

FIG. 3A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ゼブラフィッシュ B c 1 - 2 関連 (B 2 R) マルチドメインアポトーシス促進性ポリペプチドまたはゼブラフィッシュ B 2 R B H 3 のみのアポトーシス促進性ポリペプチドである、配列番号 1、5、7 および 9 から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはその改変体。

【請求項 2】

ゼブラフィッシュ B 2 R B H 3 のみのアポトーシス促進性ポリペプチドをコードする、配列番号 2、6、8 および 10 から選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、またはその改変体。

10

【請求項 3】

配列番号 2、6、8 および 10 から選択されるヌクレオチド配列によってコードされる 1 つ以上のポリヌクレオチドを欠失している、トランスジェニックゼブラフィッシュ。

【請求項 4】

配列番号 2、6、8 および 10 から選択される 1 つ以上のポリヌクレオチドの発現が、野生型ゼブラフィッシュにおける該 1 つ以上のポリヌクレオチドの発現と比べて調節されている、トランスジェニックゼブラフィッシュ。

【請求項 5】

前記発現が増加している、請求項 4 に記載のトランスジェニックゼブラフィッシュ。

【請求項 6】

前記発現が減少している、請求項 4 に記載のトランスジェニックゼブラフィッシュ。

20

【請求項 7】

配列番号 1、5、7 および 9 から選択される 1 つ以上のポリペプチドが、発現されない、トランスジェニックゼブラフィッシュ。

【請求項 8】

配列番号 1、5、7 および 9 から選択される 1 つ以上のポリペプチドの発現が、野生型ゼブラフィッシュにおける該 1 つ以上のポリペプチドの発現と比べて調節されている、トランスジェニックゼブラフィッシュ。

【請求項 9】

前記発現が増加している、請求項 8 に記載のトランスジェニックゼブラフィッシュ。

30

【請求項 10】

前記発現が減少している、請求項 8 に記載のトランスジェニックゼブラフィッシュ。

【請求項 11】

1 つ以上の内在性ゼブラフィッシュアポトーシス促進性 (Z P A) 遺伝子が、改変体 Z P A 遺伝子または別の生物由来の Z P A 遺伝子対応物で置換されている、トランスジェニックゼブラフィッシュ。

【請求項 12】

前記対応物が、哺乳動物のものである、請求項 11 に記載のトランスジェニックゼブラフィッシュ。

【請求項 13】

前記対応物が、ヒトのものである、請求項 11 に記載のトランスジェニックゼブラフィッシュ。

40

【請求項 14】

前記内在性 Z P A 遺伝子のすべてが、別の生物由来の Z P A 遺伝子対応物で置換されている、請求項 11 に記載のトランスジェニックゼブラフィッシュ。

【請求項 15】

1 つ以上の内在性内因性アポトーシス経路遺伝子が、内因性アポトーシス経路遺伝子改変体または別の生物由来の内因性アポトーシス経路遺伝子対応物で置換されている、トランスジェニックゼブラフィッシュ。

【請求項 16】

50

前記対応物が、哺乳動物のものである、請求項 15 に記載のトランスジェニックゼブラフィッシュ。

【請求項 17】

前記対応物が、ヒトのものである、請求項 15 に記載のトランスジェニックゼブラフィッシュ。

【請求項 18】

前記内在性内因性アポトーシス経路遺伝子のすべてが、別の生物由来の内因性アポトーシス経路遺伝子対応物で置換されている、請求項 15 に記載のトランスジェニックゼブラフィッシュ。

【請求項 19】

前記 1 つ以上の内在性 ZPA 遺伝子が、配列番号 2、6、8 および 10 から選択される、請求項 11 または請求項 15 に記載のトランスジェニックゼブラフィッシュ。

【請求項 20】

請求項 3 ～ 19 のいずれかに記載のゼブラフィッシュを含む、アポトーシスについてのモデル系。

【請求項 21】

配列番号 2、6、8 および 10 から選択されるヌクレオチド配列によってコードされる少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含む、アポトーシスについてのインビトロモデル系。

【請求項 22】

アポトーシスについての前記モデル系が、内因性アポトーシス経路についてのモデル系である、請求項 20 または請求項 21 に記載のモデル系。

【請求項 23】

配列番号 1、5、7 および 9 から選択される 1 つ以上のポリペプチドを含む、インビトロアポトーシスモデル系。

【請求項 24】

前記モデル系が、内因性アポトーシス経路についてのモデル系である、請求項 23 に記載のアポトーシスモデル系。

【請求項 25】

前記モデル系が、外因性アポトーシス経路についてのモデル系である、請求項 23 に記載のアポトーシスモデル系。

【請求項 26】

ZPA ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、ZPA ポリペプチドを化合物と接触させる工程および該化合物が該 ZPA ポリペプチドに結合するか否かを判定する工程を含む、方法。

【請求項 27】

ZPA ポリペプチドの活性を調節する化合物を同定するための方法であって、ZPA ポリペプチドを化合物と接触させる工程および該化合物が該 ZPA ポリペプチドの活性を調節するか否かを判定する工程を含む、方法。

【請求項 28】

アポトーシスを減少させるかまたは妨害するための薬剤を同定するための方法であって、少なくとも 1 つの薬剤をゼブラフィッシュに投与する工程およびアポトーシスが減少するかまたは妨害されるか否かを判定する工程を含む、方法。

【請求項 29】

前記少なくとも 1 つの薬剤を投与する前に、前記ゼブラフィッシュにおいてアポトーシスの存在または量を測定する工程をさらに含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記少なくとも 1 つの薬剤を投与する前に、前記ゼブラフィッシュにおいてアポトーシスを刺激する工程をさらに含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記薬剤が、内因性アポトーシス経路を介してアポトーシスを減少させるかまたは妨害する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 32】

前記薬剤が、外因性アポトーシス経路を介してアポトーシスを減少させるかまたは妨害する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 33】

前記ゼブラフィッシュにおける 1 つ以上の ZPA タンパク質の発現および／または活性が、野生型ゼブラフィッシュにおける該 1 つ以上の ZPA タンパク質の発現または活性と比べて増加する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 34】

1 つ以上の ZPA タンパク質が、前記ゼブラフィッシュにおいて発現されない、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 35】

前記ゼブラフィッシュにおいて 1 つ以上の ZPA タンパク質の発現および／または活性が、野生型ゼブラフィッシュにおける該 1 つ以上の ZPA タンパク質の発現および／または活性と比べて減少する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 36】

前記薬剤が、抗体、抗体フラグメント、アプタマーおよび低分子から選択される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 37】

前記ゼブラフィッシュが、幼生ゼブラフィッシュである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 38】

前記判定工程が、細胞生存率の顕微鏡検査を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 39】

前記判定工程が、カスパーゼ活性化を測定する工程を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 40】

アポトーシスを開始および／または刺激するための薬剤を同定するための方法であって、少なくとも 1 つの薬剤をゼブラフィッシュに投与する工程およびアポトーシスが開始または増加するか否かを判定する工程を含む、方法。

【請求項 41】

前記少なくとも 1 つの薬剤を投与する前に、前記ゼブラフィッシュにおいてアポトーシスの存在または量を測定する工程をさらに含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記少なくとも 1 つの薬剤を投与する前に、前記ゼブラフィッシュにおいてアポトーシスを妨害する工程および／または減少させる工程をさらに含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 43】

前記薬剤が、内因性アポトーシス経路を介してアポトーシスを開始および／または刺激する、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 44】

前記薬剤が、外因性アポトーシス経路を介してアポトーシスを開始および／または刺激する、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 45】

前記ゼブラフィッシュにおける 1 つ以上の ZPA タンパク質の発現および／または活性が、野生型ゼブラフィッシュにおける該 1 つ以上の ZPA タンパク質の発現または活性と比べて増加する、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 46】

1 つ以上の ZPA タンパク質が、前記ゼブラフィッシュにおいて発現されない、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 47】

10

20

30

40

50

前記ゼブラフィッシュにおいて1つ以上のZPAタンパク質の発現および／または活性が、野生型ゼブラフィッシュにおける該1つ以上のZPAタンパク質の発現および／または活性と比べて減少する、請求項40に記載の方法。

【請求項48】

前記薬剤が、抗体、抗原に結合する抗体フラグメント、アプタマーおよび低分子から選択される、請求項40に記載の方法。

【請求項49】

前記ゼブラフィッシュが、幼生ゼブラフィッシュである、請求項40に記載の方法。

【請求項50】

前記判定工程が、細胞生存率の顕微鏡検査を含む、請求項40に記載の方法。

10

【請求項51】

前記判定工程が、カスパーゼ活性化を測定する工程を含む、請求項40に記載の方法。

【請求項52】

アポトーシス関連障害を処置する方法であって、配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列によってコードされる少なくとも1つのポリペプチドを患者に投与する工程を含む、方法。

【請求項53】

アポトーシス関連障害を処置する方法であって、配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列によってコードされる少なくとも1つのポリペプチドのアンタゴニストを患者に投与する工程を含む、方法。

20

【請求項54】

前記アンタゴニストが、アプタマー、抗体、抗原に結合する抗体フラグメントおよび低分子から選択される、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

アポトーシス関連障害を処置する方法であって、配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列によってコードされる少なくとも1つのポリペプチドのアゴニストを患者に投与する工程を含む、方法。

【請求項56】

アポトーシス関連障害を処置する方法であって、配列番号2、6、8および10のポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの群から選択される少なくとも1つのポリペプチドを患者に投与する工程を含む、方法。

30

【請求項57】

前記アポトーシス関連障害が、細胞増殖性障害、ウイルス性アポトーシス障害、自己免疫障害、血液学的障害および神経障害から選択される、請求項52～56のいずれかに記載の方法。

【請求項58】

アポトーシスを妨害するかまたは減少させるための薬剤を同定するための方法であって、配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列によってコードされる少なくとも1つのポリペプチドを該薬剤と接触させる工程および該薬剤が該少なくとも1つのポリペプチドの活性を阻止するかまたは低下させる能力を測定する工程を含む、方法。

40

【請求項59】

アポトーシスを開始または刺激するための薬剤を同定するための方法であって、配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列によってコードされる少なくとも1つのポリペプチドを該薬剤と接触させる工程および該薬剤が該少なくとも1つのポリペプチドの活性を刺激するかまたは増加させる能力を測定する工程を含む、方法。

【請求項60】

アポトーシスを妨害するかまたは減少させるための薬剤を同定するための方法であって、配列番号2、6、8および10から選択されるヌクレオチド配列によってコードされる少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む細胞を該薬剤と接触させる工程および該薬剤が該少なくとも1つのポリペプチドの発現を妨害するかまたは低下させる能力を測定する工

50

程を含む、方法。

【請求項 6 1】

アポトーシスを開始または刺激するための薬剤を同定するための方法であって、配列番号 2、6、8 および 10 から選択されるヌクレオチド配列によってコードされる少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含む細胞を該薬剤と接触させる工程および該薬剤が該少なくとも 1 つのポリペプチドの発現を刺激するかまたは増加させる能力を測定する工程を含む、方法。

【請求項 6 2】

配列番号 1、5、7 および 9 から選択されるアミノ酸配列によってコードされるポリペプチドまたはそれらに対するアゴニストを含む、アポトーシスを増加させるための組成物

10

【請求項 6 3】

配列番号 1、5、7 および 9 のうちの 1 つ以上のアンタゴニストを含む、アポトーシスを減少させるかまたは妨害するための組成物。

【請求項 6 4】

前記アンタゴニストが、抗体、抗原に結合する抗体フラグメント、アプタマーおよび低分子から選択される、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 6 5】

配列番号 2、6、8 および 10 のうちの 1 つ以上の発現を減少させるかまたは阻害する薬剤を含む、アポトーシスを減少させるかまたは妨害するための組成物。

20

【請求項 6 6】

薬学的に許容可能なキャリアをさらに含む、請求項 6 2 ～ 6 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 6 7】

処置を必要とする被験体においてアポトーシス関連障害を処置する方法であって、該被験体に請求項 6 2 ～ 6 5 のいずれかに記載の組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項 6 8】

前記アポトーシス関連障害が、細胞増殖性障害、ウイルス性アポトーシス障害、自己免疫障害、血液学的障害および神経障害から選択される、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

アポトーシス関連障害またはアポトーシス関連障害に対する素因の存在または重症度を検出する方法であって、該アポトーシス関連障害を発症する危険性のある被験体において Z P A ポリペプチドホモログの存在または量を検出する工程を含む、方法。

30

【請求項 7 0】

アポトーシス関連障害またはアポトーシス関連障害に対する素因の存在または重症度を検出する方法であって、該アポトーシス関連障害を発症する危険性のある被験体において Z P A ポリヌクレオチドホモログの発現の存在または量を検出する工程を含む、方法。

【請求項 7 1】

請求項 6 2 ～ 6 5 のいずれかに記載の組成物および使用についての指示を備えた、キット。

40

【請求項 7 2】

請求項 2 1 ～ 2 5 のいずれかに記載のインビトロアポトーシスモデル系および使用についての指示を備えた、キット。

【請求項 7 3】

(a) 請求項 6 2 ～ 6 5 のいずれかに記載の組成物、(b) 前記組成物を含んでいる容器；および(c) アポトーシス関連障害の処置における該組成物の使用について言及している、該容器に固定されたラベルまたは該容器内に含められた添付文書を備えた、製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

50

発明の分野

本発明は、ZPAポリペプチド、ZPAポリペプチドに関連する抗体、核酸分子、アンタゴニスト、アゴニストおよび組成物ならびにそれらを作製および使用方法に関し、それには、哺乳動物においてアポトーシス関連障害を診断および処置するための方法が含まれる。本発明はまた、内因性アポトーシス経路についてのモデル系にも関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

制御されていない細胞増殖は、種々の細胞型における多くの疾病の原因である。例えば、癌は、増殖して腫瘍を形成する、正常組織由来の異常な細胞または腫瘍性の細胞の数が増加しているときに生じる。この腫瘍細胞は、しばしば隣接する組織を浸潤し、転移と呼ばれるプロセスによって、血液またはリンパ系を介して領域のリンパ節および遠位の部位に広がり得る。癌性増殖では、細胞は、正常細胞が成長しない条件下で増殖する。癌は、様々な程度の侵襲性および攻撃性を特徴とする多岐にわたる形態で現われる。悪性腫瘍（癌）は、心臓疾患に次いで米国の死亡原因の第2位である（Borinら、CA Cancer J. Clin. 43:7（1993））。

