ポリヌクレオチドの伸長

PCRに基づく様々な方法を用いて本明細書に開示の核酸配列を伸長させ、プロモーターおよび調節エレメントといった上流配列を検出することができる。例えば、制限部位PCRは、既知の座 (Sarkar, PCR Methods Applic. 2,318-322,1993) に隣接する未知の配列を回収するため、ユニバーサルプライマーを使用する。まず、ゲノムDNAを、リンカー配列に対するプライマーおよび既知領域に対し特異的なプライマーの存在下で増幅する。次に、増幅させた配列を、同じリンカープライマーおよび最初のもの内部にある別の特異的なプライマーを用いる第二回目のPCRに付す。各回のPCRの産物を適当なRNAポリメラーゼで転写し、逆転写酵素を用いて配列決定する。

10

【0044】

インバースPCRを用いて、既知領域 (Triglia et al., Nucleic Acids Res. 16,8186,1988) に基づく異なるプライマーを用いて配列を増幅または伸長することもできる。OLIGO 4.06 Primer Analysisソフトウェア (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.) のような市販ソフトウェアを用いて、長さ22~30ヌクレオチド長、50%またはそれ以上のGC含有量を持ち、約68~72の温度で標的配列とアニーリングするプライマーを設計できる。この方法は、遺伝子の既知領域に適当な断片を作り出す幾つかの制限酵素を使用する。次いでこの断片を分子内ライゲーションにより環化し、PCR鋳型として使用する。

【0045】

使用できるもう一つの方法は、ヒトおよび酵母人工染色体DNA中の既知配列に隣接するDNA断片のPCR増幅を含む、捕捉PCRである (Lagerstrom et al., PCR Methods Applic. 1,111-119,1991)。この方法では、複数の制限酵素消化とライゲーションを用いて、作製したある二本鎖の配列を、PCRを行う前にDNA分子の未知の断片中に配置することができる。

20

【0046】

未知の配列を回収するために使用できるもう一つの方法は、Parker et al., Nucleic Acids Res. 19,3055-3060,1991の方法である。加えて、PCR、ネスティッドプライマー、およびPROMOTERFINDERライブラリー (CLONTECH, Palo Alto, Calif.) を用いてゲノムDNAを移動させることができる (CLONTECH, Palo Alto, Calif.)。このプロセスはライブラリーをスクリーニングする必要性を排除し、イントロン/エクソン接合点の発見に有用である。

30

【0047】

完全長cDNAについてスクリーニングする場合、より大きなcDNAを含むようサイズ選択したライブラリーを使用するのが望ましい。遺伝子の5'領域を含む配列をより多く含んでいるという点で、無作為プライミングしたライブラリーが好ましい。無作為プライミングしたライブラリーの使用は、オリゴd(T)ライブラリーが完全長cDNAを産生しない状況で特に好ましいであろう。ゲノムライブラリーは、配列を5'非転写調節領域へと伸長させるのに有用であり得る。

【0048】

商業的に入手可能なキャピラリー電気泳動システムを用いて、PCRまたは配列決定産物のサイズを分析、またはヌクレオチド配列を確認することができる。例えば、キャピラリー配列決定は、電気泳動分離用の流動性ポリマー、レーザー励起する4種の異なる蛍光色素 (各ヌクレオチドにつき1種ずつ)、および電荷結合素子カメラによる放射された波長の検出を利用することができる。出力/光強度は適当なソフトウェア (例えばGENOTYPER およびSequence NAVIGATOR、Perkin Elmer) を用いて電気信号に変換でき、試料のロードからコンピューター分析および電子的データ表示に至る全プロセスをコンピューター管理することができる。キャピラリー電気泳動は、特定の試料中に限られた量で存在するかも知れないDNAの小片を配列決定するのに特に好ましい。

40

【0049】

50

ポリペプチドの取得

ヒトアミノペプチダーゼNポリペプチドは、例えばヒト細胞からの精製によって、アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドの発現によって、または直接的化学合成によって取得できる。

【0050】

タンパク質精製

ヒトアミノペプチダーゼNポリペプチドは、アミノペプチダーゼN発現構築物でトランスフェクトした宿主細胞を包含する、該酵素を発現する任意のヒト細胞から精製できる。精製されたアミノペプチダーゼNポリペプチドは、細胞内のアミノペプチダーゼNポリペプチドに通常付随するその他の化合物、例えば或る種のタンパク質、炭水化物、または脂質から、当分野で周知の方法を用いて分離する。このような方法は、サイズ排除クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム分画、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、および調製用ゲル電気泳動を包含するが、これらに限定されない。精製アミノペプチダーゼNポリペプチドの調製物は少なくとも80%純粋であり、好ましくは該調製物は90%、95%、または99%純粋である。調製物の純度はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような当分野で既知の任意の手段によって評価することができる。

10

【0051】

ポリヌクレオチドの発現

アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドを発現させるため、挿入されたコード配列の転写と翻訳に必要なエレメントを含む発現ベクター中にそのポリヌクレオチドを挿入することができる。アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする配列および適当な転写および翻訳調節エレメントを含む発現ベクターを組み立てるため、当業者に周知の方法が利用できる。これらの方法には、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えがある。このような技術は、例えばSambrook et al.(1989)およびAusubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York., 1989に記載されている。

20

【0052】

様々な発現ベクター/宿主系が、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする配列を含みそして発現させるために利用できる。これらには、微生物、例えば組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された細菌；酵母発現ベクターにより形質転換された酵母、ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）により感染させた昆虫細胞系、ウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）、もしくは細菌発現ベクター（例えばTiまたはpBR322プラスミド）により形質転換された植物細胞系、または動物細胞系が包含されるがこれらに限定される訳ではない。

30

【0053】

調節エレメントまたは調節配列は、宿主細胞タンパク質と相互作用して転写と翻訳を実行する、ベクターの非翻訳領域 エンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域である。このようなエレメントはその強さと特異性において変更しうる。利用するベクター系および宿主に応じて、構成的および誘導的プロモーターを包含する、任意の数の好適な転写および翻訳エレメントを使用できる。例えば、細菌系でクローニングを行う場合、BLUESCRIPTファージミド (Stratagene, LaJolla, Calif.) またはpSPORT1 プラスミド (Life Technologies) 等のハイブリッドlacZプロモーターのような誘導的プロモーターを使用できる。バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターは昆虫細胞に使用できる。植物細胞のゲノム（例えば熱ショック、RUBISCO、および貯蔵タンパク質遺伝子）、または植物ウイルス（例えば、ウイルスプロモーターまたはリーダー配列）由来のプロモーターまたはエンハンサーを該ベクター中にクローニングすることができる。哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子由来の、または哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが好ましい。アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を複数コピー含むセルライ

40

50

ンを作製する必要がある場合は、S V 4 0 または E B V に基づくベクターを適当な選択マーカーと共に使用することができる。

【 0 0 5 4 】

細菌および酵母発現系

細菌系では、数多くの発現ベクターをアミノペプチダーゼNポリペプチドに関して意図する用途に応じて選択することができる。例えば、抗体の誘導のため大量のアミノペプチダーゼNポリペプチドが必要である場合は、容易に精製できる融合タンパク質の高いレベルの発現を指令するベクターを用いることができる。このようなベクターは、BLUESCRIPT(S tratagene)のような多機能E.coliクローニングおよび発現ベクターを包含するが、これに限定される訳ではない。BLUESCRIPTベクターにおいては、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする配列を、ハイブリッドタンパク質が産生されるように、 - ガラクトシダーゼのアミノ末端Metとこれに続く7残基の配列と共にフレーム内で該ベクター中にライゲーションすることができる。p I Nベクター (Van Heeke & Schuster, J. Biol. C hem. 264,5503-5509,1989) または p G E Xベクター (Promega, Madison, Wis.) もまた、グルタチオンS - トランスフェラーゼ (G S T) を伴う融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させるのに使用できる。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン - アガロースビーズに吸着させ、その後遊離グルタチオンの存在下で溶離することにより、溶菌させた細胞から容易に精製できる。このような系で調製したタンパク質は、目的とするクローンポリペプチドをG S T 部分から随意に遊離させることができるように、ヘパリン、トロンピン、または第X a 因子プロテアーゼ開裂部位を含むよう設計することができる。

【 0 0 5 5 】

酵母Saccharomyces cerevisiaeにおいては、 因子、アルコールオキシダーゼ、およびP G Hのような構成的または誘導的プロモーターを含む数多くのベクターを使用することができる。総説としてAusubel et al.(1989)およびGrant et al., Methods Enzymol. 153, 516-544,1987を参照されたい。

【 0 0 5 6 】

植物および昆虫発現系

植物発現ベクターを使用する場合、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする配列の発現は、多数のプロモーターのうちの任意のプロモーターにより駆動できる。例えば、C a M V の 3 5 S および 1 9 S プロモーターのようなウイルスプロモーターを、単独で、またはT M V 由来のオメガリーダー配列と組み合わせて使用できる (Takamatsu, EMBO J. 6,307-311,1987)。別法として、RUBISCOの小サブユニットのような植物プロモーターまたは熱ショックプロモーターを使用することもできる (Coruzzi et al., EMBO J. 3,1671-1680,1984; Broglie et al., Science 224, 838-843,1984; Winter et al., Results Probl. Cell Differ. 17, 85-105,1991)。これらの組み立て物は、直接D N A 形質転換または病原体仲介トランスフェクションにより植物細胞中に導入することができる。このような技術は多くの一般に入手可能な総説に記載されている (例えば、HobbsまたはMurray、MCGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, McGraw Hill, New York, N.Y., p p191-196,1992)。

【 0 0 5 7 】

昆虫系もまたアミノペプチダーゼNポリペプチドの発現に使用できる。例えば、係る系の1つAutographa californica核多角体病ウイルス (A c N P V) は、Spodoptera frugiperda細胞またはTrichoplusiaの幼虫で外来遺伝子を発現させるベクターとして使用する。アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする配列を、ポリヘドリン遺伝子のような該ウイルスの非必須領域中にクローニングし、ポリヘドリンプロモーターの調節下に置くことができる。アミノペプチダーゼNポリペプチドをうまく挿入すると、ポリヘドリン遺伝子は不活性化し、コートタンパク質を欠く組換えウイルスが生成する。次いでこの組換えウイルスをS.frugiperda細胞またはTrichoplusiaの幼虫への感染に使用し、そこでアミノペプチダーゼNポリペプチドを発現させることができる (Engelhard et al., Proc. Nat. 50

Acad. Sci. 91, 3224-3227, 1994)。

【0058】

哺乳動物発現系

ウイルスに基づく多くの発現系を用いて哺乳動物宿主細胞においてアミノペプチダーゼNポリペプチドを発現させることができる。例えば、発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする配列は、後期プロモーターおよび3部に分かれたリーダー配列を含むアデノウイルス転写/翻訳複合体中にライゲーションできる。該ウイルスゲノムの非必須E1またはE3領域における挿入を用いて、感染宿主細胞においてアミノペプチダーゼNポリペプチドを発現できる生存ウイルスを取得できる (Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 3655-3659, 1984)。所望により、ラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサーのような転写エンハンサーを用いて哺乳動物宿主細胞での発現を増大させることができる。

10

【0059】

ヒト人工染色体 (HAC) もまた、プラスミドが内包し発現するDNA断片よりも大きなDNA断片の運搬に使用できる。6Mないし10MのHACを組み立て、常套的デリバリー法により細胞に到達させる (例えば、リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、または小胞)。

【0060】

さらに、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする配列の、より効率的な翻訳を達成するために、特異的開始シグナルを使用できる。係るシグナルはATG開始コドンおよび連続配列を包含する。アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする配列、その開始コドン、および上流配列を適当な発現ベクター中に挿入する場合、さらなる転写または翻訳調節シグナルは必要ないであろう。しかしながら、コード配列またはその断片のみを挿入する場合は、外因性の翻訳調節シグナル (ATG開始コドンを包含する) を供給すべきである。開始コドンは挿入物全体を確実に翻訳させるために、正しいリーディングフレームになければならない。外因性翻訳エレメントおよび開始コドンは天然および合成いずれの様々な起源であってよい。発現の効率は、使用する特定の細胞系に対し適切なエンハンサーを存在させることにより増強できる (Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20, 125-162, 1994)。

20

【0061】

宿主細胞

宿主細胞菌株は、挿入した配列の発現を調節する能力または発現されたアミノペプチダーゼNポリペプチドを所望の方法で処理できる能力を目的として選択できる。該ポリペプチドのこのような修飾には、アセチル化、カルボキシ化、グリコシル化、燐酸化、脂質化、およびアシル化が包含されるがこれらに限定されない。該ポリペプチドの「プレプロ」型を開裂する翻訳後プロセッシングもまた、正しい挿入、折り畳み、および/または機能を促進するために使用できる。翻訳後活性のための特異的な細胞機構および特徴的メカニズムを持つ異なる宿主細胞 (例えばCHO、HeLa、MDCK、HEK293およびWI38) が、American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) から入手でき、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするために選択できる。

30

40

【0062】

組換えタンパク質の、長期高収量産生のために、安定した発現が好ましい。例えば、アミノペプチダーゼNポリペプチドを安定に発現するセルラインは、ウイルス複製起点および/または内因性発現エレメント、および同じまたは別のベクター上にある選択マーカー遺伝子を含む発現ベクターを使用して形質転換することができる。該ベクターの導入に続いて、細胞を強化培地で1~2日間生育させた後、培地を選択培地に交換することができる。選択マーカーの目的は選択に対する抵抗性を付与することであり、その存在が、導入されたアミノペプチダーゼN配列をうまく発現する細胞の生育と回収を可能にする。安定に形質転換細胞の耐性クローンは、その細胞型にとって適当な組織培養技術を用いて増殖さ

50

せることができる。例えば、ANIMAL CELL CULTURE, R.I. Freshney, ed., 1986を参照されたい。

【0063】

幾つかの選択系を用いて、形質転換されたセルラインを回収できる。

【0064】

これらには、それぞれtk^rまたはaprt^r細胞で使用できる単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (Wigler et al., Cell 11, 223-32, 1977) およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy et al., Cell 22, 817-23, 1980) 遺伝子が包含されるがこれらに限定される訳ではない。さらに、代謝拮抗試薬、抗生物質、または除草剤耐性を選択の基準に用いることができる。例えば、dhfrはメソトレキサートに対する耐性を付与し (Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 3567-70, 1980)、nptはアミノグリコシド、ネオマイシンおよびG-418に対する耐性を付与し (Colbere-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150, 1014, 1981)、そしてalsおよびpatはそれぞれクロルスルフロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を付与する (Murray, 1992, 上記)。さらなる選択遺伝子が記載されている。例えば、trpBは細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用するようにさせ、hisDは細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用するようにさせる (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 8047-51, 1988)。アントシアニンのような可視マーカー、 β -グルクロニダーゼとその基質GUS、およびルシフェラーゼとその基質ルシフェリンは、形質転換体を同定し、特異的ベクター系に帰すことのできる一過性または安定なタンパク質発現の量を定量するために使用

10

20

【0065】

発現の検出

マーカー遺伝子発現の存在はアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドもまた存在することを示唆しているが、その存在と発現を確認する必要があるかもしれない。例えば、もしアミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする配列がマーカー遺伝子配列内部に挿入されているならば、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする配列を含む形質転換細胞は、マーカー遺伝子機能の不在によって同定できる。これに代わり、マーカー遺伝子を、単一のプロモーターの調節下にアミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする配列とタンデムに並べて位置させることもできる。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は、通常、アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドの発現を示す。

30

【0066】

これとは別に、アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドを含みアミノペプチダーゼNポリペプチドを発現する宿主細胞は、当業者に知られる様々な方法によって同定できる。これらの方法には、DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションおよびタンパク質生検またはイムノアッセイ技術 (核酸またはタンパク質の検出および/または定量のための膜、溶液、またはチップに基づく技術を包含する) が包含されるがこれらに限定されない。例えば、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の存在は、プローブまたは断片またはアミノペプチダーゼNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの断片を使用するDNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションまたは増幅によって検出できる。核酸増幅に基づく検定は、アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドを含む形質転換体を検出するための、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする配列から選択されるオリゴヌクレオチドの使用を含む。

40

【0067】

アミノペプチダーゼNポリペプチドに対し特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれかを使用して該ポリペプチドの発現を検出および測定するための様々なプロトコルが当分野で知られている。例として、酵素結合イムノソルベント検定 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、および蛍光活性化セルソーティング (FACS) がある。アミノペプチダーゼNポリペプチド上の2個の非干渉性エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いる、2部位のモノクローナルに基づくイムノアッセイが使用でき

50

、または、競合的結合検定を使用することができる。これらのそしてその他の検定は Hampton et al., SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL, APS Press, St. Paul, Minn., 1990および Maddox et al., J. Exp. Med. 158, 1211-1216, 1983に記載されている。

【0068】

多岐にわたる標識およびコンジュゲーション技術が当業者に知られており、様々な核酸およびアミノ酸検定に使用できる。アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための標識化ハイブリダイゼーションまたはPCRプローブを調製する手段は、標識したヌクレオチドを使用する、オリゴ標識化、ニック翻訳、末端標識化、またはPCR増幅を包含する。これとは別に、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする配列を、mRNAプローブの産生のためのベクター中にクローニングすることもできる。このようなベクターは当分野で既知であり、市販品が入手でき、標識化ヌクレオチドおよび適当なRNAポリメラーゼ、例えばT7、T3、またはSP6を添加することによりインピットロでのRNAプローブの合成に使用することができる。これらの方法は、市販の様々なキットを用いて実施できる(Amersham Pharmacia Biotech、Promega、およびUS Biochemical)。検出を容易にするために使用できる適当なりポーター分子または標識には、放射性核種、酵素、および蛍光、化学ルミネセント、または色素生成試薬、ならびに基質、補助因子、インヒビター、磁性粒子などが包含される。

10

【0069】

ポリペプチドの発現および精製

アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードするヌクレオチド配列で形質転換させた宿主細胞は、発現と、細胞培養からのタンパク質の回収に適した条件下で培養できる。形質転換細胞により産生されたポリペプチドは、その配列および/または使用したベクターに応じて分泌されまたは細胞内に貯留され得る。当業者には理解できるであろうが、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核または真核細胞膜を介する可溶性アミノペプチダーゼNポリペプチドの分泌を指令する、または膜結合アミノペプチダーゼNポリペプチドの、膜挿入を指令する、シグナル配列を含むよう設計することができる。

20

【0070】

上に論じたように、他の組み立て物を用いて、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする配列を、可溶性タンパク質の精製を促進するポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列と結合させることができる。このような精製促進ドメインは、金属キレート化ペプチド、例えば固定化金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュール、固定化免疫グロブリン上での精製を可能にするタンパク質Aドメイン、およびFLAGS伸長/アフィニティー精製系で利用するドメインが包含されるが、これらに限定されない(Immunex Corp., Seattle, Wash.)。精製ドメインとアミノペプチダーゼNポリペプチドとの間に開裂可能リンカー配列、例えば第Xa因子またはエンテロキナーゼに特異的なリンカー配列を入れること(Invitrogen, San Diego, CA)もまた、精製を促進するために利用できる。このような発現ベクターの1つは、アミノペプチダーゼNポリペプチドと、チオレドキシンまたはエンテロキナーゼ開裂部位に先立つ6個のヒスチジン残基とを含む融合タンパク質の発現をもたらす。このヒスチジン残基はIMAC(Porath et al., Prot. Exp. Purif. 3, 263-281, 1992に記載の固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー)による精製を促進し、一方エンテロキナーゼ開裂部位は融合タンパク質からのアミノペプチダーゼNポリペプチドの精製手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターはKroll et al., DNA Cell Biol. 12, 441-453, 1993に開示されている。

30

40

【0071】

化学合成

アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードする配列は、その全体または一部を、当分野で周知の化学的方法を用いて合成できる(Caruthers et al., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215-223, 1980; Horn et al., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232, 1980)。これとは別に、アミノペプチダーゼNポリペプチド自身を、そのアミノ酸配列を合成するため

50

の化学的方法、例えば固相技術を用いる直接ペプチド合成を用いて調製できる (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154, 1963; Roberge et al., Science 269, 202-204, 1995)。タンパク質合成は手動による技術またはオートメーションを用いて実施できる。自動化された合成は、例えばApplied Biosystems 431Aペプチド合成機 (Perkin Elmer) を用いて達成することができる。所望により、アミノペプチダーゼNポリペプチドの断片を別々に合成し、化学的方法を用いて合成して完全長の分子を調製することもできる。

【0072】

新たに合成したペプチドは、調製用高速液体クロマトグラフィー (例えばCreighton, PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983) により実質的に精製できる。合成アミノペプチダーゼNポリペプチドの組成はアミノ酸分析または配列決定により確認できる (例えばエドマン分解法; Creighton、上記を参照されたい)。さらに、直接合成中にアミノペプチダーゼNポリペプチドのアミノ酸配列の任意の部分を改変させ、そして/または化学的方法を用いて他のタンパク質由来の配列と合して、変異体ポリペプチドまたは融合タンパク質を調製することができる。

10

【0073】

改変ポリペプチドの調製

当業者には理解できるであろうが、天然に存在しないコドンをもつアミノペプチダーゼNポリペプチドコード化ヌクレオチドを調製することは有利であり得る。例えば、特定の原核または真核宿主が好むコドンを選択して、タンパク質発現の速度を増大させ、または所望の性質、例えば天然に存在する配列から産み出される転写物の半減期より長い半減期を持つRNA転写物を調製することができる。

20

【0074】

本明細書に開示するヌクレオチド配列は、当分野で一般的に知られる方法を用いて、該ポリペプチドまたはmRNA産物のクローニング、プロセッシングおよび/または発現を修飾する改変を包含する (但しこれらに限定される訳ではない) 様々な理由で、アミノペプチダーゼNポリペプチドコード配列を改変させるように設計できる。無作為断片化によるDNAシャフリングと遺伝子断片および合成オリゴヌクレオチドのPCR再構築を用いてヌクレオチド配列を設計できる。例えば、部位特異的突然変異誘発を用いて、新たな制限部位を挿入し、グリコシル化パターンを変え、コドンの優先性を変え、スプライス変異体を調製し、突然変異を導入する等を実施できる。

30

【0075】

抗体

当分野で知られているいかなる型の抗体も、アミノペプチダーゼNポリペプチドのエピトープに特異的に結合するよう作製できる。本明細書で使用する「抗体」とは、無傷の免疫グロブリン分子、およびその断片、例えばFab、(Fab')₂、およびFvを包含し、これらはアミノペプチダーゼNポリペプチドのエピトープに結合することが可能である。典型的には、エピトープを形成するためには少なくとも6、8、10、または12の連続するアミノ酸が必要である。しかしながら、非連続アミノ酸を含むエピトープはより多くの、例えば少なくとも15、25、または50のアミノ酸を必要とするかも知れない。

40

【0076】

アミノペプチダーゼNポリペプチドのエピトープに特異的に結合する抗体は治療に使用でき、そして免疫化学検定、例えばウェスタンブロット、ELISA、ラジオイムノアッセイ、免疫組織化学検定、免疫沈降、またはその他の当分野で既知の免疫化学的検定に使用できる。所望の特異性を有する抗体の同定のため、様々なイムノアッセイが使用できる。競合的結合または免疫放射検定のための多数のプロトコルが当分野でよく知られている。このようなイムノアッセイは典型的には、免疫原と、その免疫原に特異的に結合する抗体との間の複合体形成の測定を含んでいる。

【0077】

典型的には、アミノペプチダーゼNポリペプチドに特異的に結合する抗体は、免疫化学検定に使用する時、他のタンパク質が提供する検出シグナルより少なくとも5、10、また

50

は20倍高い検出シグナルを提供する。好ましくは、アミノペプチダーゼNポリペプチドに特異的に結合する抗体は、免疫化学検定で他のタンパク質を検出せず、アミノペプチダーゼNポリペプチドを溶液から免疫沈降させることができる。

【0078】

ヒトアミノペプチダーゼNポリペプチドは、哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、モルモット、サル、またはヒトを免疫してポリクローナル抗体を産生させるのに使用できる。所望により、アミノペプチダーゼNポリペプチドは、担体タンパク質、例えばウシ血清アルブミン、チログロブリン、およびキーホールリンペットヘモシアニンとコンジュゲートさせることができる。宿主の種に応じて、免疫学的反応を増大させるために種々のアジュバントを使用できる。このようなアジュバントは、フロイントアジュバント、鉱物性ゲル（例えば水酸化アルミニウム）、および界面活性試薬（例えばリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、およびジニトロフェノール）を包含するがこれらに限定されない。ヒトに使用するアジュバントの中ではBCG（bacilli Calmette-Guerin）およびCorynebacterium parvumが特に有用である。

10

【0079】

アミノペプチダーゼNポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体は、培養中の連続的セルラインにより抗体分子の産生を提供する任意の技術を用いて調製できる。これらの技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBV-ハイブリドーマ技術があるがこれらに限定されない（Kohler et al., Nature 256, 495-497, 1985; Kozbor et al., J. Immunol. Methods 81, 31-42, 1985; Cote et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 2026-2030, 1983; Cole et al., Mol. Cell Biol. 62, 109-120, 1984）。

20

【0080】

さらに、マウス抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子にスプライシングして適当な抗原特異性と生物学的活性を持つ分子を得る、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術が利用できる（Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 6851-6855, 1984; Neuberger et al., Nature 312, 604-608, 1984; Takeda et al., Nature 314, 452-454, 1985）。モノクローナルおよびその他の抗体はまた、これを治療に使用した場合に患者が該抗体に対する免疫反応を起こすのを防ぐため、「ヒト化」することができる。このような抗体は、治療に直接使用できるほど配列が充分ヒト抗体に類似しているかも知れず、または幾つかの重要な残基の変更を必要とするかも知れない。齧歯類の抗体とヒト配列の間の配列相違は、個々の残基の部位特異的突然変異誘発により、または相補性決定領域全体のグラフティング（grating）により、ヒト配列内の残基と相違する残基を置き換えることによって最小化することができる。別法として、ヒト化抗体はGB2188638Bに記載のように組換え法を用いて調製できる。アミノペプチダーゼNポリペプチドに特異的に結合する抗体は、U.S. 5,563,332に開示のように、部分的または完全にヒト化した抗原結合部位を含むことができる。

30

【0081】

これに代わり、当分野で既知の方法を用いて、一本鎖抗体の調製のために記載した技術を適合させ、アミノペプチダーゼNポリペプチドに特異的に結合する一本鎖抗体を調製することができる。関連する特異性を持つが別個のイデオタイプ組成を有する抗体を、無作為組み合わせ免疫グロブリンライブラリーから鎖シャフリングによって調製することができる（Burton, Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 11120-23, 1991）。

40

【0082】

一本鎖抗体はまた、ハイブリドーマcDNAを鋳型に用いて、PCRのようなDNA増幅法を用いて組み立てることができる（Thirion et al., 1996, Eur. J. Cancer Prev. 5, 507-11）。一本鎖抗体は単一または二重特異性であり得、また、二価または四価であり得る。四価二重特異性一本鎖抗体の組み立ては例えばColoma & Morrison, 1997, Nat. Biotechnol. 15, 159-63に教示されている。二価二重特異性一本鎖抗体の組み立てはMallende

50

r & Voss, 1994, J. Biol. Chem. 269, 199-206に教示されている。

【0083】

下記のように、一本鎖抗体をコードするヌクレオチド配列を手動または自動ヌクレオチド合成を用いて組み立て、標準的組換えDNA法を用いて発現組み立て物中にクローニングし、そして細胞中に導入してコード配列を発現させることができる。別法として、一本鎖抗体を、例えば糸状ファージ技術を用いて直接調製することもできる (Verhaar et al., 1995, Int. J. Cancer 61, 497-501; Nicholla et al., 1993, J. Immunol. Meth. 165, 81-91)。

【0084】

アミノペプチダーゼNポリペプチドに特異的に結合する抗体はまた、リンパ球集団においてインビボ産生を誘導することによって、または、文献に開示されている極めて特異的な結合試薬のパネルまたは免疫グロブリンライブラリーをスクリーニングすることによって調製することもできる (Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3833-3837, 1989; Winter et al., Nature 349, 293-299, 1991)。

10

【0085】

その他の型の抗体を、本発明方法において組み立て、治療に使用することができる。例えば、W093/03151に開示のように、キメラ抗体を組み立てることができる。免疫グロブリンから誘導され多価且つ多重特異的である結合タンパク質、例えばW094/13804に記載の「diabodies」もまた調製することができる。

【0086】

本発明に係る抗体は当分野で周知の方法により精製できる。例えば、抗体は、アミノペプチダーゼNポリペプチドが結合しているカラムを通過させることによりアフィニティー精製することができる。次いで、結合した抗体を、高い塩濃度の緩衝液を用いてカラムから溶出することができる。

20

【0087】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定のDNAまたはRNA配列に対し相補的なヌクレオチド配列である。いったん細胞中に導入されるとこの相補的なヌクレオチドは、該細胞が産生した天然配列と結合して複合体を形成し、転写または翻訳のいずれかを遮断する。好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは少なくとも11ヌクレオチド長であるが、少なくとも12、15、20、25、30、35、40、45もしくは50またはそれ以上のヌクレオチド長であってもよい。より長い配列もまた使用できる。アンチセンスオリゴヌクレオチド分子をDNA組み立て物に提供し、上記のように細胞中に導入して、その細胞におけるアミノペプチダーゼN遺伝子産物のレベルを低下させることができる。

30

【0088】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはこの両者の組み合わせであってよい。オリゴヌクレオチドは、1つのヌクレオチドの5'末端を、アルキルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホノチオエート、アルキルホスホネート、ホスホロアミデート、燐酸エステル、カルバメート、アセトアミデート、カルボキシメチルエステル、カルボネート、および燐酸トリエステルといった非ホスホジエステルヌクレオチド間結合を有する別のヌクレオチドの3'末端と共有結合させることにより、手動で、または自動合成機によって合成できる。Brown, Meth. Mol. Biol. 20, 1-8, 1994; Sonveaux, Meth. Mol. Biol. 26, 1-72, 1994; Uhlmann et al., Chem. Rev. 90, 543-583, 1990を参照されたい。

40

【0089】

アミノペプチダーゼN遺伝子の制御、5'、または調節領域と二本鎖を形成するアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計することにより、アミノペプチダーゼN遺伝子発現の修飾が得られる。転写開始部位、例えば開始部位より-10~+10位から誘導されるオリゴヌクレオチドが好ましい。同様に、「三重らせん」塩基対合法を用いて阻害を達成することができる。三重らせん対合は、二重らせんがポリメラーゼ、転写因子またはシャペロン

50

の結合に足るほど開く能力の阻害を惹起するため、有用である。三本鎖DNAを用いる治療上の進歩が文献に記載されている(例えばGee et al., Huber & Carr, MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994)。転写物がリボソームに結合するのを防ぐことによりmRNAの翻訳を遮断するアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた設計できる。

【0090】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドの相補配列との間に複合体をうまく形成させるためには、厳密な相補性は必要ない。例えば、アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドに対し厳密に相補的である2、3、4、もしくは5またはそれ以上の長さの連続するヌクレオチドであって、その各々が、隣接するアミノペプチダーゼNヌクレオチドとは相補的ではない連続するある長さのヌクレオチドによって隔てられているものを含有するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、アミノペプチダーゼNmRNAに対する十分な標的化特異性を提供できる。好ましくは、相補的な連続ヌクレオチドの長さはそれぞれ少なくとも4、5、6、7もしくは8またはそれ以上のヌクレオチド長である。非相補的な介在配列は、好ましくは1、2、3、または4ヌクレオチド長である。当業者は、アンチセンス-センスの対の算出融点を容易に使用して、特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドと特定のアミノペプチダーゼNポリヌクレオチド配列間で寛容されるミスマッチの程度を決定することができるであろう。

10

【0091】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドとハイブリダイズする能力に影響を及ぼすことなく修飾できる。これらの修飾は該アンチセンス分子の内部、または一端もしくは両端であり得る。例えば、ヌクレオチド間の燐酸結合は、アミノ基と末端リボースの間にいるいるな数の炭素残基を有するコレステリルまたはジアミン部分を加えることによって修飾できる。修飾された塩基および/または糖、例えばリボースの代わりにアラビノース、または3'ヒドロキシ基または5'燐酸基が置換されている3',5'-置換オリゴヌクレオチドもまた修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドに使用できる。これらの修飾オリゴヌクレオチドは当分野で周知の方法により調製できる。例えば、Agrawal et al., Trends Biotechnol. 10, 152-158, 1992; Uhlmann et al., Chem. Rev. 90, 543-584, 1990; Uhlmann et al., Tetrahedron. Lett. 215, 3539-3542, 1987を参照されたい。

20

30

【0092】

リボザイム

リボザイムは触媒活性を有するRNA分子である。例えば、Cech, Science 236, 1532-1539; 1987; Cech, Ann. Rev. Biochem. 59, 543-568; 1990, Cech, Curr. Opin. Struct. Biol. 2, 605-609; 1992, Couture & Stinchcomb, Trends Genet. 12, 510-515, 1996を参照されたい。当分野で知られるように、リボザイムは、RNA配列を開裂することにより遺伝子機能を阻害するのに使用できる(例えば、Haseloff et al., 米国特許5641673)。リボザイムの作用機構は、相補的標的RNAに対するリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションと、その後の内ヌクレオチド結合分解性(endonucleolytic)の開裂を含む。例には、特異的ヌクレオチド配列の内ヌクレオチド結合分解性開裂を特異的且つ効果的に触媒できる、設計されたハンマーヘッドモチーフリボザイム分子がある。

40

【0093】

アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドのコード配列を用いて、アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドから転写されたmRNAに特異的に結合するリボザイムを作製できる。他のトランスのRNA分子を極めて配列特異的に開裂できるリボザイムを設計し組み立てる方法が開発され、当分野に記載されている(Haseloff et al. Nature 334, 585-591, 1988)。例えば、リボザイムの開裂活性は、別個の「ハイブリダイゼーション」領域を該リボザイム中に組み入れることによって、特定のRNAを標的とさせることができる。このハイブリダイゼーション領域は標的RNAに対し相補的な配列を含んでおり、したがってその標的と特異的にハイブリダイズする(例えばGerlach et al., EP321201を参照された

50

い)。

【0094】

アミノペプチダーゼ N R N A 標的内部の特異的リボザイム開裂部位は、この標的分子を、以下の配列：G U A、G U U、およびG U Cを包含するリボザイム開裂部位についてスキャンすることにより同定できる。同定できたならば、該開裂部位を含む標的R N Aの領域に対応する、15～20のリボヌクレオチドを有する短いR N A配列を、標的を非機能的にし得る二次構造の特徴について評価することができる。さらに、候補のアミノペプチダーゼN R N A標的の適合性を、リボヌクレアーゼ防護検定を用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対する利用可能性を試験することによって評価することができる。より長い相補配列を用いて、標的に対するハイブリダイゼーション配列の親和性を増大させることができる。リボザイムのハイブリダイズおよび開裂する領域は、相補領域を介して標的R N Aにハイブリダイズすると、リボザイムの触媒領域が標的を開裂し得るといったように、完全に相関している。

10

【0095】

リボザイムはD N A組み立て物の一部として細胞内に導入することができる。マイクロ注入、リボソーム仲介トランスフェクション、エレクトロポレーション、または燐酸カルシウム沈殿といった機械的方法を用いて、アミノペプチダーゼN発現の低下が望まれる細胞中にリボザイム含有D N A組み立て物を導入することができる。これとは別に、細胞がD N A組み立て物を安定的に保持することが望まれる場合は、該組み立て物をプラスミド上で供給し、当分野で知られるように、別個の要素として維持するか、または細胞のゲノム中に組み込むことができる。リボザイムをコードするD N A組み立て物は、細胞中のリボザイムの転写を調節するために、プロモーター要素、エンハンサーまたはU A S要素、および転写ターミネーターシグナルといった転写調節要素を含み得る。

20

【0096】

Haseloff et al., 米国特許5641673に教示のように、リボザイムは、標的遺伝子の発現を誘導する因子に応答してリボザイムの発現が起こるように設計することができる。リボザイムはまた、追加レベルの調節を提供するように設計でき、その結果、m R N Aの破壊はリボザイムと標的遺伝子の両者が細胞に誘導された時にのみ起こる。

【0097】

区別的に発現される遺伝子

遺伝子産物がヒトアミノペプチダーゼNと相互作用する遺伝子の同定方法をここに記載する。このような遺伝子は、癌、C N S障害およびC O P Dを包含する(但しこれらに限定されない)障害において区別的に発現される遺伝子を表し得る。さらに、係る遺伝子は、このような障害の進行または処置に関連する操作に応答して区別的に調節される遺伝子を表し得る。加えて、このような遺伝子は、組織または生物の発生の異なる段階で増大または低下する、一時的に調節される発現を示すことができる。区別的に発現される遺伝子はまた、その発現を、対照対実験条件の下で調節させることができる。さらに、ヒトアミノペプチダーゼN遺伝子または遺伝子産物は、これ自体を区別的発現について試験できる。

30

【0098】

発現が正常対疾病状態で相違する程度は、標準的なキャラクタリゼーション技術、例えば区別的ディスプレイ技術によって視覚化されるに十分に大きいという点だけは必要である。発現の相違を視覚化することのできる、その他のこのような標準的なキャラクタリゼーション技術は、定量的R T(逆転写酵素)、P C R、およびノーザン分析を包含するが、これらに限定されない。

40

【0099】

区別的に発現される遺伝子の同定

区別的に発現される遺伝子を同定するためには、目的とする組織から全R N A、または好ましくはm R N Aを単離する。例えば、R N A試料は、実験対象の組織から、そして対照となる対象の対応組織から取得する。m R N Aの単離に対して選択しない任意のR N A単

50

離技術を、係るRNA試料の精製に利用できる。例えば、Ausubel et al., ed., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1987-1993を参照されたい。当業者に周知の技術、例えばChomczynski、米国特許4843155の一段階RNA単離プロセスを用いて多数の組織試料を容易に処理することができる。

【0100】

区別的に発現される遺伝子が産生したRNAを表す、集められたRNA試料内部の転写物は、当業者に周知の方法により同定する。これらには、例えば、ディファレンシャルスクリーニング (Tedder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 208-12, 1988)、差引きハイブリダイゼーション (Hedrick et al., Nature 308, 149-53; Lee et al., Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 2825, 1984)、および好ましくはディファレンシャルディスプレイ (Liang & Pardee, Science 257, 967-71, 1992; 米国特許5262311) が包含される。

10

【0101】

区別的発現の情報はこれ自体、ヒトアミノペプチダーゼNの関与する障害の治療のための関連法を示唆している。例えば、治療は、区別的に発現される遺伝子および/またはヒトアミノペプチダーゼNをコードする遺伝子の発現の調節を包含し得る。区別的発現の情報は、区別的に発現される遺伝子もしくは遺伝子産物またはヒトアミノペプチダーゼN遺伝子もしくは遺伝子産物の活性または発現が、アップレギュレーションであるかダウンレギュレーションであるかを示すことができる。