【0003】

多くの研究が癌のような細胞増殖性障害に対する新規の処置法を見つけ出すことに充てられている。近年の進歩にもかかわらず、細胞増殖を調節するための新規の細胞内標的の役割を同定し、理解する必要があるにあり、また、代替の処置方法またはより有効な処置方法および治療用薬剤および診断用薬剤を開発する必要があるにある。また、特定の細胞型を処置するためおよび癌のような異常な細胞増殖が原因である疾病またはそれに関連する疾病を処置するための代替の治療薬、ならびに、方法を開発する必要がある。抗癌治療薬を開発する1つのアプローチは、プログラムされた細胞死としても知られているアポトーシスのメカニズムを研究することである。

【0004】

細胞運命を決定するアポトーシスのメカニズムの頑健な管理が、生物の発生、ホメオスタシスおよび細胞傷害応答に必要である。そのような経路の調節不全によって、重篤な疾患が生じることが多い。例えば、多くの癌は、増殖の制御を意図した宿主の応答を逃れるために、アポトーシス促進性経路を選択的に阻害し、そして／または生存促進性経路を選択的に増強する（Kirkira、Biochim Biophys Acta 1644（2-3）:229-249（2004）；LeBlancら、Nature Med. 8:2274-281（2002）；Cory and Adams, Trends Biochem. Sci. 26:61-66（2001））。ゆえに、癌、自己免疫疾患および変性障害をはじめとした種々の疾患を理解し、処置することが、アポトーシスの理解に必要である（Strasser, Nat. Rev. Immunol. 5:189-200（2005）；Strasserら、Biochim Biophys Acta 1333:F151-178（1997））。

【0005】

2つのアポトーシスシグナル伝達経路が、哺乳動物において報告されている（Andersonら、Nat. Rev. Drug Discov. 4（5）:399-409（2005））：代表的にはTNFファミリーの死誘導リガンドによって開始される外因性経路、およびBcl-2ファミリーによって媒介される細胞内の刺激に主に応答する（Strasserら、Nat. Rev. Imm. 5:189-200（2005）；Borner, Mol. Immunol. 39:615-647（2003））が外因性経路の構成要素によっても活性化される内因性経路。

【0006】

Bcl-2タンパク質は、Bcl-2相同（BH）ドメインBH1～BH4として知られている4つの異なるアルファヘリックスの配列モチーフによって特徴付けられる。いくつかの場合において、Bcl-2タンパク質は、ミトコンドリア外膜、核膜または小胞体

10

20

30

40

50

の細胞質の面にそのタンパク質を局在化させるC末端の膜貫通領域も有する (B o r n e r, M o l. I m m u n o l. 39: 615-647 (2003))。B c l-2 タンパク質ファミリーメンバーは、3つの群に分けられ得る: (i) 生存促進性 B c l-2 様タンパク質 (例えば、B c l-2、B c l-x_L、B c l-w、M c l-1、A1/B f l-1、N R-13、B H R F1、L M W5-H L、O R F16、v-B c l-2 (K S H V)、E1B-19K、C E D-9、B o o/D I V A/B c l2-L-10 および B c l-B); (i i) アポトーシス促進性マルチドメインタンパク質 (例えば、B a x、B a k、B o k/M t d および B c l-x_s); および (i i i) B H3 のみ (B H3-o n l y) アポトーシス促進性タンパク質 (例えば、B i k/N b k、B l k、H r k/D P5、B N i p3、B i m L/B o d、B a d、B i d、E G L-1、N o x a、P u m a/B b c3 および B m f) (同文献)。ほとんどの生存促進性メンバーが、4つすべての B Hドメインを含むが、ほとんどのマルチドメインアポトーシス促進性タンパク質は、B H4ドメインを有しない。

【0007】

刺激されていない細胞では、生存促進性ファミリーメンバーとアポトーシス促進性マルチドメインファミリーメンバーとの相互作用によって、B a x 様タンパク質がミトコンドリア膜においてオリゴマー化し、そしてアポトーシスプログラムを開始することが妨害されている。B H3 のみのタンパク質は、刺激されると、生存促進性タンパク質と二量体を形成することによって B a x 様タンパク質の阻害を止め、アポトーシス促進性マルチドメインタンパク質が自由にミトコンドリア膜電位を損ない、アポトーシスを開始する。これまでの実験によって、B c l-2 ファミリーのいくつかのメンバーが、正常な発生に極めて重要であることが証明されている (L i n d s t e n ら、M o l. C e l l. 6: 1389-1399 (2000); M o t o y a m a ら、S c i e n c e 267: 1506-1510 (1995); V e i s ら、C e l l 75: 229-240 (1993); R i n k e n b e r g e r ら、G e n e s D e v. 14: 23-27 (2000))。しかしながら、このタンパク質ファミリーの発生中の機能の大部分は、不明である: 重大な発生の影響を受けた B c l-2 関連遺伝子のノックアウトにおいてでさえも、アポトーシス開始シグナルとそのシグナルに応答して活性化される B H3 のみのタンパク質の両方が、知られていない。

【0008】

B c l-2 に対する配列類似性によって、多くの新規 B c l-2 ファミリーメンバーが脊椎動物において同定されており、そのファミリーの冠名のメンバーは、B細胞リンパ腫における役割にちなんで命名された (T s u j i m o t o ら、S c i e n c e 228: 1440-1443 (1985))。しかしながら、B c l-2 ファミリーメンバーは、発生および制御に極めて重要であるので、このファミリーのタンパク質の1つ以上のメンバーにおける異常またはメンバーの欠失によって、それらの機能的な重要性の特徴付けを妨害する病状または最初の段階において生育不能の動物をもたらす病状を引き起こすことが多い。成長の最初の段階から発生および制御の変化をモニターすることができるモデル系は、アポトーシスにおける B c l-2 ファミリーの遺伝子の役割に関する課題に立ち向かうための重大なツールを提供し得る。

【0009】

ゼブラフィッシュ (D a n i o r e r i o) は、種々の生物学的経路についての有用なモデル系としての機能を果たしている。この魚の生育は速く、かつ、ゼブラフィッシュ胚は胚形成の大部分を通して透明なままであるだけではなく、異常なアポトーシスを示す変異ゼブラフィッシュ系統が利用可能であるので、ゼブラフィッシュは、アポトーシスを研究するためのひときわ優れたモデルとしての機能を果たし得る (例えば、C o l e a n d R o s s, D e v e l. B i o l. 240: 123-142 (2001)) を参照のこと)。アポトーシス細胞およびアポトーシスの全般的な動態の検出が、ゼブラフィッシュにおいて知られているので、アポトーシスパターンを、ゼブラフィッシュにおいて検討している (同文献)。しかしながら、ゼブラフィッシュにおけるアポトーシスパターンに

関与する生化学的な経路は、特徴付けられていない。内因性アポトーシス経路がゼブラフィッシュにおいて機能しているか否かということは、未解決の問題として残っている。

【0010】

ゼブラフィッシュを、内因性経路を介したアポトーシスシグナル伝達についてのモデルとして確立する必要条件は、Bcl-2ファミリーの主要なメンバーが、ゼブラフィッシュに存在することを証明することである。いくつかの研究では、ゼブラフィッシュにおいてBcl-2ファミリーメンバーの同定を試みている。InoharaおよびNunezは、哺乳動物および鳥類の外因性経路メンバー（例えば、カスパーゼ）に相同な多くのゼブラフィッシュ遺伝子を見出しただけでなく、内因性経路Bcl-2ファミリーのたった6つのメンバー（Bcl-x_L、Mcl-1、NR-13、Bax、BNIP3およびBad）におそらく関連する8つのゼブラフィッシュ遺伝子を同定した（非特許文献1）。Coultrasらは、tblastnによって、ゼブラフィッシュ非冗長性データベースおよびEST Genbankデータベースを徹底的に検索し、たった3つのさらなるBH3のみBcl-2ファミリーメンバー：Bid、NoxaおよびBmfを同定した（非特許文献2）。実際、このグループは、翻訳されたBLAST検索を使用してゼブラフィッシュにおいてBik、BimおよびPumaを同定できなかったことについて特に解説している（同文献）。この観察結果は、PSI-BLASTおよびtblastnを使用してEnsemblならびにGenBankのヌクレオチド配列およびタンパク質配列を徹底的に検索した後、Aouacheriaらによって最近確かめられた（非特許文献3）。

【非特許文献1】Inohara and Nunez, Cell Death Differ. (2000) 7: 509-510

【非特許文献2】Coultrasら、Cell Death Differ. (2002) 9: 1163-1166

【非特許文献3】Aouacheriaら、Mol. Biol. Evol. (2005) 22 (12): 2395-416

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

発明の要旨

本発明は、インビボおよびインビトロにおいてアポトーシスを研究するための新規モデル系を提供し、アポトーシスを調節する薬剤を同定するための方法を提供する。本発明はまた、アポトーシス、特に内因性アポトーシス経路を標的化することによって癌をはじめとしたアポトーシス関連疾患を処置または予防するための新規の治療薬、診断用薬剤および方法も提供する。

【0012】

ある特定の実施形態において、本発明は、ゼブラフィッシュアポトーシス促進性（「ZPA」）ポリペプチドおよびポリヌクレオチドを提供する。1つの実施形態において、配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドが提供され、ここで、このポリペプチドは、ゼブラフィッシュBcl-2関連（「B2R」）アポトーシス促進性ポリペプチドである。別の実施形態において、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドが提供され、ここで、このポリペプチドは、ゼブラフィッシュB2Rマルチドメインアポトーシス促進性ポリペプチドである。別の実施形態において、配列番号5、7および9から選択されるアミノ酸を有するポリペプチドが提供され、ここで、このポリペプチドは、ゼブラフィッシュB2R BH3のみのアポトーシス促進性ポリペプチドである。別の実施形態において、配列番号2、6、8および10から選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドが提供され、ここで、このポリヌクレオチドは、ゼブラフィッシュB2Rアポトーシス促進性ポリペプチドをコードする。別の実施形態において、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が提供され、ここで、このポリヌクレオチドは、ゼブラフィッシュB2Rマルチドメインアポトーシス促進性ポ

リペプチドをコードする。別の実施形態において、配列番号 6、8 および 10 から選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドが提供され、ここで、このポリヌクレオチドは、ゼブラフィッシュ B 2 R B H 3 のみのアポトーシス促進性ポリペプチドをコードする。

【0013】

他の実施形態において、本発明は、1つ以上のアポトーシス関連タンパク質に対するゼブラフィッシュトランスジェニックを提供する。1つの実施形態において、配列番号 2、6、8 および 10 から選択される 1つ以上のポリヌクレオチドを欠失しているトランスジェニックゼブラフィッシュが提供される。別の実施形態において、配列番号 2、6、8 および 10 から選択される 1つ以上のポリヌクレオチドの発現が、野生型ゼブラフィッシュにおける前記 1つ以上のポリヌクレオチドの発現と比べて調節されているトランスジェニックゼブラフィッシュが提供される。1つの局面において、その発現は、増加する。別の局面において、その発現は、減少する。別の実施形態において、配列番号 1、5、7 および 9 から選択される 1つ以上のポリペプチドが発現されないトランスジェニックゼブラフィッシュが提供される。別の実施形態において、配列番号 1、5、7 および 9 から選択される 1つ以上のポリペプチドの発現が、野生型ゼブラフィッシュにおける 1つ以上のポリペプチドの発現と比べて調節されているトランスジェニックゼブラフィッシュが提供される。1つの局面において、その発現は、増加する。別の局面において、その発現は、減少する。

【0014】

別の実施形態において、1つ以上の内在性 B 2 R 遺伝子が別の生物由来の B 2 R 遺伝子対応物で置換されているトランスジェニックゼブラフィッシュが提供される。1つの局面において、その対応物は、哺乳動物のものである。別の局面において、その対応物は、ヒトのものである。別の局面において、内在性 B 2 R 遺伝子のすべては、別の生物由来の B 2 R 遺伝子対応物で置換されている。1つの局面において、その対応物は、哺乳動物のものである。別の局面において、その対応物は、ヒトのものである。別の実施形態において、1つ以上の内在性内因性アポトーシス経路遺伝子が別の生物由来の内因性アポトーシス経路遺伝子対応物で置換されているトランスジェニックゼブラフィッシュが提供される。1つの局面において、その対応物は、哺乳動物のものである。別の局面において、その対応物は、ヒトのものである。別の局面において、その 1つ以上の内在性内因性アポトーシス経路遺伝子は、配列番号 2、6、8 および 10 から選択される。別の実施形態において、内在性内因性アポトーシス経路遺伝子のすべてが、別の生物由来の内因性アポトーシス経路遺伝子対応物で置換されているトランスジェニックゼブラフィッシュが提供される。1つの局面において、その対応物は、哺乳動物のものである。別の局面において、その対応物は、ヒトのものである。別の局面において、その内在性内因性アポトーシス経路遺伝子は、配列番号 2、6、8 および 10 を含む。

【0015】

ある特定の実施形態において、本発明は、アポトーシスについてのモデル系を提供する。1つの実施形態において、先の実施形態のいずれかに記載されたようなゼブラフィッシュを含むアポトーシスについてのモデル系が提供される。1つの局面において、そのモデル系は、内因性アポトーシス経路についてのモデル系である。別の実施形態において、配列番号 1、5、7 および 9 から選択されるアミノ酸配列によってコードされる少なくとも 1つのポリペプチドを含む、アポトーシスについてのインビトロモデル系が提供される。1つの局面において、そのモデル系は、内因性アポトーシス経路についてのモデル系である。別の局面において、そのモデル系は、外因性アポトーシス経路についてのモデル系である。別の実施形態において、配列番号 2、6、8 および 10 から選択されるヌクレオチド配列によってコードされる少なくとも 1つのポリヌクレオチドを含む、アポトーシスについてのインビトロモデル系が提供される。1つの局面において、そのモデル系は、内因性アポトーシス経路についてのモデル系である。別の局面において、そのモデル系は、外因性アポトーシス経路についてのモデル系である。