【0102】

スクリーニング方法

本発明は、アミノペプチダーゼNポリペプチドまたはアミノペプチダーゼNポリヌクレオチドに結合する、またはその活性を調節する、被験化合物をスクリーニングするための検定を提供する。被験化合物は好ましくはアミノペプチダーゼNポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する。より好ましくは、被験化合物は、被験化合物の不在時と比較して、酵素活性を少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%低下または増大させる。

20

【0103】

被験化合物

被験化合物は当分野で既知の薬理的試薬であってよく、または薬理活性を持っていることが前もって分かっていない化合物であってよい。この化合物は天然に存在する、または実験室で設計されたものであってよい。これらは、微生物、動物、または植物から単離されたものであってよく、そして組換え的に調製され、または当分野で既知の化学的方法により合成されたものであってよい。所望により被験化合物は、生物学的ライブラリー、空間的アドレス可能な並行固相または液相ライブラリー、デコンボリューションを要する合成ライブラリー法、「一ピース化合物」ライブラリー法、およびアフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法を包含する(但しこれらに限定される訳ではない)当分野で既知の数多くの組み合わせライブラリー法のいずれかを用いて取得できる。生物学的ライブラリーの方法は、ポリペプチドライブラリーに限定されているが、他の4種のアプローチはポリペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の小分子ライブラリーに適用できる。Lam, Anticancer Drug Des. 12, 145, 1997を参照されたい。

30

40

【0104】

分子ライブラリーの合成法は当分野でよく知られている(例えば、DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho et al., Science 261, 1303, 1993; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37, 1233, 1994を参照されたい)。化合物のライブラリーは溶液で(例えば、Houghton, Biotechniques 13, 412-421, 1992)、またはビーズ(Lam, Nature 354, 82-84, 1991)、チップ(Fodor, Nature 364, 555-556, 1993)、細菌または孢子(Ladner、米国特

50

許5223409)、プラスミド(Cull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 1865-1869, 1992)、またはファージ(Scott & Smith, Science 249, 386-390, 1990; Devlin, Science 249, 404-406, 1990);Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 6378-6382, 1990; Felici, J. Mol. Biol. 222, 301-310, 1991; およびLadner、米国特許5223409)上に提供できる。

【0105】

ハイスループットスクリーニング

被験化合物は、ハイスループットスクリーニングを用いて、アミノペプチダーゼNポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する能力、またはアミノペプチダーゼN活性もしくはアミノペプチダーゼN遺伝子発現に影響を及ぼす能力についてスクリーニングすることができる。ハイスループットスクリーニングを使用して、多くの化合物を個々に並行して試験でき、その結果多数の被験化合物を迅速にスクリーニングできる。最も広範に確立されている技術は、96ウェルマイクロタイタープレートを利用するものである。このマイクロタイタープレートのウェルは、典型的には50~500 μ lの範囲の検定容量を必要とする。このプレートに加えて、96ウェルフォーマットに適合させた多くの機器、材料、ピペット、ロボット、プレート洗浄機、およびプレート読み取り機が市販されている。

10

【0106】

別法として、「フリーフォーマット検定」、即ち試料間に物理的障壁を持たない検定が使用できる。例えば、組み合わせペプチドライブラリーのための、単純な均質検定で色素細胞(メラノサイト)を用いる検定が、Jayawickreme et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 19, 1614-18(1994)に記載されている。ペトリ皿中のアガロースの下にこの細胞を入れた後、組み合わせ化合物を伴っているビーズをアガロースの表面に載せる。組み合わせ化合物はこのビーズから化合物を部分的に放出する。化合物がゲルマトリックス中へと局所的に拡散するにつれて活性化合物が細胞の色の变化を惹起するため、活性化合物を暗色素領域として視覚化することができる。

20

【0107】

フリーフォーマット検定のもう一つの例は、生体分子スクリーニング学会第1回年次総会(Philadelphia, Pa.、1995年11月7-10日)で報告されたChelsky、「Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches,」により記載されている。Chelskyは、炭酸脱水酵素のための単純な均質酵素検定をアガロースゲルの内部に入れて、ゲル中の酵素がゲル全体に色の变化を惹起するようにさせた。その後、光リンカーを介して組み合わせ化合物を持つビーズをゲル内部に入れ、該化合物をUV光により部分的に放出させた。酵素を阻害する化合物は、色の变化の少ない局所的な阻害領域として観察された。

30

【0108】

さらに別の例がSalmon et al., Molecular Diversity 2, 57-63(1996)に記載されている。この例では、組み合わせライブラリーを、寒天中で生育する癌細胞への細胞毒性効果を有する化合物についてスクリーニングした。

【0109】

もう一つのハイスループットスクリーニング法がBeutel et al.、米国特許5976813に記載されている。この方法では、被験試料を多孔性マトリックスに入れる。次に1またはそれ以上の検定成分を、マトリックス、例えばゲル、プラスチックシート、フィルター、またはその他の形の容易に操作できる固体担体の内部、上、または底に入れる。試料がこの多孔性マトリックスに導入されると、これら試料は充分ゆっくりと拡散し、被験試料が混ざらずに検定を遂行することができる。

40

【0110】

結合検定

結合検定については、被験化合物は好ましくは、例えばアミノペプチダーゼNポリペプチドの活性部位に結合してこれを占有し、その結果正常な生物学的活性が妨げられるような小分子である。このような小分子の例は、小ペプチドまたはペプチド様分子を包含するが

50

、これらに限定される訳ではない。

【0111】

結合検定では、被験化合物またはアミノペプチダーゼNポリペプチドのいずれかは、検出可能な標識、例えば蛍光、放射性同位元素、化学ルミネセント、または酵素標識（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼ）を含むことができる。そこで、アミノペプチダーゼNポリペプチドに結合している被験化合物の検出は、例えば放射能の放出を直接計数することにより、またはシンチレーション計数により、または検出可能な産物への適当な基質の変換を測定することにより、達成することができる。

【0112】

別法として、アミノペプチダーゼNポリペプチドへの被験化合物の結合を、反応体のいずれをも標識せずに測定することができる。例えば、マイクロフィジオメーターを用いて、被験化合物とアミノペプチダーゼNポリペプチドとの結合を検出することができる。マイクロフィジオメーター（例えばサイトセンサー（Cytosensor（商標））とは、細胞がその環境を酸性化する速度を光応答性（addressable）電位差センサー（LAPS）を用いて測定する分析機器である。この酸性化速度の変化は、被験化合物とアミノペプチダーゼNポリペプチドの間の相互作用の指標として用いることができる（McConnell et al., Science 257, 1906-1912, 1992）。

【0113】

被験化合物がアミノペプチダーゼNポリペプチドに結合する能力の測定はまた、リアルタイムのBimolecular Interaction Analysis（BIA）のような技術を用いて達成することができる（Sjolander & Urbaniczky, Anal.Chem. 63,2338-2345,1991、およびSzabo et al., Curr.Opin.Struct.Biol. 5,699-705,1995）。BIAは、いかなる反応体をも標識せずに、生体特異的相互作用をリアルタイムで研究するための技術である（例えばBIAcore（商標））。光学的現象表面プラズモン共鳴（SPR）の変化を、生体分子間のリアルタイムの反応の指標に使用できる。

【0114】

本発明のさらに別の態様では、アミノペプチダーゼNポリペプチドを二ハイブリッド検定または三ハイブリッド検定（例えば、米国特許5283317; Zervos et al., Cell 72,223-232,1993; Madura et al., J.Biol.Chem. 268,12046-12054,1993; Bartel et al., Biotechniques 14,920-924,1993; Iwabuchi et al., Oncogene 8,1693-1696,1993; およびBrent W094/10300）における「おとりタンパク質」として使用し、アミノペプチダーゼNポリペプチドに結合またはこれと相互作用してその活性を調節する他のタンパク質を同定することができる。

【0115】

二ハイブリッド系は大部分の転写因子のモジュールの性格に基づくものであり、それは、分離可能なDNA結合および活性化ドメインから成っている。簡潔に述べると、この検定は二種の異なるDNA組み立て物を利用する。例えば、一方の組み立て物においては、アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、既知の転写因子のDNA結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに融合できる（例えばGAL-4）。別の組み立て物においては、未同定タンパク質（「餌」または「試料」）をコードするDNA配列が、既知の転写因子の活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドに融合できる。もし「おとり」および「餌」タンパク質がインピボで相互作用してタンパク質依存複合体を形成できたならば、該転写因子のDNA結合および活性化ドメインは極めて近位に招来される。この近位性は、転写因子に応答する転写調節部位と機能的に結合しているリポーター遺伝子（例えばlacZ）の転写を可能にする。リポーター遺伝子の発現は、検出することができ、機能的転写因子を含む細胞コロニーは、単離して、アミノペプチダーゼNポリペプチドと相互作用するタンパク質をコードするDNA配列を得るために使用することができる。

【0116】

10

20

30

40

50

反応体の一方または両方の非結合型からの結合型の分離を促進するため、そして検定の自動化の便宜を図るため、アミノペプチダーゼNポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物のいずれかを固定化することが望ましいかも知れない。したがって、アミノペプチダーゼNポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物のいずれかを固体支持体に結合させることができる。好適な固体支持体は、ガラスまたはプラスチックスライド、組織培養プレート、マイクロタイターウェル、チューブ、シリコンチップ、またはビーズ（ラテックス、ポリスチレン、またはガラスビーズを包含するがこれらに限定されない）のような粒子を包含するがこれらに限定されない。酵素ポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または試験化合物を、共有および非共有結合、受動吸収、またはそれぞれポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物に付着させた結合部分と固体支持体の対、の使用を包含する当分野で既知の任意の方法を用いてアミノペプチダーゼNポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物を固体支持体に付着させることができる。被験化合物は、好ましくは、個々の被験化合物の位置を追跡することができるように、固体支持体に整列させて結合させることができる。アミノペプチダーゼNポリペプチド（またはポリヌクレオチド）への被験化合物の結合は、反応体を入れるのに適した任意の容器で達成することができる。係る容器の例にはマイクロタイタープレート、試験管、およびマイクロ遠心管がある。

10

【0117】

一つの態様において、アミノペプチダーゼNポリペプチドは、アミノペプチダーゼNポリペプチドを固体支持体に結合させるドメインを含む融合タンパク質である。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質をグルタチオンセファロースビーズ（Sigma Chemical, St. Louis, Mo.）上またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着させ、次いでこれを被験化合物または被験化合物および非吸着アミノペプチダーゼNポリペプチドに合し；次にこの混合物を複合体形成が行われる条件下でインキュベートする（例えば、塩およびpHに関して生理的条件）。インキュベーションの後、ビーズまたはマイクロタイタープレートのウェルを洗浄して未結合成分を除去する。反応体の結合は上記のように直接的または間接的に測定できる。別法として、複合体を固体支持体から解離させた後に結合を測定することができる。

20

【0118】

本発明に係るスクリーニング検定には、タンパク質またはポリヌクレオチドを固体支持体上に固定化するためのその他の技術を使用することもできる。例えば、アミノペプチダーゼNポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物のいずれかを、ビオチンとストレプトアビジンのコンジュゲーションを利用して固定化できる。当分野で周知の技術（例えばビオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, Ill.）を用いて、ビオチニル化したアミノペプチダーゼNポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物をビオチン-NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）から調製し、ストレプトアビジン被覆した96ウェルプレート（Pierce Chemical）のウェルに固定化できる。別法として、アミノペプチダーゼNポリペプチド、ポリヌクレオチド、または被験化合物に特異的に結合するが、所望の結合部位、例えばアミノペプチダーゼNポリペプチドの活性部位に干渉しない抗体をプレートのウェルに誘導体化することができる。未結合の標的またはタンパク質が抗体コンジュゲーションによりウェル中に捕捉できる。

30

40

【0119】

GST-固定化複合体について上に記載した方法に加え、このような複合体を検出する方法には、アミノペプチダーゼNポリペプチドまたは被験化合物に特異的に結合する抗体を用いる、複合体の免疫検出、アミノペプチダーゼNポリペプチドの活性検出へと引き継がれる酵素結合検定、および非還元条件下でのSDSゲル電気泳動がある。

【0120】

アミノペプチダーゼNポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する被験化合物のスクリーニングは、無傷の細胞で実施することもできる。アミノペプチダーゼNポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む任意の細胞が、細胞に基づく検定系で使用できる。アミノ

50

ペプチダーゼNポリヌクレオチドは細胞中に天然に存在し、または上記のような技術を用いて導入することができる。アミノペプチダーゼNポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する被験化合物の結合は、上記のように測定する。

【0121】

機能検定

ヒトアミノペプチダーゼNポリペプチドの酵素活性を増大または低下させる能力について被験化合物を試験できる。酵素活性は、例えば、Ishii et al. (Int. J. Cancer 92(1): 49-54, 2001)に記載されているように測定することができる。

【0122】

酵素分析は、精製したアミノペプチダーゼNポリペプチド、細胞膜調製物、または無傷の細胞のいずれかを被験化合物と接触させた後に実施できる。アミノペプチダーゼNポリペプチドの酵素活性を少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%低下させる被験化合物を、ヒトアミノペプチダーゼN活性を減少させる可能性ある試薬として同定する。ヒトアミノペプチダーゼNの酵素活性を少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%増大させる被験化合物を、ヒトアミノペプチダーゼN活性を増大させる可能性ある試薬として同定する。

【0123】

遺伝子発現

別の態様では、アミノペプチダーゼN遺伝子発現を増大または減少させる被験化合物を同定する。アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドを被験化合物と接触させ、アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドのRNAまたはポリペプチド産物の発現を測定する。被験化合物存在下での適当なmRNAまたはポリペプチドの発現レベルを、該被験化合物不在下でのmRNAまたはポリペプチドの発現レベルと比較する。次いで、被験化合物を、この比較に基づく発現のモジュレーターとして同定することができる。例えば、mRNAまたはポリペプチドの発現が、被験化合物の不在時よりも存在時のほうが大きい場合は、この被験化合物を、該mRNAまたはポリペプチド発現の刺激因子または増強因子と同定する。また、mRNAまたはポリペプチドの発現が、被験化合物の不在時よりも存在時のほうが小さい場合は、この被験化合物を、該mRNAまたはポリペプチド発現のインヒビターと同定する。

【0124】

細胞におけるアミノペプチダーゼN mRNAまたはポリペプチド発現のレベルは、mRNAまたはポリペプチドを検出するための当分野で周知の方法により測定することができる。定性または定量的方法のいずれかが使用できる。アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドのポリペプチド産物の存在は、例えばラジオイムノアッセイのような免疫化学的方法、ウエスタンブロッティング、および免疫組織化学を包含する、当分野で周知の様々な技術を用いて測定することができる。別法として、ポリペプチド合成は、アミノペプチダーゼNポリペプチド内への標識アミノ酸の取り込みを検出することにより、インビボで、細胞培養で、またはインビトロ翻訳系で測定することができる。

【0125】

このようなスクリーニングは、無細胞検定系または無傷の細胞のいずれかで実施することができる。アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドを発現するいかなる細胞も細胞に基づく検定系で使用できる。アミノペプチダーゼNポリヌクレオチドは細胞内に天然に存在するか、または上記のような技術を用いて導入することができる。一次培養または確立されたセルライン、例えばCHOまたはヒト胚性腎293細胞のいずれかを使用できる。

【0126】

医薬組成物

本発明はさらに、治療効果を達成するために患者に投与することができる医薬組成物を提供する。本発明に係る医薬組成物は、例えばアミノペプチダーゼNポリペプチド、アミノペプチダーゼNポリヌクレオチド、リボザイムまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド、アミノペプチダーゼNポリペプチドに特異的に結合する抗体、または模擬物、アミノペ

10

20

30

40

50

チダーゼNポリペプチド活性の活性化因子またはインヒビターを含み得る。この組成物は単独で、または少なくとも1種類の他の試薬、例えば安定化化合物と組み合わせて投与でき、これは、食塩水、緩衝化食塩水、デキストロース、および水を包含する（但しこれらに限定されない）任意の無菌で生物学的適合性のある製薬的担体中で投与することができる。この組成物は単独で、または他の試薬、薬物またはホルモンと組み合わせて患者に投与することができる。

【0127】

活性成分に加えてこれらの医薬組成物は、製薬的に使用できる調製物への活性化化合物の処理を促進する賦形剤および補助試薬を含む適当な製薬的に許容し得る担体を含有することができる。本発明に係る医薬組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、非経口、局所、舌下、または直腸手段を包含する（但しこれらに限定されない）多くの経路により投与することができる。経口投与用医薬組成物は、当分野で既知の製薬的に許容し得る担体を用いて経口投与に適した用量に調合できる。このような担体により、該医薬組成物を、患者が内服するための錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル剤、液体、ゲル、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などに調合できる。

10

【0128】

経口使用のための医薬製剤は、活性化化合物を、固体賦形剤と合し、得られた混合物を所望により粉碎し、そしてこの顆粒混合物を、所望ならば適当な補助試薬を加えた後に処理して錠剤または糖衣剤核を得る。好適な賦形剤は炭水化物またはタンパク質増量剤、例えば乳糖、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを包含する糖；トウモロコシ、小麦、米、馬鈴薯、またはその他の植物由来の澱粉；セルロース、例えばメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはカルボキシメチルセルロースナトリウム；アラビアゴムおよびトラガカントゴムを包含するゴム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンのようなタンパク質である。所望により崩壊剤または可溶化剤、例えば架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムを添加できる。

20

【0129】

糖衣剤核は、濃縮糖溶液のような適当な被覆剤と共に使用でき、これはさらに、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物を包含することができる。製品の同定のためまたは活性化化合物の量、即ち用量をあらわすために染料または色素を錠剤または糖衣被覆剤に添加できる。

30

【0130】

経口的に使用できる医薬調合物は、ゼラチン製の押しではめ込む（push-fit）カプセル剤、ならびに、ゼラチンおよび被覆剤、例えばグリセロールまたはソルビトールでできた軟封入カプセル剤を包含する。押しではめ込むカプセル剤は、活性成分を、乳糖または澱粉のような増量剤または結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、および所望により安定剤と混合して含有できる。軟カプセル剤では、活性化化合物を、安定剤を加えたまたは加えない適当な液体、例えば脂肪油、液体、または液体ポリエチレングリコールに溶解または懸濁することができる。

40

【0131】

非経口投与に好適な医薬製剤は、水溶液、好ましくは生理学的適合性の緩衝液、例えばハanks溶液、リンゲル溶液、または生理学的に緩衝化した食塩水中で調合できる。水性注射用懸濁剤は、該懸濁液の粘度を増加させる試薬、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランを含有できる。さらに、活性化化合物の懸濁剤は適当な油性注射用懸濁剤として調製できる。好適な親油性溶媒または媒質は、胡麻油のような脂肪油、またはオレイン酸エチルまたはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、またはリポソームを包含する。非脂質ポリカチオンアミノポリマーもまたデリバリーに使用できる。所望により懸濁剤は、化合物の溶解性を増し高濃縮溶液の調製を可能にするような適当な安定剤または試薬を包含することができる。局所または鼻腔投与のためには

50

、透過すべき特定の障壁に対し適当な浸透剤を製剤に使用する。このような浸透剤は当分野で一般に知られている。

【0132】

本発明に係る医薬組成物は当分野で既知の方法で、例えば常套的混合、溶解、顆粒化、糖衣剤製造、すりつぶし、乳化、カプセル化、捕捉、または凍結乾燥プロセスによって製造できる。この医薬組成物は塩として提供でき、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、琥珀酸などを包含する（但しこれらに限定されない）多くの酸を用いて調製できる。塩は、水性または他のプロトン性溶媒において、対応する遊離塩基型よりもより可溶性の傾向がある。別の場合には、好ましい調製物は、pH範囲4.5ないし5.5において以下のもの：1～50 mMヒスチジン、0.1%～2%シュクロース、および2～7%マンニトール、の全てまたは任意のものを含有できる凍結乾燥粉末であってよく、これを使用前に緩衝液と合する。

10

【0133】

調合と投与のための技術のさらなる詳細は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Co., Easton, Pa)の最新版に見出すことができる。医薬組成物を製造した後、これらを適当な容器に入れ、適応状態の治療のためにラベルを貼る。このようなラベル表示は、投与の量、頻度、および投与方法を包含する。

【0134】

治療上の適応および方法

ヒトアミノペプチダーゼNを調節して、癌、CNS障害およびCOPDを処置することができる。

20

【0135】

癌

癌は、基本的に発癌性細胞形質転換によって発症する疾患である。形質転換細胞をそれらの正常な対応物から区別し、かつ癌の病態生理に基づく形質転換細胞の特徴は幾つかある。それらには、非制御型細胞性増殖、通常の死誘導シグナルに対する不応答（不死化）、増大した細胞運動性および侵襲性、新たな血管新生の誘導を通じた血液供給を補充するための増大した能力（血管新生）、遺伝子の不安定性、並びに調節不全遺伝子発現が挙げられる。薬剤耐性の獲得とともに、これらの異常な生理機能の種々の組み合わせにより、最終的に臓器不全および患者の死となる難治性疾患状態に頻繁に陥る。

30

【0136】

最も一般的な癌治療は、細胞増殖を標的とし、形質転換細胞と正常細胞との間の効率に関するその特異な増殖能に基づいている。このアプローチは、幾つかの重要な正常細胞タイプもまた高増殖であり、かつ癌細胞が高頻度にこれらの物質に対して耐性となるという現実により妨げられている。従って、従来の抗癌治療についての治療指数は珍しく2.0を超えている。

【0137】

ゲノクス主導の分子標的同定は、癌患者に安全で、かつより効率的な処置を提供する治療介入のための新たな癌特異的標的を同定する可能性を開いた。従って、新たに発見される腫瘍関連遺伝子およびその産物を疾患におけるそれらの機能（群）について試験でき、そして革新的な治療を発見し、かつ発展させるためのツールとして用いることができる。以上に概説した生理学的プロセスの多くに重要な働きがある遺伝子は、癌標的として特徴付けることができる。

40

【0138】

ゲノクスを通じて同定される遺伝子または遺伝子断片は容易に1つまたはそれ以上の非同相（ヘテロガス）発現系において発現させ、機能性組換えタンパク質を産生させることができる。このタンパク質は、その生物学的機能についてインピトロで特徴付けられ、その後その生物化学的活性の化学修飾因子（モジュレーター）を同定するため、ハイスループット分子スクリーニングプログラムにおけるツールとして用いられる。標的タンパク質活性のアゴニストおよび/またはインヒビターをこの様式で同定し、次いで、細胞およ

50

びインビボ疾患モデルにて抗癌活性について試験する。生物学的モデルにおける反復試験や、詳細な薬物動態力学的分析および中毒学的分析を用いたリード化合物の最適化により、薬物開発および次のヒトでの試験についての基礎を形成する。

【0139】

CNS障害

中枢および末梢神経系障害、例えば、脳損傷後の原発性および二次的障害、気分の障害、不安障害、思考および意思の障害、睡眠および覚醒の障害、運動単位の疾患、例えば、神経性および筋障害性の障害、神経変性疾患、例えばアルツハイマー病およびパーキンソン病および末梢および慢性的な疼痛もまた処置することができる。

【0140】

CNS障害に関連する疼痛もまた、ヒトアミノペプチダーゼNの活性を調節することによって処置できる。処置できる疼痛には、中枢神経系障害と関連するもの、例えば多発性硬化症、脊髄損傷、坐骨神経痛、失敗した腰部手術(failed back surgery)症候群、外傷性脳損傷、癲癇、パーキンソン病、脳卒中後、および脳や脊髄における血管破壊(例えば、梗塞、出血、血管新生異常)が挙げられる。非中枢神経因性疼痛には、乳房切除術後疼痛、反射性交感神経性ジストロフィー(RDS)、三叉神経痛ラジオキュロパシー(trigeminal neuralgia/radio-culopathy)、術後の疼痛、HIV/AIDS関連疼痛、癌疼痛、代謝神経痛(例えば、糖尿病性神経障害、結合組織疾患に対する第2の血管炎神経障害)、例えば肺癌種、白血病、リンパ腫、前立腺、大腸若しくは胃癌種、三叉神経痛および疱疹後神経痛と関連する腫瘍随伴性多発神経障害が挙げられる。癌および癌処置と関連する疼痛もまた処置でき、頭痛(例えば感覚的刺激を伴う片頭痛、感覚的刺激を伴わない片頭痛、および他の片頭痛障害)、偶発性および慢性緊張性頭痛、緊張型様頭痛、群発性頭痛や慢性発作性片頭痛も処置できる。

10

20

30

40

50

【0141】

慢性閉塞性肺(または気道)疾患(COPD)は、慢性気管支炎による肺気腫および末梢気道閉塞の併発が一般的な原因である、気流閉塞として生理的に定義される状態である(Senior & Shapiro, Pulmonary Diseases and Disorders, 3d ed., New York, McGraw-Hill, 1998, pp. 659-681, 1998; Barnes, Chest 117, 10S-14S, 2000)。肺気腫は、肺空気間隙の異常な拡張を引き起こす肺胞壁の破壊によって特徴付けられる。慢性気管支炎は、慢性的な喀痰を伴う咳が1年3ヶ月間、2年間連続して見られる状態として臨床的に定義される。COPDにおいては、気流閉塞は一般に進行性であり、希に好転することがある。COPDの発症において、タバコの喫煙はかなり重要な危険因子であるが、この疾患は非喫煙者にも発症する。

【0142】

気道の慢性炎症は、COPDの鍵となる病態的特徴である(Senior & Shapiro, 1998)。炎症細胞群には、増加した数のマクロファージ、好中球およびCD8⁺リンパ球が含まれる。吸引した刺激物、例えばタバコの煙が、気道に常在するマクロファージを活性化し、同様にケモカイン(例えば、インターロイキン-8)および他の走化因子の放出につながる上皮細胞を活性化する。これらの走化因子が作用して、血液から肺組織および気道へ輸送される好中球/単球を増加させる。気道に運ばれた好中球および単球が、ダメージを与える可能性のある種々の媒介物、例えばタンパク質分解酵素や活性酸素種を放出し得る。マトリックス分解、並びに気道壁の肥大化、界面活性機能障害および粘液過分泌を伴う気腫、これら全ては、可能性がある炎症性応答の合併症であり、気流およびガス交換の障害につながる。

【0143】

本発明は、上記のスクリーニング検定によって同定される新規試薬の使用にさらに関する。従って、本明細書に記載したように同定される被験化合物を適当な動物モデルに使用することは、本発明の範囲内にある。例えば、本明細書に記載したように同定される試薬(例えば、調節試薬、アンチセンス核酸分子、特異的抗体、リボザイムまたはアミノペプチダーゼNポリペプチド結合分子)を、そのような試薬を用いた処置の効果、毒性または副

作用を決定するために、動物モデルに用いることができる。あるいは、本明細書に記載したように同定された試薬を、該試薬の作用機序を決定するために、動物モデルに使用することができる。さらに、本発明は、本明細書に記載した処置に対する上記スクリーニング検定によって同定される新規試薬の使用に関する。

【0144】

アミノペプチダーゼN活性に影響を及ぼす試薬を、インビトロまたはインビボのいずれかにおいてアミノペプチダーゼN活性を低下させるために、ヒト細胞に投与することができる。この試薬は、ヒトアミノペプチダーゼN遺伝子の発現産物と結合することが好ましい。その発現産物がタンパク質である場合、この試薬は抗体であることが好ましい。生体外でのヒト細胞の処置については、抗体を、人体から取り出しておいた幹細胞の調製物に添加することができる。その後、その細胞を、当分野で周知のように、クローン増殖させるか、またはさせずに同じまたは別の人体に戻すことができる。

10

【0145】

1つの態様においては、リポソームを用いて試薬を送達する。好ましくは、リポソームは、投与した動物にて、少なくとも約30分間、より好ましくは少なくとも約1時間、さらにより好ましくは少なくとも約24時間安定であることが好ましい。リポソームは、試薬、特にポリヌクレオチドを、動物(例えばヒト)の特定の部位に標的化することができる脂質組成物を含む。好ましくは、リポソームの脂質組成物は、動物の特定の器官、例えば肺、肝臓、脾臓、心臓、脳、リンパ節および皮膚を標的化できる。

【0146】

本発明に有用なリポソームは、標的化した細胞の原形質膜と融合でき、その内容物を細胞に送達できる脂質組成物を含む。好ましくは、リポソームのトランスフェクション効率は約 10^6 細胞に送達されるリポソーム 16nmol 当たりDNA約 $0.5\mu\text{g}$ であり、より好ましくは約 10^6 細胞に送達されるリポソーム 16nmol 当たりDNA約 $1.0\mu\text{g}$ であり、さらにより好ましくは約 10^6 細胞に送達されるリポソーム 16nmol 当たりDNA約 $2.0\mu\text{g}$ である。好ましくは、リポソームは、直径が、約 $100\sim 500\text{nm}$ であり、より好ましくは約 $150\sim 450\text{nm}$ であり、さらにより好ましくは約 $200\sim 400\text{nm}$ である。

20

【0147】

本発明に用いるに適したリポソームは、例えば当業者に知られる遺伝子送達法に標準的に用いられるリポソームを含む。より好ましいリポソームは、ポリカチオン脂質組成物を有するリポソームおよび/またはポリエチレングリコールと連結されたコレステロールバックボーン(骨格鎖)を有するリポソームを含む。場合により、リポソームは特定の細胞タイプを標的化できる化合物、例えばリポソームの外側表面に曝される細胞特異的リガンドを包含する。

30

【0148】

リポソームを、試薬、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムと複合体化することは、当分野で標準的な方法(例えば、米国特許5,705,151を参照のこと)を用いて達成することができる。好ましくは、ポリヌクレオチド約 $0.1\mu\text{g}\sim 10\mu\text{g}$ をリポソーム約 8nmol 、より好ましくは約 $0.5\mu\text{g}\sim 5\mu\text{g}$ のポリヌクレオチドと組み合わせる、より好ましくはポリヌクレオチド約 $0.5\mu\text{g}\sim 5\mu\text{g}$ をリポソーム約 8nmol と組み合わせる、さらにより好ましくはポリヌクレオチド約 $1.0\mu\text{g}$ をリポソーム約 8nmol と組み合わせる。

40

【0149】

別の態様においては、抗体を、受容体媒介性標的化送達を用いて、インビボにて特定の組織に送達することができる。受容体媒介性DNA送達技術は、例えば、Findeisら、Trends in Biotechnol. 11, 202-05 (1993); Chiouら、GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J. A. Wolffら、) (1994); Wu & Wu, J. Biol. Chem. 263, 621-24 (1988); Wuら、J. Biol. Chem. 269, 542-46 (1994); Zenkeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 3655-59 (1990); Wuら、J. Biol. Chem. 266, 338-42 (19

50

91) にて教示されている。

【0150】

治療的有効量の決定

治療的有効量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内にある。治療的有効量とは、治療的有効量の不在下で起こるアミノペプチダーゼN活性に比較してアミノペプチダーゼN活性を増大または低下させる活性成分の量を指す。

【0151】

いかなる化合物に関しても、治療的有効量は、はじめに、細胞培養検定にて、または動物モデル（通常、マウス、ウサギ、イヌ、またはブタ）において見積もることができる。動物モデルは適当な濃度範囲および投与経路の決定にも使用できる。次にこのような情報を用いて、ヒトでの有用な用量と投与経路を決定することができる。

10

【0152】

治療的有効性および毒性、例えば ED_{50} （集団の50%で治療的に有効な用量）および LD_{50} （集団の50%で致死的な用量）は、培養細胞または実験動物にて、標準的薬学的方法により決定することができる。治療効果に対する毒性効果の用量比が治療指数であり、 LD_{50}/ED_{50} の比で表すことができる。

【0153】

大きな治療指数を示す医薬組成物が好ましい。培養細胞検定および動物実験から得られるデータを、ヒトへの使用のための用量範囲を処方する際に使用する。かかる組成物に含まれる用量は、好ましくは殆どまたは全く毒性を持たない ED_{50} を包含する循環濃度の範囲内である。この用量は、使用する用量型、患者の感受性、および投与経路に応じてこの範囲内で変わる。

20

【0154】

正確な用量は、治療を必要とする対象に関連する因子に照らして医師が決定する。用量および投与は、十分なレベルの活性成分を提供するよう、または所望の効果を保持するよう、調節する。考慮できる因子は、疾病状態の重篤度、対象の全身健康状態、年齢、体重、および対象の性別、食餌、投与の時間および頻度、薬物の組み合わせ、反応の感受性、および療法に対する寛容/応答を包含する。長時間作用性医薬組成物は、その具体的な製剤の半減期およびクリアランス率に応じて3から4日毎、毎週、または2週間に1回投与することができる。

30

【0155】

標準的な用量は、投与経路に応じて $0.1 \sim 100,000 \mu g$ まで変更することができる、総用量約 $1 g$ までとすることができる。特定の用量および送達方法についての指針は文献に提供されており、一般に当分野の医師が入手できる。当業者は、ヌクレオチド用にはタンパク質またはそれらのインヒビター用のものとは異なる製剤を使用するであろう。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達は特定の細胞、状態、場所などに特異的である。

【0156】

この試薬が一本鎖抗体である場合、この抗体をコードするポリヌクレオチドを構築し、トランスフェリン-ポリカチオン-媒介DNA転移、裸のまたはカプセル内核酸を用いるトランスフェクション、リポソーム媒介の細胞融合、DNA被覆ラテックスビーズの細胞内輸送、プロトプラスト融合、ウイルス感染、エレクトロポレーション、「遺伝子銃」、およびDEAEまたは燐酸カルシウム介在のトランスフェクションを包含する（但しこれらに限定される訳ではない）十分に確立した技術を用いて、*ex vivo*またはインビボで細胞内に導入することができる。

40

【0157】

抗体の有効なインビボ用量は、約 $5 \mu g \sim 約 50 \mu g/kg$ 、約 $50 \mu g \sim 約 5 mg/kg$ 、約 $100 \mu g \sim 約 500 \mu g/kg$ （患者の体重）、および約 $200 \sim 約 250 \mu g/kg$ （患者の体重）の範囲である。一本鎖抗体をコードするポリヌクレオチドの投与のためには、有効なインビボ用量は、約 $100 ng \sim 約 200 ng$ 、 $500 ng \sim 約 50 mg$ 、約 $1 \mu g \sim 約 2 mg$ 、約 5

50

μg ~ 約 500 μg 、および約 20 μg ~ 約 100 μg の DNA の範囲である。

【0158】

発現産物が mRNA である場合、試薬は好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムである。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを発現するポリヌクレオチドは、上記のように、多岐にわたる方法によって細胞中に導入することができる。

【0159】

好ましくは、試薬は、アミノペプチダーゼ N 遺伝子の発現またはアミノペプチダーゼ N ポリペプチドの活性を、該試薬の不在時と比較して少なくとも約 10、好ましくは約 50、より好ましくは約 75、90、または 100% 低下させる。アミノペプチダーゼ N 遺伝子の発現レベルまたはアミノペプチダーゼ N ポリペプチドの活性を低下させるよう選択した機構の有効性は、当分野で周知の方法、例えばアミノペプチダーゼ N 特異的 mRNA へのヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーション、定量的 RT-PCR、アミノペプチダーゼ N ポリペプチドの免疫学的検出、またはアミノペプチダーゼ N 活性の測定を用いて評価することができる。

【0160】

上記のいずれの態様においても、本発明に係る任意の医薬組成物は他の適当な治療薬と組み合わせ投与することができる。併用療法に使用するための適当な試薬の選択は、常套的製薬原理に従って当業者が実施することができる。治療薬の組み合わせは、相乗的に作用して、上記の様々な疾患の治療または予防を奏効させる。このアプローチを用いて、より低い各試薬の用量で治療効果を達成することができ、有害な副作用の可能性を低減することができる。

【0161】

上記の任意の治療方法を、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル、および最も好ましくはヒトといった哺乳動物を包含する、このような治療を必要とする任意の対象に適用することができる。

【0162】

診断方法

ヒトアミノペプチダーゼ N はさらに、この酵素をコードする核酸配列における突然変異の存在に関連する疾病および異常、または疾病および異常に対する感受性を検出する診断検定に使用できる。例えば、疾病に罹患している個体と正常な個体とにおけるアミノペプチダーゼ N をコードする cDNA またはゲノム配列の間の相違を決定することができる。もし罹患している個体の幾つかまたは全てに突然変異が観察され、正常な個体には観察されないならば、この突然変異がその疾病の原因であると思われる。

【0163】

参照遺伝子と突然変異を有する遺伝子との間の配列の相違は、直接の DNA 配列決定法によって明らかにできる。加えて、クローニングした DNA セグメントを、特定の DNA セグメントを検出するためのプローブとして使用できる。この方法の感受性は PCR と組み合わせたときに大きく増大する。例えば、二本鎖 PCR 産物または修飾 PCR により調製された一本鎖鑄型分子と共に、配列決定プライマーを使用することができる。配列決定は、放射標識したヌクレオチドを用いる常套的方法によって、または蛍光標識を使用する自動配列決定法によって実施する。

【0164】

DNA 配列相違に基づく遺伝子試験は、変性試薬を含むまたは含まないゲル中の DNA 断片の電気泳動移動度の変化を検出することにより実施することができる。小さな配列の欠失および挿入は、例えば高分解能ゲル電気泳動によって視覚化できる。異なる配列の DNA 断片は変性させるホルムアミド勾配ゲル上で識別でき、ここでは、異なる DNA 断片の移動度が、それらの特異的融解温度または部分的融解温度に従って、ゲル中の異なる位置で遅延する（例えば、Myersら、Science 230, 1242, 1985を参照されたい）。特定の位置での配列改変もまたヌクレアーゼ保護検定、例えば RNアーゼおよび S1 保護または化学

10

20

30

40

50

的開裂法によって明らかにすることができる(例えば、Cottonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4397-4401, 1985)。即ち特異的DNA配列の検出は、ハイブリダイゼーション、RNAアーゼ保護、化学的開裂、直接のDNA配列決定といった方法によって、または制限酵素とゲノムDNAのサザンブロッティングを使用することによって実施することができる。ゲル電気泳動およびDNA配列決定のような直接法に加えて、突然変異はin situ分析により検出することもできる。

【0165】

アミノペプチダーゼNのレベルの変化もまた種々の組織で検出できる。血液または組織生検のような、宿主から得られた身体試料中の受容体ポリペプチドのレベルを検出するために用いる検定は、当業者に周知であり、ラジオイムノアッセイ、競合的結合検定、ウェスタンブロット分析、およびELISA検定を包含する。

10

【0166】

本明細書に引用する全ての特許および特許出願は、引用により本明細書の一部とする。上記の開示は本発明を一般的に記載するものである。より完全な理解は以下の具体的な実施例を参照することによって得られ、それらの実施例は説明目的で提供するものであり、本発明の範囲を限定する意図は無い。

【実施例】

【0167】

実施例 1

アミノペプチダーゼN活性の検出

20

配列番号1に記載のポリヌクレオチドを発現ベクターpCEV4に挿入し、得られた発現ベクターpCEV4-アミノペプチダーゼNポリペプチドをヒト胚の腎臓293細胞にトランスフェクトする。これらの細胞から溶解物を得、1mLあたりRNAアーゼA(EC3.1.27.5; Sigma) 15Uと37にて30分間、および1mLあたりDNAアーゼI(EC3.1.21.1; Sigma) 1.7Uと20にて30分間インキュベーションし、細胞抽出物を、20,000×gにて20分間の遠心により回収する。タンパク質の濃度を、ウシ血清アルブミンを標準としてBradfordの方法により推定する。アミノペプチダーゼN活性の測定のために、蛍光法により118μMのLys-7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC)(Bachem)に対して0.1Mリン酸ナトリウム(pH7.0)中37にて、標準の酵素分析を行う。試料の体積は2~100μLであり、活性は、タンパク質1mgが、1分間あたりに基質を加水分解するマイクロモル数で表す。配列番号2のポリペプチドがアミノペプチダーゼN活性を有することが示される。

30

【0168】

実施例 2

組換えヒトアミノペプチダーゼNの発現

ピキアパストリス(*Pichia pastoris*)発現ベクターpPICZB(Invitrogen, San Diego, CA)を用いて、大量の組換えヒトアミノペプチダーゼNポリペプチドを酵母中に産生させる。アミノペプチダーゼNコード化DNA配列は配列番号1から誘導する。ベクターpPICZBに挿入する前に、DNA配列を、その5'端に開始コドン、および3'端にエンテロキナーゼ開列部位、His6レポータータグや終止コドンを含ませるといった周知の方法によって修飾する。さらに、その両末端に制限エンドヌクレアーゼの認識配列を加え、対応する制限酵素を用いてpPICZBの複数のクローニング部位を消化した後に、修飾されたDNA配列をpPICZB中にライゲートする。この発現ベクターを、ピキアパストリスにおいて、発現が酵母プロモーターにより誘導される誘導性発現用に設計する。得られたpPICZ/md-His6ベクターを用いて、酵母を形質転換する。

40

【0169】

この酵母を、5リッター振盪フラスコ中で通常の条件下にて培養し、組換えにより産生したタンパク質を、8M尿素の存在下でアフィニティークロマトグラフィー(Ni-NTA-樹脂)により培養物から単離する。結合したポリペプチドを、pH3.5の緩衝液を用いて溶出し、中和する。His6レポータータグからのポリペプチドの分離は、製造元の

50

指示に従い、エンテロキナーゼ (Invitrogen, San Diego, CA) を用いる部位特異的タンパク質分解により行なう。精製されたヒトアミノペプチダーゼ N ポリペプチドが得られる。

【0170】

実施例 3

アミノペプチダーゼ N ポリペプチドと結合する被験化合物の同定

グルタチオン-S-トランスフェラーゼタンパク質を含み 96 ウェル マイクロタイタープレートのグルタチオン誘導化ウェルに吸着した精製アミノペプチダーゼ N ポリペプチドを、生理緩衝溶液 pH 7.0 の小分子ライブラリー由来の被験化合物と接触させる。ヒトアミノペプチダーゼ N ポリペプチドは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む。被験化合物は蛍光標識を含む。この試料を 5 分間 ~ 1 時間インキュベートする。コントロール試料は、被験化合物の非存在下にてインキュベートする。

10

【0171】

被験化合物を含む緩衝液を、ウェルから洗い出す。アミノペプチダーゼ N ポリペプチドに対する被験化合物の結合を、ウェルの内容物の蛍光測定により検出する。被験化合物をインキュベートしていないウェルの蛍光と比較して少なくとも 15 % ウェル中の蛍光を増大させる被験化合物を、アミノペプチダーゼ N ポリペプチドと結合する化合物と同定する。

【0172】

実施例 4

アミノペプチダーゼ N 遺伝子発現を低下させる被験化合物の同定

被験化合物を、アミノペプチダーゼ N 発現構築物でトランスフェクトしたヒト培養細胞に投与し、37 °C で 10 ~ 45 分間インキュベートする。トランスフェクトしなかった同じタイプの細胞培養を、被験化合物なしで同じ時間インキュベートし、ネガティブコントロールとする。

20

【0173】

RNA を、Chirgwin ら、Biochem. 18, 5294-99, 1979 に記載のように 2 つの培養物から単離する。ノーザンブロットを全 RNA 20 ~ 30 μ g を用いて調製し、エクスプレスハイブ (Expresshyb) (CLONTECH) にて 65 °C で、³²P-標識化アミノペプチダーゼ N 特異的プローブを用いてハイブリダイズさせる。このプローブは配列番号 1 の相補物より選ばれる少なくとも 11 個の連続ヌクレオチドを包含する。被験化合物の非存在下にて得られるシグナルと比較してアミノペプチダーゼ N 特異的シグナルを低下させる被験化合物を、アミノペプチダーゼ N 遺伝子発現のインヒビターとして同定する。

30

【0174】

実施例 5

アミノペプチダーゼ N 活性を低下させる被験化合物の同定

被験化合物を、アミノペプチダーゼ N 発現構築物でトランスフェクトしたヒト培養細胞に投与し、37 °C で 10 ~ 45 分間インキュベートする。トランスフェクトしなかった同じタイプの細胞培養を、被験化合物なしで同じ時間インキュベートし、ネガティブコントロールとする。アミノペプチダーゼ N 活性は、Ishii ら (Int. J. Cancer 92(1): 49-54) の方法を用いて測定する。

40

【0175】

アミノペプチダーゼ N のヒトアミノペプチダーゼ N 活性を試験化合物非存在下でのヒトアミノペプチダーゼ N 活性と比べて減少させる試験化合物を、アミノペプチダーゼ N 活性のインヒビターとして同定する。

【0176】

実施例 6

アミノペプチダーゼ N タンパク質の組織特異的発現

種々の組織におけるアミノペプチダーゼ N の質的な発現パターンは、逆転写ポリペプチドメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によって決定することができる。

【0177】

50

アミノペプチダーゼNタンパク質がCOPDの疾患過程に關与することを実証するために、初期発現パネルはCOPDに關連する呼吸器組織および炎症細胞由来のRNA試料からなる：肺（成人および胎児）、気管、新たに単離されたII型肺胞細胞、培養されたヒト気管支上皮細胞、培養された小気道上皮細胞、培養された気管支平滑筋細胞、培養されたH441細胞（Clara様）、新たに単離された好中球および単球、並びに培養された単球（マクロファージ様）。また、Clontechから購入した全RNAパネルを用いてボディマッププロファイリングも行う。組織は、副腎腺、骨髓、脳、大腸、心臓、腎臓、肝臓、肺、乳腺、膵臓、前立腺、唾液腺、骨格筋、小腸、脾臓、胃、精巣、胸腺、気管、甲状腺および子宮である。

【0178】

アミノペプチダーゼNがCNS障害に關与することを実証するために、以下の組織をスクリーニングする：胎児および成人の脳、筋肉、心臓、肺、腎臓、肝臓、胸腺、精巣、大腸、胎盤、気管、膵臓、腎臓、胃粘膜、大腸、肝臓、小脳、皮膚、大脳皮質（アルツハイマーのおよび正常な）、視床下部、大脳皮質、扁桃体、小脳、海馬、脈絡膜、叢（plexus）、視床および脊椎。

【0179】

アミノペプチダーゼNが癌に關与することを実証するために、発現を以下の組織における発現を測定する：副腎、骨髓、脳、小脳、大腸、胎児脳、胎児肝臓、心臓、腎臓、肝臓、肺、乳腺、膵臓、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、小腸、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、子宮および末梢血リンパ球。以下の癌細胞系における発現も測定する：DU-145（前立腺）、NCI-H125（肺）、HT-29（大腸）、COLO-205（大腸）、A-549（肺）、NCI-H460（肺）、HT-116（大腸）、DLDD-1（大腸）、MDA-MD-231（乳房）、LS174T（大腸）、ZF-75（乳房）、MDA-MN-435（乳房）、HT-1080、MCF-7（乳房）およびU87。同じ患者からの癌組織および正常な組織のマッチングしたペアも試験する。

【0180】

定量的発現プロファイル。定量的発現プロファイルは、Higuchiら、BioTechnology 10, 413-17, 1992、およびHiguchiら、BioTechnology 11, 1026-30, 1993に初めて記載された、「速度論的解析」と呼ばれる定量的PCR解析の方式により実施した。原理は、PCRの対数相内の任意に与えられたサイクルにおいて、産物の量が最初の鋳型のコピー数に比例するというものである。

【0181】

増幅を、標的配列に相補的な、クエンチングを内部に有する（internally quenched）蛍光オリゴヌクレオチド（TaqManプローブ）の存在下で行なう場合、プローブはTaq DNAポリメラーゼの5'-3'エンドヌクレアーゼ活性により開裂され、媒体中に蛍光色素が放出される（Hollandら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 7276-80, 1991）。蛍光発光は、特異的な増幅産物の量に直接比例して増大するため、PCR産物の対数増幅相を検出し、最初の鋳型濃度を決定するのに用いることができる（Heidら、Genome Res. 6, 986-94, 1996、およびGibsonら、Genome Res. 6, 995-1001, 1996）。

【0182】

内部対照の増幅を行って、反応物に添加したサンプルRNAの量を標準化することができる。この種類の実験では、選択した対照は18SリボソームRNAである。異なる放射スペクトルを有するレポーター染料が得られるため、異なる染料で標識したプローブを用いれば、標的と内部標準とを同じ試験管内で独立して定量することができる。

【0183】

蛍光リアルタイムPCR測定はすべて、ABI Prism 7700で行う。

【0184】

RNA抽出およびcDNA調製。上記の組織から得た全RNAを発現の定量化に使用する。「剖検から得た」標識RNAを、TRIzol試薬（Life Technologies, MD）を用い、製造元のプロトコルにしたがって、剖検組織から抽出した。

10

20

30

40

50

【0185】

各RNA 50 µgを、以下の反応混合物中、DNase Iで37にて1時間処理する：0.2 U / µL RNase不含DNase I (Roche Diagnostics, Germany); 0.4 U / µL RNase インヒビター (PE Applied Biosystems, CA); 10 mM Tris-HCl pH 7.9; 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; および1 mM DTT。

【0186】

インキュベーション後、RNAを1体積のフェノール：クロロホルム - イソアミールアルコール (24 : 24 : 1) で1回、クロロホルムで1回抽出し、1 / 10体積の3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) および2体積のエタノールで沈殿させた。

【0187】

剖検組織から得た各RNA 50 µgを、Ambion (Ambion, TX) から購入したDNA 不含キットを用いてDNase処理する。再懸濁および分光学的定量の後、各サンプルをTaqMan 逆転写試薬 (PE Applied Biosystems, CA) を用い、製造元のプロトコルにしたがって逆転写する。反応混合物中のRNAの最終濃度は200 mg / µLである。逆転写は2.5 µMのランダムヘキサマープライマーを用いて行う。

10

【0188】

TaqMan 定量分析。特異的プライマーおよびプローブは、PE Applied Biosystems の推奨に基づいて設計する。プローブは、FAM (6 - カルボキシフルオレセイン) で5'末端を、TAMRA (6 - カルボキシ - テトラメチル - ローダミン) で3'末端を標識する。定量実験は、それぞれの試料由来の逆転写RNA 10 ng に対して行う。それぞれの測定は3回行なう。

20

【0189】

全cDNA含有量を、Pre-Developed TaqMan Assay Reagents (PDAR) コントロールキット (PE Applied Biosystems, CA) を用いて、18S リボソームRNAの同時定量 (多重PCR) により標準化する。

【0190】

検定反応混合物は以下のとおりである：1 × 最終TaqManユニバーサルPCRマスターミックス (2 × ストック溶液から) (PE Applied Biosystems, CA); 1 × PDAR コントロール - 18S RNA (20 × ストック溶液から); 300 nM フォワードプライマー; 900 nM リバースプライマー; 200 nM プローブ; 10 ng cDNA; および水を加えて25 µlにする。

30

【0191】

以下の工程のそれぞれを一回行う：50で2分間、そして95で10分間のプレPCR。以下の工程は40回行なう：95で15秒の変性、60で1分のアニーリング / 伸長。

【0192】

実験は、ABI Prism 7700 シークエンス検出器 (PE Applied Biosystems, CA) を用いて実施する。より良いバックグラウンド控除、並びに出発標的量に対する直線性を達成するために、この実施の最後に、PCRの間に得られた蛍光データを、ABI Prism 7700 使用者マニュアルに記載のように処理する。

40

【0193】

実施例 7

増殖阻害検定：アンチセンスオリゴヌクレオチドは癌細胞系の増殖を抑制する

試験に用いられる細胞系はヒト大腸癌細胞系HCT 116である。細胞は、10 ~ 15 % 胎児ウシ血清を含むPRMI - 1640中、濃度10,000細胞 / ml 0.5 ml 量にて37、95 % 空気 / 5 % CO₂ 雰囲気下で培養する。

【0194】

ホスホロチオネート オリゴリボヌクレオチドは、ホスホロアミデイト (phosphoroamidite) ケミストリーを用いるApplied Biosystems Model 380B DNA シンセサイザーにて合成する。配列番号1の1 ~ 24位のヌクレオチドと相補的な24塩基の配列を、被験オリ

50

ゴヌクレオチドとして用いる。コントロールとして、別の(ランダム)配列: 5'-T C A A C T G A C T A G A T G T A C A T G G A C - 3'を用いる。構築および脱保護の後、オリゴヌクレオチドを、エタノール沈殿2回、乾燥、そしてリン酸緩衝食塩水中に所望の濃度に懸濁する。オリゴヌクレオチドの純度は、キャピラリーゲル電気泳動およびイオン交換HPLCによって試験する。精製オリゴヌクレオチドを、7日間にわたり、培養培地に1日に1回10 μ M濃度を加える。

【0195】

7日間の被験オリゴヌクレオチド添加により、ヒトアミノペプチダーゼNの発現は、ウェスタンブロッティングにより決定されるように有意に低下する。この効果は、コントロールオリゴヌクレオチドでは観察されない。3~7日後、培養中の細胞の数を、自動細胞カウンターを用いて計数する。被験オリゴヌクレオチドで処理した培養中の細胞の数(100%と表す)を、コントロールオリゴヌクレオチドで処理した培養中の細胞の数と比較する。被験オリゴヌクレオチドで処理した培養物の細胞数は、コントロールの30%を超えない、このことはヒトアミノペプチダーゼNの阻害が、癌細胞において抗増殖効果を有することを示している。

10

【0196】

実施例8

化合物/標的確認のインビボ試験

1. 急性機械的検定

1.1. 分裂促進血漿ホルモンレベルの低下

この非腫瘍検定では、循環ホルモンの内因的なレベルまたは生物学的刺激に反応して生産されるホルモンのレベルのいずれかを低下させる化合物の能力を測定する。げっ歯類に試験化合物を投与(経口、腹腔内、静脈内、筋肉内または皮下投与)する。試験化合物投与後の所定時間に、血漿を採集する。目的のホルモンレベルについて、血漿を検定する。ホルモンの正常な循環レベルが低すぎる、および/または変化し過ぎて一致した結果が得られない場合は、生物学的刺激で前処理してホルモンレベルを亢進してもよい(即ち、LHRH 30 ng/マウス用量をマウスに筋肉内注射して、テストステロン合成のブーストを誘導することができる)。血漿採集の時期を調整して、誘導したホルモン応答のピークを一致させることができよう。化合物の効果を、媒体で処置したコントロール群と比較する。分散が一致するか、一致しないかを決定するためにF試験、次いでチューデントt試験後を行う。媒体コントロール群と比較して有意性はp値0.05以下である。

20

30

【0197】

1.2. 中空繊維の作用メカニズム分析

中空繊維は、所望の細胞系(群)を用いて調製し、げっ歯類に腹腔内および/または皮下移植する。化合物は、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内または皮下投与する。繊維を、特定のげっ歯類検定プロトコル(これらは遺伝子発現についての分析(dDNA、PCRまたはTaqman)または特定の生物化学的活性(例えば、cAMPレベル)についての検定を含み得る)に基づいて回収する。結果は、群間の分散をF試験によって比較し(媒体コントロール群と比較して有意性はp値0.05以下である)、スチューデントt試験またはランク・サム・テストによって分析する。

40

【0198】

2. 亜急性機能インビボ検定

2.1. ホルモン依存的組織量の低下

これは、ホルモン依存性組織(即ち、雄の精嚢および雌の子宮)の質量を低下させる化合物の能力を測定する、別の非腫瘍検定である。げっ歯類に、試験化合物を予め決められたスケジュールに基づき、予め決められた期間(即ち、1週間)投与(経口、腹腔内、静脈内、筋肉内または皮下)する。この実験の最後に、動物の体重を測り、標的器官を切除し、全ての体液を搾り出し、その器官の重量を記録する。また、血漿も回収できる。血漿は、目的のホルモンレベルまたは被験試薬のレベルについて検定することができる。器官重量を直接比較するか、それらを動物の体重について標準化することができる。化合物の効

50

果を、ピークル処置コントロール群と比較する。F試験は分散が一致するか、一致しないかを決定するために行ない、次いでスチューデントt試験を行なう。媒体コントロール群と比較して有意性はp値0.05以下である。

【0199】

2.2. 中空繊維増殖検定

中空繊維は、所望の細胞系(群)を用いて調製し、げっ歯類に腹腔内および/または皮下移植する。化合物は、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内または皮下投与する。繊維を、特定のげっ歯類検定プロトコルに基づいて回収する。細胞増殖は、細胞数のマーカー(即ち、MTTまたはLDH)を測定することによって決定する。細胞数と出発接種材料からの細胞数の変化を、群間の分散をF試験(媒体コントロール群と比較して有意性はp値0.05以下である)によって比較した後、スチューデントt試験またはランク・サム・テストによって分析する。

10

【0200】

2.3. 抗血管新生モデル

2.3.1. 角膜血管新生

成長因子または細胞を伴う若しくは伴わないヒドロペレットを、げっ歯類の角膜に外科的に作ったマイクロポケット中に移植する。化合物(ヒドロペレット中に成長因子と混合した化合物)を、全身または局所投与することができる。移植の7日後にコロイド性カーボンを心臓内注入した後すぐに、角膜を回収し、そして10%ホルマリン中に固定する。読み取りは、定性的スコアリングおよび/またはイメージ分析で行なう。定性的スコアをランク・サム・テストにより比較する。イメージ分析データは、血管新生領域(ピクセル内)を測定することによって評価し、群平均をスチューデントt試験(2テイル)によって比較する。成長因子または細胞のみの群と比較して、p値0.05以下が有意である。

20

【0201】

2.3.2. マトリゲル(Matrigel)血管新生

細胞または成長因子を含有するマトリゲルを、皮下注射する。化合物を、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内または皮下投与する。マトリゲルプラグを、予め決定した時点で回収し、読み取りのために準備する。読み取りは、ヘモグロビン濃度および/または組織学試験についてのELISAを基礎とする検定である(即ち、容器カウント、内皮表面マーカーの特殊染色:CD31、因子-8)。読み取りは、群間の分散をF試験によって比較した後(媒体コントロール群と比較して有意性はp値0.05以下である)、スチューデントt試験によって分析する。

30

【0202】

3. 原発性抗腫瘍効果

3.1. 初期治療モデル

3.1.1. 皮下腫瘍

腫瘍細胞または破砕物(フラグメント)を、0日目に皮下移植する。媒体および/または化合物を、ある時、通常1日目から開始する所定のスケジュールに基づいて経口、腹腔内、静脈内、筋肉内または皮下投与し、次いでその能力について腫瘍重量(burden)を測定する。体重および腫瘍測定を週に2、3回記録する。正味の体重および腫瘍重量の平均を、それぞれのデータ収集日ごとに計算する。抗腫瘍効果は、既定の日処置腫瘍のサイズ(T)およびコントロール腫瘍のサイズ(C)を、群間の分散をF試験により比較した後(p0.05以下を有意とする)、スチューデントt試験により比較することで最初に決定することができる。また、この実験は、腫瘍成長遅延をモニターし記録して腫瘍測定を継続する場合には、投与の終了後にも継続できる。腫瘍成長遅延は、予め定めたサイズに達するのに要した処置群とコントロール群の中央時間の差を、該サイズに達するのに要したコントロール群の中央時間で割ったものとして表される。成長遅延は、評価サイズに達した個々の腫瘍についての時間から Kaplan-Meier 曲線を作成することによって比較する。p 0.05 が有意である。

40

50

【0203】

3.1.2. 腹腔内/頭蓋内腫瘍モデル

腫瘍細胞を、0日目に腹腔内または頭蓋内注射する。化合物を、1日目に開始する所定のスケジュールに基づき、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内または皮下投与する。罹患率および/または死亡率の観察を、1日に2回記録する。体重は1週間に2回測定し記録する。罹患率/死亡率のデータを、生存中央値の期間で表し、長期生存数は分けて示す。生存時間を用いて、カプラン-マイヤー曲線を作成する。この実験のコントロール群と比較した対数範囲試験による有意性は $p = 0.05$ である。

【0204】

3.2. 疾患モデルの確立

腫瘍細胞または破砕物を、皮下的に移植し、処置を開始するのに所望のサイズにまで成長させる。所定のサイズ範囲に達したら、マウスを処置群に無作為に分ける。化合物を、所定のスケジュールに従い、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内または皮下投与する。腫瘍重量および体重を、1週間に2~3回測定し記録する。インキュベート後の幾日かに渡って全群の腫瘍重量の平均値を、比較のためにグラフにする。F試験は分散が一致するか、一致しないかを決定するために行ない、次いでスチューデントt試験を処置終了時点の処置群およびコントロール群の腫瘍サイズを比較するために行なう。コントロール群と比較して $p = 0.05$ が有意である。腫瘍測定は、投与を止め腫瘍成長遅延をモニターした後に、記録することができる。腫瘍成長遅延は、予め定めたサイズに達するのに要した処置群とコントロール群の中央時間の差を、該サイズに達するのに要したコントロール群の中央時間で割ったものとして表される。成長遅延は、評価サイズに達した個々の腫瘍についての時間からカプラン-マイヤー曲線を作成することによって比較する。媒体コントロール群と比較して $p = 0.05$ が有意である。

【0205】

3.3. 同所性疾患モデル

3.3.1. 哺乳類脂肪体検定

哺乳動物の腺癌起源の腫瘍細胞または破砕物を、外科的に露出させて表出させたげっ歯類の乳腺脂肪体 (fat pad) に直接移植する。その脂肪体を元あった場所に戻し、外科部分を閉じる。また、ホルモンを、腫瘍の成長を補助するためにげっ歯類に投与することもできる。化合物を所定のスケジュールに基づき、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内または皮下投与する。腫瘍重量および体重を、1週間に2~3回測定し記録する。接種後の幾日かに渡って全群の腫瘍重量の平均値を、比較のためにグラフにする。F試験は分散が一致するか、一致しないかを決定するために行ない、次いでスチューデントt試験を処置終了時の処置群およびコントロール群の腫瘍サイズを比較するために行なう。コントロール群と比較して $p = 0.05$ が有意である。

【0206】

腫瘍測定は、投与を止め腫瘍成長遅延をモニターした後に、記録することができる。腫瘍成長遅延は、予め定めたサイズに達するのに要した処置群とコントロール群の中央時間の差を、該サイズに達するのに要したコントロール群の中央時間で割ったものとして表される。成長遅延は、評価サイズに達した個々の腫瘍についての時間からカプラン-マイヤー曲線を作成することによって比較する。媒体コントロール群と比較して $p = 0.05$ が有意である。さらに、このモデルは、このタイプの腫瘍の自発的転移速度を増大させる機会を提供する。転移は、標的器官当たりの目視できる病巣 (フォーカス) の数を計数すること、または標的器官重量を測定することによって、この実験の最後に評価することができる。これらの終点の平均値を、F試験を行なった後 (この実験のコントロール群と比較して $p = 0.05$ を有意とする)、スチューデントt試験によって比較する。

【0207】

3.2.2. 前立腺内検定

前立腺癌器官の腫瘍細胞または破砕物を、外科的に露出させたげっ歯類の前立腺の背葉に直接移植する。腹部切除して前立腺を外面化し、移植組織が精嚢に侵入しないことを検証

10

20

30

40

50

しながら、腫瘍を背葉に特異的に移植できるようにする。上手く接種できた前立腺を腹部に移し、腹部に沿った切開部および皮膚を閉じる。また、ホルモンを、腫瘍の成長を助けるためにげっ歯類に投与することもできる。化合物を、所定のスケジュールに基づき、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内または皮下投与する。体重を1週間に2～3回測定し記録する。所定の時点で実験を終了し、動物を解剖する。原発性腫瘍のサイズを、カリパスまたは解剖顕微鏡を取り付けた接眼マイクロメーターのいずれかを用いて三次元的に測定する。F試験は分散が一致するか、一致しないかを決定するために行ない、次いでスチューデントt試験を処置終了時の処置群およびコントロール群の腫瘍サイズを比較するために行なう。コントロール群と比較して $p < 0.05$ を有意とする。このモデルは、このタイプの腫瘍の自発的転移速度を増大させる機会を与える。転移は、標的器官（即ち、肺）当たりの目視できる病巣の数を計数すること、または標的器官（即ち、局所的リンパ節）重量を測定することによって、この実験の最後に評価することができる。これらの終点の平均値を、F試験を行なった後（この実験のコントロール群と比較して $p < 0.05$ を有意とする）、スチューデントt試験によって比較する。

10

【0208】

3.3.3. 気管支内検定

肺器官の腫瘍細胞を、皮膚を切開し、気管を曝すことによって、気管支内に移植することができる。気管支は、斜端の25ゲージニードルを用いて穴を開け、腫瘍細胞を、主要な気管支に90°に曲げた平滑端の27ゲージニードルを用いて接種する。化合物を、所定のスケジュールに基づき、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内または皮下投与する。体重を1週間に2～3回測定し記録する。所定の時点で実験を終了し、動物を解剖する。原発性腫瘍のサイズを、カリパスまたは解剖顕微鏡を取り付けた接眼マイクロメーターのいずれかを用いて三次元的に測定する。F試験は分散が一致するか、一致しないかを決定するために行ない、次いでスチューデントt試験を処置終了時の処置群およびコントロール群の腫瘍サイズを比較するために行なう。コントロール群と比較して $p < 0.05$ を有意とする。このモデルは、このタイプの腫瘍の自発的転移速度を増大させる機会を与える。転移は、標的器官（即ち、反対側の肺）当たりの目視できる病巣の数を計数すること、または標的器官の重量を測定することによって、この実験の最後に評価することができる。これらの終点の平均値を、F試験を行なった後（この実験のコントロール群と比較して $p < 0.05$ を有意とする）、スチューデントt試験によって比較する。

20

30

【0209】

3.3.4. 盲腸内検定

消化系器官の腫瘍細胞を、腹部の皮膚を切開し、腸を外面化することで盲腸内移植することができる。腫瘍細胞を、27または30ゲージニードルを用いて腸の管腔を貫通することなく、盲腸壁に接種する。化合物を、所定のスケジュールに基づき、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内または皮下投与する。体重を1週間に2～3回測定し記録する。所定の時点で実験を終了し、動物を解剖する。原発性腫瘍のサイズを、カリパスまたは解剖顕微鏡を取り付けた接眼マイクロメーターのいずれかを用いて三次元的に測定する。F試験は分散が一致するか、一致しないかを決定するために行ない、次いでスチューデントt試験を処置終了時の処置群およびコントロール群の腫瘍サイズを比較するために行なう。コントロール群と比較して $p < 0.05$ を有意とする。このモデルは、このタイプの腫瘍の自発的転移速度を増大させる機会を与える。転移は、標的器官（即ち、肝臓）当たりの目視できる病巣の数を計数すること、または標的器官の重量を測定することによって、この実験の最後に評価することができる。これらの終点の平均値を、F試験を行なった後（この実験のコントロール群と比較して $p < 0.05$ を有意とする）、スチューデントt試験によって比較する。

40

【0210】

4. 続発性（転移性）抗腫瘍効果

4.1. 自発転移

腫瘍細胞を皮下接種し、腫瘍を肺または肝臓への自発的転移実験のため予め定めた範囲に

50

まで成長させる。次いで、この原発性腫瘍を切除する。腫瘍転移の初期段階を阻害することを目的とした治療を評価するために、原発性腫瘍を切除するまでの期間を含むことある所定のスケジュールに従い、化合物を、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内または皮下投与する。罹患率および/または死亡率の観察を毎日記録する。1週間に2回、体重を測定し記録する。可能なエンドポイントとしては、生存時間、標的器官当たりの目視できる病巣の数、または標的器官重量が挙げられる。生存時間をエンドポイントとして用いた場合、他の値は定まらない。生存データは、カプラン-マイヤー曲線を作成するのに用いる。この実験では対数範囲試験によりコントロール群と比較して $p < 0.05$ が有意である。解剖マイクロスコープの下で決定されるような目視できる腫瘍の病巣数の平均と、標的器官重量の平均値は、F試験を行なった後(エンドポイント両方についてこの実験においてコントロール群と比較して $p < 0.05$ が有意である)、スチューデントt試験によって比較する。

10

【0211】

4.2. 強制的転移

実験用(強制的)肺、肝臓および骨転移実験のそれぞれにおいて、腫瘍細胞を、尾静脈、門脈、または心臓の左心室に注射する。化合物を、所定のスケジュールに基づいて、経口、腹腔内、静脈内、筋肉内または皮下投与する。罹患率および/または死亡率の観察を毎日記録する。1週間に2回、体重を測定し記録する。可能なエンドポイントとしては、生存時間、標的器官当たりの目視できる病巣の数、または標的器官重量が挙げられる。生存時間をエンドポイントとして用いた場合、他の値は定まらない。生存データは、カプラン-マイヤー曲線を作成するのに用いる。この実験では対数範囲試験によりコントロール群と比較して $p < 0.05$ が有意である。解剖マイクロスコープの下で決定されるような目視できる腫瘍の病巣数の平均と、標的器官重量の平均値は、F試験を行なった後(エンドポイント両方についてこの実験においてコントロール群と比較して $p < 0.05$ が有意である)、スチューデントt試験によって比較する。

20

【0212】

実施例9

化合物/標的確認のインビボ試験

1. 疼痛:

急性疼痛

急性疼痛は、主にラットについてはホットプレートで測定される。ホットプレート試験の2つの変法を用いる:典型的な変法は、動物を熱表面(52~56)に置き、動物が侵害防御機構行動、例えば、ステップまたは足舐めを見せるまでの時間を測定する。もう1つの変法では、実験動物を室温の表面に置いてホットプレートの温度を上昇させる。次いで、この表面を、動物が後足を舐め始めるまで連続的ではあるがゆっくり熱する。後足を舐め始めた時に達している温度を、疼痛の閾値の尺度とする。

30

【0213】

化合物をピークル処置コントロール群に対して試験する。物質の適用は、疼痛試験前に、種々の適用経路(静脈内、腹腔内、経口、くも膜下腔内、脳室内、皮下、皮内、経皮的)により種々の時点で行なう。

40

【0214】

持続痛

持続痛は、主にラットについてはホルマリン試験またはカプサイシン試験を用いて測定する。1~5%ホルマリンまたは10~100 μ gカプサイシン溶液を、実験動物の片方の後ろ足に注射する。ホルマリンまたはカプサイシンを適用した後、その動物は、たじろぎ、患部の足を舐めたり、噛んだりして侵害防御応答を見せる。90分までの時間帯の侵害防御応答の数が、疼痛強度の尺度である。

【0215】

化合物をピークル処置コントロール群に対して試験する。物質の適用は、疼痛試験前に、種々の適用経路(静脈内、腹腔内、経口、くも膜下腔内、脳室内、皮下、皮内、経皮的)

50

により種々の時点で行なう。

【0216】

神経因性疼痛

神経因性疼痛は、主にラットにおいては片側坐骨神経損傷の種々の変法により誘導される。手術は麻酔下で行なわれる。坐骨神経損傷の第一の変法は、共通の坐骨神経周辺を紐でゆるく締め付けることによって行なわれる。第二の変法は、共通の坐骨神経の直径が約半分になるまできつく縛ることである。次の変法は、モデル群を用いて、L5とL6脊髄神経またはL5脊髄神経のみ、のいずれかをきつく縛ったものまたは切除したものを作製する。第四の変法は、坐骨神経の3つの末端分枝の2つ（脛骨神経および共通腓骨神経）を軸索切除し、腓腹神経を無傷で残すことを包含するのに対し、最後の変法は、脛骨分枝のみを軸索切除し、腓腹神経および共通神経を傷付けずに残すことを含む。コントロール動物は偽手術を用いて処置する。

10

【0217】

術後に、神経損傷動物は、慢性機械的異痛症（アロディニア）、冷アロディニアおよび温熱性痛覚過敏症を発症する。機械的アロディニアは、圧力変換法（electronic von Frey Anesthesiometer, IITC Inc.-Life Science Instruments, Woodland Hills, SA, USA; Electronic von Frey System, Somedic Sales AB, Hourby, Sweden）により測定する。温熱性痛覚過敏症は、患部の後足の侵害防御応答を疼痛強度の尺度として計数する、放射熱源法（Plantar Test, Ugo Basile, Comerio, Italy）または冷却プレート（5～10℃）により測定する。冷却誘導型疼痛の更なる試験は、患部の後肢にアセトンを足裏投与した後の侵害防御応答または侵害防御応答持続を測定することである。一般に慢性痛は、活性のサーカディアンリズムを記録すること（SurjoおよびArndt, Universität zu Köln, Cologne, Germany）、および足取りの違いをスコアリングすること（フットプリントパターン；FOOTPRINTSプログラム, Klappdorfer, 1997. フットプリントパターン分析の低コスト法、J. Neurosci. Methods 75,49-54）により評価する。

20

【0218】

化合物を、偽手術コントロール群およびピークル処置コントロール群に対して試験する。物質の適用は、疼痛試験前に、種々の適用経路（静脈内、腹腔内、経口、くも膜下腔内、脳室内、皮下、皮内、経皮的）により種々の時点で行なう。

【0219】

炎症疼痛

炎症疼痛は、主にラットにおいては一方の後足にカラゲナン0.75mgまたは完全フロインドアジュバンドを注射することによって引き起こす。動物は、機械的アロディニアおよび温熱性痛覚過敏症を伴う浮腫を発症する。機械的アロディニアは、圧力変換器法（electronic von Frey Anesthesiometer, IITC Inc.-Life Science Instruments, Woodland Hills, SA, USA）により測定する。温熱性痛覚過敏症は、放射熱源法（Plantar Test, Ugo Basile, Comerio, Italy, Paw thermal stimulator, G. Ozaki, University of California, USA）により測定する。浮腫測定については、2つの方法を用いる。第一の方法は、動物を屠殺して、患部の後足を細分し、重量を測ることである。第二の方法は、プレチスモメーター（Ugo Basile, Comerio, Italy）における水の押しのけ容積を測定することによる足の容積の差を含む。

30

40

【0220】

化合物を、非炎症コントロール群およびピークル処置コントロール群に対して試験する。物質の適用は、疼痛試験前に、種々の適用経路（静脈内、腹腔内、経口、くも膜下腔内、脳室内、皮下、皮内、経皮的）により種々の時点で行なう。

【0221】

糖尿病性神経症性疼痛

ストレプトゾトシン50～80mg/kgを単回腹腔内注射して処置したラットは、1～3週間以内に著しい高血糖および機械的アロディニアを発症する。機械的アロディニアは圧力変換器法（electronic von Frey Anesthesiometer, IITC Inc.-Life Science Instru

50

ments, Woodland Hills, SA, USA) により測定する。

【0222】

化合物を、糖尿病および非糖尿病媒体コントロール群に対して試験する。物質の適用は、疼痛試験前に、種々の適用経路（静脈内、腹腔内、経口、くも膜下腔内、脳室内、皮下、皮内、経皮的）により種々の時点で行なう。

【0223】

2. パーキンソン病

6 - ヒドロキシドーパミン (6 - OH - DA) 病変

ドーパミン作動性黒質線条体および線条体淡蒼球経路の変性は、パーキンソン病における中心的な病理現象である。6 - OH - DA を内側前脳束 (MFB) 中に単回 / 逐次片側定位 (sequential unilateral stereotaxic) 注射してラットにおいてこの疾患を実験的に模倣した。

【0224】

実験開始時の体重が 200 ± 250 g の雄ウィスターラット (Harlan Winkelmann, Germany) を用いる。実験期間にないときは、ラットは飼料と水を自由飲食することができ、昼 / 夜 12 時間のサイクルのもと温度と湿度が管理された環境下で飼育する。以下のインビボプロトコールは、政府の権限により認可されている。動物への負担を最小限にし、用いる動物の数を減らし、インビボ技術の代替法を利用するようあらゆる努力をする。

【0225】

動物に、モノアミンオキシダーゼによる 6 - OHDA の代謝を阻害するためパーズリン (Sigma, St. Louis, MO, USA; 50 mg / kg、腹腔内投与) と、ノルアドレナリン作動性末端による 6 - OHDA の取り込みを防止するためのメチルイミプラミン HCl (Sigma; 25 mg / kg、腹腔内投与) を、外科手術の日に投与する。30 分後、そのラットをペントバービタルナトリウム (50 mg / kg) を用いて麻酔し、定位固定フレームに移す。DA 黒質線条体経路を損傷させるため、6 - OHDA HBr (Sigma) 8 μ g を含む 0.01% アスコルビン酸 - 食塩水 4 μ l を、左内側前脳側 (十字縫合 (プレグマ) および頭蓋骨表面に対して 2.4 mm 前側、1.49 mm 側方、- 2.7 mm 腹側) に 1 μ l / 分の割合で注射する。ニードル (針) をさらに 5 分間そのままにして拡散させる。

【0226】

ステップング試験

前肢無動症 (アキネジア) は、損傷付与後の 3 週間、改変ステップング試験プロトコールを用いて評価する。簡単には、実験者が片手でこの動物の後肢を固定し、表面から一方の後足をわずかに持ち上げて、その動物を維持する。一方の足はテーブルについており、初めはフォアハンド方向、その次はバックハンド方向へゆっくり側方移動させる (5 秒で 1 m)。調整ステップの数を、両足について移動のバックハンド方向およびフォアハンド方向においてカウントする。試験の順序は、右足フォアハンドおよびバックハンド調整ステップ、その次に左足フォアハンドおよびバックハンド方向である。この試験は、最初の試験に先立ち 3 日間の最初のトレーニングの後、連続して 3 日間で 3 回繰り返す。フォアハンド調整ステップは、損傷動物と健康なコントロール動物の間に一致した差がないことが分かる。従って、バックハンド調整ステップに限定して分析を行う。