【0016】

ある特定の実施形態において、本発明は、ZPAポリペプチドに結合する化合物を同定する方法を提供し、その方法は、ZPAポリペプチドを化合物と接触させる工程およびその化合物がZPAポリペプチドに結合するか否かを判定する工程を含む。ある特定の実施形態において、本発明は、ZPAポリペプチドの活性を調節する化合物を同定するための方法を提供し、この方法は、ZPAポリペプチドを化合物と接触させる工程およびその化合物がZPAポリペプチドの活性を調節するか否かを判定する工程を含む。

【0017】

ある特定の実施形態において、本発明は、アポトーシスを調節する薬剤を同定するための方法を提供する。1つの実施形態において、アポトーシスを減少させるかまたは妨害するための薬剤を同定するための方法が提供され、この方法は、少なくとも1つの薬剤をゼブラフィッシュに投与する工程およびアポトーシスが減少するかまたは妨害されるか否かを判定する工程を含む。1つの局面において、その方法は、前記少なくとも1つの薬剤を投与する前に、前記ゼブラフィッシュにおいてアポトーシスの存在または量を測定する工程をさらに含む。別の局面において、その方法は、前記少なくとも1つの薬剤を投与する前に、前記ゼブラフィッシュにおいてアポトーシスを刺激する工程をさらに含む。別の局面において、その薬剤は、内因性アポトーシス経路を介してアポトーシスを減少させるかまたは妨害する。別の局面において、その薬剤は、外因性アポトーシス経路を介してアポトーシスを減少させるかまたは妨害する。別の局面において、前記ゼブラフィッシュにおける前記1つ以上のB2Rタンパク質の発現および／または活性は、野生型ゼブラフィッシュにおける1つ以上のB2Rタンパク質の発現または活性と比べて増加している。別の局面において、1つ以上のB2Rタンパク質は、前記ゼブラフィッシュにおいて発現されない。別の局面では、前記ゼブラフィッシュにおいて1つ以上のB2Rタンパク質の発現および／または活性は、野生型ゼブラフィッシュにおける前記1つ以上のB2Rタンパク質の発現および／または活性と比べて減少している。別の局面において、前記薬剤は、抗体、抗原に結合する抗体フラグメント、アプタマーおよび低分子から選択される。別の局面において、前記ゼブラフィッシュは、幼生ゼブラフィッシュである。別の局面において、前記判定工程は、細胞生存率の顕微鏡検査を含む。別の局面において、前記判定工程は、カスパーゼ活性化を測定する工程を含む。

【0018】

別の実施形態において、アポトーシスを開始および／または刺激するための薬剤を同定するための方法が提供され、その方法は、少なくとも1つの薬剤をゼブラフィッシュに投与する工程およびアポトーシスが開始または増加するか否かを判定する工程を含む。1つの局面において、その方法は、前記少なくとも1つの薬剤を投与する前に、前記ゼブラフィッシュにおいてアポトーシスの存在または量を測定する工程をさらに含む。別の局面において、その方法は、前記少なくとも1つの薬剤を投与する前に、前記ゼブラフィッシュにおいてアポトーシスを妨害する工程および／または減少させる工程をさらに含む。別の局面において、前記薬剤は、内因性アポトーシス経路を介してアポトーシスを開始および／または刺激する。別の局面において、前記薬剤は、外因性アポトーシス経路を介してアポトーシスを開始および／または刺激する。別の局面において、前記ゼブラフィッシュにおける1つ以上のB2Rタンパク質の発現および／または活性は、野生型ゼブラフィッシュにおける1つ以上のB2Rタンパク質の発現または活性と比べて増加している。別の局面において、1つ以上のB2Rタンパク質は、前記ゼブラフィッシュにおいて発現されない。別の局面において、1つ以上のB2Rタンパク質の発現および／または活性は、野生型ゼブラフィッシュにおける1つ以上のB2Rタンパク質の発現および／または活性と比べて、前記ゼブラフィッシュにおいて減少している。別の局面において、前記薬剤は、抗体、抗原に結合する抗体フラグメント、アプタマーおよび低分子から選択される。別の局面において、前記ゼブラフィッシュは、幼生ゼブラフィッシュである。別の局面において、前記判定工程は、細胞生存率の顕微鏡検査を含む。別の局面において、前記判定工程は、カスパーゼ活性化を測定する工程を含む。

【0019】

ある特定の実施形態において、本発明は、アポトーシスを調節するための薬剤を同定するためのさらなる方法を提供する。1つの実施形態において、アポトーシスを妨害するかまたは減少させるための薬剤を同定するための方法が提供され、この方法は、配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列によってコードされる少なくとも1つのポリペプチドを前記薬剤と接触させる工程およびその薬剤がその少なくとも1つのポリペプチドの活性を阻止するかまたは低下させる能力を測定する工程を含む。別の実施形態において、アポトーシスを妨害するかまたは減少させるための薬剤を同定するための方法が提供され、この方法は、配列番号2、6、8および10から選択されるヌクレオチド配列によってコードされる少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む細胞を前記薬剤と接触させる工程およびその薬剤がその少なくとも1つのポリペプチドの発現を予防する能力または低下させる能力を測定する工程を含む。

10

【0020】

別の実施形態において、アポトーシスを開始または刺激するための薬剤を同定するための方法が提供され、この方法は、配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列によってコードされる少なくとも1つのポリペプチドを前記薬剤と接触させる工程およびその薬剤がその少なくとも1つのポリペプチドの活性を刺激するかまたは増加させる能力を測定する工程を含む。1つの実施形態において、アポトーシスを開始または刺激するための薬剤を同定するための方法、配列番号2、6、8および10から選択されるヌクレオチド配列によってコードされる少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む細胞を前記薬剤と接触させる工程およびその薬剤がその少なくとも1つのポリペプチドの発現を刺激するかまたは増加させる能力を測定する工程を含む。

20

【0021】

ある特定の実施形態において、本発明は、処置方法を提供する。1つの実施形態において、アポトーシス関連障害を処置する方法が提供され、この方法は、配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列によってコードされる少なくとも1つのポリペプチドを患者に投与する工程を含む。別の実施形態において、アポトーシス関連障害を処置する方法が提供され、この方法は、そのような処置を必要とする患者に配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列によってコードされる少なくとも1つのポリペプチドの有効量を投与することによって、アポトーシス関連障害をその患者において処置する工程を含む。別の実施形態において、アポトーシス関連障害を処置する方法が提供され、この方法は、配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列によってコードされる少なくとも1つのポリペプチドのアゴニストを患者に投与する工程を含む。別の実施形態において、アポトーシス関連障害を処置する方法が提供され、この方法は、そのような処置を必要とする患者に、配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列によってコードされる少なくとも1つのポリペプチドのアゴニストの有効量を投与することによって、アポトーシス関連障害をその患者において処置する工程を含む。別の実施形態において、アポトーシス関連障害を処置する方法が提供され、この方法は、配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列によってコードされる少なくとも1つのポリペプチドのアンタゴニストを患者に投与する工程を含む。別の実施形態において、アポトーシス関連障害を処置するが提供され、この方法は、そのような処置を必要とする患者に、配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列によってコードされる少なくとも1つのポリペプチドのアンタゴニストの有効量を投与することによって、アポトーシス関連障害をその患者において処置する工程を含む。1つの局面において、前記アンタゴニストは、アプタマー、抗体、抗原に結合する抗体フラグメントおよび低分子から選択される。別の局面において、前記アポトーシス関連障害は、細胞増殖性障害、ウイルス性アポトーシス障害、自己免疫障害、血液学的障害および神経障害から選択される。1つの局面において、前記アポトーシス関連障害は、癌である。別の実施形態において、アポトーシス関連障害を処置するが提供され、この方法は、配列番号2、6、8および10のポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの群から選択される少なくとも1つ

30

40

50

のポリペプチドを患者に投与する工程を含む。1つの局面において、前記アポトーシス関連障害は、細胞増殖性障害、ウイルス性アポトーシス障害、自己免疫障害、血液学的障害および神経障害から選択される。1つの局面において、そのアポトーシス関連障害は、癌である。

【0022】

ある特定の実施形態において、本発明は、アポトーシスを調節するための組成物を提供する。1つの実施形態において、アポトーシスを増加させるための組成物が提供され、この組成物は、配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列によってコードされるポリペプチドを含む。1つの局面において、その組成物は、薬学的に許容可能なキャリアをさらに含む。別の実施形態において、アポトーシスを増加させるための組成物が提供され、この組成物は、配列番号1、5、7および9から選択されるアミノ酸配列によってコードされるポリペプチドのアゴニストを含む。別の実施形態において、アポトーシスを減少させるかまたは妨害するための組成物が提供され、この組成物は、配列番号1、5、7および9のうちの1つ以上のアンタゴニストを含む。1つの局面において、そのアンタゴニストは、抗体、抗原に結合する抗体フラグメント、アプタマーおよび低分子から選択される。別の局面において、その組成物は、薬学的に許容可能なキャリアをさらに含む。別の実施形態において、アポトーシスを減少させるかまたは妨害するための組成物が提供され、この組成物は、配列番号2、6、8および10のうちの1つ以上の発現を減少させるかまたは阻害する薬剤を含む。1つの局面において、その組成物は、薬学的に許容可能なキャリアをさらに含む。

【0023】

ある特定の実施形態において、本発明は、アポトーシス関連障害を処置する必要がある被験体においてそのような処置を行う方法を提供し、この方法は、本発明の組成物のうちの少なくとも1つを投与する工程を含む。ある特定の実施形態において、本発明は、アポトーシス関連障害を処置する必要がある被験体においてそのような処置を行う方法を提供し、その方法は、本発明の組成物の少なくとも1つの有効量を投与するによって、アポトーシス関連障害をその患者において処置する工程を含む。ある特定の局面において、前記アポトーシス関連障害は、細胞増殖性障害、ウイルス性アポトーシス障害、自己免疫障害、血液学的障害および神経障害から選択される。

【0024】

ある特定の実施形態において、本発明は、被験体においてアポトーシス関連障害の存在、重症度および／またはそれに対する素因を検出する方法を提供する。1つの実施形態において、アポトーシス関連障害の存在は、被験体由来の細胞内のZPAポリペプチドの存在または量を検出することによって検出される。別の実施形態において、アポトーシス関連障害に対する素因は、被験体由来の細胞内のZPAポリペプチドの存在または量を検出することによって検出される。別の実施形態において、アポトーシス関連障害の重症度は、被験体由来の細胞内のZPAポリペプチドの存在または量を検出することによって検出される。別の実施形態において、アポトーシス関連障害の存在は、被験体由来の細胞内のZPAポリペプチドホモログの存在または量を検出することによって検出される。別の実施形態において、アポトーシス関連障害に対する素因は、被験体由来の細胞内のZPAポリペプチドホモログの存在または量を検出することによって検出される。別の実施形態において、アポトーシス関連障害の重症度は、被験体由来の細胞内のZPAポリペプチドホモログの存在または量を検出することによって検出される。ある特定の局面において、前記アポトーシス関連障害は、細胞増殖性障害、ウイルス性アポトーシス障害、自己免疫障害、血液学的障害および神経障害から選択される。

【0025】

別の実施形態において、アポトーシス関連障害の存在は、被験体由来の細胞内のZPAポリヌクレオチドの発現の存在または量を検出することによって検出される。別の実施形態において、アポトーシス関連障害に対する素因は、被験体由来の細胞内のZPAポリヌクレオチドの発現の存在または量を検出することによって検出される。別の実施形態にお

いて、アポトーシス関連障害の重症度は、被験体由来の細胞内のZPAポリヌクレオチドの発現の存在または量を検出することによって検出される。別の実施形態において、アポトーシス関連障害の存在は、被験体由来の細胞内のZPAポリヌクレオチドホモログの発現の存在または量を検出することによって検出される。別の実施形態において、アポトーシス関連障害に対する素因は、被験体由来の細胞内のZPAポリヌクレオチドホモログの発現の存在または量を検出することによって検出される。別の実施形態において、アポトーシス関連障害の重症度は、被験体由来の細胞内のZPAポリヌクレオチドホモログの発現の存在または量を検出することによって検出される。ある特定の局面において、前記アポトーシス関連障害は、細胞増殖性障害、ウイルス性アポトーシス障害、自己免疫障害、血液学的障害および神経障害から選択される。

10

【0026】

ある特定の実施形態において、本発明はまた、任意の有用な組み合わせで、本明細書中に記載される化合物および組成物についてのキットおよび製品も提供する。1つの実施形態において、本発明の組成物のうちの1つ以上および使用についての指示を備えたキットが提供される。1つの局面において、その使用は、治療上の使用である。別の局面において、その使用は、診断上の使用である。別の局面において、その使用は、研究上の使用である。別の実施形態において、インビトロ内因性アポトーシス経路モデル系およびその使用についての指示を備えたキットが提供される。1つの局面において、その使用は、診断上の使用である。別の局面において、その使用は、研究上の使用である。別の実施形態において、ゼブラフィッシュ内因性アポトーシス経路モデル系およびその使用についての指示を備えたキットが提供される。1つの局面において、その使用は、診断上の使用である。別の局面において、その使用は、研究上の使用である。別の実施形態において、本発明は、(a) 1つ以上のZPAポリペプチド、アゴニストおよびアンタゴニストを含む組成物、(b) 前記組成物を含んでいる容器；および(c) アポトーシス関連障害の処置におけるその組成物の使用について言及している、その容器に固定されたラベルまたはその容器内に含められた添付文書を備えた製品を提供する。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

発明の詳細な説明

本出願人は、カスタマイズされた検索手法を使用して、これまで不明だった、Bcl-2ファミリータンパク質に関連する5つのゼブラフィッシュ遺伝子を同定し、そのうちの4つは、これまでゼブラフィッシュにおいて同定されていなかったBcl-2ファミリーメンバー：Bak、Bik、PumaおよびBimである。本出願人はまた、ある特定のゼブラフィッシュBcl-2関連(「B2R」)タンパク質の機能的活性を本明細書中で初めて特徴付け、そしてゼブラフィッシュにおける内因性アポトーシス経路の存在および機能ならびに内因性アポトーシス経路についてのモデル系としてのゼブラフィッシュの有用性を証明する。本出願人の発明によって、アポトーシスを妨害し、減少させ、開始し、そして/または刺激する新規の薬剤および治療薬ならびにアポトーシス関連障害におけるBcl-2遺伝子および/または内因性アポトーシス経路の役割を研究する新規方法の同定が可能になる。本出願人の発明はまた、異常なアポトーシスに関連するかまたはそれによって引き起こされる疾患または障害を処置するための新規治療薬および処置する方法を提供する。

30

40

【0028】

本明細書中に記載されるように、配列番号1、3、5、7および9(それぞれ配列番号2、4、6、8および10によってコードされる)は、内因性アポトーシス経路に関連するBcl-2ファミリータンパク質のある特定のヒトメンバーに相同である。配列番号1は、マルチドメインアポトーシス促進性タンパク質であるヒトBakと配列同一性を有するゼブラフィッシュタンパク質である。配列番号3は、BH3のみアポトーシス促進性タンパク質であるヒトBadと配列同一性を有するゼブラフィッシュタンパク質である。配列番号5は、BH3のみアポトーシス促進性タンパク質であるヒトBikと配列同一性を

50

有するゼブラフィッシュタンパク質である。配列番号7は、BH3のみアポトーシス促進性タンパク質であるヒトPumaと配列同一性を有するゼブラフィッシュタンパク質である。配列番号9は、BH3のみアポトーシス促進性タンパク質であるBmfと配列同一性を有するゼブラフィッシュタンパク質である。本出願人はまた、BH3のみアポトーシス促進性タンパク質であるヒトBimのゼブラフィッシュホモログを同定したが、実施例2(d)に記載されるように、この遺伝子は、ゼブラフィッシュゲノムの現在の構築における明らかな誤りに起因してクローニングされ得なかったものである。

【0029】

配列番号2、6、8および10（配列番号1、5、7および9のタンパク質をコードする）は、ゼブラフィッシュゲノムプロジェクトの一部として以前に同定されたが、本出願人の研究まで、（1）ヒトBcl-2ファミリーメンバーのコードホモログとして同定されていなかったか、または（2）1つ以上のアポトーシス経路のコードメンバーと関係付けられていなかった。本出願人は、配列同一性／配列類似性と機能解析の両方によって、配列番号1、5、7および9を本明細書中に記載されるようにそれぞれヒトBak、Bik、PumaおよびBmfのゼブラフィッシュホモログと同定した。

【0030】

それゆえ、本発明は、1つの実施形態において、ゼブラフィッシュB2RマルチドメインまたはBH3のみアポトーシス促進性タンパク質である配列番号1、3、5、7および9から選択されるタンパク質、それらを含む組成物ならびにそれらのタンパク質および組成物を使用する方法を提供する。本発明はまた、別の実施形態において、ゼブラフィッシュB2RマルチドメインまたはBH3のみアポトーシス促進性タンパク質をコードする配列番号2、4、6、8および10から選択されるポリヌクレオチド、それらを含む組成物ならびにそれらのポリヌクレオチドおよび組成物を使用する方法を提供する。別の実施形態において、配列番号1、3、5、7および9から選択される配列に対して1つ以上のアミノ酸の付加、欠失または変異を含む改変体タンパク質が提供される。別の実施形態において、配列番号2、4、6、8および10から選択される配列に対して1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失または変異を含む改変体ポリヌクレオチドが提供される。

【0031】

本発明のタンパク質、改変体タンパク質、核酸および改変体核酸は、治療上の目的に使用され得る。例えば、本発明のZPA（「ゼブラフィッシュアポトーシス促進性」）タンパク質またはそれらの改変体の1つ以上は、アポトーシスの増加が望ましいアポトーシス関連障害（例えば、細胞増殖障害）を処置する治療薬として使用され得る。本発明また、本発明の1つ以上のZPAタンパク質および薬学的に許容可能なキャリアを含み、必要に応じて1つ以上のさらなる治療薬を含む組成物を提供する。別の実施形態において、本発明のZPA核酸またはそれらの改変体の1つ以上は、例えば、患者の細胞において1つ以上のZPAタンパク質を発現させるような処置を必要とする被験体においてその核酸を発現することによって、アポトーシスの増加が望ましいアポトーシス関連障害を処置する治療薬として使用され得る。ゼブラフィッシュのタンパク質および核酸は、例えば、抗自己反応を引き起こす危険性が低いので、任意の哺乳動物のホモログよりも治療薬としての使用に好ましい場合がある。

【0032】

本発明のZPAタンパク質はまた、アポトーシスを開始、刺激、阻害または阻止する薬剤を同定する方法における有用性も見出される。1つ以上のZPAタンパク質に対するアゴニストは、内因性アポトーシス経路において1つ以上のZPAタンパク質の活性を開始または刺激する能力によって同定され得る。そのような刺激は、例えば、ZPAタンパク質を活性化することによるものであり得るか、またはZPAタンパク質活性を正常に阻害する1つ以上の分子で妨害することによるものであり得、適当なアゴニストとしては、抗体および低分子が挙げられるが、これらに限定されない。逆に、1つ以上のZPAタンパク質に対するアンタゴニストは、内因性アポトーシス経路において1つ以上のZPAタンパク質の活性を阻止または阻害する能力によって同定され得る。そのような阻害は、例え

ば、ZPAタンパク質が1つ以上のリガンドもしくは標的に結合することの妨害によるものであり得るか、またはZPAタンパク質自体の活性の妨害によるものであり得、適当なアンタゴニストとしては、抗体およびその抗原結合フラグメント、アプタマーおよび低分子が挙げられる。内因性アポトーシス経路においてZPAタンパク質活性を測定するある特定の適切なアッセイは、本明細書中に記載される。ZPAタンパク質アゴニストは、アポトーシスの増加が望ましいアポトーシス関連障害を処置する治療薬として使用され得、また、ZPAタンパク質アンタゴニストは、アポトーシスの減少が望ましいアポトーシス関連障害を処置する治療薬として使用され得る。

【0033】

内因性アポトーシス経路は、プログラムされた細胞死を指示する細胞内シグナルに対して応答する。この経路の調節不全によって、不適切なアポトーシスまたは不適切なアポトーシスの欠如がもたらされ得、このいずれかは、癌のような障害をもたらし得る。従って、1つ以上の経路の構成要素の発現および／または活性を乱すことができ、そしてその反動を直ちに検討できるアポトーシスの経路およびモデル系をより一層理解することが必要である。本明細書中に記載されるZPAタンパク質の同定および解析に加えて、本出願人はまた、これまで哺乳動物において特徴付けられていた内因性アポトーシス経路に類似する内因性アポトーシス経路が、ゼブラフィッシュにおいて存在することも証明した。

【0034】

従って、本発明はまた、アポトーシスを研究するためのモデル系としてゼブラフィッシュを使用する方法も提供する。いくつかの実施形態において、1つ以上のZPAタンパク質の発現および／または活性が野生型ゼブラフィッシュと比べて調節されているトランスジェニックゼブラフィッシュが提供される。そのようなトランスジェニックゼブラフィッシュは、ゼブラフィッシュアポトーシス経路の正常な働きを解明する役割を果たし得、また、アゴニスト作用またはアンタゴニスト作用のアポトーシス活性を有する薬剤についてスクリーニングする際に使用するためのツールを提供し得る。他の実施形態において、本発明は、1つ以上のZPAタンパク質が、他の生物由来の対応物で置換されているトランスジェニックゼブラフィッシュを提供することによって、コファクター、環境要因または配列および構造の変更が、特定のアポトーシス経路の構成要素の機能に影響を及ぼすか否か、また、どの程度影響を及ぼすかを評価するモデル系が作製される。いくつかの実施形態において、ゼブラフィッシュ内因性アポトーシス経路タンパク質のすべて（すなわち、B2Rタンパク質のすべて）が、別の生物（すなわち、哺乳動物のまたはヒト）由来の内因性アポトーシス経路の成分で遺伝的に置換される。そのようなトランスジェニックゼブラフィッシュは、他の生物において可能だった程度よりもかなり容易に検討し、操作することができる、内因性アポトーシス経路を研究するためのツールを提供する。

【0035】

いくつかの実施形態において、その解析を妨害し得る他の経路または刺激の非存在下で内因性アポトーシス経路メンバー間の生化学的な相互作用を検討することが、有用であり得る。従って、本発明はまた、インビトロモデル系も提供することによって、必要に応じて1つ以上のコファクター、試薬、インヒビターおよび／または刺激物質を用いて、ゼブラフィッシュ内因性アポトーシス経路がインビトロにおいて再構成される。1つの局面において、そのインビトロモデル系は、活性または量に変更された1つ以上のZPAタンパク質を含む。別の局面において、そのインビトロモデル系は、活性または量に変更された1つ以上のB2Rタンパク質を含む。別の局面において、そのインビトロモデル系は、1つ以上のZPAタンパク質改変体を含む。別の局面において、そのインビトロモデル系は、少なくとも1つのZPAタンパク質を欠く。別の局面において、そのインビトロモデル系は、少なくとも1つのB2Rタンパク質を欠く。別の局面において、少なくとも1つのZPAタンパク質は、別の生物由来の対応タンパク質で置換されている。別の局面において、少なくとも1つのB2Rタンパク質は、別の生物由来の対応タンパク質で置換されている。

10

20

30

40

50

【0036】

本明細書中に記載されるZPAタンパク質および核酸もまた、被験体におけるアポトーシス関連障害の検出における用途が見出される。1つの実施形態において、アポトーシス関連障害の存在は、被験体由来の細胞内のZPAポリペプチドまたはZPAポリペプチドホモログの存在または量を検出することによって検出される。別の実施形態において、アポトーシス関連障害に対する素因は、被験体由来の細胞内のZPAポリペプチドまたはZPAポリペプチドホモログの存在または量を検出することによって検出される。別の実施形態において、アポトーシス関連障害の重症度は、被験体由来の細胞内のZPAポリペプチドまたはZPAポリペプチドホモログの存在または量を検出することによって検出される。

10

【0037】

別の実施形態において、アポトーシス関連障害の存在は、被験体由来の細胞内のZPAポリヌクレオチドまたはZPAポリヌクレオチドホモログの発現の存在または量を検出することによって検出される。別の実施形態において、アポトーシス関連障害に対する素因は、被験体由来の細胞内のZPAポリヌクレオチドまたはZPAポリヌクレオチドホモログの発現の存在または量を検出することによって検出される。別の実施形態において、アポトーシス関連障害の重症度は、被験体由来の細胞内のZPAポリヌクレオチドまたはZPAポリヌクレオチドホモログの発現の存在または量を検出することによって検出される。

20

【0038】

本発明はまた、任意の有用な組み合わせで、本明細書中に記載される化合物および組成物についてのキットおよび製品も提供する。例えば、本発明の組成物のうちの1つ以上および使用（例えば、治療上、診断上および／または研究上の使用）についての指示を備えたキットが提供される。別の例では、インビトロ内因性アポトーシス経路モデル系またはゼブラフィッシュ内因性アポトーシス経路モデル系および研究においてそれを使用するための指示またはアポトーシスを調節する薬剤についてスクリーニングするための指示を備えたキットが提供される。

【0039】

これらの方法、組成物、モデル系、キットおよび製品の詳細は、本明細書中に提供される。

30

【0040】

定義

用語「Bcl-2関連タンパク質」、「Bcl-2関連ポリペプチド」および「B2Rタンパク質」は、本明細書中で使用されるとき、別段明記されない限り、ネイティブ配列ポリペプチド、ポリペプチド改変体ならびにネイティブ配列ポリペプチドおよびポリペプチド改変体のフラグメント（これらは本明細書中でさらに定義される）を含む。B2Rタンパク質は、本発明の抗体を使用することによってまたは寄託された核酸分子の使用を含む組換え方法もしくは合成方法によって、様々な種、例えば、ヒトから得ることができる。ある特定の実施形態において、B2Rタンパク質は、ゼブラフィッシュから得られる。B2Rタンパク質をゼブラフィッシュから得るとき、それを「zB2Rタンパク質」と命名する。B2Rタンパク質としては、Bcl-2様生存因子（Bcl2、Bcl-x_L、Bcl-w、Mcl-1、A1/Bfl-1、NR-13、BHRF1、LMW5-HL、ORF16、v-Bcl-2（KSHV）、E1B-19K、CED-9、Bcl-2/DIVA/Bcl2-L-10、Bcl-Bが挙げられるがこれらに限定されない）；アポトーシス促進性マルチドメイン因子（Bax、Bpr、Bak、Bok/Mtd、Bcl-Rambo、Bcl-x_sおよびBcl-Gが挙げられるがこれらに限定されない）；およびアポトーシス促進性BH3のみ因子（Bik/Nbk、Bik、Hrk/DP5、BNIP3、BimL/Bod、Bad、Bid、EG1-1、Noxa、PUMA/Bbc3、Bmf、Bnip1、Bnip2およびBnip3が挙げられるがこれらに限定されない）が挙げられるが、これらに限定されない。zB2Rタンパク質としては、生存

40

50

促進性因子（z B l p 1、z B l p 2、z M c l - 1 a、z M c l - 1 bおよびz N R 1 3が挙げられるがこれらに限定されない）；アポトーシス促進性マルチドメイン因子（z B a k、z B a x、z B o k 1およびz B o k 2が挙げられるがこれらに限定されない）；およびアポトーシス促進性BH3のみ因子（z B a d 1、z B a d 2、z B i d、z B i k、z B m f 1、a B m f 2、z N o x a、z P u m aおよびz B i mが挙げられるがこれらに限定されない）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0041】

用語「ゼブラフィッシュアポトーシス促進性（p r o - a p o p t o s i s）タンパク質」、「ゼブラフィッシュアポトーシス促進性（p r o - a p o p t o s i s）ポリペプチド」、「ゼブラフィッシュアポトーシス促進性（p r o - a p o p t o t i c）タンパク質」、「ゼブラフィッシュアポトーシス促進性（p r o - a p o p t o t i c）ポリペプチド」、「Z P Aポリペプチド」および「Z P Aタンパク質」は、本明細書中で交換可能に使用され、それらは、別段明記されない限り、ネイティブ配列ポリペプチド、ポリペプチド改変体ならびにネイティブ配列ポリペプチドおよびポリペプチド改変体のフラグメント（これらは本明細書中でさらに定義される）を含む。Z P Aタンパク質は、本発明の抗体を使用することによってまたは寄託された核酸分子の使用を含む組換え方法もしくはは合成方法によって、ゼブラフィッシュから得ることができる。Z P Aタンパク質には、本明細書中で同定されるゼブラフィッシュタンパク質、例えば、z B a k（配列番号1）、z B i k（配列番号5）、z B i m、z P u m a（配列番号7）およびz B m f 2（配列番号9）が含まれる。