【0227】

バランス試験

ステップング試験セッションの間に、姿勢検証後のバランス調整も測定する。ラットをステップング試験に記載のように同じ位置で維持し、側方移動に変えて、実験者がテーブルについた足を前方向へ傾ける。この演習はバランスの喪失の結果となり、前肢移動でバランスを回復するラットの能力を 0 ~ 3 の範囲スケールであるスコア化する。スコア 0 は正常な足置きに与えられる。前肢運動は遅れるが、姿勢バランスの回復が検出される場合は、スコア 1 を与える。スコア 2 は、筋肉収縮によって現れるように、十分とは言えないが明らかな前肢反応であるがバランス回復は成功していないことを表し、スコア 3 は行動の反応のないものに与える。この試験は、最初の試験に先立ち 3 日間の最初のトレーニング

10

20

30

40

50

の後、3日間連続してそれぞれの側（足）で1日に3回繰り返す。

【0228】

階段試験（足到達）

階段試験の改良法を用いて最初または2回目の損傷付与後の3週間の足到達（リーチング）行動を評価する。中央に台、両側に取り外し可能な階段を有するプレキシガラス試験ボックスを用いる。この器具は、それぞれの階段で同じ側の足のみを用い、独立して足の運びを測定できるように設計されている。それぞれの試験において、動物をこの試験ボックスに15分間置く。ダブルの階段に、7×3飼料ペレット（Precision food pellets, formula: P, purified rodent diet, サイズ45mg; Sandown Scientific）を各々の側に入れる。それぞれの試験の後、各々の足について食べたペレット（上手く回収したペレット）の数と取得したペレット（触ったが、落とした）の数、およびその成功率（食べたペレット/取得したペレット）を別々に計数する。3日間の絶食（1日当たり12g/動物）後の動物を11日間試験する。全ての分析は最後の5日間のみで行なう。

10

【0229】

MPTP処置

神経毒である1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロ-ピリジン（MPTP）は、げっ歯類、ヒト以外の霊長類およびヒトにおいて中脳ドーパミン作動性（DAergic）ニューロン変性を引き起こすことで、多くのパーキンソン病症状を再現する。MPTPは、ドーパミンレベルおよびその代謝物レベル、並びに線条体におけるドーパミン作動性末端数の顕著な減少を引き起こし、同様に黒質、パルス緻密質におけるチロシンヒドロキシラーゼ（TH）-免疫応答細胞体の著しい喪失を引き起こす。

20

【0230】

重篤で、長期に及ぶ損傷を与え、かつ死亡率を減少させるために、MPTPを動物に単回注射し、その後重症度について損傷の7~10日後に試験する。MPTPの連続注射は、1、2および3日目に投与する。1日に1度食塩水中のMPTPヒドロクロライド（シグマ）4mg/kgを、動物に投与する。注射は全て腹腔内（i.p.）で行ない、MPTPストック溶液は、注射と注射との間凍結しておく。動物を11日目に断頭する。

【0231】

免疫組織化学

行動実験が終了した時点で、全ての動物をチオペンタール（1g/40ml、腹腔内投与、Tyrol Parma）3mlで麻酔する。マウスは、0.01M PBS（pH 7.4）で2分間、次いでPBS中の4%パラホルムアルデヒド（Merck）で15分間、噴門から（transcardially）還流する。脳を取り出し、4%パラホルムアルデヒド中に、4にて24時間置く。その後、脱水のために、それを4の0.1M PBS中の20%スクロース（Merck）溶液に移して染み込ませる。脳を-20のメチルブタン中で2分間凍結させ、-70で保存する。スレッジマイクロトーム（mod. 3800-Frigocut, Leica）を用いて、25μmの切片を、脳梁（AP 1.7mm）の膝部から海馬（AP 21.8mm）まで、およびAP 24.16からAP 26.72から得る。46の切片をカットし、免疫組織化学実験のため、選別機（assorter）にて0.25M トリスバッファー（pH 7.4）中に保存する。

30

40

【0232】

一連の切片を、遊離-浮動性チロシンデヒドロキシラーゼ（TH）免疫組織化学試験について処理する。0.1M PBS中で3回リンスした後、内因性のペルオキシダーゼ活性を、0.3% H₂O₂ ± PBS中で10分間クエンチする。PBS中でリンスした後、切片を、ブロッキング物質として10% 正常ウシ血清（シグマ）中で5分間ブレインキュベーションし、一次抗ラットTHウサギ抗血清（希釈率1:2000）のいずれかに移す。

【0233】

一晚中室温でインキュベートした後、TH免疫応答用の切片をPBS中ですすぎ（2×10分）、ヤギで産生させたビオチン化抗ウサギ免疫グロブリンG（希釈率1:200）（Vector）中で90分間インキュベートし、繰り返すすぎ、そしてVectastain ABC（V

50

ector) 溶液中に移し1時間置く。0.005% H_2O_2 を加えた0.1M PBS中の3,3'-ジアミノベンジジン テトラヒドロクロリド (DAB; Sigma)は、続く可視化反応における色素原として働く。切片を、ゼラチンコーティングスライドに載せ、一晚置いて乾燥させ、ヘマトキシリンを用いて対比染色(counter-stained)し、アルコール濃度の昇華により脱水し、ブチルアセテート中で透明にする。カバースリップをエンテラン(entellan)の上に置く。

【0234】

ローターロッド試験

我々は、IBM互換パソコン、CIO-24データ取得カード、コントロールユニット、および4線ロータロッドユニットからなるCR-1 Rotamexシステム(Columbus Instruments, Columbus, OH)を用いるRozasおよびLabandeira-Garcia(1997)が記載した手順の改良法を使用する。このロータロッドユニットは、回転軸(半径7.3cm)と、それぞれのマウスのための個別のコンパートメントとから成る。このシステムソフトウェアは、回転速度を変化させて(0~80rpm)セッションプロトコルを予めプログラムすることができる。赤外線ビームは、マウスがロータロッドの真下の基底鉄柵(base grid)に落ちた時を検出するために用いる。このシステムは、落下をマウスについての実験の終了として記録し、ローターロッドの上にいる全時間、並びに落下時間および設定したパラメータのすべてを記録する。また、このシステムでは、トレーニングを目的として、微弱電流を基底鉄柵に流すことができる。

10

【0235】

3. 痴呆

物体認知課題

物体認知課題を、げっ歯類の認知能力に対する実験操作の効果を評価するために設計した。ラットを、同一の物体が2個存在する開放された空間に置く。ラットは、最初の対物認知課題の試行で、両方の物体を見て調べる。2度目の試行では、例えば24時間の保持間隔の後、最初の試行で用いた2個の物体の内の1個、即ち「知っている」物体、と新しい物体とを、その開放された空間に置く。この物体それぞれを見て調べる時間を記録する。OR課題における基本的な測定値は、ラットが2度目の試行で2個の物体を探索するのにかけた時間である。保持の良さは、「知っている」物体よりも新たな物体に対する探索時間が長いことに反映される。

20

30

【0236】

推定される認知エンハンサーを最初の試行の前に投与することは、主に、習得および最終的には固定化プロセスにおける効果の評価を可能にする。最初の試行後の試験化合物の投与は、固定プロセスにおける効果を評価できるのに対して、2度目の試行前の投与では、想起プロセスにおける効果を測定できる。

【0237】

受動的回避課題

受動的回避課題により、ラットおよびマウスにおける記憶能力を評価する。抑制的回避装置は、明区画と暗区画との2つの区画を有する箱から成る。この2つの区画は、実験者が操作できるギロチンドアによって分けられている。ギロチンドアを上げたとき、2cmの敷居で2つの区画は分けられている。ドアを開けたときの暗区画の照度は約2ルクスである。明区画の中央の床の明度は約500ルクスである。

40

【0238】

24時間間隔の中間セッションで分けられた2つの習慣セッション、1つのショックセッションおよび保持セッションが与えられる。ラットは、習慣セッションと保持セッション中、300秒間装置内を探索することができる。ラットを、ギロチンドアの反対の壁に頭を向けた状態で、明区画に置く。15秒の適応時間の後、ギロチンドアを器具内の全領域を自由に動き回れるように開ける。通常、ラットはまぶしい明領域を避け、数秒の内に暗区画に入るであろう。

【0239】

50

ショックセッションにおいては、ラットが4本の足で暗区画に入るやいなや区画間のギロチンドアを下ろし、すぐさま1 mAのフットショックを2秒間与える。ラットを装置から取り出し、ホーム籠に戻す。保持セッション中の手順は、習慣セッションの手順と同じである。

【0240】

ステップ通過潜伏、すなわち保持セッション中に暗区画に入る最初の潜伏(秒)は、動物の記憶能力の指標である；暗区画に入る潜伏が長ければ長いほど、保持はよりよい。ショックセッションの30分前に、スコポラミン $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ と一緒に試験化合物を与える。スコポラミンは、24時間後の保持セッション中の記憶能力を損なわせる。試験化合物が、スコポラミン処置コントロールと比較して侵入潜伏を増大させた場合、認知を増強する潜在能力を有する。

10

【0241】

モーリス水脱出課題

モーリス水脱出課題により、げっ歯類における空間方向学習を測定する。ラットおよびマウスの認知機能に対する推定される治療物質の効果を調べるのに広く用いられている試験系である。動物のこの能力は、水面下約1 cmのところ避難用台を沈めた円形水タンク中で評価する。避難用台は、水タンク中を泳いでいる動物には見えない。机、コンピューター設備、第二の水タンクを含む室内の備品、実験者の存在、および優しく響く柵上のラジオにより、迷路外の合図を十分に与える。

【0242】

動物は、日々の獲得セッション5日の間に4回の試行を受ける。試行は、動物をプール中に置き、タンクの壁に頭を向けることによって始める。四分区画、北、西、南および東の4つの開始位置のそれぞれは一連の4回の試行のなかで1度は用いる(それらの順序は無作為である)。避難用台はいつも同じ場所に置く。試行は、動物が避難用台に上った時かまたは90秒経過した時のいずれか早い方で終了とする。動物はその台の上に30秒間留まらせる。その後台から下し、次の試行を始める。動物が90秒以内に台を見つけられなかったときは、実験者がその動物を台の上に置き、30秒間そこに留まらせる。5日間の毎日のセッションの4回目の試行後に、探索試行として更なる試行を行なう：これは、台を取り出し、動物が4つの4分円内で過ごす時間を30秒または60秒間測定する。この探索試行において、動物は全て、獲得セッションの間に避難用台が置いてあった4分円の反対側の同じ開始位置から始める。

20

30

【0243】

獲得トレーニング中の4つの異なる基準：避難潜伏、移動距離、台への距離および水泳速度を用いて動物の能力を評価する。探索試行については以下の基準：4分円内における時間(秒)および4つの4分円内での移動距離(cm)を評価する。この探知試行は、動物が避難用台の位置をどれくらい良く学習したかについての情報をさらに与える。動物が、獲得セッション中に台のあった4分円内で、その他の4分円における時間および距離よりも、より多くの時間を費やし、より多くの距離を泳いだ場合、これは結論として、台の位置をよく学習したことを示す。

【0244】

推定される認知増強化合物の効果を評価するために、認知機能を損なわせる特定の脳損傷を持つラット若しくはマウス、または正常な学習を妨げるスコポラミン若しくはMK-801などの化合物で処置した動物、または認知欠損を患っている高齢動物を用いる。

40

【0245】

T迷路自発的択一課題

T迷路自発的択一課題(TeMCAAT)により、マウスの空間認知能力を評価する。T迷路のスタートアームと2つのゴールアームは、実験者が手動で操作できるギロチンドアを備えている。トレーニングの開始時、マウスをスタートアーム置く。ギロチンドアは閉めてある。最初の試行、「強制試行」では、左または右のいずれかのゴールアームはギロチンドアを下げてブロックする。マウスがスタートアームから離れた後、迷路を通り抜け、

50

最終的に、開放されたゴールアームに入り、そしてスタート地点に戻り、そこでギロチンドアを下げることによって5秒間閉じ込められる。次に動物は、14回の「自由選択」試行の間に左と右のゴールアームを自由に選ぶことができる（全てのギロチンドアは開いている）。マウスが一方のゴールアームに入るとすぐに、もう一方のゴールアームを閉じる。マウスは最終的にスタートアームに戻り、マウスはスタートアームに5秒間閉じ込められた後、望むいずれのゴールアームにも自由に向かうことができる。1回のセッション中14回の自由選択試行が完了した後、動物を迷路から取り出す。トレーニングの間は、マウスには決して手を触れない。

【0246】

14回後の試行から択一パーセントを計算する。このパーセントと最初の強制試行および連続14回の自由選択試行を完了するのに要した時間（秒）とを分析する。認知欠損は、通常、トレーニングセッションの開始30分前にスコポラミンを注射することによって誘導する。スコポラミンは、択一パーセントレベルを偶然レベルかまたはそれより低いレベルにまで下げる。トレーニング試行の前に必ず投与される認知エンハンサーは、少なくとも部分的には、スコポラミンにより誘導される偶発的択一率の減少と拮抗し得る。

【0247】

実施例10

COPD動物モデルにおける試験化合物効果の同定

モルモットを、タバコの煙に50分間曝す。曝した後10分～24時間の間に動物を屠殺し、その肺をRNA later（商標）中に置く。肺組織をホモジナイズし、キアゲン RNeasy（商標）Maxiキットを用いて、全RNAを抽出した。Molecular Probes RiboGreen（商標）RNA定量法を用いて、それぞれの試料におけるRNA量を定量する。

【0248】

全RNAを逆転写し、得られたcDNAを実時間ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に用いる。そのcDNAを、センスおよびアンチセンスプライマーおよびアミノペプチダーゼN遺伝子の6-カルボキシ-テトラメチル-ローダミン標識化プローブを含む溶液に加える。サイクロフィリンをハウスキーピング遺伝子として用いる。アミノペプチダーゼN遺伝子の発現を、それぞれの試料についての増幅曲線を作り出すTaqMan実時間PCRシステムを用いて測定する。この曲線からサイクル閾値を計算する：増幅された標的の量が固定された閾値に達する小数点（fractional）のサイクル数。アミノペプチダーゼN遺伝子の多数コピーを含む試料は、少ないコピーを含む試料よりも早くこの閾値に達する。閾値を0.2に設定し、サイクル閾値 C_T を増幅曲線から計算する。アミノペプチダーゼN遺伝子の C_T 値を、ハウスキーピング遺伝子の C_T 値を用いて標準化する。

【0249】

タバコの煙に10分～3時間曝露した動物は、空気に曝したコントロール動物と比較して、アミノペプチダーゼN遺伝子の発現が少なくとも3倍増大する。

【0250】

以下のように試験化合物を評価する。動物を、タバコ煙への曝露の5分～1時間前に試験化合物で前処理し、タバコ煙曝露を完了した3時間後までに屠殺する。コントロール動物は、試験化合物の際に選んだ投与経路を介して、試験化合物の媒体で前処理する。ピークル処置したタバコ煙に曝露した動物にみられる発現と比較して、タバコ煙により誘導されるアミノペプチダーゼN遺伝子の上方調節を低下させる試験化合物を、アミノペプチダーゼN遺伝子発現の阻害物質として同定する。

【0251】

参考文献

クロン化cDNAから推定されるヒト小腸アミノペプチダーゼNの完全なアミノ酸配列。FEBS Lett 1988 Oct 10; 238 (2): 307-14

ヒト骨髄性原形質膜糖タンパク質CD13 (gp150) はアミノペプチダーゼNと同一である。J Clin Invest 1989 Apr; 83 (4): 1299-307

骨髄性細胞および小腸上皮細胞におけるヒトアミノペプチダーゼN遺伝子の分離したプロ

モーター制御の転写。J Biol Chem 1991 Jun 25; 266 (18): 11999-2007

ヒトアミノペプチダーゼNはヒトコロナウイルス229Eのレセプターである。Nature 1992 Jun 4 ; 357 (6377): 420-2

SSCP解析および配列決定によるアミノペプチダーゼN遺伝子における点変異の同定。Hum Mutat 1998;Suppl 1 :S158-60

ヒトアミノペプチダーゼNは腫瘍ホーミングペプチドのレセプターであり、血管新生の阻害標的である。Cancer Res 2000 Feb 1; 60 (3): 722-7

アミノペプチダーゼN/CD13は、単球においてシグナル伝達経路と直接連携している。Cell Immunol 2000 Apr 10; 201 (1): 22-32

多発性硬化症の患者における末梢血単核球細胞での天然のエンドペプチダーゼ(NEP)およびアミノペプチダーゼN(APN)の増大した発現。Immunol Lett 2000 Feb 1 ; 71 (2): 127-9

【図面の簡単な説明】

【0252】

【図1】アミノペプチダーゼNポリペプチドをコードするDNA配列(配列番号1)を示す。

【図2】図1のDNA配列から推定されるアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図3】swiss|P15144|AMPN_HUMANアミノペプチダーゼNによって同定されるタンパク質のアミノ酸配列(配列番号3)を示す。

【図4】swiss|P15144|AMPN_HUMANアミノペプチダーゼN(配列番号3)に対する340(配列番号2)のBLASTP-アライメントを示す。

【図5】pfam|hmm|Peptidase_M1に対する340(配列番号2)のHMMPFAM-アライメントを示す。

【図6】プロサイトサーチの結果を示す。

【図7】TMHMMの結果を示す。

【図4A】

【図4B】

FIG. 4

BLASTP - swiss|P15144|AMPN_ヒトアミノペプチダーゼN(EC 3.4.11.2)に対する340のアライメント

(ミクロソームアミノペプチダーゼ) (P150) (骨髄性血漿糖タンパク質 CD13)

このヒットは以下のスコアリングである: 5e-167 (期待値)

アライメント長 (重複): 942

同一性: 36%

スコアリングマトリクス: BLOSUM62 (コンセンサスバスターンの推測に使用)

サーチしたデータベース: nrdb_1;

膜貫通領域

Q: 6 SSGFYVSRVAVLLAGLVALLLAVLALVLAALYCHCERVPPSELPGLRDLRAESSPLRQK
:GFYIS:::L L A:::L:::Y::: A.SSP
H: 1 AKGFYISKSLGILGILLGVAACVCTIIALSIVYSQ-----EKNKANSSPVA---
PTPTKPSARELAVTTTPSNWRPPGPDQLRLEPWLYLHVDLELWQLRDELPAQSL
:TP.S::: A TT .: . W:::RLP L P Y::L P.L.P:: .G.
-SPTPSASATINPASAITLDQSKA--WNRYLPLNTLKPDYSQVTLRPLTPND--RGLY
PFTGRVNIIVRCVTATSRLLLSLFDQCERAEVRFGLSPCTGNATVGRVFDVDFWALDT
F.G.:::C AT:::HS :::: G.G::: .D::: .T
VFKGSSVTRFTCKEATDVIIHKKKLYLTSQSHRVLRVGGSSQPP--DIDKTELVEFT
EYVLESEPLKPGSSYELQLSGLVKEDELREGLFLVNYTDOGERALLASQLKPTFAR
EX.V::L L .S.YE:: F.G:::DL G:: Y:: R:::Q:::AR
EYLVLHKGSLVKDQYEMDSEFEGELADDLA-GFYRSEYMEGNRVKVVATTQQAADAR

図4の続き

YVPCFDEPAKATFNITMHHPSYVALSNMPLKQSEK--EDWNGSKWTVTFSTTPHM
PFCFDEPA.KA.FNIT.IH .:::ALSNM G.S. ED N W.VT.F.TTP.M
KSFPCFDEPAKAEFNITLIHPKDLTALSNNMLPKGSPFLPEDPN---WNVTEFHITPKM
PVIYVAVICDYDHNVR-TERGKEIRIWARDAIANGSADFALNITGPIFSELDLFWIS
.TYL.AF:::D.V:::G IRIWAR.AIA G.D:ALN:TCPL.:F.:.:.:.
STYLLAFIVSEFDYVEKQASGVLRIRIWARPSAIAAGHGDIYALNVTGPIINFFAGHYDTP
垂糸プロテアーゼ領域
YSLPKTDIILALPFDNHAMENGLMIFDESGLLEPPKQDLTEKKTLLISVVSHEIG.HQWF
Y.LPK:D I.LP.F: AMENGL::E::LL:P .::K.: V::HE.T.HQWF
YPLPKSDQIGLPPDNAGAMENGLVYRENSLLFPDPLSSSSSNKERVTVIARELHQWF
垂糸結合領域
GNLVTMWNWNNIWLNEGFASYEFVINYFNPKLFRNEIFFSNHLNHLREDHALVTRAV
GNLVT::WN::WLNEGFASY.E.:Y.P.:::N:::D:::D:::
GNLVTIEWNDLWLNNEGFASYEYLCADYAEPTWNLKDLVNDVYRVWAVDALASSHPL
活性部位残基
AMKVENPKY-SEIQELFDIPTYKSGASMARMLSCFLNEHLFVSGALSKSYLKTFSYNAEQD
:.....T:::I.E.LFD:::YKSGAS:RMLS.FL.E.:F..L.SYL.TF.Y.N..
STPASEINTPAQISELFDAYSYSKASVLRMLSSFLSEDFVKQGLASYLHTFAYQNTIYL
DLWRHFQWADDQSTVILPATIKNIMDSWTHQSGFPVITLNVSTGVMKQEPFYLENIKVR
:LW.H.Q.A:::S:L.P.T::IM::WT.Q.GFPVIT::STG::QE.F.L:.N
NLWDHLOEAVNRS-IQLPTTERDIMNRWTLQMGFPVITVDTSTGTLSQEHFLDPPDSNY

【 図 5 】

FIG. 5
HMMPFAM - pfam|hmm|ペプチダーゼ_M1に対する340のアライメント
ペプチダーゼファミリーM1
このヒットは以下でのスコアリングである: 431.5
スコアリングマトリクス: BLOSUM62 (コンセンサスバターンの推測に使用)

Q: 98 LPPWLVPVHYDLELWPO--LRPEL--PAGSLPFTGRVNIIV--RCTVA-TSRLLLHSL
LP: : EHYDL L P: P: : : F:G V IT: : T A T: : : LH:
H: 1 LPTTVKPIHYDLC LpkfgfIpekpnyadeknfFsgsvtIltngackaatdeivlhak

FQDCERAev:gpIspGTGNATVGRVPVDD-----VWFALDT-----EYMWVLEL
..... G.G : : T E : : : L
dltsst.....gegvrvclvlvngsqkIpesvefslgdetdflavdankeklcIlnl
SEPLKPGSS--YELQLSPGIVKEDLREGLFLNVYTD-QGERRALLASQLE-PTFARYV
.E.L..G.. Y.L:..G.: : G.: : YTD GE.: : : O.E PT. AR .
pealsagggsspytLeIeyegkIndismLGfyrseftdgdgetkymatQfseeptdARra

FPFDEPALKATEFITMIHHPSYVALSNMPKLGqseKEDVNGSKWTVTFSTTPHMPTYL
FPFDEP: KATE. IT: IH . ALSNMP: . : .D :G. :TTF JTP. M. TYL
PFDFEpfKATFITiIihpkgttalSNmpeis..tkkdddgprrvittFetTpkMSTYL

VAFVICDYDHWNR-TERG-----KEIRIWARQDALANGSADPALNITGPIFSLFDLFI
:AF: : : : : T: G : :R: :AR: :A G: : :AL: :T: : :F.E: :F. I
lAfIvGeIeyIetctkdgysarevprvyarpgaknagggqyalevtrkklIefyeyfgl

【 図 6 】

FIG. 6
プロサイト検索結果:

アクセス #	始点->終点	名称	Doc#
PS00142	412->422	アミノペプチダーゼ N7ミノペプチダーゼ N	PDOC00129
		垂給_プロテアーゼ	

【 図 7 】

FIG. 7
TMHMM 結果 # 配列の長さ: 933
推定 TMHs の配列の数: 1
配列 TWHMM2.0 TMhelix 13 35

【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
23 January 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/006646 A1

- (51) International Patent Classification: C12N 9/48
- (21) International Application Number: PCT/JP02/07157
- (22) International Filing Date: 28 June 2002 (28.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 50/303,693 10 July 2001 (10.07.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): SMOLYAR, Alex [US/US]; 734 Boylston Street, Brookline, MA 03467 (US).
- (74) Common Representative: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:
 — as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG) as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations

Published:
 — with international search report before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

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 03/006646 A1

(54) Title: REGULATION OF HUMAN AMINOPEPTIDASE N

(57) Abstract: Reagents that regulate human aminopeptidase N and reagents which bind to human aminopeptidase N gene products can play a role in preventing, ameliorating, or correcting dysfunctions or diseases including, but not limited to, cancer, a CNS disorder or COPD.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 1 -

REGULATION OF HUMAN AMINOPEPTIDASE N

5 This application incorporates by reference and claims the benefit of co-pending provisional applications Serial No. 60/303,693 filed July 10, 2001.

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

10 The invention relates to the regulation of human aminopeptidase N.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15 Aminopeptidase N (membrane alanyl aminopeptidase) is a peptidase that functions in general peptide degradation. This enzyme is located in the small-intestinal membrane and functions in the final digestion of peptides generated from hydrolysis of proteins by gastric and pancreatic proteases (Kruse *et al.*, 1988, FEBS Lett. 239:305-308). There is a need in the art to identify related enzymes, which can be regulated to provide therapeutic effects.

SUMMARY OF THE INVENTION

20 It is an object of the invention to provide reagents and methods of regulating a human aminopeptidase N. This and other objects of the invention are provided by one or more of the embodiments described below.

25 One embodiment of the invention is a aminopeptidase N polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

30 amino acid sequences which are at least about 37% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 2 -

Yet another embodiment of the invention is a method of screening for agents which decrease extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a aminopeptidase N polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

amino acid sequences which are at least about 37% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

10

Binding between the test compound and the aminopeptidase N polypeptide is detected. A test compound which binds to the aminopeptidase N polypeptide is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation. The agent can work by decreasing the activity of the aminopeptidase N.

15

Another embodiment of the invention is a method of screening for agents which decrease extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a polynucleotide encoding a aminopeptidase N polypeptide, wherein the polynucleotide comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

20

nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1; and the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1.

25

Binding of the test compound to the polynucleotide is detected. A test compound which binds to the polynucleotide is identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation. The agent can work by decreasing the amount of the aminopeptidase N through interacting with the aminopeptidase N mRNA.

30

Another embodiment of the invention is a method of screening for agents which regulate extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 3 -

aminopeptidase N polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

- 5 amino acid sequences which are at least about 37% identical to
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

10 A aminopeptidase N activity of the polypeptide is detected. A test compound which increases aminopeptidase N activity of the polypeptide relative to aminopeptidase N activity in the absence of the test compound is thereby identified as a potential agent for increasing extracellular matrix degradation. A test compound which decreases aminopeptidase N activity of the polypeptide relative to aminopeptidase N activity in the absence of the test compound is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation.

15 Even another embodiment of the invention is a method of screening for agents which decrease extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a aminopeptidase N product of a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

- 20 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to
the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1; and
the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1.

25 Binding of the test compound to the aminopeptidase N product is detected. A test compound which binds to the aminopeptidase N product is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation.

30 Still another embodiment of the invention is a method of reducing extracellular matrix degradation. A cell is contacted with a reagent which specifically binds to a polynucleotide encoding a aminopeptidase N polypeptide or the product encoded by

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 4 -

the polynucleotide, wherein the polynucleotide comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

- 5 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to
the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1; and
the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1.

Aminopeptidase N activity in the cell is thereby decreased.

- 10 The invention thus provides a human aminopeptidase N that can be used to identify test compounds that may act, for example, as activators or inhibitors at the enzyme's active site. Human aminopeptidase N and fragments thereof also are useful in raising specific antibodies that can block the enzyme and effectively reduce its activity.

15 **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

Fig. 1 shows the DNA-sequence encoding a aminopeptidase N Polypeptide (SEQ ID NO: 1).

- 20 Fig. 2 shows the amino acid sequence deduced from the DNA-sequence of Fig.1 (SEQ ID NO: 2).

Fig. 3 shows the amino acid sequence of the protein identified by swissP15144|AMPN_HUMAN aminopeptidase N (SEQ ID NO: 3).

- 25 Fig. 4 shows the BLASTP - alignment of 340 (SEQ ID NO: 2) against swissP15144|AMPN_HUMAN aminopeptidase N (SEQ ID NO: 3).

- 30 Fig. 5 shows the HMMPFAM - alignment of 340 (SEQ ID NO: 2) against pfam|hmm|Peptidase_M1.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 5 -

Fig. 6 shows the Prosite search results.

Fig. 7 shows the TMHMM result.

5 **DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

The invention relates to an isolated polynucleotide from the group consisting of:

- 10 a) a polynucleotide encoding a aminopeptidase N polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

amino acid sequences which are at least about 37% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

15

- b) a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO: 1;
- c) a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to a polynucleotide specified in (a) and (b) and encodes a aminopeptidase N polypeptide;
- 20 d) a polynucleotide the sequence of which deviates from the polynucleotide sequences specified in (a) to (c) due to the degeneration of the genetic code and encodes a aminopeptidase N polypeptide; and
- 25 e) a polynucleotide which represents a fragment, derivative or allelic variation of a polynucleotide sequence specified in (a) to (d) and encodes a aminopeptidase N polypeptide.

30 Furthermore, it has been discovered by the present applicant that a novel aminopeptidase N, particularly a human aminopeptidase N, can be used in therapeutic methods to treat cancer, a CNS disorder or COPD. Human aminopeptidase N

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 6 -

comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2. A coding sequence for human aminopeptidase N is shown in SEQ ID NO: 1. This sequence is located on chromosome 5q23.1. Related ESTs (BG720834; BG719375; BG208666; BG11371; AI222989; BG623101) are expressed in placenta and testis.

5

Human aminopeptidase N is 36% identical over 942 amino acids to swissP15144|AMPN_HUMAN aminopeptidase N (SEQ ID NO: 3) (FIG. 1). A search against the pfam database identified a peptidase family M1. The protein of the invention's function as a zinc metalloprotease is supported by the identification of a Zinc_protease region by prosite analysis. The transmembrane region and prosite signature are underlined in FIG. 1. Metal binding and active site residues are shown in bold.

10

Human aminopeptidase N of the invention is expected to be useful for the same purposes as previously identified aminopeptidase N enzymes. Human aminopeptidase N is believed to be useful in therapeutic methods to treat disorders such as cancer, CNS disorders, and COPD. Human aminopeptidase N also can be used to screen for human aminopeptidase N activators and inhibitors.

15

20 *Polypeptides*

Human aminopeptidase N polypeptides according to the invention comprise at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, or 933 contiguous amino acids selected from the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or a biologically active variant thereof, as defined below. An aminopeptidase N polypeptide of the invention therefore can be a portion of an aminopeptidase N protein, a full-length aminopeptidase N protein, or a fusion protein comprising all or a portion of an aminopeptidase N protein.

25

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 7 -

Biologically Active Variants

Amino peptidase N polypeptide variants that are biologically active, *i.e.*, retain the ability to bind a ligand to produce a biological effect, such as cyclic AMP formation, mobilization of intracellular calcium, or phosphoinositide metabolism, also are amino peptidase N polypeptides. Preferably, naturally or non-naturally occurring amino peptidase N polypeptide variants have amino acid sequences which are at least about 37, 40, 45, 50, preferably at least about 55, 65, 70, 75, 90, 96, or 98% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or a fragment thereof. Percent identity between a putative amino peptidase N polypeptide variant and an amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 is determined by conventional methods. See, for example, Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48:603 (1986), and Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992). Briefly, two amino acid sequences are aligned to optimize the alignment scores using a gap opening penalty of 10, a gap extension penalty of 1, and the "BLOSUM62" scoring matrix of Henikoff and Henikoff (*ibid.*). Those skilled in the art appreciate that there are many established algorithms available to align two amino acid sequences. The "FASTA" similarity search algorithm of Pearson and Lipman is a suitable protein alignment method for examining the level of identity shared by an amino acid sequence disclosed herein and the amino acid sequence of a putative variant. The FASTA algorithm is described by Pearson and Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444(1988), and by Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990). Briefly, FASTA first characterizes sequence similarity by identifying regions shared by the query sequence and a test sequence that have either the highest density of identities (if the ktup variable is 1) or pairs of identities (if ktup=2), without considering conservative amino acid substitutions, insertions, or deletions. The ten regions with the highest density of identities are then rescored by comparing the similarity of all paired amino acids using an amino acid substitution matrix, and the ends of the regions are "trimmed" to include only those residues that contribute to the highest score. If there are several regions with scores greater than the "cutoff" value (calculated by a predetermined formula based upon the length of the sequence and the ktup value), then the trimmed initial regions are

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 8 -

examined to determine whether the regions can be joined to form approximate alignment with gaps. Finally, the highest scoring regions of the two amino acid sequences are aligned using a modification of the Needleman-Wunsch-Sellers algorithm (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444 (1970); Sellers, *SIAM J. Appl. Math.* 26:787 (1974)), which allows for amino acid insertions and deletions. Preferred parameters for FASTA analysis are: *k*tup=1, gap opening penalty=10, gap extension penalty=1, and substitution matrix=BLOSUM62. These parameters can be introduced into a FASTA program by modifying the scoring matrix file ("SMATRIX"), as explained in Appendix 2 of Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63 (1990). FASTA can also be used to determine the sequence identity of nucleic acid molecules using a ratio as disclosed above. For nucleotide sequence comparisons, the *k*tup value can range between one to six, preferably from three to six, most preferably three, with other parameters set as default.

Variations in percent identity can be due, for example, to amino acid substitutions, insertions, or deletions. Amino acid substitutions are defined as one for one amino acid replacements. They are conservative in nature when the substituted amino acid has similar structural and/or chemical properties. Examples of conservative replacements are substitution of a leucine with an isoleucine or valine, an aspartate with a glutamate, or a threonine with a serine.

Amino acid insertions or deletions are changes to or within an amino acid sequence. They typically fall in the range of about 1 to 5 amino acids. Guidance in determining which amino acid residues can be substituted, inserted, or deleted without abolishing biological or immunological activity of an aminopeptidase N polypeptide can be found using computer programs well known in the art, such as DNASTAR software.

The invention additionally, encompasses aminopeptidase N polypeptides that are differentially modified during or after translation, e.g., by glycosylation, acetylation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to an antibody molecule or other cellular ligand, etc.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 9 -

Any of numerous chemical modifications can be carried out by known techniques including, but not limited, to specific chemical cleavage by cyanogen bromide, trypsin, chymotrypsin, papain, V8 protease, NaBH₄, acetylation, formylation, oxidation, reduction, metabolic synthesis in the presence of tunicamycin, etc.

5

Additional post-translational modifications encompassed by the invention include, for example, *e.g.*, N-linked or O-linked carbohydrate chains, processing of N-terminal or C-terminal ends), attachment of chemical moieties to the amino acid backbone, chemical modifications of N-linked or O-linked carbohydrate chains, and addition or deletion of an N-terminal methionine residue as a result of prokaryotic host cell expression. The aminopeptidase N polypeptides may also be modified with a detectable label, such as an enzymatic, fluorescent, isotopic or affinity label to allow for detection and isolation of the protein.

10

The invention also provides chemically modified derivatives of aminopeptidase N polypeptides that may provide additional advantages such as increased solubility, stability and circulating time of the polypeptide, or decreased immunogenicity (see U.S. Patent No. 4,179,337). The chemical moieties for derivitization can be selected from water soluble polymers such as polyethylene glycol, ethylene glycol/propylene glycol copolymers, carboxymethylcellulose, dextran, polyvinyl alcohol, and the like. The polypeptides can be modified at random or predetermined positions within the molecule and can include one, two, three, or more attached chemical moieties.

15

20

Whether an amino acid change or a polypeptide modification results in a biologically active aminopeptidase N polypeptide can readily be determined by assaying for enzymatic activity, as described for example, in Ishii et al. (Int. J. Cancer 92(1):49-54, 2001).

25

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 10 -

Fusion Proteins

5 Fusion proteins are useful for generating antibodies against aminopeptidase N polypeptide amino acid sequences and for use in various assay systems. For example, fusion proteins can be used to identify proteins that interact with portions of an aminopeptidase N polypeptide. Protein affinity chromatography or library-based assays for protein-protein interactions, such as the yeast two-hybrid or phage display systems, can be used for this purpose. Such methods are well known in the art and also can be used as drug screens.

10

An aminopeptidase N polypeptide fusion protein comprises two polypeptide segments fused together by means of a peptide bond. The first polypeptide segment comprises at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, or 933 contiguous amino acids of SEQ ID NO: 2 or of a biologically active variant, such as those described above. The first polypeptide segment also can comprise full-length aminopeptidase N protein.

15

The second polypeptide segment can be a full-length protein or a protein fragment. Proteins commonly used in fusion protein construction include β -galactosidase, β -glucuronidase, green fluorescent protein (GFP), autofluorescent proteins, including blue fluorescent protein (BFP), glutathione-S-transferase (GST), luciferase, horseradish peroxidase (HRP), and chloramphenicol acetyltransferase (CAT). Additionally, epitope tags are used in fusion protein constructions, including histidine (His) tags, FLAG tags, influenza hemagglutinin (HA) tags, Myc tags, VSV-G tags, and thioredoxin (Trx) tags. Other fusion constructions can include maltose binding protein (MBP), S-tag, Lex a DNA binding domain (DBD) fusions, GAL4 DNA binding domain fusions, and herpes simplex virus (HSV) BP16 protein fusions. A fusion protein also can be engineered to contain a cleavage site located between the aminopeptidase N polypeptide-encoding sequence and the heterologous protein

20

25

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 11 -

sequence, so that the aminopeptidase N polypeptide can be cleaved and purified away from the heterologous moiety.

5 A fusion protein can be synthesized chemically, as is known in the art. Preferably, a fusion protein is produced by covalently linking two polypeptide segments or by standard procedures in the art of molecular biology. Recombinant DNA methods can be used to prepare fusion proteins, for example, by making a DNA construct which comprises coding sequences selected from SEQ ID NO: 1 in proper reading frame with nucleotides encoding the second polypeptide segment and expressing the DNA
10 construct in a host cell, as is known in the art. Many kits for constructing fusion proteins are available from companies such as Promega Corporation (Madison, WI), Stratagene (La Jolla, CA), CLONTECH (Mountain View, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), MBL International Corporation (MIC; Watertown, MA), and Quantum Biotechnologies (Montreal, Canada; 1-888-DNA-KITS).

15

Identification of Species Homologs

Species homologs of human aminopeptidase N polypeptide can be obtained using aminopeptidase N polypeptide polynucleotides (described below) to make suitable
20 probes or primers for screening cDNA expression libraries from other species, such as mice, monkeys, or yeast, identifying cDNAs which encode homologs of aminopeptidase N polypeptide, and expressing the cDNAs as is known in the art.

Polynucleotides

25

An aminopeptidase N polynucleotide can be single- or double-stranded and comprises a coding sequence or the complement of a coding sequence for an aminopeptidase N polypeptide. A coding sequence for human aminopeptidase N is shown in SEQ ID NO: 1.

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 12 -

Degenerate nucleotide sequences encoding human aminopeptidase N polypeptides, as well as homologous nucleotide sequences which are at least about 50, 55, 60, 65, 70, preferably about 75, 90, 96, 98, or 99% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or its complement also are aminopeptidase N polynucleotides.