【0042】

用語「内因性アポトーシス経路」、「内因性アポトーシス経路」または「内因性経路」は、本明細書中で交換可能に使用され、これらは、細胞内で開始される細胞のアポトーシスをもたらす細胞の生化学的経路のことをいう。

【0043】

用語「外因性アポトーシス経路」、「外因性アポトーシス経路」および「外因性経路」は、本明細書中で交換可能に使用され、これらは、細胞外で開始される細胞のアポトーシスをもたらす細胞の生化学的経路のことをいう。

【0044】

本明細書中で使用されるとき、用語「ゼブラフィッシュ」とは、属および種がD a n i o r e r i oであると考えられる任意の魚類または魚類の系統のことをいう。

【0045】

「ネイティブ配列」ポリペプチドまたは「ネイティブ」ポリペプチドは、天然に由来するポリペプチド（例えば、抗体）と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドである。「ネイティブ配列」ポリペプチドは、天然に由来するポリペプチド（例えば、抗体）と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドである。そのようなネイティブ配列ポリペプチドは、天然から単離することができるか、または組換え手段もしくはは合成手段によって生成することができる。従って、ネイティブ配列ポリペプチドは、天然に存在するヒトポリペプチド、ゼブラフィッシュポリペプチドまたは他の任意の種由来のポリペプチドのアミノ酸配列を有し得る。「ネイティブ配列」Z P Aポリペプチドまたは「ネイティブ」Z P Aポリペプチドは、天然に由来し、対応するZ P Aポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。例えば、1つの実施形態において、ゼブラフィッシュZ P Aタンパク質z P u m aのネイティブ配列をコードする核酸配列は、配列番号8および実施例2（e）に見出され得る。

【0046】

そのようなZ P Aポリペプチドは、天然から単離することができるか、または組換え手段もしくはは合成手段によって生成することができる。用語「ネイティブ配列」Z P Aポリペプチドもしくはは「ネイティブ配列」Z P Aタンパク質または「ネイティブ」Z P Aポリペプチドもしくはは「ネイティブ」Z P Aタンパク質は、天然に存在する切断型または分泌型のZ P Aタンパク質、そのポリペプチドの天然に存在する改変体型（例えば、選択的ス

プライシング型) および天然に存在する対立遺伝子変異体を特に包含する。本発明のある特定の実施形態において、本明細書中に開示されるネイティブ配列 Z P A ポリペプチドは、本明細書中に示される全長アミノ酸配列を含む、成熟ネイティブ配列ポリペプチドまたは全長ネイティブ配列ポリペプチドである。

【0047】

本明細書中に開示される様々な Z P A ポリペプチドの「シグナルペプチド」のおおよその位置は、本明細書および／または添付の図面において見ることができる。また、いくつかの場合において、分泌ポリペプチドからのシグナル配列の切断は、完全に均一というわけではないことから、2つ以上の分泌種が生じることが理解される。これらの成熟ポリペプチド(ここで、そのシグナルペプチドは、本明細書中において同定されるようなシグナルペプチドの C 末端境界のいずれかの側における約 5 アミノ酸以内で切断される) およびそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明によって企図される。

【0048】

「Z P A ポリペプチド改変体」または「Z P A タンパク質改変体」は、本明細書中に開示されるような全長ネイティブ配列 Z P A ポリペプチド配列と少なくとも約 80 % のアミノ酸配列同一性を有する Z P A ポリペプチドまたは本明細書中に開示されるような全長 Z P A ポリペプチド配列の任意のフラグメント(例えば、全長 Z P A ポリペプチドについての完全なコード配列の一部のみである核酸によってコードされるもの)のことを意味する。そのような Z P A ポリペプチド改変体は、例えば、1つ以上のアミノ酸残基が全長ネイティブアミノ酸配列の N 末端または C 末端において付加または欠失している Z P A ポリペプチドを含む。通常、Z P A ポリペプチド改変体は、本明細書中に開示されるような全長ネイティブ配列 Z P A ポリペプチド配列または本明細書中に開示されるような全長 Z P A ポリペプチド配列の任意の特別に定義されたフラグメントに対して少なくとも約 80 % のアミノ酸配列同一性あるいは少なくとも約 81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % のアミノ酸配列同一性を有する。通常、Z P A 改変体ポリペプチドは、少なくとも約 10 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210 アミノ酸長またはそれ以上である。必要に応じて、Z P A 改変体ポリペプチドは、ネイティブ Z P A ポリペプチド配列と比べて、ただ 1 つの保存的アミノ酸置換を有するか、あるいは、ネイティブ Z P A ポリペプチド配列と比べてわずか 2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個の保存的アミノ酸置換を有する。

【0049】

本明細書中において同定される Z P A ポリペプチド配列に関して「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列をアラインメントし、そして必要であれば、いずれの保存的置換も配列同一性の一部とみなされずに最大パーセント配列同一性を達成するためにギャップを挿入した後の、特定の Z P A ポリペプチド配列内のアミノ酸残基と同一である、候補配列内のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的でのアラインメントは、当該分野の技術の範囲内である様々な方法で、例えば、公的に利用可能なコンピュータソフトウェア(例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN または Megalign (DNASTAR) ソフトウェア)を使用して、達成され得る。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するのに必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書中の目的で、%アミノ酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラム ALIGN-2 を使用して生成される。ALIGN-2 配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. によって創作されたものであり、ソースコードは、ユーザー文書とともに米国著作権局(U. S. Copyright Office), Washington D. C., 20559 に申請されており、米国著作権登録番号(U. S. Copyright Registr

ation No.) TXU510087として登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaから公的に利用可能であるか、または公的に利用可能なソースコードからコンパイルされ得る。ALIGN-2プログラムは、UNIX（登録商標）オペレーティングシステム、例えば、デジタルUNIX（登録商標）V4.0Dにおいて使用するためにコンパイルされるべきである。すべての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定されており、変更しない。

【0050】

ALIGN-2がアミノ酸配列比較に使用される場合において、所与のアミノ酸配列Bに対する所与のアミノ酸配列Aの%アミノ酸配列同一性（これは、代わりに、所与のアミノ酸配列Bに対するある特定の%アミノ酸配列同一性を有するかまたは含む所与のアミノ酸配列Aと表現されることもある）は、以下のとおり計算される：

$100 \times \text{分数 } X / Y$

ここで、Xは、配列アラインメントプログラムALIGN-2のAとBとのアラインメントにおいてそのプログラムによって完全一致とスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、Yは、Bにおけるアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さが、アミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、Bに対するAの%アミノ酸配列同一性が、Aに対するBの%アミノ酸配列同一性と等しくないことが理解されるだろう。別段明示的に述べられない限り、本明細書中で使用されるすべての%アミノ酸配列同一性の値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用してこのすぐ後の段落に記載されるとおりに得られる。

【0051】

本明細書中で使用されるとき、「保存されたシンテニー」とは、ヒト遺伝子座が、ゼブラフィッシュ遺伝子座から進化したという事実、例えば、ZPA遺伝子およびそのZPA遺伝子と相同であると考えられているヒト遺伝子の片側または両側に類似の隣接遺伝子が存在することをいう。

【0052】

「ZPA改変体ポリヌクレオチド」または「ZPA改変体核酸配列」は、ZPAポリペプチド、好ましくは、本明細書中で定義されるような活性なZPAポリペプチドをコードし、そして本明細書中に開示されるような全長ネイティブ配列ZPAポリペプチド配列をコードするヌクレオチド酸配列または本明細書中に開示されるような全長ZPAポリペプチド配列の任意のフラグメントと少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する核酸分子のことを意味する。通常、ZPA改変体ポリヌクレオチドは、本明細書中に開示されるような全長ネイティブ配列ZPAポリペプチド配列をコードする核酸配列または本明細書中に開示されるような全長ZPAポリペプチド配列の任意のフラグメントと、少なくとも約80%の核酸配列同一性を有するか、あるいは、少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の核酸配列同一性を有する。改変体は、ネイティブヌクレオチド配列を包含しない。

【0053】

通常、ZPA改変体ポリヌクレオチドは、少なくとも約5ヌクレオチド長であるか、あるいは、少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620または625ヌクレオチド長であり、ここで、この文脈で用語「

約」は、参照ヌクレオチド配列の長さ＋または－その参照配列の長さの10%を意味する。

【0054】

本明細書中において同定されるZPAをコードする核酸配列に関して「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列をアラインメントし、そして必要であれば最大パーセント配列同一性を達成するためにギャップを挿入した後の、目的のZPA核酸配列内のヌクレオチドと同一である、候補配列内のヌクレオチドのパーセンテージと定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的でのアラインメントは、当該分野の技術の範囲内である様々な方法で、例えば、公的に利用可能なコンピュータソフトウェア(例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign(DNASTAR)ソフトウェア)を使用して、達成され得る。しかしながら、本明細書中の目的で、%核酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.によって創作されたものであり、ソースコードは、ユーザー文書とともに米国著作権局, Washington D. C., 20559に申請されており、米国著作権登録番号TXU510087として登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaから公的に利用可能であるか、または公的に利用可能なソースコードからコンパイルされ得る。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、例えば、デジタルUNIX(登録商標) V4.0Dにおいて使用するためにコンパイルされるべきである。すべての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定されており、変更しない。

【0055】

ALIGN-2が核酸配列比較に使用される場合において、所与の核酸配列Dに対する所与の核酸配列Cの%核酸配列同一性(これは、代わりに、所与の核酸配列Dに対するある特定の%核酸配列同一性を有するかまたは含む所与の核酸配列Cと表現されることもある)は、以下のとおり計算される:

$$100 \times \text{分数 } W / Z$$

ここで、Wは、配列アラインメントプログラムALIGN-2のCとDとのアラインメントにおいてそのプログラムによって完全一致とスコア付けされたヌクレオチドの数であり、Zは、Dにおけるヌクレオチドの総数である。核酸配列Cの長さが、核酸配列Dの長さと等しくない場合、Dに対するCの%核酸配列同一性が、Cに対するDの%核酸配列同一性と等しくないことが理解されるだろう。別段明示的に述べられない限り、本明細書中で使用されるすべての%核酸配列同一性の値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用してこのすぐ後の段落に記載されるとおりに得られる。

【0056】

他の実施形態において、ZPA改変体ポリヌクレオチドは、ZPAポリペプチドをコードし、そして例えば、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下および洗浄条件下において、本明細書中に開示されるような全長ZPAポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができる核酸分子である。ZPA改変体ポリペプチドは、ZPA改変体ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであり得る。

【0057】

用語「全長コード領域」とは、ZPAポリペプチドをコードする核酸についての言及において使用されるとき、本発明の全長ZPAポリペプチドをコードするヌクレオチドの配列(しばしば本明細書中で開始コドンと終止コドン(それらを含む)との間と示される)のことをいう。

【0058】

「単離(された)」とは、本明細書中に開示される様々なZPAポリペプチドを記載するために使用されるとき、その天然の環境の成分から同定されており、そして分離されており、そして/または回収されているポリペプチドのことを意味する。その天然の環境の

夾雑成分は、代表的にはそのポリペプチドに対する診断上または治療上の使用を妨害し得る物質であり、それらとしては、酵素、ホルモンおよび他のタンパク質性溶質または非タンパク質性溶質が挙げられ得る。ある特定の実施形態において、ポリペプチドは、(1) スピニングカップ配列決定装置を使用することによってN末端または内部のアミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度に、または(2) クマシーブルー染色および/または銀染色を使用して非還元条件下または還元条件下でSDS-PAGEによって均一に、精製される。単離されたポリペプチドには、組換え細胞内のインサイチュにおけるポリペプチドが含まれる。なぜなら、ZPAポリペプチド環境成分の少なくとも1つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常、単離されたポリペプチドは、少なくとも1つの精製段階によって調製される。

10

【0059】

「単離された」ZPAポリペプチドコード核酸または「単離された」他のポリペプチドコード核酸は、そのポリペプチドをコードする核酸の天然源に通常関連する少なくとも1つの夾雑核酸分子から同定および分離されている核酸分子である。単離されたポリペプチドコード核酸分子は、それが天然において見られる形態以外または環境以外のものである。ゆえに、単離されたポリペプチドコード核酸分子は、それが天然の細胞に存在するとき、特定のポリペプチドをコードする核酸分子と区別される。しかしながら、単離されたポリペプチドコード核酸分子は、例えば、その核酸分子が、天然の細胞の染色体位置と異なる染色体位置に存在する場合、通常そのポリペプチドを発現する細胞内に含まれるポリペプチドコード核酸分子を含む。

20

【0060】

用語「調節配列」とは、特定の宿主生物において作動可能に連結された、コード配列の発現に必要なDNA配列のことをいう。原核生物に適した調節配列は、例えば、プロモーター、必要に応じてオペレーター配列およびリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを利用することが知られている。

【0061】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関連性をもって配置されているとき、その核酸は、「作動可能に連結されている」。例えば、プレ配列または分泌リーダーに対するDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、そのポリペプチドに対するDNAに作動可能に連結されている；プロモーターまたはエンハンサーは、その配列の転写に影響を与える場合、コード配列に作動可能に連結されている；またはリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように位置されている場合、コード配列に作動可能に連結されている。一般に、「作動可能に連結されている(された)」とは、連結されるDNA配列が、連続的であることを意味し、分泌リーダーの場合は、連続的かつ読み枠(reading phase)であることを意味する。しかしながら、エンハンサーは、連続的である必要はない。連結は、好都合な制限酵素認識部位におけるライゲーションによって達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来 of 慣例に従って使用される。

30

【0062】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定可能であり、一般に、プローブの長さ、洗浄温度および塩濃度に応じて経験的に計算される。通常、プローブが長いほど、適正なアニーリングには高い温度が必要であり、プローブが短いほど、低い温度で済む。ハイブリダイゼーションは、通常、その融解温度よりも低い環境において相補鎖が存在するときに変性DNAが再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との所望の相同性の程度が高いほど、高い相対温度を使用することができる。結果として、高い相対温度は、よりストリンジェントな反応条件をもたらす傾向があり、低い温度は、その傾向が低いということになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーに関する追加の詳細および説明については、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Bio

40

50

logy, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

【0063】

「ストリンジェントな条件」または「高ストリンジェンシー条件」は、本明細書中で定義されるとき、(1)洗浄に低イオン強度および高温を使用する条件、例えば、50℃における0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム；(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミドのような変性剤を使用する条件、例えば、42℃における750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを含む0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%Ficoll/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)を含む50%(v/v)ホルムアミドを使用する条件；または(3)0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中での42℃における10分間の洗浄の後、55℃でのEDTA含有0.1×SSCからなる10分間の高ストリンジェンシー洗浄を伴う、42℃において、50%ホルムアミド、5×SSC(0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×Denhardt溶液、超音波処理サケ精子DNA(50μg/ml)、0.1%SDSおよび10%デキストラン硫酸を使用している溶液中での一晚のハイブリダイゼーションによって特定され得る。

10

【0064】

「中程度のストリンジェントな条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989に記載されているとおりに特定され得、そしてこの条件は、上に記載された条件よりも低い、ストリンジェントな洗浄溶液条件およびハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度および%SDS)の使用を含む。中程度のストリンジェントな条件の例は、20%ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×Denhardt溶液、10%デキストラン硫酸および20mg/ml変性切断サケ精子DNAを含む溶液中での37℃における一晚のインキュベーションの後、約37~50℃においてそのフィルターを1×SSC中で洗浄することである。当業者は、プローブの長さなどのような因子を適応させるのに必要な温度、イオン強度などをどのように調整するかを認識している。

20

30

【0065】

用語「エピトープタグ化(された)」とは、本明細書中で使用されるとき、「タグポリペプチド」に融合されたZPAポリペプチドまたは抗ZPA抗体を含むキメラポリペプチドのことをいう。このタグポリペプチドは、抗体を作製することができるエピトープを提供するのに十分な残基を有するが、融合されたポリペプチドの活性を妨害しないくらい十分に短い。ある特定の実施形態において、タグポリペプチドはまた、その抗体が、他のエピトープと実質的に交差反応しないくらいかなり独特のものである。適当なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6アミノ酸残基、通常、約8~50アミノ酸残基(ある特定の実施形態において、約10~20アミノ酸残基)を有する。エピトープタグ化された本発明のポリペプチドおよび抗体が企図される。

40

【0066】

「生物学的に活性な」および「生物学的活性」および「生物学的特性」は、ZPAポリペプチドに関して、(1)インビボまたはエキソビボにおいてアポトーシスを開始または刺激する能力を有すること；(2)内因性アポトーシス経路の上流および/または下流のメンバーに特異的に結合する能力を有すること；および/または(3)別段明記される場合を除いてZPAシグナル伝達またはZPA活性を別途調節する能力を有することを意味する。

【0067】

「生物学的に活性な」および「生物学的活性」および「生物学的特性」は、修飾された

50

Z P A ポリペプチドに関して、(1) インビボまたはエキソビボにおいてアポトーシスを開始または刺激する能力を有すること；(2) 内因性アポトーシス経路の上流および／または下流のメンバーに特異的に結合する能力を有すること；および／または(3) 別段明記される場合を除いて Z P A シグナル伝達または Z P A 活性を別途調節する能力を有することを意味する。

【0068】

「生物学的に活性な」および「生物学的活性」および「生物学的特性」は、本発明の抗 Z P A 抗体に関して、(1) ネイティブ Z P A ポリペプチドの生物学的活性を部分的または完全に阻止、阻害または中和する能力を有すること（アンタゴニスト様式または阻止様式のいずれかで）；(2) Z P A ポリペプチドに特異的に結合する能力を有すること；および／または(3) 別段明記される場合を除いて Z P A シグナル伝達または Z P A 活性を調節する能力を有することを意味する。1つの実施形態において、本発明の抗体は、少なくとも $1\text{ }\mu\text{M}$ 以下、 100 nm 以下、 50 nm 以下、 10 nm 以下、 5 nM 以下、 1 nm 以下の親和性で Z P A タンパク質に結合する。本明細書中で使用されるとき、「抗体可変ドメイン」とは、相補性決定領域 (CDR；すなわち、CDR 1、CDR 2 および CDR 3) およびフレームワーク領域 (FR) のアミノ酸配列を含む抗体分子の軽鎖および重鎖の部分のことをいう。V_H とは、重鎖の可変ドメインのことをいう。V_L とは、軽鎖の可変ドメインのことをいう。本発明において使用される方法によれば、CDR および FR に割り当てられるアミノ酸の位置は、Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 および 1991)) に従って定義される。抗体または抗原結合フラグメントのアミノ酸のナンバリングもまた、Kabat に従う。

【0069】

本明細書中で使用されるとき、「コドンセット」とは、所望の改変体アミノ酸をコードするために使用される様々なヌクレオチドトリプレット配列のセットのことをいう。オリゴヌクレオチドのセットは、例えば、コドンセットによって提供されるヌクレオチドトリプレットのすべての可能な組み合わせであり、かつ、所望の群のアミノ酸をコードする配列を含む固相合成法により合成され得る。コドン命名の標準的な形態は、当該分野で公知であり、本明細書中に記載される IUB コードの形態である。

【0070】

「異種 DNA」は、宿主細胞に導入された任意の DNA である。この DNA は、種々の供給源から得ることができ、それらとしては、ゲノム DNA、cDNA、合成 DNA およびこれらの融合または組み合わせが挙げられる。この DNA は、宿主細胞またはレシピエント細胞と同じ細胞または細胞型由来の DNA または例えば、哺乳動物または植物由来の異なる細胞型由来の DNA を含み得る。この DNA は、必要に応じて、マーカーまたは選択遺伝子、例えば、抗生物質耐性遺伝子、温度抵抗性遺伝子などを含み得る。本発明のポリペプチドおよび抗体を含む異種 DNA をコードする宿主細胞は、それらの使用と同様に企図される。

【0071】

本明細書中で使用されるとき、「ライブラリー」とは、複数のポリペプチド（例えば、抗体配列または抗体フラグメント配列）またはこれらの配列をコードする複数の核酸のことをいい、これらの配列は、本発明の方法に従ってこれらの配列に導入された改変体アミノ酸の組み合わせが異なる。

【0072】

「ファージディスプレイ」は、改変体ポリペプチドを、コートタンパク質との融合タンパク質としてファージ（例えば、繊維状ファージ、粒子）の表面上にディスプレイする手法のことである。ファージディスプレイの有用性は、ランダム化されたタンパク質改変体の大規模なライブラリーを、高親和性で標的分子に結合するそれらの配列について迅速かつ効率的に分類することができるという事実にある。ペプチドライブラリーおよびタンパ

ク質ライブラリーのファージ上のディスプレイは、特異的な結合特性によって何百万ものポリペプチドのスクリーニングに使用されている。多価ファージディスプレイ法は、繊維状ファージの遺伝子 I I I または遺伝子 V I I I のいずれかへの融合を介して小さなランダムペプチドおよび低分子タンパク質をディスプレイするために使用されている。Wells and Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol., 3: 355-362 (1992) およびこれに引用されている参考文献。一価ファージディスプレイでは、タンパク質ライブラリーまたはペプチドライブラリーは、遺伝子 I I I またはその一部に融合されており、それらは、野生型遺伝子 I I I タンパク質の存在下において低レベルで発現し、ファージ粒子は、融合タンパク質の 1 コピーをディスプレイするかまたはディスプレイしない。分類が、内因性リガンド親和性に基づくものであり、DNA 操作を簡便にするファージミドベクターを使用しているために、アビディティー効果は、多価ファージと比べて低い。Lowman and Wells, Methods: A companion to Methods in Enzymology, 3: 205-0216 (1991)。

【0073】

「ファージミド」は、細菌の複製起点、例えば ColE1 およびバクテリオファージの遺伝子間領域のコピーを有するプラスミドベクターである。ファージミドは、繊維状バクテリオファージおよびラムダバクテリオファージをはじめとした任意の公知のバクテリオファージにおいて使用され得る。このプラスミドはまた、通常、抗生物質耐性についての選択可能マーカーを含む。これらのベクターにクローニングされた DNA のセグメントは、プラスミドとして増殖され得る。これらのベクターを含む細胞は、ファージ粒子の産生に必要なすべての遺伝子が提供されるとき、プラスミドの複製様式をローリングサークル複製に変更することによって、プラスミド DNA の 1 本の鎖のコピーを生成し、そしてファージ粒子を包む。ファージミドは、感染性または非感染性のファージ粒子を形成し得る。この用語は、その異種ポリペプチドがファージ粒子の表面上にディスプレイされるように遺伝子融合物として異種ポリペプチド遺伝子に連結されたファージコートタンパク質遺伝子またはそのフラグメントを含むファージミドを包含する。

【0074】

用語「ファージベクター」は、異種遺伝子を含み、かつ、複製することができるバクテリオファージの二本鎖複製型を意味する。ファージベクターは、ファージ複製およびファージ粒子形成を可能にするファージ複製起点を有する。ファージは、繊維状バクテリオファージ（例えば、M13、f1、fd、Pf3 ファージまたはそれらの派生物）またはラムダファージ（例えば、ラムダ、21、phi80、phi81、82、424、434 などまたはそれらの派生物）であり得る。

【0075】

用語「プロテオグリカン」とは、少なくとも 1 つのグリコサミノグリカン側鎖が、分子のタンパク質コアに共有結合している分子のことをいう。本発明のプロテオグリカン合成欠損細胞株は、ガラクトシルトランスフェラーゼ I が欠損した細胞株を含む。1 つの実施形態によれば、その細胞株は、CHO-psbg 細胞株である。

【0076】

用語「アンタゴニスト」は、ネイティブ ZPA ポリペプチドの生物学的活性を部分的または完全に阻止、阻害または中和し、そしてネイティブ ZPA ポリペプチドに特異的に結合する任意の分子である。1 つの実施形態によれば、アンタゴニストは、ポリペプチドである。別の実施形態によれば、本発明の抗体は、ネイティブ ZPA ポリペプチドへのアンタゴニストの結合を阻害し得る。

【0077】

用語「低分子アンタゴニスト」とは、分子量が 1500 ダルトン以下であり、かつ、本発明のアンタゴニストである任意の分子のことをいう。1 つの実施形態によれば、低分子アンタゴニストは、約 500 ダルトン未満である。

【0078】

1つの実施形態によれば、アンタゴニストは、少なくとも1つのネイティブZPAポリペプチドを発現している細胞においてアポトーシスを阻止するか、阻害するか、減少させるか、または中和する。適当なアンタゴニストとしては、抗体、抗原に結合する抗体フラグメント、ネイティブZPAポリペプチドのアミノ酸配列改変体、本発明のペプチド、アプタマーなどが挙げられる。ZPAポリペプチドのアンタゴニストを同定するための方法は、ZPAポリペプチドをアンタゴニスト分子候補と接触させる工程およびZPAポリペプチドに関連する1つ以上の生物学的活性の検出可能な変化を測定する工程を含み得る。

【0079】

用語「アプタマー」とは、ZPAポリペプチドのような標的分子に結合することができる核酸分子のことをいう。アプタマーの生成および治療上の使用は、当該分野において十分に確立されている。例えば、米国特許第5,475,096号および加齢黄斑変性症を処置するためのMacugen（登録商標）（Eyeteck, New York）の治療上の有効性を参照のこと。

【0080】

用語「増強剤」および「アゴニスト」とは、ネイティブZPAポリペプチドの生物学的活性を増大する任意の分子のことをいい、ここで、この増強剤は、アポトーシスを開始および／または刺激する。1つの実施形態において、アゴニストは、ネイティブZPAポリペプチドに特異的に結合し、そのネイティブZPAポリペプチドの生物学的活性を増大する。別の実施形態において、アゴニストは、ネイティブZPAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの転写および／または翻訳を刺激してネイティブZPAポリペプチドの発現を増加させる。別の実施形態において、アゴニストは、ネイティブZPAポリペプチドのインヒビターの正常な機能を阻害する。前述の実施形態は互いに矛盾せず、アゴニストは、例えば、ネイティブZPAポリペプチドのインヒビターの正常な機能を阻害しながら、ネイティブZPAポリペプチドに特異的に結合し得、そしてそのネイティブZPAポリペプチドの生物学的活性を増大し得ることが理解される。ZPAポリペプチドのアゴニストを同定するための方法は、ZPAに結合する分子をZPAポリペプチドおよびアゴニスト候補と接触させる工程ならびにZPAポリペプチドに関連する1つ以上の生物学的活性の検出可能な変化（例えば、カスパーゼ活性化の増加またはアポトーシスの速度もしくは量の増加）を測定する工程を含み得る。

【0081】

「処置する」または「処置」または「軽減」とは、治療上の処置と予防的または防止的な手段の両方のことをいい、その目的は、標的とする病理学的な状態または障害を予防するかまたは減速（減少）させることである。処置を必要とする者としては、すでにその障害を有する者ならびに障害を有する傾向にある者または障害を予防すべき者が挙げられる。これらの用語は、本明細書中の治療上の使用および予防的な使用によって、疾患に関連する症状、合併症または他の問題を改善するか、減速させるかもしくは減少させるか、あるいは、疾患に関連する症状、合併症または他の問題の発症の機会または頻度を改善するか、減速させるかもしくは減少させる場合に、その使用が成功であることを示す。

【0082】

被験体または哺乳動物は、本発明の方法に従って治療量のアンタゴニストを投与された後に、その患者が、以下の1つ以上の観察可能な減少および／もしくは測定可能な減少を示すかまたは以下の1つ以上が無くなることを示す場合に、癌に対して首尾よく「処置される」：癌細胞の数の減少または癌細胞がなくなること；腫瘍サイズの減少；軟部組織および骨への癌の転移を含む末梢器官への癌細胞浸潤の阻害（すなわち、ある程度の遅延および好ましくは停止）；腫瘍転移の阻害（すなわち、ある程度の遅延および好ましくは停止）；腫瘍増殖のある程度の阻害；および／または特定の癌に関連する症状の1つ以上のある程度の緩和；罹患率および死亡率の低下ならびに生活の質の問題の改善。抗ZPA抗体またはZPA結合オリゴペプチドが、増殖を予防し得、そして／または既存の癌細胞を殺滅し得る程度に、それらは、細胞分裂抑制性および／または細胞傷害性であり得る。これらの兆候または症状の減少もまた、患者が感じることができる。