5 Percent sequence identity between the sequences of two polynucleotides is determined using computer programs such as ALIGN which employ the FASTA algorithm, using an affine gap search with a gap open penalty of -12 and a gap extension penalty of -2. Complementary DNA (cDNA) molecules, species homologs, and variants of aminopeptidase N polynucleotides that encode biologically

10 active aminopeptidase N polypeptides also are aminopeptidase N polynucleotides. Polynucleotide fragments comprising at least 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, or 25 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 1 or its complement also are aminopeptidase N polynucleotides. These fragments can be used, for example, as hybridization probes or as antisense oligonucleotides.

15

Identification of Polynucleotide Variants and Homologs

Variants and homologs of the aminopeptidase N polynucleotides described above also are aminopeptidase N polynucleotides. Typically, homologous aminopeptidase

20 N polynucleotide sequences can be identified by hybridization of candidate polynucleotides to known aminopeptidase N polynucleotides under stringent conditions, as is known in the art. For example, using the following wash conditions--2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate, pH 7.0), 0.1% SDS, room temperature twice, 30 minutes each; then 2X SSC, 0.1% SDS, 50°C once, 30 minutes; then 2X SSC, room

25 temperature twice, 10 minutes each--homologous sequences can be identified which contain at most about 25-30% basepair mismatches. More preferably, homologous nucleic acid strands contain 15-25% basepair mismatches, even more preferably 5-15% basepair mismatches.

30 Species homologs of the aminopeptidase N polynucleotides disclosed herein also can be identified by making suitable probes or primers and screening cDNA expression

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 13 -

libraries from other species, such as mice, monkeys, or yeast. Human variants of aminopeptidase N polynucleotides can be identified, for example, by screening human cDNA expression libraries. It is well known that the T_m of a double-stranded DNA decreases by 1-1.5°C with every 1% decrease in homology (Bonner *et al.*, *J. Mol. Biol.* 81, 123 (1973)). Variants of human aminopeptidase N polynucleotides or aminopeptidase N polynucleotides of other species can therefore be identified by hybridizing a putative homologous aminopeptidase N polynucleotide with a polynucleotide having a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or the complement thereof to form a test hybrid. The melting temperature of the test hybrid is compared with the melting temperature of a hybrid comprising polynucleotides having perfectly complementary nucleotide sequences, and the number or percent of basepair mismatches within the test hybrid is calculated.

Nucleotide sequences which hybridize to aminopeptidase N polynucleotides or their complements following stringent hybridization and/or wash conditions also are aminopeptidase N polynucleotides. Stringent wash conditions are well known and understood in the art and are disclosed, for example, in Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed., 1989, at pages 9.50-9.51.

Typically, for stringent hybridization conditions a combination of temperature and salt concentration should be chosen that is approximately 12-20°C below the calculated T_m of the hybrid under study. The T_m of a hybrid between an aminopeptidase N polynucleotide having a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or the complement thereof and a polynucleotide sequence which is at least about 50, preferably about 75, 90, 96, or 98% identical to one of those nucleotide sequences can be calculated, for example, using the equation of Bolton and McCarthy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48, 1390 (1962):

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} - 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G + C) - 0.63(\%\text{formamide}) - 600/l,$$
where l = the length of the hybrid in basepairs.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 14 -

Stringent wash conditions include, for example, 4X SSC at 65°C, or 50% formamide, 4X SSC at 42°C, or 0.5X SSC, 0.1% SDS at 65°C. Highly stringent wash conditions include, for example, 0.2X SSC at 65°C.

5 Preparation of Polynucleotides

An aminopeptidase N polynucleotide can be isolated free of other cellular components such as membrane components, proteins, and lipids. Polynucleotides can be made by a cell and isolated using standard nucleic acid purification techniques, or synthesized using an amplification technique, such as the polymerase chain reaction (PCR), or by using an automatic synthesizer. Methods for isolating polynucleotides are routine and are known in the art. Any such technique for obtaining a polynucleotide can be used to obtain isolated aminopeptidase N polynucleotides. For example, restriction enzymes and probes can be used to isolate polynucleotide fragments, which comprise aminopeptidase N nucleotide sequences. Isolated polynucleotides are in preparations that are free or at least 70, 80, or 90% free of other molecules.

Human aminopeptidase N cDNA molecules can be made with standard molecular biology techniques, using aminopeptidase N mRNA as a template. Human aminopeptidase N cDNA molecules can thereafter be replicated using molecular biology techniques known in the art and disclosed in manuals such as Sambrook *et al.* (1989). An amplification technique, such as PCR, can be used to obtain additional copies of polynucleotides of the invention, using either human genomic DNA or cDNA as a template.

Alternatively, synthetic chemistry techniques can be used to synthesize aminopeptidase N polynucleotides. The degeneracy of the genetic code allows alternate nucleotide sequences to be synthesized which will encode an aminopeptidase N polypeptide having, for example, an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or a biologically active variant thereof.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 15 -

Extending Polynucleotides

5 Various PCR-based methods can be used to extend the nucleic acid sequences disclosed herein to detect upstream sequences such as promoters and regulatory elements. For example, restriction-site PCR uses universal primers to retrieve unknown sequence adjacent to a known locus (Sarkar, *PCR Methods Applic.* 2, 318-322, 1993). Genomic DNA is first amplified in the presence of a primer to a linker sequence and a primer specific to the known region. The amplified sequences
10 are then subjected to a second round of PCR with the same linker primer and another specific primer internal to the first one. Products of each round of PCR are transcribed with an appropriate RNA polymerase and sequenced using reverse transcriptase.

15 Inverse PCR also can be used to amplify or extend sequences using divergent primers based on a known region (Triglia *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16, 8186, 1988). Primers can be designed using commercially available software, such as OLIGO 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.), to be 22-30 nucleotides in length, to have a GC content of 50% or more, and to anneal to the
20 target sequence at temperatures about 68-72°C. The method uses several restriction enzymes to generate a suitable fragment in the known region of a gene. The fragment is then circularized by intramolecular ligation and used as a PCR template.

25 Another method which can be used is capture PCR, which involves PCR amplification of DNA fragments adjacent to a known sequence in human and yeast artificial chromosome DNA (Lagerstrom *et al.*, *PCR Methods Applic.* 1, 111-119, 1991). In this method, multiple restriction enzyme digestions and ligations also can be used to place an engineered double-stranded sequence into an unknown fragment of the DNA molecule before performing PCR.

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 16 -

Another method which can be used to retrieve unknown sequences is that of Parker *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19, 3055-3060, 1991). Additionally, PCR, nested primers, and PROMOTERFINDER libraries (CLONTECH, Palo Alto, Calif.) can be used to walk genomic DNA (CLONTECH, Palo Alto, Calif.). This process avoids the need to screen libraries and is useful in finding intron/exon junctions.

When screening for full-length cDNAs, it is preferable to use libraries that have been size-selected to include larger cDNAs. Randomly-primed libraries are preferable, in that they will contain more sequences which contain the 5' regions of genes. Use of a randomly primed library may be especially preferable for situations in which an oligo d(T) library does not yield a full-length cDNA. Genomic libraries can be useful for extension of sequence into 5' non-transcribed regulatory regions.

Commercially available capillary electrophoresis systems can be used to analyze the size or confirm the nucleotide sequence of PCR or sequencing products. For example, capillary sequencing can employ flowable polymers for electrophoretic separation, four different fluorescent dyes (one for each nucleotide) that are laser activated, and detection of the emitted wavelengths by a charge coupled device camera. Output/light intensity can be converted to electrical signal using appropriate software (*e.g.* GENOTYPER and Sequence NAVIGATOR, Perkin Elmer), and the entire process from loading of samples to computer analysis and electronic data display can be computer controlled. Capillary electrophoresis is especially preferable for the sequencing of small pieces of DNA that might be present in limited amounts in a particular sample.

Obtaining Polypeptides

Human aminopeptidase N polypeptides can be obtained, for example, by purification from human cells, by expression of aminopeptidase N polynucleotides, or by direct chemical synthesis.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 17 -

Protein Purification

Human aminopeptidase N polypeptides can be purified from any cell that expresses the polypeptide, including host cells that have been transfected with aminopeptidase N expression constructs. A purified aminopeptidase N polypeptide is separated from other compounds that normally associate with the aminopeptidase N polypeptide in the cell, such as certain proteins, carbohydrates, or lipids, using methods well-known in the art. Such methods include, but are not limited to, size exclusion chromatography, ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography, affinity chromatography, and preparative gel electrophoresis. A preparation of purified aminopeptidase N polypeptides is at least 80% pure; preferably, the preparations are 90%, 95%, or 99% pure. Purity of the preparations can be assessed by any means known in the art, such as SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Expression of Polynucleotides

To express an aminopeptidase N polynucleotide, the polynucleotide can be inserted into an expression vector that contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted coding sequence. Methods that are well known to those skilled in the art can be used to construct expression vectors containing sequences encoding aminopeptidase N polypeptides and appropriate transcriptional and translational control elements. These methods include *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. Such techniques are described, for example, in Sambrook *et al.* (1989) and in Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989.

A variety of expression vector/host systems can be utilized to contain and express sequences encoding an aminopeptidase N polypeptide. These include, but are not limited to, microorganisms, such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid, or cosmid DNA expression vectors; yeast transformed with yeast

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 18 -

expression vectors, insect cell systems infected with virus expression vectors (*e.g.*, baculovirus), plant cell systems transformed with virus expression vectors (*e.g.*, cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or with bacterial expression vectors (*e.g.*, Ti or pBR322 plasmids), or animal cell systems.

5

The control elements or regulatory sequences are those non-translated regions of the vector -- enhancers, promoters, 5' and 3' untranslated regions -- which interact with host cellular proteins to carry out transcription and translation. Such elements can vary in their strength and specificity. Depending on the vector system and host utilized, any number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, can be used. For example, when cloning in bacterial systems, inducible promoters such as the hybrid lacZ promoter of the BLUESCRIPT phagemid (Stratagene, LaJolla, Calif.) or pSPORT1 plasmid (Life Technologies) and the like can be used. The baculovirus polyhedrin promoter can be used in insect cells. Promoters or enhancers derived from the genomes of plant cells (*e.g.*, heat shock, RUBISCO, and storage protein genes) or from plant viruses (*e.g.*, viral promoters or leader sequences) can be cloned into the vector. In mammalian cell systems, promoters from mammalian genes or from mammalian viruses are preferable. If it is necessary to generate a cell line that contains multiple copies of a nucleotide sequence encoding an aminopeptidase N polypeptide, vectors based on SV40 or EBV can be used with an appropriate selectable marker.

10

15

20

Bacterial and Yeast Expression Systems

25

In bacterial systems, a number of expression vectors can be selected depending upon the use intended for the aminopeptidase N polypeptide. For example, when a large quantity of an aminopeptidase N polypeptide is needed for the induction of antibodies, vectors which direct high level expression of fusion proteins that are readily purified can be used. Such vectors include, but are not limited to, multi-functional *E. coli* cloning and expression vectors such as BLUESCRIPT (Stratagene). In a BLUESCRIPT vector, a sequence encoding the aminopeptidase N polypeptide

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 19 -

can be ligated into the vector in frame with sequences for the amino-terminal Met and the subsequent 7 residues of β -galactosidase so that a hybrid protein is produced. pIN vectors (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509, 1989) or pGEX vectors (Promega, Madison, Wis.) also can be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. Proteins made in such systems can be designed to include heparin, thrombin, or factor Xa protease cleavage sites so that the cloned polypeptide of interest can be released from the GST moiety at will.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a number of vectors containing constitutive or inducible promoters such as alpha factor, alcohol oxidase, and PGH can be used. For reviews, see Ausubel *et al.* (1989) and Grant *et al.*, *Methods Enzymol.* 153, 516-544, 1987.

Plant and Insect Expression Systems

If plant expression vectors are used, the expression of sequences encoding aminopeptidase N polypeptides can be driven by any of a number of promoters. For example, viral promoters such as the 35S and 19S promoters of CaMV can be used alone or in combination with the omega leader sequence from TMV (Takamatsu, *EMBO J.* 6, 307-311, 1987). Alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO or heat shock promoters can be used (Coruzzi *et al.*, *EMBO J.* 3, 1671-1680, 1984; Broglie *et al.*, *Science* 224, 838-843, 1984; Winter *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 17, 85-105, 1991). These constructs can be introduced into plant cells by direct DNA transformation or by pathogen-mediated transfection. Such techniques are described in a number of generally available reviews (*e.g.*, Hobbs or Murray, in MCGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, McGraw Hill, New York, N.Y., pp. 191-196, 1992).

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 20 -

An insect system also can be used to express an aminopeptidase N polypeptide. For example, in one such system *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes in *Spodoptera frugiperda* cells or in *Trichoplusia* larvae. Sequences encoding aminopeptidase N polypeptides can be cloned into a non-essential region of the virus, such as the polyhedrin gene, and placed under control of the polyhedrin promoter. Successful insertion of aminopeptidase N polypeptides will render the polyhedrin gene inactive and produce recombinant virus lacking coat protein. The recombinant viruses can then be used to infect *S. frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae in which aminopeptidase N polypeptides can be expressed (Engelhard *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 3224-3227, 1994).

Mammalian Expression Systems

A number of viral-based expression systems can be used to express aminopeptidase N polypeptides in mammalian host cells. For example, if an adenovirus is used as an expression vector, sequences encoding aminopeptidase N polypeptides can be ligated into an adenovirus transcription/translation complex comprising the late promoter and tripartite leader sequence. Insertion in a non-essential E1 or E3 region of the viral genome can be used to obtain a viable virus that is capable of expressing an aminopeptidase N polypeptide in infected host cells (Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3655-3659, 1984). If desired, transcription enhancers, such as the Rous sarcoma virus (RSV) enhancer, can be used to increase expression in mammalian host cells.

Human artificial chromosomes (HACs) also can be used to deliver larger fragments of DNA than can be contained and expressed in a plasmid. HACs of 6M to 10M are constructed and delivered to cells via conventional delivery methods (*e.g.*, liposomes, polycationic amino polymers, or vesicles).

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 21 -

Specific initiation signals also can be used to achieve more efficient translation of sequences encoding aminopeptidase N polypeptides. Such signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where sequences encoding an aminopeptidase N polypeptide, its initiation codon, and upstream sequences are inserted into the appropriate expression vector, no additional transcriptional or translational control signals may be needed. However, in cases where only coding sequence, or a fragment thereof, is inserted, exogenous translational control signals (including the ATG initiation codon) should be provided. The initiation codon should be in the correct reading frame to ensure translation of the entire insert. Exogenous translational elements and initiation codons can be of various origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression can be enhanced by the inclusion of enhancers which are appropriate for the particular cell system which is used (see Scharf *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 20, 125-162, 1994).

15 Host Cells

A host cell strain can be chosen for its ability to modulate the expression of the inserted sequences or to process the expressed aminopeptidase N polypeptide in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation, and acylation. Post-translational processing which cleaves a "prepro" form of the polypeptide also can be used to facilitate correct insertion, folding and/or function. Different host cells that have specific cellular machinery and characteristic mechanisms for post-translational activities (*e.g.*, CHO, HeLa, MDCK, HEK293, and WI38), are available from the American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) and can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

Stable expression is preferred for long-term, high-yield production of recombinant proteins. For example, cell lines which stably express aminopeptidase N polypeptides can be transformed using expression vectors which can contain viral origins

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 22 -

of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same or on a separate vector. Following the introduction of the vector, cells can be allowed to grow for 1-2 days in an enriched medium before they are switched to a selective medium. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to selection, and its presence allows growth and recovery of cells which successfully
5 express the introduced aminopeptidase N sequences. Resistant clones of stably transformed cells can be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell type. See, for example, ANIMAL CELL CULTURE, R.I. Freshney, ed., 1986.

10 Any number of selection systems can be used to recover transformed cell lines.

These include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler *et al.*, *Cell* 11, 223-32, 1977) and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy *et al.*, *Cell* 22, 817-23, 1980) genes which can be employed in *tk* or *aprt* cells,
15 respectively. Also, antimetabolite, antibiotic, or herbicide resistance can be used as the basis for selection. For example, *dhfr* confers resistance to methotrexate (Wigler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3567-70, 1980), *npt* confers resistance to the aminoglycosides, neomycin and G-418 (Colbere-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150, 1-14, 1981), and *als* and *pat* confer resistance to chlorsulfuron and phosphinotricin
20 acetyltransferase, respectively (Murray, 1992, *supra*). Additional selectable genes have been described. For example, *trpB* allows cells to utilize indole in place of tryptophan, or *hisD*, which allows cells to utilize histinol in place of histidine (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8047-51, 1988). Visible markers such as anthocyanins, β -glucuronidase and its substrate GUS, and luciferase and its
25 substrate luciferin, can be used to identify transformants and to quantify the amount of transient or stable protein expression attributable to a specific vector system (Rhodes *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 55, 121-131, 1995).

Detecting Expression

Although the presence of marker gene expression suggests that the aminopeptidase N polynucleotide is also present, its presence and expression may need to be confirmed. For example, if a sequence encoding an aminopeptidase N polypeptide is inserted within a marker gene sequence, transformed cells containing sequences that encode an aminopeptidase N polypeptide can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding an aminopeptidase N polypeptide under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the aminopeptidase N polynucleotide.

Alternatively, host cells which contain an aminopeptidase N polynucleotide and which express an aminopeptidase N polypeptide can be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridizations and protein bioassay or immunoassay techniques that include membrane, solution, or chip-based technologies for the detection and/or quantification of nucleic acid or protein. For example, the presence of a polynucleotide sequence encoding an aminopeptidase N polypeptide can be detected by DNA-DNA or DNA-RNA hybridization or amplification using probes or fragments or fragments of polynucleotides encoding an aminopeptidase N polypeptide. Nucleic acid amplification-based assays involve the use of oligonucleotides selected from sequences encoding an aminopeptidase N polypeptide to detect transformants that contain an aminopeptidase N polynucleotide.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of an aminopeptidase N polypeptide, using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the polypeptide, are known in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay using monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on an aminopeptidase N

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 24 -

polypeptide can be used, or a competitive binding assay can be employed. These and other assays are described in Hampton *et al.*, SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL, APS Press, St. Paul, Minn., 1990) and Maddox *et al.*, *J. Exp. Med.* 158, 1211-1216, 1983).

5

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and can be used in various nucleic acid and amino acid assays. Means for producing labeled hybridization or PCR probes for detecting sequences related to polynucleotides encoding aminopeptidase N polypeptides include oligolabeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, sequences encoding an aminopeptidase N polypeptide can be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and can be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of labeled nucleotides and an appropriate RNA polymerase such as T7, T3, or SP6. These procedures can be conducted using a variety of commercially available kits (Amersham Pharmacia Biotech, Promega, and US Biochemical). Suitable reporter molecules or labels which can be used for ease of detection include radionuclides, enzymes, and fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents, as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.

10
15
20

Expression and Purification of Polypeptides

Host cells transformed with nucleotide sequences encoding an aminopeptidase N polypeptide can be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the protein from cell culture. The polypeptide produced by a transformed cell can be secreted or contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing polynucleotides which encode aminopeptidase N polypeptides can be designed to contain signal sequences which direct secretion of soluble aminopeptidase N polypeptides through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane or which direct the membrane insertion of membrane-bound aminopeptidase N polypeptide.

25
30

As discussed above, other constructions can be used to join a sequence encoding an aminopeptidase N polypeptide to a nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins. Such purification
5 facilitating domains include, but are not limited to, metal chelating peptides such as histidine-tryptophan modules that allow purification on immobilized metals, protein A domains that allow purification on immobilized immunoglobulin, and the domain utilized in the FLAGS extension/affinity purification system (Immunex Corp.,
10 Seattle, Wash.). Inclusion of cleavable linker sequences such as those specific for Factor Xa or enterokinase (Invitrogen, San Diego, CA) between the purification domain and the aminopeptidase N polypeptide also can be used to facilitate purification. One such expression vector provides for expression of a fusion protein containing an aminopeptidase N polypeptide and 6 histidine residues preceding a
15 thioredoxin or an enterokinase cleavage site. The histidine residues facilitate purification by IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography, as described in Porath *et al.*, *Prot. Exp. Purif.* 3, 263-281, 1992), while the enterokinase cleavage site provides a means for purifying the aminopeptidase N polypeptide from the fusion protein. Vectors that contain fusion proteins are disclosed in Kroll *et al.*, *DNA Cell
20 Biol.* 12, 441-453, 1993.

Chemical Synthesis

Sequences encoding an aminopeptidase N polypeptide can be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see Caruthers *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215-223, 1980; Horn *et al.* *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-232, 1980). Alternatively, an aminopeptidase N polypeptide itself can be
25 produced using chemical methods to synthesize its amino acid sequence, such as by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154, 1963; Roberge *et al.*, *Science* 269, 202-204, 1995). Protein synthesis can be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis
30 can be achieved, for example, using Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 26 -

(Perkin Elmer). Optionally, fragments of aminopeptidase N polypeptides can be separately synthesized and combined using chemical methods to produce a full-length molecule.

5 The newly synthesized peptide can be substantially purified by preparative high performance liquid chromatography (*e.g.*, Creighton, PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). The composition of a synthetic aminopeptidase N polypeptide can be confirmed by amino acid analysis or sequencing (*e.g.*, the Edman degradation procedure; *see* Creighton, 10 *supra*). Additionally, any portion of the amino acid sequence of the aminopeptidase N polypeptide can be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with sequences from other proteins to produce a variant polypeptide or a fusion protein.

15 Production of Altered Polypeptides

As will be understood by those of skill in the art, it may be advantageous to produce aminopeptidase N polypeptide-encoding nucleotide sequences possessing non-naturally occurring codons. For example, codons preferred by a particular 20 prokaryotic or eukaryotic host can be selected to increase the rate of protein expression or to produce an RNA transcript having desirable properties, such as a half-life that is longer than that of a transcript generated from the naturally occurring sequence.

25 The nucleotide sequences disclosed herein can be engineered using methods generally known in the art to alter aminopeptidase N polypeptide-encoding sequences for a variety of reasons, including but not limited to, alterations which modify the cloning, processing, and/or expression of the polypeptide or mRNA product. DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and 30 synthetic oligonucleotides can be used to engineer the nucleotide sequences. For example, site-directed mutagenesis can be used to insert new restriction sites, alter

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 27 -

glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, introduce mutations, and so forth.

Antibodies

5

Any type of antibody known in the art can be generated to bind specifically to an epitope of an aminopeptidase N polypeptide. "Antibody" as used herein includes intact immunoglobulin molecules, as well as fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, and Fv, which are capable of binding an epitope of an aminopeptidase N polypeptide.

10

Typically, at least 6, 8, 10, or 12 contiguous amino acids are required to form an epitope. However, epitopes which involve non-contiguous amino acids may require more, e.g., at least 15, 25, or 50 amino acids.

15

An antibody which specifically binds to an epitope of an aminopeptidase N polypeptide can be used therapeutically, as well as in immunochemical assays, such as Western blots, ELISAs, radioimmunoassays, immunohistochemical assays, immunoprecipitations, or other immunochemical assays known in the art. Various immunoassays can be used to identify antibodies having the desired specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays are well known in the art. Such immunoassays typically involve the measurement of complex formation between an immunogen and an antibody that specifically binds to the immunogen.

20

25

Typically, an antibody which specifically binds to an aminopeptidase N polypeptide provides a detection signal at least 5-, 10-, or 20-fold higher than a detection signal provided with other proteins when used in an immunochemical assay. Preferably, antibodies which specifically bind to aminopeptidase N polypeptides do not detect other proteins in immunochemical assays and can immunoprecipitate an aminopeptidase N polypeptide from solution.

30

Human aminopeptidase N polypeptides can be used to immunize a mammal, such as a mouse, rat, rabbit, guinea pig, monkey, or human, to produce polyclonal antibodies. If desired, an aminopeptidase N polypeptide can be conjugated to a carrier protein, such as bovine serum albumin, thyroglobulin, and keyhole limpet hemocyanin.

5 Depending on the host species, various adjuvants can be used to increase the immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's adjuvant, mineral gels (e.g., aluminum hydroxide), and surface active substances (e.g. lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol). Among adjuvants used in humans, BCG

10 (*bacilli Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are especially useful.

Monoclonal antibodies that specifically bind to an aminopeptidase N polypeptide can be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These techniques include, but are not

15 limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique (Kohler *et al.*, *Nature* 256, 495-497, 1985; Kozbor *et al.*, *J. Immunol. Methods* 81, 31-42, 1985; Cote *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026-2030, 1983; Cole *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 62, 109-120, 1984).

20 In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity, can be used (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855, 1984; Neuberger *et al.*, *Nature* 312, 604-608, 1984; Takeda *et al.*, *Nature* 314, 452-454, 1985). Monoclonal and other antibodies

25 also can be "humanized" to prevent a patient from mounting an immune response against the antibody when it is used therapeutically. Such antibodies may be sufficiently similar in sequence to human antibodies to be used directly in therapy or may require alteration of a few key residues. Sequence differences between rodent antibodies and human sequences can be minimized by replacing residues which

30 differ from those in the human sequences by site directed mutagenesis of individual residues or by grafting of entire complementarity determining regions. Alternatively,

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 29 -

humanized antibodies can be produced using recombinant methods, as described in GB2188638B. Antibodies that specifically bind to an aminopeptidase N polypeptide can contain antigen binding sites which are either partially or fully humanized, as disclosed in U.S. 5,565,332.

5

Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies can be adapted using methods known in the art to produce single chain antibodies that specifically bind to aminopeptidase N polypeptides. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, can be generated by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries (Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120-23, 1991).

10

Single-chain antibodies also can be constructed using a DNA amplification method, such as PCR, using hybridoma cDNA as a template (Thirion *et al.*, 1996, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 507-11). Single-chain antibodies can be mono- or bispecific, and can be bivalent or tetravalent. Construction of tetravalent, bispecific single-chain antibodies is taught, for example, in Coloma & Morrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15, 159-63. Construction of bivalent, bispecific single-chain antibodies is taught in Mallender & Voss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 199-206.

20

A nucleotide sequence encoding a single-chain antibody can be constructed using manual or automated nucleotide synthesis, cloned into an expression construct using standard recombinant DNA methods, and introduced into a cell to express the coding sequence, as described below. Alternatively, single-chain antibodies can be produced directly using, for example, filamentous phage technology (Verhaar *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 61, 497-501; Nicholls *et al.*, 1993, *J. Immunol. Meth.* 165, 81-91).

25

Antibodies which specifically bind to aminopeptidase N polypeptides also can be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 30 -

disclosed in the literature (Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 3833-3837, 1989; Winter *et al.*, *Nature* 349, 293-299, 1991).

5 Other types of antibodies can be constructed and used therapeutically in methods of the invention. For example, chimeric antibodies can be constructed as disclosed in WO 93/03151. Binding proteins which are derived from immunoglobulins and which are multivalent and multispecific, such as the "diabodies" described in WO 94/13804, also can be prepared.

10 Antibodies according to the invention can be purified by methods well known in the art. For example, antibodies can be affinity purified by passage over a column to which an aminopeptidase N polypeptide is bound. The bound antibodies can then be eluted from the column using a buffer with a high salt concentration.

15 Antisense Oligonucleotides

Antisense oligonucleotides are nucleotide sequences that are complementary to a specific DNA or RNA sequence. Once introduced into a cell, the complementary nucleotides combine with natural sequences produced by the cell to form complexes
20 and block either transcription or translation. Preferably, an antisense oligonucleotide is at least 11 nucleotides in length, but can be at least 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, or 50 or more nucleotides long. Longer sequences also can be used. Antisense oligonucleotide molecules can be provided in a DNA construct and introduced into a cell as described above to decrease the level of aminopeptidase N gene products in
25 the cell.

Antisense oligonucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, or a combination of both. Oligonucleotides can be synthesized manually or by an automated synthesizer, by covalently linking the 5' end of one nucleotide with the 3'
30 end of another nucleotide with non-phosphodiester internucleotide linkages such as alkylphosphonates, phosphorothioates, phosphorodithioates, alkylphosphonothioates,

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 31 -

alkylphosphonates, phosphoramidates, phosphate esters, carbamates, acetamidate, carboxymethyl esters, carbonates, and phosphate triesters. See Brown, *Meth. Mol. Biol.* 20, 1-8, 1994; Sonveaux, *Meth. Mol. Biol.* 26, 1-72, 1994; Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 543-583, 1990.

5

Modifications of aminopeptidase N gene expression can be obtained by designing antisense oligonucleotides that will form duplexes to the control, 5', or regulatory regions of the aminopeptidase N gene. Oligonucleotides derived from the transcription initiation site, *e.g.*, between positions -10 and +10 from the start site, are preferred. Similarly, inhibition can be achieved using "triple helix" base-pairing methodology. Triple helix pairing is useful because it causes inhibition of the ability of the double helix to open sufficiently for the binding of polymerases, transcription factors, or chaperons. Therapeutic advances using triplex DNA have been described in the literature (*e.g.*, Gee *et al.*, in Huber & Carr, MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994). An antisense oligonucleotide also can be designed to block translation of mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes.

Precise complementarity is not required for successful complex formation between an antisense oligonucleotide and the complementary sequence of an aminopeptidase N polynucleotide. Antisense oligonucleotides which comprise, for example, 2, 3, 4, or 5 or more stretches of contiguous nucleotides which are precisely complementary to an aminopeptidase N polynucleotide, each separated by a stretch of contiguous nucleotides which are not complementary to adjacent aminopeptidase N nucleotides, can provide sufficient targeting specificity for aminopeptidase N mRNA. Preferably, each stretch of complementary contiguous nucleotides is at least 4, 5, 6, 7, or 8 or more nucleotides in length. Non-complementary intervening sequences are preferably 1, 2, 3, or 4 nucleotides in length. One skilled in the art can easily use the calculated melting point of an antisense-sense pair to determine the degree of mismatching which will be tolerated between a particular antisense oligonucleotide and a particular aminopeptidase N polynucleotide sequence.

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 32 -

Antisense oligonucleotides can be modified without affecting their ability to hybridize to an aminopeptidase N polynucleotide. These modifications can be internal or at one or both ends of the antisense molecule. For example, internucleo-
5 side phosphate linkages can be modified by adding cholesteryl or diamine moieties with varying numbers of carbon residues between the amino groups and terminal ribose. Modified bases and/or sugars, such as arabinose instead of ribose, or a 3', 5'-substituted oligonucleotide in which the 3' hydroxyl group or the 5' phosphate group are substituted, also can be employed in a modified antisense oligonucleotide.
10 These modified oligonucleotides can be prepared by methods well known in the art. See, e.g., Agrawal *et al.*, *Trends Biotechnol.* 10, 152-158, 1992; Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 543-584, 1990; Uhlmann *et al.*, *Tetrahedron. Lett.* 215, 3539-3542, 1987.

15 Ribozymes

Ribozymes are RNA molecules with catalytic activity. See, e.g., Cech, *Science* 236, 1532-1539; 1987; Cech, *Ann. Rev. Biochem.* 59, 543-568; 1990; Cech, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 605-609; 1992; Couture & Stinchcomb, *Trends Genet.* 12, 510-515,
20 1996. Ribozymes can be used to inhibit gene function by cleaving an RNA sequence, as is known in the art (e.g., Haseloff *et al.*, U.S. Patent 5,641,673). The mechanism of ribozyme action involves sequence-specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Examples include engineered hammerhead motif ribozyme molecules that can
25 specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of specific nucleotide sequences.

The coding sequence of an aminopeptidase N polynucleotide can be used to generate ribozymes that will specifically bind to mRNA transcribed from the aminopeptidase
30 N polynucleotide. Methods of designing and constructing ribozymes which can cleave other RNA molecules in trans in a highly sequence specific manner have been

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 33 -

developed and described in the art (*see Haseloff et al. Nature 334, 585-591, 1988*). For example, the cleavage activity of ribozymes can be targeted to specific RNAs by engineering a discrete "hybridization" region into the ribozyme. The hybridization region contains a sequence complementary to the target RNA and thus specifically hybridizes with the target (*see, for example, Gerlach et al., EP 321,201*).

Specific ribozyme cleavage sites within an aminopeptidase N RNA target can be identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites which include the following sequences: GUA, GUU, and GUC. Once identified, short RNA sequences of between 15 and 20 ribonucleotides corresponding to the region of the target RNA containing the cleavage site can be evaluated for secondary structural features which may render the target inoperable. Suitability of candidate aminopeptidase N RNA targets also can be evaluated by testing accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays. Longer complementary sequences can be used to increase the affinity of the hybridization sequence for the target. The hybridizing and cleavage regions of the ribozyme can be integrally related such that upon hybridizing to the target RNA through the complementary regions, the catalytic region of the ribozyme can cleave the target.

Ribozymes can be introduced into cells as part of a DNA construct. Mechanical methods, such as microinjection, liposome-mediated transfection, electroporation, or calcium phosphate precipitation, can be used to introduce a ribozyme-containing DNA construct into cells in which it is desired to decrease aminopeptidase N expression. Alternatively, if it is desired that the cells stably retain the DNA construct, the construct can be supplied on a plasmid and maintained as a separate element or integrated into the genome of the cells, as is known in the art. A ribozyme-encoding DNA construct can include transcriptional regulatory elements, such as a promoter element, an enhancer or UAS element, and a transcriptional terminator signal, for controlling transcription of ribozymes in the cells.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 34 -

As taught in Haseloff *et al.*, U.S. Patent 5,641,673, ribozymes can be engineered so that ribozyme expression will occur in response to factors that induce expression of a target gene. Ribozymes also can be engineered to provide an additional level of regulation, so that destruction of mRNA occurs only when both a ribozyme and a target gene are induced in the cells.

Differentially Expressed Genes

Described herein are methods for the identification of genes whose products interact with human aminopeptidase N. Such genes may represent genes that are differentially expressed in disorders including, but not limited to, cancer, CNS disorders, and COPD. Further, such genes may represent genes that are differentially regulated in response to manipulations relevant to the progression or treatment of such diseases. Additionally, such genes may have a temporally modulated expression, increased or decreased at different stages of tissue or organism development. A differentially expressed gene may also have its expression modulated under control versus experimental conditions. In addition, the human aminopeptidase N gene or gene product may itself be tested for differential expression.

The degree to which expression differs in a normal versus a diseased state need only be large enough to be visualized via standard characterization techniques such as differential display techniques. Other such standard characterization techniques by which expression differences may be visualized include but are not limited to, quantitative RT (reverse transcriptase), PCR, and Northern analysis.

Identification of Differentially Expressed Genes

To identify differentially expressed genes total RNA or, preferably, mRNA is isolated from tissues of interest. For example, RNA samples are obtained from tissues of experimental subjects and from corresponding tissues of control subjects.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 35 -

Any RNA isolation technique that does not select against the isolation of mRNA may be utilized for the purification of such RNA samples. See, for example, Ausubel *et al.*, ed., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1987-1993. Large numbers of tissue samples may readily be processed using techniques well known to those of skill in the art, such as, for example, the single-step RNA isolation process of Chomczynski, U.S. Patent 4,843,155.

Transcripts within the collected RNA samples that represent RNA produced by differentially expressed genes are identified by methods well known to those of skill in the art. They include, for example, differential screening (Tedder *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 208-12, 1988), subtractive hybridization (Hedrick *et al.*, *Nature* 308, 149-53; Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2825, 1984), and, preferably, differential display (Liang & Pardee, *Science* 257, 967-71, 1992; U.S. Patent 5,262,311).

The differential expression information may itself suggest relevant methods for the treatment of disorders involving the human aminopeptidase N. For example, treatment may include a modulation of expression of the differentially expressed genes and/or the gene encoding the human aminopeptidase N. The differential expression information may indicate whether the expression or activity of the differentially expressed gene or gene product or the human aminopeptidase N gene or gene product are up-regulated or down-regulated.

Screening Methods

The invention provides assays for screening test compounds that bind to or modulate the activity of an aminopeptidase N polypeptide or an aminopeptidase N polynucleotide. A test compound preferably binds to an aminopeptidase N polypeptide or polynucleotide. More preferably, a test compound decreases or increases enzymatic activity by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% relative to the absence of the test compound.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 36 -

Test Compounds

5 Test compounds can be pharmacologic agents already known in the art or can be
compounds previously unknown to have any pharmacological activity. The
compounds can be naturally occurring or designed in the laboratory. They can be
isolated from microorganisms, animals, or plants, and can be produced re-
combinantly, or synthesized by chemical methods known in the art. If desired, test
10 compounds can be obtained using any of the numerous combinatorial library methods
known in the art, including but not limited to, biological libraries, spatially
addressable parallel solid phase or solution phase libraries, synthetic library methods
requiring deconvolution, the "one-bead one-compound" library method, and
synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological
15 library approach is limited to polypeptide libraries, while the other four approaches
are applicable to polypeptide, non-peptide oligomer, or small molecule libraries of
compounds. See Lam, *Anticancer Drug Des.* 12, 145, 1997.

Methods for the synthesis of molecular libraries are well known in the art (see, for
example, DeWitt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb *et al.* *Proc.*
20 *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 2678,
1994; Cho *et al.*, *Science* 261, 1303, 1993; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*
33, 2059, 1994; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop *et al.*, *J.*
Med. Chem. 37, 1233, 1994). Libraries of compounds can be presented in solution
(see, e.g., Houghten, *BioTechniques* 13, 412-421, 1992), or on beads (Lam, *Nature*
25 354, 82-84, 1991), chips (Fodor, *Nature* 364, 555-556, 1993), bacteria or spores
(Ladner, U.S. Patent 5,223,409), plasmids (Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
89, 1865-1869, 1992), or phage (Scott & Smith, *Science* 249, 386-390, 1990; Devlin,
Science 249, 404-406, 1990); Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6378-6382,
1990; Felici, *J. Mol. Biol.* 222, 301-310, 1991; and Ladner, U.S. Patent 5,223,409).

30

High Throughput Screening

5 Test compounds can be screened for the ability to bind to aminopeptidase N polypeptides or polynucleotides or to affect aminopeptidase N activity or aminopeptidase N gene expression using high throughput screening. Using high throughput screening, many discrete compounds can be tested in parallel so that large numbers of test compounds can be quickly screened. The most widely established techniques utilize 96-well microtiter plates. The wells of the microtiter plates typically require assay volumes that range from 50 to 500 μ l. In addition to the
10 plates, many instruments, materials, pipettors, robotics, plate washers, and plate readers are commercially available to fit the 96-well format.

Alternatively, "free format assays," or assays that have no physical barrier between samples, can be used. For example, an assay using pigment cells (melanocytes) in a
15 simple homogeneous assay for combinatorial peptide libraries is described by Jayawickreme *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 19, 1614-18 (1994). The cells are placed under agarose in petri dishes, then beads that carry combinatorial compounds are placed on the surface of the agarose. The combinatorial compounds are partially released the compounds from the beads. Active compounds can be visualized as
20 dark pigment areas because, as the compounds diffuse locally into the gel matrix, the active compounds cause the cells to change colors.