【0083】

被験体または哺乳動物は、本発明の方法に従って治療量のアンタゴニストまたはアゴニストを投与された後に、その患者が、アポトーシスならびに／または異常なアポトーシスに関連する症状；および生活の質の問題の改善の1つ以上のある程度の緩和の観察可能な調節および／もしくは測定可能な調節を示す場合に、アポトーシス関連障害に対して首尾よく「処置される」。

【0084】

上記疾患における首尾よい処置および改善を評価するための上記のパラメータは、医師によく知られている手順によって容易に測定可能である。癌治療に対して、有効性は、例えば、疾患が進行するまでの時間（TTP）を評価することおよび／または反応率（RR）を決定することによって、測定され得る。転移は、ステージングテストによって、および骨への転移を測定する骨スキャンならびにカルシウムレベルおよび他の酵素についての試験によって、決定され得る。CTスキャンもまた、骨盤およびその領域のリンパ節への転移を観察するために行われ得る。胸部X線および公知の方法による肝臓酵素レベルの測定が、それぞれ肺および肝臓への転移を観察するために使用される。この疾患をモニターするための他の公知の方法としては、当該分野で周知の他の方法の中でも経直腸超音波断層検査（TRUS）および経直腸的針生検（TRNB）が挙げられる。

【0085】

「長期」投与とは、最初の治療上の効果（活性）を長期間にわたって維持するために、急性様式とは反対の連続的な様式での薬剤の投与のことをいう。「間欠」投与は、中断することなく継続的に行わないが、周期性の処置である。

【0086】

癌の処置、癌の症状の軽減または癌の診断の目的の「哺乳動物」とは、ヒト、家畜および動物園の動物、スポーツ用動物または愛玩動物（例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなど）をはじめとした哺乳動物として分類される任意の動物（「患者」としても知られる）のことをいう。ある特定の実施形態において、哺乳動物は、ヒトである。

【0087】

1つ以上のさらなる治療薬と「組み合わせられた」投与は、同時（一致）投与および任意の順序の連続投与を含む。

【0088】

「キャリア」は、本明細書中で使用されるとき、使用される用量および濃度においてそれに曝露される細胞または哺乳動物に対して無毒性である薬学的に許容可能なキャリア、賦形剤または安定剤を含む。生理的に許容可能なキャリアは、水溶性のpH緩衝溶液であることが多い。生理的に許容可能なキャリアの例としては、緩衝液（例えば、リン酸、クエン酸および他の有機酸）；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満の）ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシン）；単糖類、二糖類および他の炭水化物（グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む）；キレート剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；および／または非イオン性界面活性物質（例えば、TWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）およびPLURONICS（登録商標））が挙げられる。

【0089】

「固相」または「固体支持体」とは、本発明の抗体、アンタゴニストまたはポリペプチドが、接着または付着することができる非水性マトリックスを意味する。本明細書中において包含される固相の例としては、ガラス（例えば、制御されたボアガラス）、多糖類（例えば、アガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコールおよびシリコンから部分的または完全に形成されたものが挙げられる。ある特定の実施形態

において、その状況に応じて、固相は、アッセイプレートのウェルを含み得る；他では、固相は、精製カラム（例えば、アフィニティークロマトグラフィカラム）である。この用語は、別々の粒子の不連続の固相（例えば、米国特許第4, 275, 149号に記載されているもの）も含む。

【0090】

本明細書中で使用されるとき、用語「イムノアドヘシン」は、異種タンパク質の結合特異性（「付着因子」）を免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能と組み合わせている抗体様分子のことを指す。構造的に、イムノアドヘシンは、抗体の抗原認識部位以外および結合部位以外の所望の結合特異性を有するアミノ酸配列の融合物（すなわち、「異種」である）および免疫グロブリン定常ドメイン配列を含む。イムノアドヘシン分子の付着因子部分は、代表的には、少なくともレセプターまたはリガンドの結合部位（例えば、ネイティブZPAタンパク質の一部）を含む連続したアミノ酸配列である。イムノアドヘシンにおける免疫グロブリン定常ドメイン配列は、任意の免疫グロブリン（例えば、IgG-1、IgG-2、IgG-3もしくはIgG-4サブタイプ、IgA（IgA-1およびIgA-2を含む）、IgE、IgDまたはIgM）から得ることができる。

10

【0091】

「リポソーム」は、様々なタイプの脂質、リン脂質および／または界面活性物質から構成される小型のベシクルであり、これは、哺乳動物への薬物（例えば、ZPAポリペプチド、それに対する抗体またはZPA結合オリゴペプチド）の送達に有用である。リポソームの成分は、通常、生物学的膜の脂質の配列に類似した二重層を形成して配置されている。

20

【0092】

本明細書中に開示されるようなポリペプチド、抗体、アンタゴニストまたは組成物の「有効量」は、特に述べられる目的を果たすのに十分な量である。「有効量」は、経験的におよび述べられる目的に関する公知の方法によって決定され得る。

【0093】

用語「治療有効量」とは、哺乳動物（患者としても知られる）において疾患または障害を「処置する」のに有効な本発明の抗体、ポリペプチドまたはアンタゴニストの量のことをいう。癌の場合において、薬物の治療有効量は、癌細胞の数を減少させることができ；腫瘍サイズを減少させることができ；末梢器官への癌細胞浸潤を阻害（すなわち、ある程度の遅延および好ましくは停止）することができ；腫瘍転移を阻害（すなわち、ある程度の遅延および好ましくは停止）することができ；腫瘍増殖をある程度阻害することができ；そして／またはその癌に関連する症状の1つ以上をある程度緩和することができる。「処置する」についての本明細書中の定義を参照のこと。薬物が増殖を予防し得、そして／または既存の癌細胞を殺滅し得る程度に、その薬物は、細胞分裂抑制性および／または細胞傷害性であり得る。

30

【0094】

本発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニストまたは組成物の「細胞傷害量」は、細胞、特に、腫瘍、例えば癌細胞の破壊をインビトロまたはインビボのいずれかにおいて引き起こすことができる量である。例えば、腫瘍性細胞の増殖を阻害する目的の本発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニストまたは組成物の「細胞傷害量」は、経験的におよび当該分野で公知の方法によって決定され得る。

40

【0095】

用語「抗体」は、最も広い意味において使用され、その抗体が、ネイティブZPAポリペプチドに特異的に結合し、そして／または本発明の生物学的活性または免疫学的活性を示す限り、例えば、単一の抗ZPAポリペプチドモノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニストおよび中和抗体を含む）、多エピトープ特異性を有する抗ZPAポリペプチド抗体組成物、ポリクローナル抗体、一本鎖抗ZPAポリペプチド抗体および抗ZPAポリペプチド抗体（下記を参照のこと）のフラグメントを特に包含する。抗体の「機能的なフラグメントまたはアナログ」という語句は、言及されている抗体と共通の定性的な生物学

50

的活性を有する化合物のことである。例えば、抗ZPAポリペプチド抗体の機能的なフラグメントまたはアナログは、ZPA分子に特異的に結合することができるものであり得る。1つの実施形態において、抗体は、ZPA分子がアポトーシスを誘導する能力を妨害し得るか、または実質的に低下させ得る。用語「免疫グロブリン」(Ig)は、本明細書中で「抗体」と交換可能に使用される。

【0096】

「単離された抗体」は、その天然の環境の成分から同定され、分離され、そして／または回収されている抗体である。その天然の環境の夾雑成分は、その抗体に対する診断上または治療上の使用を妨害し得る物質であり、それらとしては、酵素、ホルモンおよび他のタンパク質性溶質または非タンパク質性溶質が挙げられ得る。ある特定の実施形態において、抗体は、(1)Lowry法によって測定されるとき抗体の95重量%超に、最も好ましくは99重量%超に、(2)スピニングカップ配列決定装置を使用することによってN末端または内部のアミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度に、または(3)クマシーブルー染色または好ましくは銀染色を使用して還元条件下または非還元条件下でSDS-PAGEによって均一に、精製される。単離された抗体には、組換え細胞内のインサイチュにおける抗体が含まれる。なぜなら、その抗体の天然環境の少なくとも1つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常、単離された抗体は、少なくとも1つの精製段階によって調製される。

【0097】

基本4鎖抗体ユニットは、2本の同一の軽(L)鎖および2本の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体糖タンパク質である(IgM抗体は、J鎖と呼ばれるさらなるポリペプチドとともに5つの基本的なヘテロ四量体ユニットからなり、ゆえに、10個の抗原結合部位を含み、分泌型IgA抗体は、重合することによって、J鎖とともに2~5個の基本4鎖ユニットを含む多価の集合体を形成し得る)。IgGの場合、4鎖ユニットは、通常、約150,000ダルトンである。各L鎖は、1つのジスルフィド共有結合によってH鎖に連結しており、2本のH鎖は、H鎖アイソタイプに応じて1つ以上のジスルフィド結合によって互いに連結している。H鎖およびL鎖の各々はまた、規則的な間隔で鎖内ジスルフィド架橋を有する。各H鎖は、N末端に、可変ドメイン(V_H)、その後 α 鎖および γ 鎖の各々について3つの定常ドメイン(C_H)ならびに μ および ϵ アイソタイプに対して4つの C_H ドメインを有する。各L鎖は、N末端に、可変ドメイン(V_L)、それに続いてそのもう一方の末端に定常ドメイン(C_L)を有する。 V_L は、 V_H と並んでおり、 C_L は、重鎖の第1定常ドメイン(C_{H1})と並んでいる。特定の amino 酸残基が、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの界面を形成すると考えられている。 V_H と V_L とが一緒になって対を形成することによって、単一の抗原結合部位を形成する。様々なクラスの抗体の構造および特性については、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁およびChapter 6を参照のこと。

【0098】

任意の脊椎動物種由来のL鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、2つの明らかに異なるタイプ(カッパーおよびラムダと呼ばれる)のうちの1つを割り当てられ得る。重鎖の定常ドメイン(C_H)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンを、様々なクラスまたはアイソタイプに割り当てることができる。免疫グロブリンには5つのクラス: IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMがあり、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ および μ と呼ばれる重鎖を有する。 γ および α クラスは、 C_H の配列および機能の比較的小さな差異に基づいてさらにサブクラスに分けられる。例えば、ヒトは、以下のサブクラスを発現する: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2。

【0099】

用語「可変」とは、可変ドメインのある特定のセグメントの配列が、抗体間で広範に異

10

20

30

40

50

なる事実のことをいう。Vドメインは、抗原結合を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定義する。しかしながら、可変性は、可変ドメインの110アミノ酸全長にわたって均等に分布するものではない。その代わり、V領域は、各々9～12アミノ酸長の「超可変領域」と呼ばれる極めて可変性である短い領域に分断された15～30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不变の範囲からなる。ネイティブの重鎖および軽鎖の可変ドメインの各々は、4つのFRを含み、それらは、大部分がβシート配置をとり、3つの超可変領域に接続され、その超可変領域は、βシート構造に接続するループを形成し、いくつかの場合においては、その一部を形成する。各鎖における超可変領域は、共にFRに近い位置に存在し、もう一方の鎖の超可変領域とともに抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照のこと)。定常ドメインは、抗体が抗原に結合する際に直接関与しないが、様々なエフェクター機能(例えば、抗体依存性細胞傷害(ADCC)における抗体の関与)を示す。

【0100】

用語「超可変領域」は、本明細書中で使用されるとき、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基のことをいう。超可変領域は、通常、「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基(例えば、V_Lにおける残基約24-34(L1)、50-56(L2)および89-97(L3)ならびにV_Hにおける約1-35(H1)、50-65(H2)および95-102(H3)(1つの実施形態において、H1は、約31-35である);Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))および/または「超可変ループ」からの残基(例えば、V_Lにおける残基26-32(L1)、50-52(L2)および91-96(L3)ならびにV_Hにおける26-32(H1)、53-55(H2)および96-101(H3);Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))を含む。

【0101】

用語「モノクローナル抗体」とは、本明細書中で使用されるとき、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体のことをいい、すなわち、その集団を含む個別の抗体は、少量存在し得る、天然に存在し得る変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原性部位に対して産生されている。さらに、様々な決定基(エピトープ)に対して産生されている様々な抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原の単一の決定基に対して産生されている。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成することができるという点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、任意の特定の方法による抗体の生成が必要であると解釈されるべきでない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature, 256:495(1975)によって初めて報告されたハイブリドーマ法によって調製され得るし、細菌、真核生物動物または植物細胞における組換えDNA法を使用して作製され得る(例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと)。「モノクローナル抗体」はまた、Clacksonら、Nature, 352:624-628(1991), Marksら、J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)に記載されている手法および例えば以下の実施例を使用してファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

【0102】

本明細書中のモノクローナル抗体は、本発明の生物学的活性を示す限り、「キメラ」抗体(この抗体において、重鎖および/または軽鎖の一部は、特定の種に由来する抗体における対応配列または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応配列

と同一であるか、または相同でありながら、それらの鎖の残りの部分は、別の種に由来する抗体における対応配列または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応配列と同一であるか、または相同である）、ならびに、そのような抗体のフラグメントを含む（米国特許第4, 816, 567号；およびMorrissonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)を参照のこと）。本明細書中の目的のキメラ抗体は、非ヒト霊長類（例えば、旧世界ザル、類人猿など）由来の変域ドメイン抗原結合配列およびヒト定常領域配列を含む「霊長類化」抗体を含む。

【0103】

「インタクトな」抗体は、抗原結合部位ならびにC_Lおよび少なくとも重鎖定常ドメイン、C_H1、C_H2およびC_H3を含む抗体である。その定常ドメインは、ネイティブ配列定常ドメイン（例えば、ヒトネイティブ配列定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列改変体であり得る。ある特定の実施形態において、インタクトな抗体は、1つ以上のエフェクター機能を有する。