Another example of a free format assay is described by Chelsky, "Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches," reported at
25 the First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening in Philadelphia, Pa. (Nov. 7-10, 1995). Chelsky placed a simple homogenous enzyme assay for carbonic anhydrase inside an agarose gel such that the enzyme in the gel would cause a color change throughout the gel. Thereafter, beads carrying combinatorial compounds via a photolinker were placed inside the gel and the compounds were partially released by UV-light. Compounds that inhibited the enzyme
30 were observed as local zones of inhibition having less color change.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 38 -

Yet another example is described by Salmon *et al.*, *Molecular Diversity* 2, 57-63 (1996). In this example, combinatorial libraries were screened for compounds that had cytotoxic effects on cancer cells growing in agar.

5

Another high throughput screening method is described in Beutel *et al.*, U.S. Patent 5,976,813. In this method, test samples are placed in a porous matrix. One or more assay components are then placed within, on top of, or at the bottom of a matrix such as a gel, a plastic sheet, a filter, or other form of easily manipulated solid support.

10

When samples are introduced to the porous matrix they diffuse sufficiently slowly, such that the assays can be performed without the test samples running together.

Binding Assays

15

For binding assays, the test compound is preferably a small molecule that binds to and occupies, for example, the active site of the aminopeptidase N polypeptide, such that normal biological activity is prevented. Examples of such small molecules include, but are not limited to, small peptides or peptide-like molecules.

20

In binding assays, either the test compound or the aminopeptidase N polypeptide can comprise a detectable label, such as a fluorescent, radioisotopic, chemiluminescent, or enzymatic label, such as horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase. Detection of a test compound that is bound to the aminopeptidase N polypeptide can then be accomplished, for example, by direct counting of radioemission, by scintillation counting, or by determining conversion of an appropriate substrate to a detectable product.

25

Alternatively, binding of a test compound to an aminopeptidase N polypeptide can be determined without labeling either of the interactants. For example, a microphysiometer can be used to detect binding of a test compound with an aminopeptidase N polypeptide. A microphysiometer (*e.g.*, Cytosensor™) is an analytical

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 39 -

instrument that measures the rate at which a cell acidifies its environment using a light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Changes in this acidification rate can be used as an indicator of the interaction between a test compound and an aminopeptidase N polypeptide (McConnell *et al.*, *Science* 257, 1906-1912, 1992).

5

Determining the ability of a test compound to bind to an aminopeptidase N polypeptide also can be accomplished using a technology such as real-time Bimolecular Interaction Analysis (BIA) (Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63, 2338-2345, 1991, and Szabo *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 699-705, 1995). BIA is a technology for studying biospecific interactions in real time, without labeling any of the interactants (*e.g.*, BIAcore™). Changes in the optical phenomenon surface plasmon resonance (SPR) can be used as an indication of real-time reactions between biological molecules.

10

15

In yet another aspect of the invention, an aminopeptidase N polypeptide can be used as a "bait protein" in a two-hybrid assay or three-hybrid assay (see, *e.g.*, U.S. Patent 5,283,317; Zervos *et al.*, *Cell* 72, 223-232, 1993; Madura *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268, 12046-12054, 1993; Bartel *et al.*, *BioTechniques* 14, 920-924, 1993; Iwabuchi *et al.*, *Oncogene* 8, 1693-1696, 1993; and Brent W094/10300), to identify other proteins

20

which bind to or interact with the aminopeptidase N polypeptide and modulate its activity.

The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the assay utilizes two different DNA constructs. For example, in one construct, polynucleotide encoding an aminopeptidase N polypeptide can be fused to a polynucleotide encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (*e.g.*, GAL-4). In the other construct a DNA sequence that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") can be fused to a polynucleotide that codes for the activation domain of the known transcription factor. If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact *in vivo* to form an protein-dependent complex, the DNA-binding and

25

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 40 -

activation domains of the transcription factor are brought into close proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene (*e.g.*, LacZ), which is operably linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be detected, and cell colonies containing the functional transcription factor can be isolated and used to obtain the DNA sequence encoding the protein that interacts with the aminopeptidase N polypeptide.

It may be desirable to immobilize either the aminopeptidase N polypeptide (or polynucleotide) or the test compound to facilitate separation of bound from unbound forms of one or both of the interactants, as well as to accommodate automation of the assay. Thus, either the aminopeptidase N polypeptide (or polynucleotide) or the test compound can be bound to a solid support. Suitable solid supports include, but are not limited to, glass or plastic slides, tissue culture plates, microtiter wells, tubes, silicon chips, or particles such as beads (including, but not limited to, latex, polystyrene, or glass beads). Any method known in the art can be used to attach the enzyme polypeptide (or polynucleotide) or test compound to a solid support, including use of covalent and non-covalent linkages, passive absorption, or pairs of binding moieties attached respectively to the polypeptide (or polynucleotide) or test compound and the solid support. Test compounds are preferably bound to the solid support in an array, so that the location of individual test compounds can be tracked. Binding of a test compound to an aminopeptidase N polypeptide (or polynucleotide) can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples of such vessels include microtiter plates, test tubes, and microcentrifuge tubes.

In one embodiment, the aminopeptidase N polypeptide is a fusion protein comprising a domain that allows the aminopeptidase N polypeptide to be bound to a solid support. For example, glutathione-S-transferase fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) or glutathione derivatized microtiter plates, which are then combined with the test compound or the test compound and the non-adsorbed aminopeptidase N polypeptide; the mixture is then incubated under conditions conducive to complex formation (*e.g.*, at

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 41 -

physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtiter plate wells are washed to remove any unbound components. Binding of the interactants can be determined either directly or indirectly, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the solid support before binding is determined.

Other techniques for immobilizing proteins or polynucleotides on a solid support also can be used in the screening assays of the invention. For example, either an aminopeptidase N polypeptide (or polynucleotide) or a test compound can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated aminopeptidase N polypeptides (or polynucleotides) or test compounds can be prepared from biotin-NHS(N-hydroxysuccinimide) using techniques well known in the art (e.g., biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies which specifically bind to an aminopeptidase N polypeptide, polynucleotide, or a test compound, but which do not interfere with a desired binding site, such as the active site of the aminopeptidase N polypeptide, can be derivatized to the wells of the plate. Unbound target or protein can be trapped in the wells by antibody conjugation.

Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies which specifically bind to the aminopeptidase N polypeptide or test compound, enzyme-linked assays which rely on detecting an activity of the aminopeptidase N polypeptide, and SDS gel electrophoresis under non-reducing conditions.

Screening for test compounds which bind to an aminopeptidase N polypeptide or polynucleotide also can be carried out in an intact cell. Any cell which comprises an aminopeptidase N polypeptide or polynucleotide can be used in a cell-based assay system. An aminopeptidase N polynucleotide can be naturally occurring in the cell or can be introduced using techniques such as those described above. Binding of the

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 42 -

test compound to an aminopeptidase N polypeptide or polynucleotide is determined as described above.

Enzyme Assays

5

Test compounds can be tested for the ability to increase or decrease the enzymatic activity of a human aminopeptidase N polypeptide. Enzymatic activity can be measured, for example, as described in Ishii et al. (Int. J. Cancer 92(1):49-54, 2001).

10

Enzyme assays can be carried out after contacting either a purified aminopeptidase N polypeptide, a cell membrane preparation, or an intact cell with a test compound. A test compound that decreases enzymatic activity of an aminopeptidase N polypeptide by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% is identified as a potential therapeutic agent for decreasing aminopeptidase N activity.

15

A test compound which increases enzymatic activity of a human aminopeptidase N polypeptide by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% is identified as a potential therapeutic agent for increasing human aminopeptidase N activity.

20

Gene Expression

In another embodiment, test compounds that increase or decrease aminopeptidase N gene expression are identified. An aminopeptidase N polynucleotide is contacted with a test compound, and the expression of an RNA or polypeptide product of the aminopeptidase N polynucleotide is determined. The level of expression of appropriate mRNA or polypeptide in the presence of the test compound is compared to the level of expression of mRNA or polypeptide in the absence of the test compound. The test compound can then be identified as a modulator of expression based on this comparison. For example, when expression of mRNA or polypeptide is greater in the presence of the test compound than in its absence, the test compound is identified as a stimulator or enhancer of the mRNA or polypeptide expression.

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 43 -

Alternatively, when expression of the mRNA or polypeptide is less in the presence of the test compound than in its absence, the test compound is identified as an inhibitor of the mRNA or polypeptide expression.

5 The level of aminopeptidase N mRNA or polypeptide expression in the cells can be determined by methods well known in the art for detecting mRNA or polypeptide. Either qualitative or quantitative methods can be used. The presence of polypeptide products of an aminopeptidase N polynucleotide can be determined, for example, using a variety of techniques known in the art, including immunochemical methods
10 such as radioimmunoassay, Western blotting, and immunohistochemistry. Alternatively, polypeptide synthesis can be determined *in vivo*, in a cell culture, or in an *in vitro* translation system by detecting incorporation of labeled amino acids into an aminopeptidase N polypeptide.

15 Such screening can be carried out either in a cell-free assay system or in an intact cell. Any cell that expresses an aminopeptidase N polynucleotide can be used in a cell-based assay system. The aminopeptidase N polynucleotide can be naturally occurring in the cell or can be introduced using techniques such as those described above. Either a primary culture or an established cell line, such as CHO or human
20 embryonic kidney 293 cells, can be used.

Pharmaceutical Compositions

The invention also provides pharmaceutical compositions that can be administered to
25 a patient to achieve a therapeutic effect. Pharmaceutical compositions of the invention can comprise, for example, an aminopeptidase N polypeptide, aminopeptidase N polynucleotide, ribozymes or antisense oligonucleotides, antibodies which specifically bind to an aminopeptidase N polypeptide, or mimetics, activators, or inhibitors of an aminopeptidase N polypeptide activity. The compositions can be
30 administered alone or in combination with at least one other agent, such as stabilizing compound, which can be administered in any sterile, biocompatible pharmaceutical

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 44 -

carrier, including, but not limited to, saline, buffered saline, dextrose, and water. The compositions can be administered to a patient alone, or in combination with other agents, drugs or hormones.

5 In addition to the active ingredients, these pharmaceutical compositions can contain suitable pharmaceutically-acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries that facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. Pharmaceutical compositions of the invention can be administered by any number of routes including, but not limited to, oral, intravenous, 10 intramuscular, intra-arterial, intramedullary, intrathecal, intraventricular, transdermal, subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, parenteral, topical, sublingual, or rectal means. Pharmaceutical compositions for oral administration can be formulated using pharmaceutically acceptable carriers well known in the art in dosages suitable for oral administration. Such carriers enable the pharmaceutical compositions to be 15 formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions, and the like, for ingestion by the patient.

Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained through combination of active compounds with solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and 20 processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients are carbohydrate or protein fillers, such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; starch from corn, wheat, rice, potato, or other plants; cellulose, such as methyl cellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, or sodium carboxymethylcellulose; gums including 25 arabic and tragacanth; and proteins such as gelatin and collagen. If desired, disintegrating or solubilizing agents can be added, such as the cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, alginic acid, or a salt thereof, such as sodium alginate.

Dragee cores can be used in conjunction with suitable coatings, such as concentrated 30 sugar solutions, which also can contain gum arabic, talc, polyvinylpyrrolidone, carbopol gel, polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 45 -

suitable organic solvents or solvent mixtures. Dyestuffs or pigments can be added to the tablets or dragee coatings for product identification or to characterize the quantity of active compound, *i.e.*, dosage.

5 Pharmaceutical preparations that can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a coating, such as glycerol or sorbitol. Push-fit capsules can contain active ingredients mixed with a filler or binders, such as lactose or starches, lubricants, such as talc or magnesium stearate, and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds can be
10 dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid, or liquid polyethylene glycol with or without stabilizers.

Pharmaceutical formulations suitable for parenteral administration can be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks' solution, Ringer's solution, or physiologically buffered saline. Aqueous injection
15 suspensions can contain substances that increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Additionally, suspensions of the active compounds can be prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or
20 synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Non-lipid polycationic amino polymers also can be used for delivery. Optionally, the suspension also can contain suitable stabilizers or agents that increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions. For topical or nasal administration, penetrants appropriate to the particular barrier to be
25 permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.

The pharmaceutical compositions of the present invention can be manufactured in a manner that is known in the art, *e.g.*, by means of conventional mixing, dissolving,
30 granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping, or lyophilizing processes. The pharmaceutical composition can be provided as a salt

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 46 -

and can be formed with many acids, including but not limited to, hydrochloric, sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic, succinic, etc. Salts tend to be more soluble in aqueous or other protonic solvents than are the corresponding free base forms. In other cases, the preferred preparation can be a lyophilized powder which can contain any or all of the following: 1-50 mM histidine, 0.1%-2% sucrose, and 2-7% mannitol, at a pH range of 4.5 to 5.5, that is combined with buffer prior to use.

Further details on techniques for formulation and administration can be found in the latest edition of REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa.). After pharmaceutical compositions have been prepared, they can be placed in an appropriate container and labeled for treatment of an indicated condition. Such labeling would include amount, frequency, and method of administration.

Therapeutic Indications and Methods

Human aminopeptidase N can be regulated to treat cancer, CNS disorders, and COPD.

Cancer. Cancer is a disease fundamentally caused by oncogenic cellular transformation. There are several hallmarks of transformed cells that distinguish them from their normal counterparts and underlie the pathophysiology of cancer. These include uncontrolled cellular proliferation, unresponsiveness to normal death-inducing signals (immortalization), increased cellular motility and invasiveness, increased ability to recruit blood supply through induction of new blood vessel formation (angiogenesis), genetic instability, and dysregulated gene expression. Various combinations of these aberrant physiologies, along with the acquisition of drug-resistance frequently lead to an intractable disease state in which organ failure and patient death ultimately ensue.

Most standard cancer therapies target cellular proliferation and rely on the differential proliferative capacities between transformed and normal cells for their efficacy. This

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 47 -

approach is hindered by the facts that several important normal cell types are also highly proliferative and that cancer cells frequently become resistant to these agents. Thus, the therapeutic indices for traditional anti-cancer therapies rarely exceed 2.0.

5 The advent of genomics-driven molecular target identification has opened up the possibility of identifying new cancer-specific targets for therapeutic intervention that will provide safer, more effective treatments for cancer patients. Thus, newly discovered tumor-associated genes and their products can be tested for their role(s) in disease and used as tools to discover and develop innovative therapies. Genes
10 playing important roles in any of the physiological processes outlined above can be characterized as cancer targets.

Genes or gene fragments identified through genomics can readily be expressed in one or more heterologous expression systems to produce functional recombinant proteins.
15 These proteins are characterized *in vitro* for their biochemical properties and then used as tools in high-throughput molecular screening programs to identify chemical modulators of their biochemical activities. Activators and/or inhibitors of target protein activity can be identified in this manner and subsequently tested in cellular and *in vivo* disease models for anti-cancer activity. Optimization of lead compounds
20 with iterative testing in biological models and detailed pharmacokinetic and toxicological analyses form the basis for drug development and subsequent testing in humans.

CNS disorders. Central and peripheral nervous system disorders also can be treated,
25 such as primary and secondary disorders after brain injury, disorders of mood, anxiety disorders, disorders of thought and volition, disorders of sleep and wakefulness, diseases of the motor unit, such as neurogenic and myopathic disorders, neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease, and processes of peripheral and chronic pain.

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 48 -

Pain that is associated with CNS disorders also can be treated by regulating the activity of human aminopeptidase N. Pain which can be treated includes that associated with central nervous system disorders, such as multiple sclerosis, spinal cord injury, sciatica, failed back surgery syndrome, traumatic brain injury, epilepsy, Parkinson's disease, post-stroke, and vascular lesions in the brain and spinal cord (e.g., infarct, hemorrhage, vascular malformation). Non-central neuropathic pain includes that associated with post mastectomy pain, reflex sympathetic dystrophy (RSD), trigeminal neuralgia, post-surgical pain, HIV/AIDS related pain, cancer pain, metabolic neuropathies (e.g., diabetic neuropathy, vasculitic neuropathy secondary to connective tissue disease), paraneoplastic polyneuropathy associated, for example, with carcinoma of lung, or leukemia, or lymphoma, or carcinoma of prostate, colon or stomach, trigeminal neuralgia, cranial neuralgias, and post-herpetic neuralgia. Pain associated with cancer and cancer treatment also can be treated, as can headache pain (for example, migraine with aura, migraine without aura, and other migraine disorders), episodic and chronic tension-type headache, tension-type like headache, cluster headache, and chronic paroxysmal hemicrania.

COPD. Chronic obstructive pulmonary (or airways) disease (COPD) is a condition defined physiologically as airflow obstruction that generally results from a mixture of emphysema and peripheral airway obstruction due to chronic bronchitis (Senior & Shapiro, *Pulmonary Diseases and Disorders*, 3d ed., New York, McGraw-Hill, 1998, pp. 659-681, 1998; Barnes, *Chest* 117, 10S-14S, 2000). Emphysema is characterized by destruction of alveolar walls leading to abnormal enlargement of the air spaces of the lung. Chronic bronchitis is defined clinically as the presence of chronic productive cough for three months in each of two successive years. In COPD, airflow obstruction is usually progressive and is only partially reversible. By far the most important risk factor for development of COPD is cigarette smoking, although the disease does occur in non-smokers.

Chronic inflammation of the airways is a key pathological feature of COPD (Senior & Shapiro, 1998). The inflammatory cell population comprises increased numbers of

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 49 -

macrophages, neutrophils, and CD8⁺ lymphocytes. Inhaled irritants, such as cigarette smoke, activate macrophages which are resident in the respiratory tract, as well as epithelial cells leading to release of chemokines (*e.g.*, interleukin-8) and other chemotactic factors. These chemotactic factors act to increase the neutrophil/monocyte trafficking from the blood into the lung tissue and airways. Neutrophils and monocytes recruited into the airways can release a variety of potentially damaging mediators such as proteolytic enzymes and reactive oxygen species. Matrix degradation and emphysema, along with airway wall thickening, surfactant dysfunction, and mucus hypersecretion, all are potential sequelae of this inflammatory response that lead to impaired airflow and gas exchange.

This invention further pertains to the use of novel agents identified by the screening assays described above. Accordingly, it is within the scope of this invention to use a test compound identified as described herein in an appropriate animal model. For example, an agent identified as described herein (*e.g.*, a modulating agent, an antisense nucleic acid molecule, a specific antibody, ribozyme, or an aminopeptidase N polypeptide binding molecule) can be used in an animal model to determine the efficacy, toxicity, or side effects of treatment with such an agent. Alternatively, an agent identified as described herein can be used in an animal model to determine the mechanism of action of such an agent. Furthermore, this invention pertains to uses of novel agents identified by the above-described screening assays for treatments as described herein.

A reagent which affects aminopeptidase N activity can be administered to a human cell, either *in vitro* or *in vivo*, to reduce aminopeptidase N activity. The reagent preferably binds to an expression product of a human aminopeptidase N gene. If the expression product is a protein, the reagent is preferably an antibody. For treatment of human cells *ex vivo*, an antibody can be added to a preparation of stem cells that have been removed from the body. The cells can then be replaced in the same or another human body, with or without clonal propagation, as is known in the art.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 50 -

In one embodiment, the reagent is delivered using a liposome. Preferably, the liposome is stable in the animal into which it has been administered for at least about 30 minutes, more preferably for at least about 1 hour, and even more preferably for at least about 24 hours. A liposome comprises a lipid composition that is capable of targeting a reagent, particularly a polynucleotide, to a particular site in an animal, such as a human. Preferably, the lipid composition of the liposome is capable of targeting to a specific organ of an animal, such as the lung, liver, spleen, heart brain, lymph nodes, and skin.

10 A liposome useful in the present invention comprises a lipid composition that is capable of fusing with the plasma membrane of the targeted cell to deliver its contents to the cell. Preferably, the transfection efficiency of a liposome is about 0.5 μg of DNA per 16 nmole of liposome delivered to about 10^6 cells, more preferably about 1.0 μg of DNA per 16 nmole of liposome delivered to about 10^6 cells, and even more preferably about 2.0 μg of DNA per 16 nmol of liposome delivered to about 10^6 cells. Preferably, a liposome is between about 100 and 500 nm, more preferably between about 150 and 450 nm, and even more preferably between about 200 and 400 nm in diameter.

20 Suitable liposomes for use in the present invention include those liposomes standardly used in, for example, gene delivery methods known to those of skill in the art. More preferred liposomes include liposomes having a polycationic lipid composition and/or liposomes having a cholesterol backbone conjugated to polyethylene glycol. Optionally, a liposome comprises a compound capable of targeting the liposome to a particular cell type, such as a cell-specific ligand exposed on the outer surface of the liposome.

30 Complexing a liposome with a reagent such as an antisense oligonucleotide or ribozyme can be achieved using methods that are standard in the art (see, for example, U.S. Patent 5,705,151). Preferably, from about 0.1 μg to about 10 μg of polynucleotide is combined with about 8 nmol of liposomes, more preferably from

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 51 -

about 0.5 μg to about 5 μg of polynucleotides are combined with about 8 nmol liposomes, and even more preferably about 1.0 μg of polynucleotides is combined with about 8 nmol liposomes.

- 5 In another embodiment, antibodies can be delivered to specific tissues *in vivo* using receptor-mediated targeted delivery. Receptor-mediated DNA delivery techniques are taught in, for example, Findeis *et al.* *Trends in Biotechnol.* 11, 202-05 (1993); Chiou *et al.*, GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu & Wu, *J. Biol. Chem.* 263, 621-24 (1988);
10 Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269, 542-46 (1994); Zenke *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3655-59 (1990); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266, 338-42 (1991).

Determination of a Therapeutically Effective Dose

- 15 The determination of a therapeutically effective dose is well within the capability of those skilled in the art. A therapeutically effective dose refers to that amount of active ingredient which increases or decreases aminopeptidase N activity relative to the aminopeptidase N activity which occurs in the absence of the therapeutically effective dose.

- 20 For any compound, the therapeutically effective dose can be estimated initially either in cell culture assays or in animal models, usually mice, rabbits, dogs, or pigs. The animal model also can be used to determine the appropriate concentration range and route of administration. Such information can then be used to determine useful doses
25 and routes for administration in humans.

- Therapeutic efficacy and toxicity, *e.g.*, ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population) and LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population), can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental
30 animals. The dose ratio of toxic to therapeutic effects is the therapeutic index, and it can be expressed as the ratio, LD₅₀/ED₅₀.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 52 -

Pharmaceutical compositions that exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from cell culture assays and animal studies is used in formulating a range of dosage for human use. The dosage contained in such compositions is preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, sensitivity of the patient, and the route of administration.

The exact dosage will be determined by the practitioner, in light of factors related to the subject that requires treatment. Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active ingredient or to maintain the desired effect. Factors that can be taken into account include the severity of the disease state, general health of the subject, age, weight, and gender of the subject, diet, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and tolerance/response to therapy. Long-acting pharmaceutical compositions can be administered every 3 to 4 days, every week, or once every two weeks depending on the half-life and clearance rate of the particular formulation.

Normal dosage amounts can vary from 0.1 to 100,000 micrograms, up to a total dose of about 1 g, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature and generally available to practitioners in the art. Those skilled in the art will employ different formulations for nucleotides than for proteins or their inhibitors. Similarly, delivery of polynucleotides or polypeptides will be specific to particular cells, conditions, locations, etc.

If the reagent is a single-chain antibody, polynucleotides encoding the antibody can be constructed and introduced into a cell either *ex vivo* or *in vivo* using well-established techniques including, but not limited to, transferrin-polycation-mediated DNA transfer, transfection with naked or encapsulated nucleic acids, liposome-mediated cellular fusion, intracellular transportation of DNA-coated latex beads,

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 53 -

protoplast fusion, viral infection, electroporation, "gene gun," and DEAE- or calcium phosphate-mediated transfection.

5 Effective *in vivo* dosages of an antibody are in the range of about 5 µg to about 50 µg/kg, about 50 µg to about 5 mg/kg, about 100 µg to about 500 µg/kg of patient body weight, and about 200 to about 250 µg/kg of patient body weight. For administration of polynucleotides encoding single-chain antibodies, effective *in vivo* dosages are in the range of about 100 ng to about 200 ng, 500 ng to about 50 mg, about 1 µg to about 2 mg, about 5 µg to about 500 µg, and about 20 µg to about 100 µg of DNA.

15 If the expression product is mRNA, the reagent is preferably an antisense oligonucleotide or a ribozyme. Polynucleotides that express antisense oligonucleotides or ribozymes can be introduced into cells by a variety of methods, as described above.

20 Preferably, a reagent reduces expression of an aminopeptidase N gene or the activity of an aminopeptidase N polypeptide by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% relative to the absence of the reagent. The effectiveness of the mechanism chosen to decrease the level of expression of an aminopeptidase N gene or the activity of an aminopeptidase N polypeptide can be assessed using methods well known in the art, such as hybridization of nucleotide probes to aminopeptidase N-specific mRNA, quantitative RT-PCR, immunologic detection of an aminopeptidase N polypeptide, or measurement of aminopeptidase N activity.

25 In any of the embodiments described above, any of the pharmaceutical compositions of the invention can be administered in combination with other appropriate therapeutic agents. Selection of the appropriate agents for use in combination therapy can be made by one of ordinary skill in the art, according to conventional pharmaceutical principles. The combination of therapeutic agents can act

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 54 -

synergistically to effect the treatment or prevention of the various disorders described above. Using this approach, one may be able to achieve therapeutic efficacy with lower dosages of each agent, thus reducing the potential for adverse side effects.

- 5 Any of the therapeutic methods described above can be applied to any subject in need of such therapy, including, for example, mammals such as dogs, cats, cows, horses, rabbits, monkeys, and most preferably, humans.

Diagnostic Methods

10

Human aminopeptidase N also can be used in diagnostic assays for detecting diseases and abnormalities or susceptibility to diseases and abnormalities related to the presence of mutations in the nucleic acid sequences that encode the enzyme. For example, differences can be determined between the cDNA or genomic sequence
15 encoding aminopeptidase N in individuals afflicted with a disease and in normal individuals. If a mutation is observed in some or all of the afflicted individuals but not in normal individuals, then the mutation is likely to be the causative agent of the disease.

20

Sequence differences between a reference gene and a gene having mutations can be revealed by the direct DNA sequencing method. In addition, cloned DNA segments can be employed as probes to detect specific DNA segments. The sensitivity of this method is greatly enhanced when combined with PCR. For example, a sequencing primer can be used with a double-stranded PCR product or a single-stranded template
25 molecule generated by a modified PCR. The sequence determination is performed by conventional procedures using radiolabeled nucleotides or by automatic sequencing procedures using fluorescent tags.

30

Genetic testing based on DNA sequence differences can be carried out by detection of alteration in electrophoretic mobility of DNA fragments in gels with or without denaturing agents. Small sequence deletions and insertions can be visualized, for

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 55 -

example, by high resolution gel electrophoresis. DNA fragments of different sequences can be distinguished on denaturing formamide gradient gels in which the mobilities of different DNA fragments are retarded in the gel at different positions according to their specific melting or partial melting temperatures (*see, e.g., Myers et al., Science 230, 1242, 1985*). Sequence changes at specific locations can also be revealed by nuclease protection assays, such as RNase and S 1 protection or the chemical cleavage method (*e.g., Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4397-4401, 1985*). Thus, the detection of a specific DNA sequence can be performed by methods such as hybridization, RNase protection, chemical cleavage, direct DNA sequencing or the use of restriction enzymes and Southern blotting of genomic DNA. In addition to direct methods such as gel-electrophoresis and DNA sequencing, mutations can also be detected by *in situ* analysis.

Altered levels of aminopeptidase N also can be detected in various tissues. Assays used to detect levels of the receptor polypeptides in a body sample, such as blood or a tissue biopsy, derived from a host are well known to those of skill in the art and include radioimmunoassays, competitive binding assays, Western blot analysis, and ELISA assays.

All patents and patent applications cited in this disclosure are expressly incorporated herein by reference. The above disclosure generally describes the present invention. A more complete understanding can be obtained by reference to the following specific examples, which are provided for purposes of illustration only and are not intended to limit the scope of the invention.

25

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 56 -

EXAMPLE 1*Detection of aminopeptidase N activity*

5 The polynucleotide of SEQ ID NO: 1 is inserted into the expression vector pCEV4 and the expression vector pCEV4-aminopeptidase N polypeptide obtained is transfected into human embryonic kidney 293 cells. From these cells extracts are obtained and after incubation with 15 U of RNase A (EC 3.1.27.5; Sigma) per ml for 30 min at 37°C and 1.7 U of DNase I (EC 3.1.21.1; Sigma) per ml for 30min at 20°C, 10 the cell extract is collected by centrifugation at 20,000 x g for 20 min. Protein concentration is estimated according to the method of Bradford with bovine serum albumin as a standard. The standard enzyme assay for the determination of aminopeptidase N activity is performed in 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0) at 37°C on 118 μM Lys-7-amino-4-methylcoumarin (AMC) (Bachem) by a fluorimetric 15 method. The sample volume is 2 to 100 μl, and the activity is expressed in micro-moles of substrate hydrolyzed per minute per milligram of protein. It is shown that the polypeptide of SEQ ID NO: 2 has a aminopeptidase N activity.

EXAMPLE 2

20

Expression of recombinant human aminopeptidase N

The *Pichia pastoris* expression vector pPICZB (Invitrogen, San Diego, CA) is used to produce large quantities of recombinant human aminopeptidase N polypeptides in 25 yeast. The aminopeptidase N-encoding DNA sequence is derived from SEQ ID NO: 1. Before insertion into vector pPICZB, the DNA sequence is modified by well known methods in such a way that it contains at its 5'-end an initiation codon and at its 3'-end an enterokinase cleavage site, a His6 reporter tag and a termination codon. Moreover, at both termini recognition sequences for restriction endonucleases are 30 added and after digestion of the multiple cloning site of pPICZ B with the corresponding restriction enzymes the modified DNA sequence is ligated into

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 57 -

pPICZB. This expression vector is designed for inducible expression in *Pichia pastoris*, driven by a yeast promoter. The resulting pPICZ/md-His6 vector is used to transform the yeast.

5 The yeast is cultivated under usual conditions in 5 liter shake flasks and the recombinantly produced protein isolated from the culture by affinity chromatography (Ni-NTA-Resin) in the presence of 8 M urea. The bound polypeptide is eluted with buffer, pH 3.5, and neutralized. Separation of the polypeptide from the His6 reporter tag is accomplished by site-specific proteolysis using enterokinase (Invitrogen, San
10 Diego, CA) according to manufacturer's instructions. Purified human aminopeptidase N polypeptide is obtained.

EXAMPLE 3

15 *Identification of test compounds that bind to aminopeptidase N polypeptides*

Purified aminopeptidase N polypeptides comprising a glutathione-S-transferase protein and absorbed onto glutathione-derivatized wells of 96-well microtiter plates are contacted with test compounds from a small molecule library at pH 7.0 in a
20 physiological buffer solution. Human aminopeptidase N polypeptides comprise the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2. The test compounds comprise a fluorescent tag. The samples are incubated for 5 minutes to one hour. Control samples are incubated in the absence of a test compound.

25 The buffer solution containing the test compounds is washed from the wells. Binding of a test compound to an aminopeptidase N polypeptide is detected by fluorescence measurements of the contents of the wells. A test compound that increases the fluorescence in a well by at least 15% relative to fluorescence of a well in which a test compound is not incubated is identified as a compound which binds to
30 an aminopeptidase N polypeptide.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 58 -

EXAMPLE 4*Identification of a test compound which decreases aminopeptidase N gene expression*

5 A test compound is administered to a culture of human cells transfected with an aminopeptidase N expression construct and incubated at 37 °C for 10 to 45 minutes. A culture of the same type of cells that have not been transfected is incubated for the same time without the test compound to provide a negative control.

10 RNA is isolated from the two cultures as described in Chirgwin *et al.*, *Biochem. 18*, 5294-99, 1979). Northern blots are prepared using 20 to 30 µg total RNA and hybridized with a ³²P-labeled aminopeptidase N-specific probe at 65°C in Express-hyb (CLONTECH). The probe comprises at least 11 contiguous nucleotides selected from the complement of SEQ ID NO: 1. A test compound that decreases the
15 aminopeptidase N-specific signal relative to the signal obtained in the absence of the test compound is identified as an inhibitor of aminopeptidase N gene expression.

EXAMPLE 5*Identification of a test compound which decreases aminopeptidase N activity*

A test compound is administered to a culture of human cells transfected with an aminopeptidase N expression construct and incubated at 37 °C for 10 to 45 minutes. A culture of the same type of cells that have not been transfected is incubated for the
25 same time without the test compound to provide a negative control. Aminopeptidase N activity is measured using the method of Ishii *et al.* (*Int. J. Cancer* 92(1):49-54).

A test compound which decreases the aminopeptidase N activity of the aminopeptidase N relative to the aminopeptidase N activity in the absence of the test
30 compound is identified as an inhibitor of aminopeptidase N activity.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 59 -

EXAMPLE 6*Tissue-specific expression of aminopeptidase N*

5 The qualitative expression pattern of aminopeptidase N in various tissues is determined by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

To demonstrate that aminopeptidase N is involved in the disease process of COPD, the initial expression panel consists of RNA samples from respiratory tissues and
10 inflammatory cells relevant to COPD: lung (adult and fetal), trachea, freshly isolated alveolar type II cells, cultured human bronchial epithelial cells, cultured small airway epithelial cells, cultured bronchial smooth muscle cells, cultured H441 cells (Clara-like), freshly isolated neutrophils and monocytes, and cultured monocytes (macrophage-like). Body map profiling also is carried out, using total RNA panels
15 purchased from Clontech. The tissues are adrenal gland, bone marrow, brain, colon, heart, kidney, liver, lung, mammary gland, pancreas, prostate, salivary gland, skeletal muscle, small intestine, spleen, stomach, testis, thymus, trachea, thyroid, and uterus.

To demonstrate that aminopeptidase N is involved in CNS disorders, the following
20 tissues are screened: fetal and adult brain, muscle, heart, lung, kidney, liver, thymus, testis, colon, placenta, trachea, pancreas, kidney, gastric mucosa, colon, liver, cerebellum, skin, cortex (Alzheimer's and normal), hypothalamus, cortex, amygdala, cerebellum, hippocampus, choroid, plexus, thalamus, and spinal cord.

To demonstrate that aminopeptidase N is involved in cancer, expression is
25 determined in the following tissues: adrenal gland, bone marrow, brain, cerebellum, colon, fetal brain, fetal liver, heart, kidney, liver, lung, mammary gland, pancreas, placenta, prostate, salivary gland, skeletal muscle, small intestine, spinal cord, spleen, stomach, testis, thymus, thyroid, trachea, uterus, and peripheral blood lymphocytes.
30 Expression in the following cancer cell lines also is determined: DU-145 (prostate), NCI-H125 (lung), H1T-29 (colon), COLO-205 (colon), A-549 (lung), NCI-H460

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 60 -

(lung), HT-116 (colon), DLD-1 (colon), MDA-MD-231 (breast), LS174T (colon), ZF-75 (breast), MDA-MN-435 (breast), HT-1080, MCF-7 (breast), and U87. Matched pairs of malignant and normal tissue from the same patient also are tested.

5 *Quantitative expression profiling.* Quantitative expression profiling is performed by the form of quantitative PCR analysis called "kinetic analysis" firstly described in Higuchi *et al.*, *BioTechnology* 10, 413-17, 1992, and Higuchi *et al.*, *BioTechnology* 11, 1026-30, 1993. The principle is that at any given cycle within the exponential phase of PCR, the amount of product is proportional to the initial number of template
10 copies.

If the amplification is performed in the presence of an internally quenched fluorescent oligonucleotide (TaqMan probe) complementary to the target sequence, the probe is cleaved by the 5'-3' endonuclease activity of Taq DNA polymerase and a
15 fluorescent dye released in the medium (Holland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7276-80, 1991). Because the fluorescence emission will increase in direct proportion to the amount of the specific amplified product, the exponential growth phase of PCR product can be detected and used to determine the initial template concentration (Heid *et al.*, *Genome Res.* 6, 986-94, 1996, and Gibson *et al.*, *Genome*
20 *Res.* 6, 995-1001, 1996).

The amplification of an endogenous control can be performed to standardize the amount of sample RNA added to a reaction. In this kind of experiment, the control of choice is the 18S ribosomal RNA. Because reporter dyes with differing emission
25 spectra are available, the target and the endogenous control can be independently quantified in the same tube if probes labeled with different dyes are used.

All "real time PCR" measurements of fluorescence are made in the ABI Prism 7700.

30 *RNA extraction and cDNA preparation.* Total RNA from the tissues listed above are used for expression quantification. RNAs labeled "from autopsy" were extracted

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 61 -

from autaptic tissues with the TRIzol reagent (Life Technologies, MD) according to the manufacturer's protocol.

5 Fifty μg of each RNA were treated with DNase I for 1 hour at 37°C in the following reaction mix: 0.2 U/ μl RNase-free DNase I (Roche Diagnostics, Germany); 0.4 U/ μl RNase inhibitor (PE Applied Biosystems, CA); 10 mM Tris-HCl pH 7.9; 10 mM MgCl_2 ; 50 mM NaCl; and 1 mM DTT.

10 After incubation, RNA is extracted once with 1 volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (24:24:1) and once with chloroform, and precipitated with 1/10 volume of 3 M NaAcetate, pH5.2, and 2 volumes of ethanol.

15 Fifty μg of each RNA from the autaptic tissues are DNase treated with the DNA-free kit purchased from Ambion (Ambion, TX). After resuspension and spectrophotometric quantification, each sample is reverse transcribed with the TaqMan Reverse Transcription Reagents (PE Applied Biosystems, CA) according to the manufacturer's protocol. The final concentration of RNA in the reaction mix is 200 ng/ μL . Reverse transcription is carried out with 2.5 μM of random hexamer primers.

20 *TaqMan quantitative analysis.* Specific primers and probe are designed according to the recommendations of PE Applied Biosystems; the probe can be labeled at the 5' end FAM (6-carboxy-fluorescein) and at the 3' end with TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). Quantification experiments are performed on 10 ng of reverse transcribed RNA from each sample. Each determination is done in triplicate.

25 Total cDNA content is normalized with the simultaneous quantification (multiplex PCR) of the 18S ribosomal RNA using the Pre-Developed TaqMan Assay Reagents (PDAR) Control Kit (PE Applied Biosystems, CA).

30 The assay reaction mix is as follows: 1X final TaqMan Universal PCR Master Mix

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 62 -

(from 2X stock) (PE Applied Biosystems, CA); 1X PDAR control – 18S RNA (from 20X stock); 300 nM forward primer; 900 nM reverse primer; 200 nM probe; 10 ng cDNA; and water to 25 µl.

- 5 Each of the following steps are carried out once: pre PCR, 2 minutes at 50°C, and 10 minutes at 95°C. The following steps are carried out 40 times: denaturation, 15 seconds at 95°C, annealing/extension, 1 minute at 60°C.

- 10 The experiment is performed on an ABI Prism 7700 Sequence Detector (PE Applied Biosystems, CA). At the end of the run, fluorescence data acquired during PCR are processed as described in the ABI Prism 7700 user's manual in order to achieve better background subtraction as well as signal linearity with the starting target quantity.

15 **EXAMPLE 7**

Proliferation inhibition assay: Antisense oligonucleotides suppress the growth of cancer cell lines

- 20 The cell line used for testing is the human colon cancer cell line HCT116. Cells are cultured in RPMI-1640 with 10-15% fetal calf serum at a concentration of 10,000 cells per milliliter in a volume of 0.5 ml and kept at 37°C in a 95% air/5%CO₂ atmosphere.

- 25 Phosphorothioate oligoribonucleotides are synthesized on an Applied Biosystems Model 380B DNA synthesizer using phosphoramidite chemistry. A sequence of 24 bases complementary to the nucleotides at position 1 to 24 of SEQ ID NO: 1 is used as the test oligonucleotide. As a control, another (random) sequence is used: 5'-TCA ACT GAC TAG ATG TAC ATG GAC-3'. Following assembly and deprotection,
30 oligonucleotides are ethanol-precipitated twice, dried, and suspended in phosphate buffered saline at the desired concentration. Purity of the oligonucleotides is tested

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 63 -

by capillary gel electrophoresis and ion exchange HPLC. The purified oligonucleotides are added to the culture medium at a concentration of 10 μ M once per day for seven days.

5 The addition of the test oligonucleotide for seven days results in significantly reduced expression of human aminopeptidase N as determined by Western blotting. This effect is not observed with the control oligonucleotide. After 3 to 7 days, the number of cells in the cultures is counted using an automatic cell counter. The number of cells in cultures treated with the test oligonucleotide (expressed as 100%) is compared with the number of cells in cultures treated with the control oligonucleotide. The number of cells in cultures treated with the test oligonucleotide is not more than 30% of control, indicating that the inhibition of human aminopeptidase N has an anti-proliferative effect on cancer cells.

15 **EXAMPLE 8**

In vivo testing of compounds/target validation

1. **Acute Mechanistic Assays**

20

1.1. Reduction in Mitogenic Plasma Hormone Levels

This non-tumor assay measures the ability of a compound to reduce either the endogenous level of a circulating hormone or the level of hormone produced in response to a biologic stimulus. Rodents are administered test compound (p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c.). At a predetermined time after administration of test compound, blood plasma is collected. Plasma is assayed for levels of the hormone of interest. If the normal circulating levels of the hormone are too low and/or variable to provide consistent results, the level of the hormone may be elevated by a pre-treatment with a biologic stimulus (i.e., LHRH may be injected i.m. into mice at a dosage of 30 ng/mouse to induce a burst of testosterone synthesis). The timing of plasma

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 64 -

collection would be adjusted to coincide with the peak of the induced hormone response. Compound effects are compared to a vehicle-treated control group. An F-test is performed to determine if the variance is equal or unequal followed by a Student's t-test. Significance is p value ≤ 0.05 compared to the vehicle control group.

1.2. *Hollow Fiber Mechanism of Action Assay*

Hollow fibers are prepared with desired cell line(s) and implanted intraperitoneally and/or subcutaneously in rodents. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. Fibers are harvested in accordance with specific readout assay protocol, these may include assays for gene expression (bDNA, PCR, or Taqman), or a specific biochemical activity (i.e., cAMP levels). Results are analyzed by Student's t-test or Rank Sum test after the variance between groups is compared by an F-test, with significance at $p \leq 0.05$ as compared to the vehicle control group.

2. *Subacute Functional In Vivo Assays*

2.1. *Reduction in Mass of Hormone Dependent Tissues*

This is another non-tumor assay that measures the ability of a compound to reduce the mass of a hormone dependent tissue (i.e., seminal vesicles in males and uteri in females). Rodents are administered test compound (p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c.) according to a predetermined schedule and for a predetermined duration (i.e., 1 week). At termination of the study, animals are weighed, the target organ is excised, any fluid is expressed, and the weight of the organ is recorded. Blood plasma may also be collected. Plasma may be assayed for levels of a hormone of interest or for levels of test agent. Organ weights may be directly compared or they may be normalized for the body weight of the animal. Compound effects are compared to a vehicle-treated control group. An F-test is performed to determine if the variance is equal or unequal followed by a Student's t-test. Significance is p value ≤ 0.05

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 65 -

compared to the vehicle control group.

2.2. *Hollow Fiber Proliferation Assay*

5 Hollow fibers are prepared with desired cell line(s) and implanted intraperitoneally
and/or subcutaneously in rodents. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or
s.c. Fibers are harvested in accordance with specific readout assay protocol. Cell
proliferation is determined by measuring a marker of cell number (i.e., MTT or
10 LDH). The cell number and change in cell number from the starting inoculum are
analyzed by Student's t-test or Rank Sum test after the variance between groups is
compared by an F-test, with significance at $p \leq 0.05$ as compared to the vehicle
control group.

2.3. *Anti-angiogenesis Models*

15

2.3.1. *Corneal Angiogenesis*

Hydron pellets with or without growth factors or cells are implanted into a
micropocket surgically created in the rodent cornea. Compound administration may
20 be systemic or local (compound mixed with growth factors in the hydron pellet).
Corneas are harvested at 7 days post implantation immediately following intracardiac
infusion of colloidal carbon and are fixed in 10% formalin. Readout is qualitative
scoring and/or image analysis. Qualitative scores are compared by Rank Sum test.
Image analysis data is evaluated by measuring the area of neovascularization (in
25 pixels) and group averages are compared by Student's t-test (2 tail). Significance is p
 ≤ 0.05 as compared to the growth factor or cells only group.

2.3.2. *Matrigel Angiogenesis*

30 Matrigel, containing cells or growth factors, is injected subcutaneously. Compounds
are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. Matrigel plugs are harvested at

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 66 -

predetermined time point(s) and prepared for readout. Readout is an ELISA-based assay for hemoglobin concentration and/or histological examination (i.e. vessel count, special staining for endothelial surface markers: CD31, factor-8). Readouts are analyzed by Student's t-test, after the variance between groups is compared by an F-test, with significance determined at $p \leq 0.05$ as compared to the vehicle control group.

3. Primary Antitumor Efficacy

3.1. Early Therapy Models

3.1.1. Subcutaneous Tumor

Tumor cells or fragments are implanted subcutaneously on Day 0. Vehicle and/or compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule starting at a time, usually on Day 1, prior to the ability to measure the tumor burden. Body weights and tumor measurements are recorded 2-3 times weekly. Mean net body and tumor weights are calculated for each data collection day. Antitumor efficacy may be initially determined by comparing the size of treated (T) and control (C) tumors on a given day by a Student's t-test, after the variance between groups is compared by an F-test, with significance determined at $p \leq 0.05$. The experiment may also be continued past the end of dosing in which case tumor measurements would continue to be recorded to monitor tumor growth delay. Tumor growth delays are expressed as the difference in the median time for the treated and control groups to attain a predetermined size divided by the median time for the control group to attain that size. Growth delays are compared by generating Kaplan-Meier curves from the times for individual tumors to attain the evaluation size. Significance is $p \leq 0.05$.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 67 -

3.1.2. Intraperitoneal/Intracranial Tumor Models

Tumor cells are injected intraperitoneally or intracranially on Day 0. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule starting on Day 1. Observations of morbidity and/or mortality are recorded twice daily. Body weights are measured and recorded twice weekly. Morbidity/mortality data is expressed in terms of the median time of survival and the number of long-term survivors is indicated separately. Survival times are used to generate Kaplan-Meier curves. Significance is $p \leq 0.05$ by a log-rank test compared to the control group in the experiment.

3.2. Established Disease Model

Tumor cells or fragments are implanted subcutaneously and grown to the desired size for treatment to begin. Once at the predetermined size range, mice are randomized into treatment groups. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule. Tumor and body weights are measured and recorded 2-3 times weekly. Mean tumor weights of all groups over days post inoculation are graphed for comparison. An F-test is performed to determine if the variance is equal or unequal followed by a Student's t-test to compare tumor sizes in the treated and control groups at the end of treatment. Significance is $p \leq 0.05$ as compared to the control group. Tumor measurements may be recorded after dosing has stopped to monitor tumor growth delay. Tumor growth delays are expressed as the difference in the median time for the treated and control groups to attain a predetermined size divided by the median time for the control group to attain that size. Growth delays are compared by generating Kaplan-Meier curves from the times for individual tumors to attain the evaluation size. Significance is $p \text{ value} \leq 0.05$ compared to the vehicle control group.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 68 -

3.3. *Orthotopic Disease Models*

3.3.1. *Mammary Fat Pad Assay*

5 Tumor cells or fragments, of mammary adenocarcinoma origin, are implanted directly into a surgically exposed and reflected mammary fat pad in rodents. The fat pad is placed back in its original position and the surgical site is closed. Hormones may also be administered to the rodents to support the growth of the tumors. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule. Tumor and body weights are measured and recorded 2-3 times weekly. Mean tumor weights of all groups over days post inoculation are graphed for comparison. An F-test is performed to determine if the variance is equal or unequal followed by a Student's t-test to compare tumor sizes in the treated and control groups at the end of treatment. Significance is $p \leq 0.05$ as compared to the control group.

15 Tumor measurements may be recorded after dosing has stopped to monitor tumor growth delay. Tumor growth delays are expressed as the difference in the median time for the treated and control groups to attain a predetermined size divided by the median time for the control group to attain that size. Growth delays are compared by generating Kaplan-Meier curves from the times for individual tumors to attain the evaluation size. Significance is $p \text{ value} \leq 0.05$ compared to the vehicle control group. In addition, this model provides an opportunity to increase the rate of spontaneous metastasis of this type of tumor. Metastasis can be assessed at termination of the study by counting the number of visible foci per target organ, or measuring the target organ weight. The means of these endpoints are compared by Student's t-test after conducting an F-test, with significance determined at $p \leq 0.05$ compared to the control group in the experiment.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 69 -

3.3.2. *Intraprostatic Assay*

Tumor cells or fragments, of prostatic adenocarcinoma origin, are implanted directly into a surgically exposed dorsal lobe of the prostate in rodents. The prostate is externalized through an abdominal incision so that the tumor can be implanted specifically in the dorsal lobe while verifying that the implant does not enter the seminal vesicles. The successfully inoculated prostate is replaced in the abdomen and the incisions through the abdomen and skin are closed. Hormones may also be administered to the rodents to support the growth of the tumors. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule. Body weights are measured and recorded 2-3 times weekly. At a predetermined time, the experiment is terminated and the animal is dissected. The size of the primary tumor is measured in three dimensions using either a caliper or an ocular micrometer attached to a dissecting scope. An F-test is performed to determine if the variance is equal or unequal followed by a Student's t-test to compare tumor sizes in the treated and control groups at the end of treatment. Significance is $p \leq 0.05$ as compared to the control group. This model provides an opportunity to increase the rate of spontaneous metastasis of this type of tumor. Metastasis can be assessed at termination of the study by counting the number of visible foci per target organ (i.e., the lungs), or measuring the target organ weight (i.e., the regional lymph nodes). The means of these endpoints are compared by Student's t-test after conducting an F-test, with significance determined at $p \leq 0.05$ compared to the control group in the experiment.

3.3.3. *Intrabronchial Assay*

Tumor cells of pulmonary origin may be implanted intrabronchially by making an incision through the skin and exposing the trachea. The trachea is pierced with the beveled end of a 25 gauge needle and the tumor cells are inoculated into the main bronchus using a flat-ended 27 gauge needle with a 90° bend. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule. Body

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 70 -

weights are measured and recorded 2-3 times weekly. At a predetermined time, the experiment is terminated and the animal is dissected. The size of the primary tumor is measured in three dimensions using either a caliper or an ocular micrometer attached to a dissecting scope. An F-test is performed to determine if the variance is equal or unequal followed by a Student's t-test to compare tumor sizes in the treated and control groups at the end of treatment. Significance is $p \leq 0.05$ as compared to the control group. This model provides an opportunity to increase the rate of spontaneous metastasis of this type of tumor. Metastasis can be assessed at termination of the study by counting the number of visible foci per target organ (i.e., the contralateral lung), or measuring the target organ weight. The means of these endpoints are compared by Student's t-test after conducting an F-test, with significance determined at $p \leq 0.05$ compared to the control group in the experiment.

3.3.4. Intracecal Assay

Tumor cells of gastrointestinal origin may be implanted intracecally by making an abdominal incision through the skin and externalizing the intestine. Tumor cells are inoculated into the cecal wall without penetrating the lumen of the intestine using a 27 or 30 gauge needle. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule. Body weights are measured and recorded 2-3 times weekly. At a predetermined time, the experiment is terminated and the animal is dissected. The size of the primary tumor is measured in three dimensions using either a caliper or an ocular micrometer attached to a dissecting scope. An F-test is performed to determine if the variance is equal or unequal followed by a Student's t-test to compare tumor sizes in the treated and control groups at the end of treatment. Significance is $p \leq 0.05$ as compared to the control group. This model provides an opportunity to increase the rate of spontaneous metastasis of this type of tumor. Metastasis can be assessed at termination of the study by counting the number of visible foci per target organ (i.e., the liver), or measuring the target organ weight. The means of these endpoints are compared by Student's t-test after conducting an F-test, with significance determined at $p \leq 0.05$ compared to the control group in the

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 71 -

experiment.

4. Secondary (Metastatic) Antitumor Efficacy

5 4.1. Spontaneous Metastasis

Tumor cells are inoculated s.c. and the tumors allowed to grow to a predetermined range for spontaneous metastasis studies to the lung or liver. These primary tumors are then excised. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule which may include the period leading up to the excision of the primary tumor to evaluate therapies directed at inhibiting the early stages of tumor metastasis. Observations of morbidity and/or mortality are recorded daily. Body weights are measured and recorded twice weekly. Potential endpoints include survival time, numbers of visible foci per target organ, or target organ weight. When survival time is used as the endpoint the other values are not determined. Survival data is used to generate Kaplan-Meier curves. Significance is $p \leq 0.05$ by a log-rank test compared to the control group in the experiment. The mean number of visible tumor foci, as determined under a dissecting microscope, and the mean target organ weights are compared by Student's t-test after conducting an F-test, with significance determined at $p \leq 0.05$ compared to the control group in the experiment for both of these endpoints.

4.2. Forced Metastasis

25 Tumor cells are injected into the tail vein, portal vein, or the left ventricle of the heart in experimental (forced) lung, liver, and bone metastasis studies, respectively. Compounds are administered p.o., i.p., i.v., i.m., or s.c. according to a predetermined schedule. Observations of morbidity and/or mortality are recorded daily. Body weights are measured and recorded twice weekly. Potential endpoints include survival time, numbers of visible foci per target organ, or target organ weight. When survival time is used as the endpoint the other values are not determined. Survival

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 72 -

data is used to generate Kaplan-Meier curves. Significance is $p \leq 0.05$ by a log-rank test compared to the control group in the experiment. The mean number of visible tumor foci, as determined under a dissecting microscope, and the mean target organ weights are compared by Student's t-test after conducting an F-test, with significance at $p \leq 0.05$ compared to the vehicle control group in the experiment for both endpoints.

EXAMPLE 910 *In vivo testing of compounds/target validation*1. **Pain***Acute Pain*

15

Acute pain is measured on a hot plate mainly in rats. Two variants of hot plate testing are used: In the classical variant animals are put on a hot surface (52 to 56°C) and the latency time is measured until the animals show nocifensive behavior, such as stepping or foot licking. The other variant is an increasing temperature hot plate where the experimental animals are put on a surface of neutral temperature. Subsequently this surface is slowly but constantly heated until the animals begin to lick a hind paw. The temperature which is reached when hind paw licking begins is a measure for pain threshold.

20

25

Compounds are tested against a vehicle treated control group. Substance application is performed at different time points via different application routes (i.v., i.p., p.o., i.t., i.c.v., s.c., intradermal, transdermal) prior to pain testing.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 73 -

Persistent Pain

Persistent pain is measured with the formalin or capsaicin test, mainly in rats. A solution of 1 to 5% formalin or 10 to 100 µg capsaicin is injected into one hind paw of the experimental animal. After formalin or capsaicin application the animals show nocifensive reactions like flinching, licking and biting of the affected paw. The number of nocifensive reactions within a time frame of up to 90 minutes is a measure for intensity of pain.

Compounds are tested against a vehicle treated control group. Substance application is performed at different time points via different application routes (i.v., i.p., p.o., i.t., i.c.v., s.c., intradermal, transdermal) prior to formalin or capsaicin administration.

Neuropathic Pain

Neuropathic pain is induced by different variants of unilateral sciatic nerve injury mainly in rats. The operation is performed under anesthesia. The first variant of sciatic nerve injury is produced by placing loosely constrictive ligatures around the common sciatic nerve. The second variant is the tight ligation of about the half of the diameter of the common sciatic nerve. In the next variant, a group of models is used in which tight ligations or transections are made of either the L5 and L6 spinal nerves, or the L₅ spinal nerve only. The fourth variant involves an axotomy of two of the three terminal branches of the sciatic nerve (tibial and common peroneal nerves) leaving the remaining sural nerve intact whereas the last variant comprises the axotomy of only the tibial branch leaving the sural and common nerves uninjured. Control animals are treated with a sham operation.

Postoperatively, the nerve injured animals develop a chronic mechanical

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 74 -

allodynia, cold allodynia, as well as a thermal hyperalgesia. Mechanical allodynia is measured by means of a pressure transducer (electronic von Frey Anesthesiometer, IITC Inc.-Life Science Instruments, Woodland Hills, SA, USA; Electronic von Frey System, Somedic Sales AB, Hörby, Sweden).
5 Thermal hyperalgesia is measured by means of a radiant heat source (Plantar Test, Ugo Basile, Comerio, Italy), or by means of a cold plate of 5 to 10°C where the nocifensive reactions of the affected hind paw are counted as a measure of pain intensity. A further test for cold induced pain is the counting of nocifensive reactions, or duration of nocifensive responses after plantar
10 administration of acetone to the affected hind limb. Chronic pain in general is assessed by registering the circadian rhythms in activity (Surjo and Arndt, Universität zu Köln, Cologne, Germany), and by scoring differences in gait (foot print patterns; FOOTPRINTS program, Klapdor et al., 1997. A low cost method to analyze footprint patterns. J. Neurosci. Methods 75, 49-54).

15 Compounds are tested against sham operated and vehicle treated control groups. Substance application is performed at different time points via different application routes (i.v., i.p., p.o., i.t., i.c.v., s.c., intradermal, transdermal) prior to pain testing.

20

Inflammatory Pain

Inflammatory pain is induced mainly in rats by injection of 0.75 mg carrageenan or complete Freund's adjuvant into one hind paw. The animals
25 develop an edema with mechanical allodynia as well as thermal hyperalgesia. Mechanical allodynia is measured by means of a pressure transducer (electronic von Frey Anesthesiometer, IITC Inc.-Life Science Instruments, Woodland Hills, SA, USA). Thermal hyperalgesia is measured by means of a radiant heat source (Plantar Test, Ugo Basile, Comerio, Italy, Paw thermal stimulator, G. Ozaki, University of California, USA). For edema measurement
30 two methods are being used. In the first method, the animals are

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 75 -

sacrificed and the affected hindpaws sectioned and weighed. The second method comprises differences in paw volume by measuring water displacement in a plethysmometer (Ugo Basile, Comerio, Italy).

5 Compounds are tested against uninflamed as well as vehicle treated control groups. Substance application is performed at different time points via different application routes (i.v., i.p., p.o., i.t., i.c.v., s.c., intradermal, transdermal) prior to pain testing.

10 ***Diabetic Neuropathic Pain***

Rats treated with a single intraperitoneal injection of 50 to 80 mg/kg streptozotocin develop a profound hyperglycemia and mechanical allodynia within 1 to 3 weeks. Mechanical allodynia is measured by means of a pressure transducer (electronic von Frey Anesthesiometer, IITC Inc.-Life Science Instruments, Woodland Hills, SA, USA).

15 Compounds are tested against diabetic and non-diabetic vehicle treated control groups. Substance application is performed at different time points via different application routes (i.v., i.p., p.o., i.t., i.c.v., s.c., intradermal, transdermal) prior to pain testing.

2. **Parkinson's disease**

25 ***6-Hydroxydopamine (6-OH-DA) Lesion***

Degeneration of the dopaminergic nigrostriatal and striatopallidal pathways is the central pathological event in Parkinson's disease. This disorder has been mimicked experimentally in rats using single/sequential unilateral stereotaxic injections of 6-OH-DA into the medium forebrain bundle (MFB).

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 76 -

Male Wistar rats (Harlan Winkelmann, Germany), weighing 200±250 g at the beginning of the experiment, are used. The rats are maintained in a temperature- and humidity-controlled environment under a 12 h light/dark cycle with free access to food and water when not in experimental sessions.

5 The following in vivo protocols are approved by the governmental authorities. All efforts are made to minimize animal suffering, to reduce the number of animals used, and to utilize alternatives to in vivo techniques.

Animals are administered pargyline on the day of surgery (Sigma, St. Louis, MO, USA; 50 mg/kg i.p.) in order to inhibit metabolism of 6-OHDA by monoamine oxidase and desmethylimipramine HCl (Sigma; 25 mg/kg i.p.) in order to prevent uptake of 6-OHDA by noradrenergic terminals. Thirty minutes later the rats are anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg) and placed in a stereotaxic frame. In order to lesion the DA nigrostriatal pathway 4 µl of 0.01% ascorbic acid-saline containing 8 µg of 6-OHDA HBr (Sigma) are injected into the left medial fore-brain bundle at a rate of 1 µl/min (2.4 mm anterior, 1.49 mm lateral, -2.7 mm ventral to Bregma and the skull surface). The needle is left in place an additional 5 min to allow diffusion to occur.

20

Stepping Test

Forelimb akinesia is assessed three weeks following lesion placement using a modified stepping test protocol. In brief, the animals are held by the experimenter with one hand fixing the hindlimbs and slightly raising the hind paw above the surface. One paw is touching the table, and is then moved slowly sideways (5 s for 1 m), first in the forehand and then in the backhand direction. The number of adjusting steps is counted for both paws in the backhand and forehand direction of movement. The sequence of testing is right paw forehand and backhand adjusting stepping, followed by left paw forehand and backhand directions. The test is repeated three times on three

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 77 -

consecutive days, after an initial training period of three days prior to the first testing. Forehand adjusted stepping reveals no consistent differences between lesioned and healthy control animals. Analysis is therefore restricted to backhand adjusted stepping.

5

Balance Test

Balance adjustments following postural challenge are also measured during the stepping test sessions. The rats are held in the same position as described in the stepping test and, instead of being moved sideways, tilted by the experimenter towards the side of the paw touching the table. This maneuver results in loss of balance and the ability of the rats to regain balance by forelimb movements is scored on a scale ranging from 0 to 3. Score 0 is given for a normal forelimb placement. When the forelimb movement is delayed but recovery of postural balance detected, score 1 is given. Score 2 represents a clear, yet insufficient, forelimb reaction, as evidenced by muscle contraction, but lack of success in recovering balance, and score 3 is given for no reaction of movement. The test is repeated three times a day on each side for three consecutive days after an initial training period of three days prior to the first testing.

10

15

20

Staircase Test (Paw Reaching)

A modified version of the staircase test is used for evaluation of paw reaching behavior three weeks following primary and secondary lesion placement. Plexiglass test boxes with a central platform and a removable staircase on each side are used. The apparatus is designed such that only the paw on the same side at each staircase can be used, thus providing a measure of independent forelimb use. For each test the animals are left in the test boxes for 15 min. The double staircase is filled with 7 x 3 chow pellets (Precision food pellets, formula: P, purified rodent diet, size 45 mg; Sandown Scientific)

25

30

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 78 -

on each side. After each test the number of pellets eaten (successfully retrieved pellets) and the number of pellets taken (touched but dropped) for each paw and the success rate (pellets eaten/pellets taken) are counted separately. After three days of food deprivation (12 g per animal per day) the animals are tested for 11 days. Full analysis is conducted only for the last five days.

MPTP treatment

The neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine (MPTP) causes degeneration of mesencephalic dopaminergic (DAergic) neurons in rodents, non-human primates, and humans and, in so doing, reproduces many of the symptoms of Parkinson's disease. MPTP leads to a marked decrease in the levels of dopamine and its metabolites, and in the number of dopaminergic terminals in the striatum as well as severe loss of the tyrosine hydroxylase (TH)-immunoreactive cell bodies in the substantia nigra, pars compacta.

In order to obtain severe and long-lasting lesions, and to reduce mortality, animals receive single injections of MPTP, and are then tested for severity of lesion 7–10 days later. Successive MPTP injections are administered on days 1, 2 and 3. Animals receive application of 4 mg/kg MPTP hydrochloride (Sigma) in saline once daily. All injections are intraperitoneal (i.p.) and the MPTP stock solution is frozen between injections. Animals are decapitated on day 11.

Immunohistology

At the completion of behavioral experiments, all animals are anaesthetized with 3 ml thiopental (1 g/40 ml i.p., Tyrol Pharma). The mice are perfused transcardially with 0.01 M PBS (pH 7.4) for 2 min, followed by 4%

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 79 -

paraformaldehyde (Merck) in PBS for 15 min. The brains are removed and placed in 4% paraformaldehyde for 24 h at 4°C. For dehydration they are then transferred to a 20% sucrose (Merck) solution in 0.1 M PBS at 4°C until they sink. The brains are frozen in methylbutan at -20°C for 2 min and stored at -70°C. Using a sledge microtome (mod. 3800-Frigocut, Leica), 25 µm sections are taken from the genu of the corpus callosum (AP 1.7 mm) to the hippocampus (AP 21.8 mm) and from AP 24.16 to AP 26.72. Forty-six sections are cut and stored in assorters in 0.25 M Tris buffer (pH 7.4) for immunohistochemistry.

10

A series of sections is processed for free-floating tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry. Following three rinses in 0.1 M PBS, endogenous peroxidase activity is quenched for 10 min in 0.3% H₂O₂ ±PBS. After rinsing in PBS, sections are preincubated in 10% normal bovine serum (Sigma) for 5 min as blocking agent and transferred to either primary anti-rat TH rabbit antiserum (dilution 1:2000).

15

Following overnight incubation at room temperature, sections for TH immunoreactivity are rinsed in PBS (2 x 10 min) and incubated in biotinylated anti-rabbit immunoglobulin G raised in goat (dilution 1:200) (Vector) for 90 min, rinsed repeatedly and transferred to Vectastain ABC (Vector) solution for 1 h. 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma) in 0.1 M PBS, supplemented with 0.005% H₂O₂, serves as chromogen in the subsequent visualization reaction. Sections are mounted on to gelatin-coated slides, left to dry overnight, counter-stained with hematoxylin dehydrated in ascending alcohol concentrations and cleared in butylacetate. Coverslips are mounted on entellan.

20

25

Rotarod Test

30

We use a modification of the procedure described by Rozas and Labandeira-

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 80 -

Garcia (1997), with a CR-1 Rotamex system (Columbus Instruments, Columbus, OH) comprising an IBM-compatible personal computer, a CIO-24 data acquisition card, a control unit, and a four-lane rotarod unit. The rotarod unit consists of a rotating spindle (diameter 7.3 cm) and individual compartments for each mouse. The system software allows preprogramming of session protocols with varying rotational speeds (0–80 rpm). Infrared beams are used to detect when a mouse has fallen onto the base grid beneath the rotarod. The system logs the fall as the end of the experiment for that mouse, and the total time on the rotarod, as well as the time of the fall and all the set-up parameters, are recorded. The system also allows a weak current to be passed through the base grid, to aid training.

3. Dementia

The object recognition task

The object recognition task has been designed to assess the effects of experimental manipulations on the cognitive performance of rodents. A rat is placed in an open field, in which two identical objects are present. The rats inspect both objects during the first trial of the object recognition task. In a second trial, after a retention interval of for example 24 hours, one of the two objects used in the first trial, the 'familiar' object, and a novel object are placed in the open field. The inspection time at each of the objects is registered. The basic measures in the OR task is the time spent by a rat exploring the two object the second trial. Good retention is reflected by higher exploration times towards the novel than the 'familiar' object.

Administration of the putative cognition enhancer prior to the first trial predominantly allows assessment of the effects on acquisition, and eventually on consolidation processes. Administration of the testing compound after the first trial allows to assess the effects on consolidation processes, whereas administration before the second trial allows to measure effects on retrieval

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 81 -

processes.

The passive avoidance task

5 The passive avoidance task assesses memory performance in rats and mice. The inhibitory avoidance apparatus consists of a two-compartment box with a light compartment and a dark compartment. The two compartments are separated by a guillotine door that can be operated by the experimenter. A threshold of 2 cm separates the two compartments when the guillotine door is raised. When the door is open, the illumination in the dark compartment is about 2 lux. The light intensity is about 500 lux at the center of the floor of the light compartment.

15 Two habituation sessions, one shock session, and a retention session are given, separated by inter-session intervals of 24 hours. In the habituation sessions and the retention session the rat is allowed to explore the apparatus for 300 sec. The rat is placed in the light compartment, facing the wall opposite to the guillotine door. After an accommodation period of 15 sec. the guillotine door is opened so that all parts of the apparatus can be visited freely. Rats normally avoid brightly lit areas and will enter the dark compartment within a few seconds.

25 In the shock session the guillotine door between the compartments is lowered as soon as the rat has entered the dark compartment with its four paws, and a scrambled 1 mA footshock is administered for 2 sec. The rat is removed from the apparatus and put back into its home cage. The procedure during the retention session is identical to that of the habituation sessions.

30 The step-through latency, that is the first latency of entering the dark compartment (in sec.) during the retention session is an index of the memory performance of the animal; the longer the latency to enter the dark

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 82 -

5 compartment, the better the retention is. A testing compound is given half an hour before the shock session, together with $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ scopolamine. Scopolamine impairs the memory performance during the retention session 24 hours later. If the test compound increases the enter latency compared with the scopolamine-treated controls, is likely to possess cognition enhancing potential.

The Morris water escape task

10 The Morris water escape task measures spatial orientation learning in rodents. It is a test system that has extensively been used to investigate the effects of putative therapeutic on the cognitive functions of rats and mice. The performance of an animal is assessed in a circular water tank with an escape platform that is submerged about 1 cm below the surface of the water. The escape platform is not visible for an animal swimming in the water tank. Abundant extra-maze cues are provided by the furniture in the room, including desks, computer equipment, a second water tank, the presence of the experimenter, and by a radio on a shelf that is playing softly.

20 The animals receive four trials during five daily acquisition sessions. A trial is started by placing an animal into the pool, facing the wall of the tank. Each of four starting positions in the quadrants north, east, south, and west is used once in a series of four trials; their order is randomized. The escape platform is always in the same position. A trial is terminated as soon as the animal had climbs onto the escape platform or when 90 seconds have elapsed, whichever event occurs first. The animal is allowed to stay on the platform for 30 seconds. Then it is taken from the platform and the next trial is started. If an animal did not find the platform within 90 seconds it is put on the platform by the experimenter and is allowed to stay there for 30 seconds. After the fourth trial of the fifth daily session, an additional trial is given as a probe trial: the platform is removed, and the time the animal spends in the four quadrants is

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 83 -

measured for 30 or 60 seconds. In the probe trial, all animals start from the same start position, opposite to the quadrant where the escape platform had been positioned during acquisition.

5 Four different measures are taken to evaluate the performance of an animal during acquisition training: escape latency, traveled distance, distance to platform, and swimming speed. The following measures are evaluated for the probe trial: time (s) in quadrants and traveled distance (cm) in the four quadrants. The probe trial provides additional information about how well an
10 animal learned the position of the escape platform. If an animal spends more time and swims a longer distance in the quadrant where the platform had been positioned during the acquisition sessions than in any other quadrant, one concludes that the platform position has been learned well.

15 In order to assess the effects of putative cognition enhancing compounds, rats or mice with specific brain lesions which impair cognitive functions, or animals treated with compounds such as scopolamine or MK-801, which interfere with normal learning, or aged animals which suffer from cognitive
20 deficits, are used.

20

The T-maze spontaneous alternation task

The T-maze spontaneous alternation task (TeMCAT) assesses the spatial memory performance in mice. The start arm and the two goal arms of the
25 T-maze are provided with guillotine doors which can be operated manually by the experimenter. A mouse is put into the start arm at the beginning of training. The guillotine door is closed. In the first trial, the 'forced trial', either the left or right goal arm is blocked by lowering the guillotine door. After the mouse has been released from the start arm, it will negotiate the
30 maze, eventually enter the open goal arm, and return to the start position, where it will be confined for 5 seconds, by lowering the guillotine door. Then,

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 84 -

the animal can choose freely between the left and right goal arm (all guillotine-doors opened) during 14 'free choice' trials. As soon as the mouse has entered one goal arm, the other one is closed. The mouse eventually returns to the start arm and is free to visit whichever goal arm it wants after having been confined to the start arm for 5 seconds. After completion of 14 free choice trials in one session, the animal is removed from the maze. During training, the animal is never handled.

The percent alternations out of 14 trials is calculated. This percentage and the total time needed to complete the first forced trial and the subsequent 14 free choice trials (in s) is analyzed. Cognitive deficits are usually induced by an injection of scopolamine, 30 min before the start of the training session. Scopolamine reduced the per-cent alternations to chance level, or below. A cognition enhancer, which is always administered before the training session, will at least partially, antagonize the scopolamine-induced reduction in the spontaneous alternation rate.

EXAMPLE 10

Identification of test compound efficacy in a COPD animal model

Guinea pigs are exposed on a single occasion to tobacco smoke for 50 minutes. Animals are sacrificed between 10 minutes and 24 hour following the end of the exposure and their lungs placed in RNAlater™. The lung tissue is homogenised, and total RNA was extracted using a Qiagen RNeasy™ Maxi kit. Molecular Probes RiboGreen™ RNA quantitation method is used to quantify the amount of RNA in each sample.

Total RNA is reverse transcribed, and the resultant cDNA is used in a real-time polymerase chain reaction (PCR). The cDNA is added to a solution containing the sense and anti-sense primers and the 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine labelled probe

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 85 -

of the aminopeptidase N gene. Cyclophilin is used as the housekeeping gene. The expression of the aminopeptidase N gene is measured using the TaqMan real-time PCR system that generates an amplification curve for each sample. From this curve a threshold cycle value is calculated: the fractional cycle number at which the amount of amplified target reaches a fixed threshold. A sample containing many copies of the aminopeptidase N gene will reach this threshold earlier than a sample containing fewer copies. The threshold is set at 0.2, and the threshold cycle C_T is calculated from the amplification curve. The C_T value for the aminopeptidase N gene is normalised using the C_T value for the housekeeping gene.

10

Expression of the aminopeptidase N gene is increased by at least 3-fold between 10 minutes and 3 hours post tobacco smoke exposure compared to air exposed control animals.

15

Test compounds are evaluated as follows. Animals are pre-treated with a test compound between 5 minutes and 1 hour prior to the tobacco smoke exposure and they are then sacrificed up to 3 hours after the tobacco smoke exposure has been completed. Control animals are pre-treated with the vehicle of the test compound via the route of administration chosen for the test compound. A test compound that reduces the tobacco smoke induced upregulation of aminopeptidase N gene relative to the expression seen in vehicle treated tobacco smoke exposed animals is identified as an inhibitor of aminopeptidase N gene expression.

20

REFERENCES

25

Complete amino acid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. *FEBS Lett* 1988 Oct 10;238(2):307-14.

30

Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J Clin Invest* 1989 Apr;83(4):1299-307.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 86 -

Separate promoters control transcription of the human aminopeptidase N gene in myeloid and intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 1991 Jun 25;266(18):11999-2007.

- 5 Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 1992 Jun 4;357(6377):420-2.

Identification of point mutations in the aminopeptidase N gene by SSCP analysis and sequencing. *Hum Mutat* 1998;Suppl 1:S158-60.

10

Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 2000 Feb 1;60(3):722-7.

Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cell Immunol* 2000 Apr 10;201(1):22-32.

15

Increased expression of neutral endopeptidase (NEP) and aminopeptidase N (APN) on peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis. *Immunol Lett* 2000 Feb 1;71(2):127-9.

20

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 87 -

CLAIMS

1. An isolated polynucleotide being selected from the group consisting of:
 - 5 a. a polynucleotide encoding a aminopeptidase N polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
 - 10 i. amino acid sequences which are at least about 37% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and
 - ii. the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.
 - b. a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO: 1;
 - 15 c. a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to a polynucleotide specified in (a) and (b) and encodes a aminopeptidase N polypeptide;
 - d. a polynucleotide the sequence of which deviates from the polynucleotide sequences specified in (a) to (c) due to the degeneration of the genetic code and encodes a aminopeptidase N polypeptide; and
 - 20 e. a polynucleotide which represents a fragment, derivative or allelic variation of a polynucleotide sequence specified in (a) to (d) and encodes a aminopeptidase N polypeptide.
- 25 2. An expression vector containing any polynucleotide of claim 1.
3. A host cell containing the expression vector of claim 2.
- 30 4. A substantially purified aminopeptidase N polypeptide encoded by a polynucleotide of claim 1.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 88 -

5. A method for producing a aminopeptidase N polypeptide, wherein the method comprises the following steps:
- 5 a. culturing the host cell of claim 3 under conditions suitable for the expression of the aminopeptidase N polypeptide; and
- b. recovering the aminopeptidase N polypeptide from the host cell culture.
- 10 6. A method for detection of a polynucleotide encoding a aminopeptidase N polypeptide in a biological sample comprising the following steps:
- 15 a. hybridizing any polynucleotide of claim 1 to a nucleic acid material of a biological sample, thereby forming a hybridization complex; and
- b. detecting said hybridization complex.
- 20 7. The method of claim 6, wherein before hybridization, the nucleic acid material of the biological sample is amplified.
8. A method for the detection of a polynucleotide of claim 1 or a aminopeptidase N polypeptide of claim 4 comprising the steps of:
- 25 a. contacting a biological sample with a reagent which specifically interacts with the polynucleotide or the aminopeptidase N polypeptide and
- b. detecting the interaction
- 30 9. A diagnostic kit for conducting the method of any one of claims 6 to 8.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 89 -

10. A method of screening for agents which decrease the activity of an aminopeptidase N, comprising the steps of:
- 5 a. contacting a test compound with any aminopeptidase N polypeptide encoded by any polynucleotide of claim 1;
- b. detecting binding of the test compound to the aminopeptidase N polypeptide, wherein a test compound which binds to the polypeptide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of a aminopeptidase N.
- 10
11. A method of screening for agents which regulate the activity of an aminopeptidase N, comprising the steps of:
- 15 a. contacting a test compound with a aminopeptidase N polypeptide encoded by any polynucleotide of claim 1; and
- b. detecting a aminopeptidase N activity of the polypeptide, wherein a test compound which increases the aminopeptidase N activity is identified as a potential therapeutic agent for increasing the activity of the aminopeptidase N, and wherein a test compound which decreases the aminopeptidase N activity of the polypeptide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of the aminopeptidase N.
- 20
- 25
12. A method of screening for agents which decrease the activity of an aminopeptidase N, comprising the steps of:
- 30 a. contacting a test compound with any polynucleotide of claim 1 and detecting binding of the test compound to the polynucleotide, wherein

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 90 -

a test compound which binds to the polynucleotide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of aminopeptidase N.

- 5 13. A method of reducing the activity of aminopeptidase N, comprising the steps of:
- 14.
- a. contacting a cell with a reagent which specifically binds to any polynucleotide of claim 1 or any aminopeptidase N polypeptide of claim 4,
10 whereby the activity of aminopeptidase N is reduced.
15. A reagent that modulates the activity of a aminopeptidase N polypeptide or a polynucleotide wherein said reagent is identified by the method of any of the claim 10 to 12.
- 15 16. A pharmaceutical composition, comprising:
- a. the expression vector of claim 2 or the reagent of claim 14 and a
20 pharmaceutically acceptable carrier.
17. Use of the expression vector of claim 2 or the reagent of claim 14 in the preparation of a medicament for modulating the activity of a aminopeptidase N in a disease.
- 25 18. Use of claim 16 wherein the disease is cancer, a CNS disorder or COPD.

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 1/10 -

Fig 1

atggggccc cttccagctc aggtctctat gtgagccgag cagtggccct gctgctggct
gggctggtag cggccctcct gctggcgttg gccgtactcg ccgcttcta cggccacatgc
gagcgcgtcc caccgtcga gctgcctgga ctcaaggact tggaaagcga gctctccctt
ccctcaggc agaagccgac gccaaacccg aaaccacgca gtgcaagcga gctagcggtg
acgaccaccc cgaacacttg gcgacccccg gggccctggg accagctacg cctgcgcccc
tggctcgtgc cgtgcacta cgtatggag ctgtgcgcg agctgagcc cgaagagctt
cggcccggtt ctttgcctt cactggcgc gtgaacatca cggctgcgctg caeagtggcc
acctctgac tgcgtcga tagcctctc caggactcgg agcgcgcga ggtgcggga
ccccctccc cgggcactgg gaacgccaca gtggcccg tcccgtgga cgaagltgtg
ttcggcctgg acacggaata catggtgctg gactcagtg agccctgaa accitgtagc
agctacagc tgcagcttag cttctcggc ctggtgaggg aagacctcag ggaaggactc
ttctcaacg tctacacga ccagggcag cgcagggccc tgttagcgtc ccagctggaa
ccaactttg ccaggtatg tttcccttg tttgatgag cagctctgaa ggaactttt
aatattaca tgattcatca tccaaagtat gtggcccttt ccaecatgcc aaagctaggt
cagctgaaa aagaagatgt gaatggaagc aaatggactg ttacaacct ttccactacg
ccccacatgc caactactt agtcgcattt gttatatgt actatgacca cgtcaacaga
acagaaaggg gcaaggagat acgcatctgg gccgggaaag atgcaatgyc aaatggaaat
gcagacttg cttgaaat cacaggtccc atctctctt tctcggagga ttgtttaat
atcagttact ccttccaaa aacagatata atgpcctgc ctagttttga caacctgca
atggaaact ggggactaat gatatttgat gaatcaggat tgttgttggg accaaaagat
caactgacag aaaaaagac tctgatccc tatgttgtct cccacgagat tggaccaccag
tggtttggaa acttggttac catgaattgg tggaaacaata tctggctcaa cgaaggtttt
gcattctatt ttgagtttga agtaattaac tactttaatc ctaactccc agraatbag
atctttttt ctaacatttt acataatalc ctccagagag atcagcccc ggtgactaga
gctgtggcca tgaagtgga aaatttcaa acaagtgaaa tacaggaact ctttgacata
tttacttaca gcaaggagc gtctatggc cggatgcttt cttttttttt gaatgagcat

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 2/10 -

Fig 1 continued

ttattgtca gtgcactcaa gtcataatttg aagacatltt cctactcaaa cgtctgagcaa
gatgatctat gggggcattt tcaaatggcc atagatgacc agaglacsgl tattttgcca
gcaacaataa aaaaataat ggacagttgg acacaccaga ggggttttcc agtgcactc
ttaaattgtt ctactggcgt catgaaacag gggcattltt atcttgaaaa cattaaagaat
cggactcttc taocacgcaa tgacacatgg attgccccta ttccttggat aaaaatgga
actacacaac ctttagtctg gctagatcaa agcagcaatt ctgaccatga ctgggtgat
ttgaatttga atatgactgg atattataga gttaatattg ataaattagg ttggaagaaa
ctaaatcac aactgaaaa ggtccctaaq gctatccctg ttattcacag actgcagttg
attgatgat ccttttctt gcttaaaac aattatattg agattgaaac agcacttgag
ttaaacaagt accttgcctga agaagatgaa attatagtat ggcatacagt cttggtaaac
ttgtaacca gggatccttgt tctgaggtg acatctatg atataactc attattaaaq
aggtacctat taagagact taatttaata tggaaatattt attcaactat aattcgtgaa
aatgtgttg cattacaaga tgactactta gctctaatat cactggaaaa acttttcta
actgogtgtt ggttgggctt tgaagactgc cttcagctgt caaagaact ttocgcaaaa
tgggtggatc atccagaaaa tgaataacct tatccaatta aagatgtggt tttatgttat
ggcattgctt tgggaagtga taaagagtgg gacatcttgt taaatactta cactaataca
acaaacaag aaaaaaat tcaacttctt tatgcaatga gctgcagcaa agaccatggg
atacttaaca gatatatga gtaigccatc agcacatctc catcacttc taatgaaaca
aatataatg aggttgtggc ttcatctgaa gttggccggt atgtgcgaaa agacttctta
gtcaacaact ggaagctgt gartaaaaaa tttacagatt gtggaagaggg aagtttttagc
ttccaggata caggaggggc tgacaccaga acttactcc

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 3/10 -

Fig. 2

MGPPSSSGFY VSRVALLLA GLVAALLLAL AVLAALYGHG ERVPPSELPG LRDLAEBSSP
 PLRQKPTPT KPSSARELAV ITTFSNRPP GPWDQLRIPP WLVPPLHYDLE LWFQLRPPDEL
 PAGSLPTGR VNIIVRCTVA TSRLLLHSLF QDCBRAFVRG PLSPGTGNAT VGRVPVDDVM
 FALDTEYWL ELSEPLRPGS SYELQLSFSG LVKEDLRBGL FLNVIYDQGE RRALLASQLE
 PTFARYVPC FDEPALKATF NITMIHPSY VALSNMPKLG QSEKEDVNGS KWTVTTFSTT
 PHMETYLVAF VICDYDHWNR TERGKEIRIW ARKDAIANGS ADFALNITGP IFSFLEDLFN
 ISYSLPKTDI IALPSFDNHA MEMWGLMIFD EGGLELLEPKD QLTAKKTLIIS YVYSHEIGHQ
 WFGNLVTMNW WNNIWLNEGF ASYFEFEVIN YFNPKLEPNE IFFSNILHNI LREDFALVTR
 AVAMKVENFK TSEIQELPDI FTYSKASMA RMLSCFLNEH LFVSALKSYL KTFYSYNAEQ
 DDLWRHFQMA IDDOSTVILL ATIKNIMDSW THQSGFPVIT LNVSTGYMKQ EPPYLENIKN
 RLLTNSDTW IVPILWIKNG ITQELVWLDQ SSNSDHDWVI LNLNMTGYIR VNYDKLGWKK
 LNOOLEKDPK AIPVIHRLQL IDDAFSLSKN NYIETIALE LTKYLAEBDE IIVMHTVIVN
 LVTRDLVSEV NIYDIYLLK RYLLKRLNLI WNIYSTIIRE NVLALQDDYL ALIISLEKLFV
 TACWLGLEDLQ LQLSKELPAK WDHPENEIP YPIKDVVILCY GIAUGSDKEW DILLNTYNT
 TNKEKIQLA YAMCSKDPW ILNRYMEYAI STSPFTSNET NIEEVASSE VGRYVAKDFL
 VNNWQAVSKR FTDCGEGSFS FQDTGRADTR TYS

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 4/10 -

Fig. 3

AKGYISKSL GILGILLGVA AVCTIIALS VYSQEKKNVA NSSPVASTTP SASATNPAS
 ATTLQSKAW NRYRLPNTLK PDSYQVTLRP YLTPNDRGLY VFKGSSTVRF TCKEATDVII
 IHSKKNYTL SQHRVVLRG VGSQPPDID KTELVEFTEY LVVHLKGLV KDSQYEMDSE
 FEGELADDLA GFRSEYMEG NVRKVVATTQ MQAADARKSF PCFDEPAMKA EFNITLIHPK
 DLTALSNMLP KGFSTPLPED PNWVTEFHT TKMSTYLLA FIVSEFDYVE KOASNGVLIR
 IWARPSAIAA GHGDYALNVT GPILNPFAGH YDTPYPLPKS DQIGLPPDNA GAMENWGLYV
 YRENSLLFDP LSSSSNKER VVTVIAHELA HQWFGNLVTI EWNNDLWLINE GFASYVEYLG
 ADYAEPTWNL KDLMWLNDVY RVMVDALAS SHPLSTPASE INTPAQISEL FPAISYKGA
 SVLRMLSSFL SEDVFKQGLA SYLHTFAYQN TIYLNLDHIL QEAVNRSIQ LPTTERDIMN
 RWTLQMGFPV ITVDISTGIL SQEHFLDEPD SNVTRSEFN YVWIVPITSI RDGRQODYX
 LMDVRAQNDL FSTGNEWVL LNLNVTGYR VNYDENWRK IQTQLORDHS AIPVINRAQI
 INDAFNLSA HKVPVTLALN NTLFLIEERQ YMEWEAALS LSYFKLMFDR SVYGPKNY
 LKKQVPLFI HFRNNINNR EIPENLMDQY SEVNAISTAC SNGVPECEEM VSGLFKQWME
 NENNP IHPN LRSTVYCNAL AQGGEEMDF AWEQFRNATL VNEADKLRAA LACSKELWIL
 NRYLSYTLNP DLIRKODATS TIIISITNVI CGGLYWDVYQ SNWKKPFNDY GGGSFSSNL
 IQAVTRRFST EYELQOLEQF KKDNEETGFG SGTRALEQAL EKTKANIKWY KENKEVVLQW
 FTENSK

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 6/10 -

Fig 4 continued

YVPCFDEPALKATFNITMTHPSYVALSNMPLKQSEK--EDVNGSKWVTFSTTPHM
 FPCFDEPA:KA.FNIT:IHALSNM .G.S.. ED N W.VT.F.TTP.M
 KSPFCFDEPAMKAENITLTHPKDALTALSNMPLKGFSTPLPEDPN--WNVTEFHTPKM

 PTVYVAFVLCDDYDVMR-TERGKEIRIWARKDAIANGSADFAINITGPIFSFLEDLFNIS
 .TYL:AF:::D:V:..G IRIWAR.AIA G.D:AIN:TCPI.:F...:..
 STYLLAFIVSEFDYVEKQASNGVLRIRIWARPSAJAAGHGDIYALNVTGPIINFFAGHYDTP

 Zinc_protease region
 YSLPKTDIIALPSFDNHAMENWGLMIFDESGILLFPKQDTEKTKTILSYVSHSIEIG HQWF
 Y.LPK:D I.LP.F: AMENWGL:: E:LL:P ...K. : V:HE:HQWF
 YPLPKSDQIGLPDFNAGAMENWGLVITYRENSLLFPDPLSSSSSNKERVVVIAHELAHQWF

 Zinc binding residue
 GNLVTMNNWNNIWLNEGFASYFEFEVINYFNPKLPRNEIFFSNILHNIREDHALVTRAV
 GNLVT:WNN:WLNKGFASY.E: .Y.P.N ::::: D ..:..
 GNLVTLIEWNDLWLNKGFASYVEYELGADYAEPTWMLKDLMLVNDVYRVMVADALASSHPL

 active site residue
 AMKVENFKT-SEIQELFDIITYSKGASMARMLSCFLNEHLFYSALKSYLKTFSYSNAEQD
 :.....T ::I.ELFD::YKSGAS:RMLS.FL:E:F ..L.SYL.TF:Y.N. .
 STPASEINTPAQISELFDALISYKGSVLRMLSSFLSEDFVKQGLASYLHTFAYQNTIYL

 DLWRHFQMAIDDQSTVILPATIKNIMDSWTHQSGFPVITLNVSTGYMKQEPFFYLENIKNR
 :LW H.Q.A:::S :LP.T ::IM.WT Q.GFPVIT::STG.:OE F.L: .N
 NLWDHLQEA VNNRS-IQLPTTERDIMNRWTLQMGFPVITVDITSTGLSQEHFLLDPSNV

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 7/10 -

Fig 4 continued

```

TLLFS-NDTWIVLWIKNGTTPQLVWL-----DQSSNSDHDWVILNLMNTGYRNVY
T : N .WIVPI .I : G . . Q . . WL      D S . S . : WV : LNLN : TGYRNVY
TRPSEFNWVIVPITTSIRDGRQQDYWLMDVRAQNDLFTSGNEWVLLNLLNVTGYRNVY

DKLGMKLNQOLEKPKAIPVIHRLQLIDDAFSLSKNNYIEIETALELTKYIAREDEIIV
D : W : K : . OL : : D AIPVI : R : O : I : DAF : L : . : : . : . AL . T : L . PE : . :
DEENWRKIQTQLQRDHSAPVINRAQIINDAFNLSAHPVVTALNNTLFLIEERQYMP

WHTVNLVTRDLVSEVNIYDYSLLKRYLLKRLNLIWNIYSTIIRENVLALQDDYLALI
W . . . L : L . : : : Y . : K . YL K : : : : I : . . . . N . : : : : : .
WEAALSLSYFKLMFDRS--EYVGFPMKNYLKQVTPLF-IFFRNNTNNWFEI PENLMDQY

SLEKLFVTACWLGLEDCLQLSKELFAKWVDHPENEIPYP-IKDVVLICYGIALGSDKEWDI
S . . . TAC G : : C : : . LF : W : : : P . N . : P : : : . V . C . IA G : : EMD .
SEVNAISTACSNVGEPECEEMVSGLFKQWMPNPNPNNPIHPNLRSTVYCNAIAQGGEEBWF

LLNTYNTTNKEEKIQLAYAMSCSKDPWILNKYMEYAI STSPPTSNE-TNIIIEVVASSEV
. . . : N . T . E . : L . A : : CSK : WILNRY : Y : : : . . . . : T : I : : : :
AWEQFRNATLVNEADKLRALACSKELWILNRYLSYTLNFDLIRKQDATSTIISITNNVI

GRYVAKDFLVNNQAVSKRFTDCGEGSFSFQDTGRADTRTYS      933
G : . . DF : : NW : K F D G GSEFSF . . . A TR : : S
GGGLVWDFVQSNWK---KPFNDYGGGFSFSNLIQAVTRRFS      909

```


WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 9/10 -

Fig 5 continued

SYSLEKTDIIALPSPDNHAMENWGLMIFDESGLLLEPKDQJTEKKTLLISVYVSHEIGHQW
 .Y.LPK.D :A:P.F. AMENWGL::E.LL:P:....K.::V:HE:..HQW
 pYpIpKlDqvAvPdFsaGAMENWGLiTyrepallydprsstnsdkqrVaeViaHELAHQW

 FGNLVTMMWNNIWLNEGFAFYFPEVINYF--MPKLPNEIFFS-NIL-HNILLREHAL
 FGNLVTM.WW::WLNEGFA:Y.E:..P:..F:..L..D..
 FGNLVTmkWWddLWLNEGFAtymEylgtdeIlggepewnieaqflllrdvvaqialasDslg

 VTRAVAMK-VENFKTSEIOELFD-IFTYSGK 506
 :...K VE ..EI.E:FD..TY:KG
 sshPitnklivevntpaeiseifdsaitYakG 441

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 10/10 -

FIG. 6

Prosite search results:

Access#	From->To Name	Doc#
PS00142	412->422 ZINC_PROTEASE	PDOC00129

FIG. 7

TMHMM result# Sequence Length: 933
Sequence Number of predicted TMHs: 1
Sequence TMHMM2.0 TMhelix 13 35

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 1 -

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer AG

<120> REGULATION OF HUMAN AMINOPEPTIDASE N

<130> Lio 373

<150> 60/303,693

<151> 2001-07-10

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2799

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
atggggcccc ctccaagctc aggttctat gtgagccgcg cagtggccct gctgctggct 60
gggctggtag ccgccctcct gctggcgtc gccgtactcg ccgccttgta cggccactgc 120
gagcgcgtcc caccgtcggg gctgcctgga ctcagggact tggagccga gtcttccct 180
ccccctcaggc agaagccgac gccaaccccc aaaccagca gtgcacgcga gctagcggtg 240
acgaccaccc cagcaactg gcgacccccg gggccctggg accagctacg cctgcccgcc 300
tggctcgtgc cgtgcaacta cgtctggag ctgtggccgc agctgaggcc cgacgagctt 360
ccggccgggt ctttgcctt cactggccgc gtgaacatca cggtcgctg cactgtggcc 420
acctctgac tctgctgca tagcctcttc caggactgcg agcgcgccga ggtcgggga 480
cccccttccc cgggcactgg gaaagccaca gtgggccgcg tgcccgtgga cgactgtgg 540

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 2 -

ttcgcgctgg acacggaata catgggtgctg gagctcagtg agccccgaa acctggtagc 600
agctacgagc tgcagcttag cttctcgggc ctgggtgaagg aagacctcag ggagggactc 660
ttcctcaacg tctacaccca ccagggcgag cgcagggcco tggtagcgtc ccagctggaa 720
ccaacatttg ccaggtagt tttcccttgt tttgatgagc cagctctgaa ggcaactttt 780
aatattacaa tgattcatca tccaagttat gtggcccttt ccaacatgcc aaagctaggc 840
cagctctgaaa aagaagatgt gaatggaagc aaatggactg ttacaacctt ttccactacg 900
ccccacatgc caacttactt agtcgacttt gttatatgtg actatgacca cgtcaacaga 960
acagaagggg gcaaggagat acgcatctgg gcccggaag atgcaattgc aaatggaagt 1020
gcagactcttg ctttgaacat cacaggctcc atctctctt tctcggagga tttgtttaat 1080
atcagttact ctcttccaaa aacagatata attgccctgc ctagttttga caaccatgca 1140
atggaanaact ggggactaat gatatttgat gaatcaggat tgtgtttgga accaaaagat 1200
cagctgacag aaaaaaagac tctgatctcc tatgttctcc cccaogagat tggacacacc 1260
tggtttggaa acctgggttac catgaattgg tggacaata tctggctcaa cgaagggttt 1320
gcactttatt ttgagtttga agtaattaac tactttaac ctaaacctcc aagaatgag 1380
atcttttttt ctaacatttt acataatate ctcagagaag atcacgcoct ggtgactaga 1440
gctgtggcca tgaagggtga aaatttcaaa acaagtgaac tacaggaact ctttgacata 1500
tttacttaca gcaagggagc gtctatggcc cggatgcttt cttgtttott gaatgagcat 1560
ttatttgcga gtgcaactcaa gtcataattg aagacatttt cctactcaaa cgctgagcaa 1620
gatgatctat ggaggcattt tcaaatggcc atagatgacc agagtacagt tattttgcca 1680
gcaacaataa aaaacataat ggacagttgg acacaccaga gtggttttcc agtgatcact 1740
ttaaagtgtt ctactggcgt catgaaacag gagccatttt atcttgaaaa cattaaaaat 1800
cggactcttc taaccagcaa tgacacatgg attgtcccta ttctttggat aaaaaatgga 1860
actacacaac ctttagctcg gctagatcaa agcagcaatt ctgacctga ctgggtgatt 1920
ttgaatttga atatgactgg atattataga gttaattatg ataaattagg ttggaagaaa 1980
ctaaatcaac aacttgaaaa ggatcctaag gcgattcctg ttattcaccag actgcagttg 2040
attgatgatg ccttttccct gtctaaaaac aattatattg agattgaaac agcacttgag 2100
ttaaaccaagt accttgcctga agaagatgaa attatagtat ggcatacagt cttggtaaac 2160
ttggtaacca gggatcttgt tctcagggtg aacatctatg atatabactc attattaag 2220
aggtacctat taaagagact taatttaata tggaaatatt attcaactat aattcgtgaa 2280
aatgtgttgg cattacaaga tgactactta gctctaatat cactggaaaa actttttgta 2340

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 3 -

actgogtgtt ggttggcct tgaagactgc cttcagctgt caaaagaact tttcgcaaaa 2400
 tgggtggatc atccagaaaa tgaataacct tatccaatta aagatgtggt tttatgttat 2460
 ggcattgcct tgggaagtga taaagagtgg gacatcttgt taaatactta cactaataca 2520
 acaancaaag aagaaaagat tcaacttgct tatgcaatga gctgcagcaa agaccoatgg 2580
 atacttaaca gatatatgga gtatgccatc agcacatctc cattcacttc taatgaaaca 2640
 aatataattg aggttgggc ttcacttgaa gttggccggt atgtcgcaaa agacttttta 2700
 gtcaacaact ggcaagctgt gactaaaaga tttacagatt gttggagaggg aagtttttagc 2760
 ttccaggata cagggagggc tgacaccaga acttactcc 2799

<210> 2

<211> 933

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Pro Pro Ser Ser Ser Gly Phe Tyr Val Ser Arg Ala Val Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Gly Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ala Val
 20 25 30

Leu Ala Ala Leu Tyr Gly His Cys Glu Arg Val Pro Pro Ser Glu Leu
 35 40 45

Pro Gly Leu Arg Asp Leu Glu Ala Glu Ser Ser Pro Pro Leu Arg Gln
 50 55 60

Lys Pro Thr Pro Thr Pro Lys Pro Ser Ser Ala Arg Glu Leu Ala Val
 65 70 75 80

Thr Thr Thr Pro Ser Asn Trp Arg Pro Pro Gly Pro Trp Asp Gln Leu
 85 90 95

Arg Leu Pro Pro Trp Leu Val Pro Leu His Tyr Asp Leu Glu Leu Trp
 100 105 110

Pro Gln Leu Arg Pro Asp Glu Leu Pro Ala Gly Ser Leu Pro Phe Thr
 115 120 125

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 4 -

Gly Arg Val Asn Ile Thr Val Arg Cys Thr Val Ala Thr Ser Arg Leu
 130 135 140

Leu Leu His Ser Leu Phe Gln Asp Cys Glu Arg Ala Glu Val Arg Gly
 145 150 155

Pro Leu Ser Pro Gly Thr Gly Asn Ala Thr Val Gly Arg Val Pro Val
 165 170 175

Asp Asp Val Trp Phe Ala Leu Asp Thr Glu Tyr Met Val Leu Glu Leu
 180 185 190

Ser Glu Pro Leu Lys Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Leu Ser Phe
 195 200 205

Ser Gly Leu Val Lys Glu Asp Leu Arg Glu Gly Leu Phe Leu Asn Val
 210 215 220

Tyr Thr Asp Gln Gly Glu Arg Arg Ala Leu Leu Ala Ser Gln Leu Glu
 225 230 235

Pro Thr Phe Ala Arg Tyr Val Phe Pro Cys Phe Asp Glu Pro Ala Leu
 245 250 255

Lys Ala Thr Phe Asn Ile Thr Met Ile His His Pro Ser Tyr Val Ala
 260 265 270

Leu Ser Asn Met Pro Lys Leu Gly Gln Ser Glu Lys Glu Asp Val Asn
 275 280 285

Gly Ser Lys Trp Thr Val Thr Thr Phe Ser Thr Thr Pro His Met Pro
 290 295 300

Thr Tyr Leu Val Ala Phe Val Ile Cys Asp Tyr Asp His Val Asn Arg
 305 310 315

Thr Glu Arg Gly Lys Glu Ile Arg Ile Trp Ala Arg Lys Asp Ala Ile
 325 330 335

Ala Asn Gly Ser Ala Asp Phe Ala Leu Asn Ile Thr Gly Pro Ile Phe
 340 345 350

Ser Phe Leu Glu Asp Leu Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Leu Pro Lys Thr
 355 360 365

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 5 -

Asp Ile Ile Ala Leu Pro Ser Phe Asp Asn His Ala Met Glu Asn Trp
 370 375 380

Gly Leu Met Ile Phe Asp Glu Ser Gly Leu Leu Leu Glu Pro Lys Asp
 385 390 395 400

Gln Leu Thr Glu Lys Lys Thr Leu Ile Ser Tyr Val Val Ser His Glu
 405 410 415

Ile Gly His Gln Trp Phe Gly Asn Leu Val Thr Met Asn Trp Trp Asn
 420 425 430

Asn Ile Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala Ser Tyr Phe Glu Phe Glu Val
 435 440 445

Ile Asn Tyr Phe Asn Pro Lys Leu Pro Arg Asn Glu Ile Phe Phe Ser
 450 455 460

Asn Ile Leu His Asn Ile Leu Arg Glu Asp His Ala Leu Val Thr Arg
 465 470 475 480

Ala Val Ala Met Lys Val Glu Asn Phe Lys Thr Ser Glu Ile Gln Glu
 485 490 495

Leu Phe Asp Ile Phe Thr Tyr Ser Lys Gly Ala Ser Met Ala Arg Met
 500 505 510

Leu Ser Cys Phe Leu Asn Glu His Leu Phe Val Ser Ala Leu Lys Ser
 515 520 525

Tyr Leu Lys Thr Phe Ser Tyr Ser Asn Ala Glu Gln Asp Asp Leu Trp
 530 535 540

Arg His Phe Gln Met Ala Ile Asp Asp Gln Ser Thr Val Ile Leu Pro
 545 550 555 560

Ala Thr Ile Lys Asn Ile Met Asp Ser Trp Thr His Gln Ser Gly Phe
 565 570 575

Pro Val Ile Thr Leu Asn Val Ser Thr Gly Val Met Lys Gln Glu Pro
 580 585 590

Phe Tyr Leu Glu Asn Ile Lys Asn Arg Thr Leu Leu Thr Ser Asn Asp
 595 600 605

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 6 -

Thr Trp Ile Val Pro Ile Leu Trp Ile Lys Asn Gly Thr Thr Gln Pro
 610 615 620
 Leu Val Trp Leu Asp Gln Ser Ser Asn Ser Asp His Asp Trp Val Ile
 625 630 635 640
 Leu Asn Leu Asn Met Thr Gly Tyr Tyr Arg Val Asn Tyr Asp Lys Leu
 645 650 655
 Gly Trp Lys Lys Leu Asn Gln Gln Leu Glu Lys Asp Pro Lys Ala Ile
 660 665 670
 Pro Val Ile His Arg Leu Gln Leu Ile Asp Asp Ala Phe Ser Leu Ser
 675 680 685
 Lys Asn Asn Tyr Ile Glu Ile Glu Thr Ala Leu Glu Leu Thr Lys Tyr
 690 695 700
 Leu Ala Glu Glu Asp Glu Ile Ile Val Trp His Thr Val Leu Val Asn
 705 710 715
 Leu Val Thr Arg Asp Leu Val Ser Glu Val Asn Ile Tyr Asp Ile Tyr
 725 730 735
 Ser Leu Leu Lys Arg Tyr Leu Leu Lys Arg Leu Asn Leu Ile Trp Asn
 740 745 750
 Ile Tyr Ser Thr Ile Ile Arg Glu Asn Val Leu Ala Leu Gln Asp Asp
 755 760 765
 Tyr Leu Ala Leu Ile Ser Leu Glu Lys Leu Phe Val Thr Ala Cys Trp
 770 775 780
 Leu Gly Leu Glu Asp Cys Leu Gln Leu Ser Lys Glu Leu Phe Ala Lys
 785 790 795 800
 Trp Val Asp His Pro Glu Asn Glu Ile Pro Tyr Pro Ile Lys Asp Val
 805 810 815
 Val Leu Cys Tyr Gly Ile Ala Leu Gly Ser Asp Lys Glu Trp Asp Ile
 820 825 830
 Leu Leu Asn Thr Tyr Thr Asn Thr Thr Asn Lys Glu Glu Lys Ile Gln
 835 840 845

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 7 -

Leu Ala Tyr Ala Met Ser Cys Ser Lys Asp Pro Trp Ile Leu Asn Arg
 850 855 860

Tyr Met Glu Tyr Ala Ile Ser Thr Ser Pro Phe Thr Ser Asn Glu Thr
 865 870 875 880

Asn Ile Ile Glu Val Val Ala Ser Ser Glu Val Gly Arg Tyr Val Ala
 885 890 895

Lys Asp Phe Leu Val Asn Asn Trp Gln Ala Val Ser Lys Arg Phe Thr
 900 905 910

Asp Cys Gly Glu Gly Ser Phe Ser Phe Gln Asp Thr Gly Arg Ala Asp
 915 920 925

Thr Arg Thr Tyr Ser
 930

<210> 3
 <211> 966
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Ala Lys Gly Phe Tyr Ile Ser Lys Ser Leu Gly Ile Leu Gly Ile Leu
 1 5 10 15

Leu Gly Val Ala Ala Val Cys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Val Val Tyr
 20 25 30

Ser Gln Glu Lys Asn Lys Asn Ala Asn Ser Ser Pro Val Ala Ser Thr
 35 40 45

Thr Pro Ser Ala Ser Ala Thr Thr Asn Pro Ala Ser Ala Thr Thr Leu
 50 55 60

Asp Gln Ser Lys Ala Trp Asn Arg Tyr Arg Ileu Pro Asn Thr Leu Lys
 65 70 75 80

Pro Asp Ser Tyr Gln Val Thr Leu Arg Pro Tyr Leu Thr Pro Asn Asp
 85 90 95

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 8 -

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

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 9 -

Leu Pro Lys Ser Asp Gln Ile Gly Leu Pro Asp Phe Asn Ala Gly Ala
 340 345 350

Met Glu Asn Trp Gly Leu Val Thr Tyr Arg Glu Asn Ser Leu Leu Phe
 355 360 365

Asp Pro Leu Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asn Lys Glu Arg Val Val Thr Val
 370 375 380

Ile Ala His Glu Leu Ala His Gln Trp Phe Gly Asn Leu Val Thr Ile
 385 390 395 400

Glu Trp Trp Asn Asp Leu Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala Ser Tyr Val
 405 410 415

Glu Tyr Leu Gly Ala Asp Tyr Ala Glu Pro Thr Trp Asn Leu Lys Asp
 420 425 430

Leu Met Val Leu Asn Asp Val Tyr Arg Val Met Ala Val Asp Ala Leu
 435 440 445

Ala Ser Ser His Pro Leu Ser Thr Pro Ala Ser Glu Ile Asn Thr Pro
 450 455 460

Ala Gln Ile Ser Glu Leu Phe Asp Ala Ile Ser Tyr Ser Lys Gly Ala
 465 470 475 480

Ser Val Leu Arg Met Leu Ser Ser Phe Leu Ser Glu Asp Val Phe Lys
 485 490 495

Gln Gly Leu Ala Ser Tyr Leu His Thr Phe Ala Tyr Gln Asn Thr Ile
 500 505 510

Tyr Leu Asn Leu Trp Asp His Leu Gln Glu Ala Val Asn Asn Arg Ser
 515 520 525

Ile Gln Leu Pro Thr Thr Glu Arg Asp Ile Met Asn Arg Trp Thr Leu
 530 535 540

Gln Met Gly Phe Pro Val Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Gly Thr Leu
 545 550 555 560

Ser Gln Glu His Phe Leu Leu Asp Pro Asp Ser Asn Val Thr Arg Pro
 565 570 575

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 10 -

Ser Glu Phe Asn Tyr Val Trp Ile Val Pro Ile Thr Ser Ile Arg Asp
 580 585 590

Gly Arg Gln Gln Gln Asp Tyr Trp Leu Met Asp Val Arg Ala Gln Asn
 595 600 605

Asp Leu Phe Ser Thr Ser Gly Asn Glu Trp Val Leu Leu Asn Leu Asn
 610 615 620

Val Thr Gly Tyr Tyr Arg Val Asn Tyr Asp Glu Glu Asn Trp Arg Lys
 625 630 635 640

Ile Gln Thr Gln Leu Gln Arg Asp His Ser Ala Ile Pro Val Ile Asn
 645 650 655

Arg Ala Gln Ile Ile Asn Asp Ala Phe Asn Leu Ala Ser Ala His Lys
 660 665 670

Val Pro Val Thr Leu Ala Leu Asn Asn Thr Leu Phe Leu Ile Glu Glu
 675 680 685

Arg Gln Tyr Met Pro Trp Glu Ala Ala Leu Ser Ser Leu Ser Tyr Phe
 690 695 700

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

Leu Lys Lys Gln Val Thr Pro Leu Phe Ile His Phe Arg Asn Asn Thr
 725 730 735

Asn Asn Trp Arg Glu Ile Pro Glu Asn Leu Met Asp Gln Tyr Ser Glu
 740 745 750

Val Asn Ala Ile Ser Thr Ala Cys Ser Asn Gly Val Pro Glu Cys Glu
 755 760 765

Glu Met Val Ser Gly Leu Phe Lys Gln Trp Met Glu Asn Pro Asn Asn
 770 775 780

Asn Pro Ile His Pro Asn Leu Arg Ser Thr Val Tyr Cys Asn Ala Ile
 785 790 795 800

Ala Gln Gly Gly Glu Glu Glu Trp Asp Phe Ala Trp Glu Gln Phe Arg
 805 810 815

WO 03/006646

PCT/EP02/07157

- 11 -

Asn Ala Thr Leu Val Asn Glu Ala Asp Lys Leu Arg Ala Ala Leu Ala
820 825 830

Cys Ser Lys Glu Leu Trp Ile Leu Asn Arg Tyr Leu Ser Tyr Thr Leu
835 840 845

Asn Pro Asp Leu Ile Arg Lys Gln Asp Ala Thr Ser Thr Ile Ile Ser
850 855 860

Ile Thr Asn Asn Val Ile Gly Gln Gly Leu Val Trp Asp Phe Val Gln
865 870 875 880

Ser Asn Trp Lys Lys Pro Phe Asn Asp Tyr Gly Gly Gly Ser Phe Ser
885 890 895

Phe Ser Asn Leu Ile Gln Ala Val Thr Arg Arg Phe Ser Thr Glu Tyr
900 905 910

Glu Leu Gln Gln Leu Glu Gln Phe Lys Lys Asp Asn Glu Glu Thr Gly
915 920 925

Phe Gly Ser Gly Thr Arg Ala Leu Glu Gln Ala Leu Glu Lys Thr Lys
930 935 940

Ala Asn Ile Lys Trp Val Lys Glu Asn Lys Glu Val Val Leu Gln Trp
945 950 955 960

Phe Thr Glu Asn Ser Lys
965

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/07157
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N9/48		
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) EPO-Internal, EMBL, BIOSIS, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 13329 A (BURNHAM INST) 18 March 1999 (1999-03-18) figures 12A-E	1-13, 16-18
X	DOUGLAS S E ET AL: "Molecular investigation of aminopeptidase N expression in the winter flounder, <i>Pleuronectes americanus</i> ." JOURNAL OF APPLIED ICHTHYLOGY, vol. 15, no. 2, May 1999 (1999-05), pages 80-86, XP002222927 ISSN: 0175-8659 figure 1B	1-13, 16-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
28 November 2002		11/12/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5016 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-3300, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pilat, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/07157

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MALFROY B ET AL: "MOLECULAR CLONING AND AMINO SEQUENCE OF RAT KIDNEY AMINOPEPTIDASE M: A MEMBER OF A SUPER FAMILY OF ZINC-METALLOHYDROLASES" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 161, no. 1, 30 May 1989 (1989-05-30), pages 236-241, XP000051775 ISSN: 0006-291X figure 1	1-13, 16-18
X	WATT V M ET AL: "AMINO ACID SEQUENCE DEDUCED FROM A RAT KIDNEY cDNA SUGGESTS IT ENCODES THE Zn-PEPTIDASE AMINOPEPTIDASE N" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 264, no. 10, 5 April 1989 (1989-04-05), pages 5480-5487, XP002138184 ISSN: 0021-9258 abstract; figure 1	1-13, 16-18
X	MIDORIKAWA T ET AL: "Isolation and characterization of cDNA encoding chicken egg yolk aminopeptidase E _y ." COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY. PART B, BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY. ENGLAND MAR 1998, vol. 119, no. 3, March 1998 (1998-03), pages 513-520, XP002222928 ISSN: 1096-4959 figure 1	1-13, 16-18
X	RIKEN GENOME EXPLORATION RESEARCH GROUP PHASE II TEAM AND FANTOM CONSORTIUM: "FUNCTIONAL ANNOTATION OF A FULL-LENGTH MOUSE CDNA COLLECTION" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 409, no. 6821, 8 February 2001 (2001-02-08), pages 685-690, XP001009930 ISSN: 0028-0836	1
X	-& DATABASE EMBL 'Online! EMBL; 8 February 2001 (2001-02-08) "Mus musculus 0 day neonate head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4833403I15:related to AMINOPEPTIDASE N (EC 3.4.11.2) (FRAGMENT), full insert sequence." Database accession no. AK014652 XP002222929 abstract	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of Section 6) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/07157

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 01 83782 A (PLOWMAN GREGORY D ;PAYNE VILIA (US); SUGEN INC (US); WHYTE DAVID () 8 November 2001 (2001-11-08) SEQ ID N°30 -----	1-13, 16-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/EP 02/07157
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. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 15 completely, 16-18 partially because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
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. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 02 07157

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 15 completely, 16-18 partially

Present claims relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely which modulates the activity of aminopeptidase N polypeptide or a polynucleotide. The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides no support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has not been carried out for claim 15 and for claims 16-18 which refer to such a compound.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 02/07157

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9913329	A	18-03-1999	US 6180084 B1	30-01-2001
			AU 9477398 A	29-03-1999
			EP 1015884 A1	05-07-2000
			JP 2001516055 T	25-09-2001
			WO 9913329 A1	18-03-1999
WO 0183782	A	08-11-2001	AU 5947301 A	12-11-2001
			WO 0183782 A2	08-11-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 9/48	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/99	
C 1 2 N 9/48	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 9/99	C 1 2 Q 1/37	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/37	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/566	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 アレックス・スモリアー

アメリカ合衆国 0 2 4 6 7 マサチューセッツ州ブルックライン、ボイルストン・ストリート 7 3 4 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA14 CA04 CA05 CA06 CA09 DA02 DA03 DA12
EA04 FA02 FA10 GA11 GA18 HA03 HA08 HA12 HA14 HA17
4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ44 QQ53 QR08 QR16 QR32 QR41 QR42
QR48 QR55 QR59 QR62 QR66 QR69 QR77 QR82 QS12 QS24
QS25 QS28 QS34 QS36 QX02 QX07
4B065 AA72X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA24 CA33 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 NA14 ZA592
ZB262 ZC022