【0104】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の一部、好ましくは、インタクトな抗体の抗原結合領域または変域領域を含む。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFvフラグメント；ダイアボディ；鎖状抗体（米国特許第5, 641, 870号，実施例2；Zapataら、Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]を参照のこと）；一本鎖抗体分子；および抗体フラグメントから形成される多特異的抗体が挙げられる。表現「鎖状抗体」とは、通常、Zapataら、Protein Eng., 8(10): 1057-1062 (1995)に記載されている抗体のことをいう。簡潔には、これらの抗体は、相補的な軽鎖ポリペプチドとともに抗原結合領域の対を形成するタンデム型のFdセグメント（VH-C_H1-VH-C_H1）の対を含む。鎖状抗体は、二重特異的または単一特異的であり得る。

【0105】

抗体のパパイン消化によって、「Fab」フラグメントと呼ばれる2つの同一の抗原結合フラグメントおよびその残りの「Fc」フラグメント（容易に結晶化される能力を反映した名称）が生成する。Fabフラグメントは、H鎖の変域ドメイン（V_H）および1つの重鎖の第1定常ドメイン（C_H1）とともにL鎖全体からなる。各Fabフラグメントは、抗原結合性に関して一価であり、すなわち、単一の抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理によって、二価の抗原結合活性を有するジスルフィド結合した2つのFabフラグメントにほぼ対応し、そしてなおも抗原を架橋することができる単一の大きなF(ab')₂フラグメントがもたらされる。Fab'フラグメントは、抗体ヒンジ領域から1つ以上のシステインを含むC_H1ドメインのカルボキシ末端においてさらに数残基を有することでFabフラグメントとは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を有するFab'についての本明細書中での呼称である。F(ab')₂抗体フラグメントは、元々、Fab'フラグメント間にヒンジシステインを有するFab'フラグメントの対として生成された。抗体フラグメントの他の化学的結合もまた知られている。

【0106】

Fcフラグメントは、ジスルフィドとともに両H鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、Fc領域の配列によって決定され、この領域は、ある特定のタイプの細胞上に見られるFcレセプター（FcR）によって認識される部分でもある。

【0107】

「Fv」は、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。このフラグメントは、堅固な非共有結合性会合での、1つの重鎖変域ドメインと1つの軽鎖変域ドメインとの二量体からなる。抗原結合性にアミノ酸残基を寄与させ、そしてその抗体に対する抗原結合特異性を付与する6つの超変域ループ（H鎖およびL鎖から各々3つのループ）がこれらの2つのドメインのフォールディングから突き出て

10

20

30

40

50

いる。しかしながら、単一の可変ドメイン（または抗原に特異的な3つのみのCDRを含むFvの半分）は、抗原を認識し、結合する能力を有するが、結合部位全体よりも低い親和性で抗原を認識し、結合する。

【0108】

「sFv」または「scFv」とも省略される「一本鎖Fv」は、単一のポリペプチド鎖に接続されたV_HおよびV_L抗体ドメインを含む抗体フラグメントである。ある特定の実施形態において、sFvポリペプチドは、sFvが抗原結合に対して所望の構造を形成することを可能にするポリペプチドリンカーをV_HドメインとV_Lドメインとの間にさらに含む。sFvの概説については、Pluckthun *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, 後掲を参照のこと。

【0109】

用語「ダイアボディ」とは、V_HドメインとV_Lドメインとの間の短いリンカー（約5～10残基）とともにsFvフラグメント（前の段落を参照のこと）を構築し、Vドメインの鎖内対形成ではなく鎖間対形成が達成されて、二価のフラグメント、すなわち、2つの抗原結合部位を有するフラグメントがもたらされることによって調製される小さい抗体フラグメントのことをいう。二重特異性ダイアボディは、2つの抗体のV_HドメインおよびV_Lドメインが、異なるポリペプチド鎖上に存在する、2つの「交差」sFvフラグメントのヘテロ二量体である。ダイアボディは、例えば、EP404,097; WO93/11161; およびHollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:6444-6448 (1993)において十分に説明されている。

【0110】

非ヒト（例えば、げっ歯類）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト抗体に由来する最小配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの部分について、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の抗体特異性、親和性および能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）（例えば、マウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類）の超可変領域からの残基によって置換されているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基で置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体の性能をさらに洗練させるために行われる。通常、ヒト化抗体は、少なくとも1つおよび代表的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、ここで、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが、非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、FRのすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリン配列のFRである。ヒト化抗体は、必要に応じて、免疫グロブリン定常領域（Fc）、代表的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部も含む。さらなる詳細については、Jonesら、Nature 321:522-525 (1986); Riechmannら、Nature 332:323-329 (1988); およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照のこと。

【0111】

「種依存性抗体」、例えば、哺乳動物の抗ヒトIgE抗体は、第2の哺乳動物の種由来の抗原のホモログに対して有する結合親和性よりも強い結合親和性を第1の哺乳動物の種由来の抗原に対して有する抗体である。通常、種依存性抗体は、ヒト抗原に「特異的に結合する」（すなわち、約 1×10^{-7} M以下、約 1×10^{-8} M以下および約 1×10^{-9} M以下の結合親和性（K_d）値を有する）が、そのヒト抗原に対する結合親和性よりも少なくとも約50倍、または少なくとも約500倍または少なくとも約1000倍弱い結合親和性を第2の非ヒト哺乳動物種由来の抗原のホモログに対して有する。種依存性抗体は、上で定義されたような様々なタイプの抗体のいずれかであり得、ある特定の実施形態に

において、ヒト化抗体またはヒト抗体である。

【0112】

「ZPA結合オリゴペプチド」は、本明細書中に記載されるようなZPAポリペプチドに結合する、好ましくは特異的に結合する、オリゴペプチドである。ZPA結合オリゴペプチドは、公知のオリゴペプチド合成法を用いて化学的に合成され得るし、組換え技術を用いて調製および精製され得る。ZPA結合オリゴペプチドは、通常、少なくとも約5アミノ酸長であるか、あるいは、少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100アミノ酸長またはそれ以上であり、ここで、そのようなオリゴペプチドは、本明細書中に記載されるようなZPAポリペプチドに結合することができ、好ましくは特異的に結合することができる。ZPA結合オリゴペプチドは、公知の手法を用いて過剰な実験をすることなく同定され得る。これに関して、標的ポリペプチドに特異的に結合することができるオリゴペプチドについてオリゴペプチドライブラリーをスクリーニングするための手法が、当該分野で公知であることに注意されたい（例えば、米国特許第5,556,762号、同第5,750,373号、同第4,708,871号、同第4,833,092号、同第5,223,409号、同第5,403,484号、同第5,571,689号、同第5,663,143号；PCT公開番号WO84/03506およびWO84/03564；Geysenら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81:3998-4002 (1984)；Geysenら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82:178-182 (1985)；Geysenら、Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)；Geysenら、J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)；Schoofsら、J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirlla, S. E. ら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378；Lowman, H. B. ら (1991) Biochemistry, 30:10832；Clackson, T. ら (1991) Nature, 352:624；Marks, J. D. ら (1991), J. Mol. Biol., 222:581；Kang, A. S. ら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363ならびにSmith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668を参照のこと）。

【0113】

目的の抗原、例えば、ZPAポリペプチドに「結合する」本発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニストまたは組成物は、あるポリペプチド、抗体、アンタゴニストまたは組成物が、その抗原を発現する細胞または組織を標的にする際に診断薬および／または治療薬として有用であり、他のタンパク質に有意に交差反応しない程度に十分な親和性で抗原に結合するものである。そのような実施形態において、「非標的」タンパク質に対する、そのポリペプチド、その抗体、アンタゴニストまたは組成物の結合の程度は、蛍光励起細胞分取（FACS）解析または放射性免疫沈降法（RIA）によって測定されるとき、その特定の標的タンパク質への、ポリペプチド、抗体、アンタゴニストまたは組成物の結合性の約10%未満である。標的分子に対するポリペプチド、抗体、アンタゴニストまたは組成物の結合性に関して、用語「特異的な結合」または特定のポリペプチドまたは特定の標的ポリペプチド上のエピトープ「に特異的に結合する」もしくは「に特異的である」とは、非特異的な相互作用とは測定可能な程度に異なる結合を意味する。特異的な結合は、例えば、一般に、結合活性を有しない類似の構造の分子であるコントロール分子の結合と比

べて、分子の結合を測定することによって決定され得る。例えば、特異的な結合は、標的に類似のコントロール分子（例えば、過剰量の非標識標的）との競合によって測定され得る。この場合、標識された標的のプロープに対する結合が、過剰量の非標識標的によって競合的に阻害される場合に、特異的な結合が示唆される。用語「特異的な結合」または特定のポリペプチドまたは特定の標的ポリペプチド上のエピトープ「に特異的に結合する」もしくは「に特異的である」は、本明細書中で使用されるとき、例えば、その標的に対して、少なくとも約 10^{-4} M、あるいは、少なくとも約 10^{-5} M、あるいは、少なくとも約 10^{-6} M、あるいは、少なくとも約 10^{-7} M、あるいは、少なくとも約 10^{-8} M、あるいは、少なくとも約 10^{-9} M、あるいは、少なくとも約 10^{-10} M、あるいは、少なくとも約 10^{-11} M、あるいは、少なくとも約 10^{-12} M またはそれ以上の Kd を有する分子によって示され得る。1つの実施形態において、用語「特異的な結合」とは、分子が、他の任意のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープ（例えば、非 Z P A タンパク質）に実質的に結合することなく、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープに結合する結合のことをいう。ゼブラフィッシュネイティブ Z P A ポリペプチドに特異的に結合する抗体は、Z P A ポリペプチドに対する非ゼブラフィッシュポリペプチドホモログにも結合し得ることが理解される。

10

【0114】

腫瘍細胞の「増殖を阻害する」ポリペプチド、抗体、アンタゴニストもしくは組成物または「増殖阻害性」ポリペプチド、抗体、アンタゴニストもしくは組成物は、癌細胞の測定可能な増殖阻害をもたらすものである。ある特定の実施形態において、増殖阻害性ポリペプチド、抗体、アンタゴニストまたは組成物は、適切なコントロールと比べて、20%超、約20%～約50%および50%超（例えば、約50%～約100%）腫瘍細胞の増殖を阻害し、このコントロールは、代表的には、試験されるポリペプチド、抗体、アンタゴニストまたは組成物で処理されていない腫瘍細胞である。1つの実施形態において、増殖阻害は、細胞培養物において約 $0.1 \sim 30 \mu\text{g}/\text{ml}$ または約 $0.5 \text{ nM} \sim 200 \text{ nM}$ の抗体濃度において測定され得、ここで、増殖阻害は、腫瘍細胞を抗体に曝露した1～10日後に測定される。インビボにおける腫瘍細胞の増殖阻害は、様々な方法（例えば、以下の実験的な実施例の項に記載される方法）で測定され得る。約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重における抗 Z P A 抗体の投与によって、抗体の最初の投与から約5日～3ヶ月以内、例えば、約5～30日以内に腫瘍サイズまたは腫瘍細胞増殖の減少がもたら

20

30

【0115】

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体の Fc 領域（ネイティブ配列 Fc 領域またはアミノ酸配列改変体 Fc 領域）に起因し得、そして抗体アイソタイプによって異なる生物学的活性のことをいう。抗体のエフェクター機能の例としては：C1q 結合および補体依存性細胞傷害；Fc レセプター結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）；食作用；細胞表面レセプター（例えば、B 細胞レセプター）のダウンレギュレーション；および B 細胞活性化が挙げられる。

【0116】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「ADCC」とは、ある特定の細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球およびマクロファージ）上に存在する Fc レセプター（FcR）上に結合した分泌型 Ig によって、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が、抗原を有する標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒によって標的細胞を殺滅することを可能にする細胞傷害性の形態のことをいう。抗体は、細胞傷害性細胞を「武装させ」、また、抗体は、そのような殺滅に絶対的に必要とされる。ADCC を媒介するための主要な細胞である NK 細胞は、Fc γ RIII のみを発現するのに対し、単球は、Fc γ RI、Fc γ RII および Fc γ RIII を発現する。造血細胞上の FcR 発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991) の 464 頁の表 3 にまとめられている。目的の分子の ADCC 活性を評価するために、インビトロ ADCC アッセイ（例えば、米国特許第 5, 50

40

50

0, 362号または同第5, 821, 337号に記載されているもの)が行われ得る。そのようなアッセイに対して有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核球(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。あるいは、または、さらに、目的の分子のADCC活性は、インビボ、例えば、Clynesら、(USA)95:652-656(1998)に開示されているような動物モデルにおいて評価され得る。

【0117】

「Fcレセプター」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターのことを記述するものである。ある特定の実施形態において、FcRは、ネイティブ配列ヒトFcRである。さらに、FcRは、IgG抗体(ガンマレセプター)に結合するFcRであり得、そしてFcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIサブクラスのレセプター(これらのレセプターの対立遺伝子変異体および選択的スプライシング型を含む)を含む。FcγRIIレセプターには、FcγRIIA(「活性レセプター」)およびFcγRIIB(「阻害レセプター」)が含まれ、これらは、その細胞質ドメインが主に異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性レセプターFcγRIIAは、その細胞質ドメイン内に免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(ITAM)を含む。阻害レセプターFcγRIIBは、その細胞質ドメイン内に免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ(ITIM)を含む。(概説M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234(1997)を参照のこと)。FcRは、Ravetch and Kinetic, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991); Capella, Immunomethods 4:25-34(1994); および de Haasら, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41(1995)に概説されている。将来同定されるFcRを含む他のFcRが、本明細書中の用語「FcR」によって包含される。この用語はまた、胎仔への母系IgGの輸送に関与する新生仔レセプターFcRnを含む(Guyerら, J. Immunol. 117:587(1976)およびKimら, J. Immunol. 24:249(1994))。

【0118】

「ヒトエフェクター細胞」は、1つ以上のFcRを発現し、エフェクター機能を果たす白血球である。ある特定の実施形態において、この細胞は、少なくともFcγRIIIを発現し、およびADCCエフェクター機能を果たす。ADCCを媒介するヒト白血球の例としては、末梢血単核球(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞傷害性T細胞および好中球が挙げられ; PBMCおよびNK細胞が好ましい。このエフェクター細胞は、ネイティブな起源(例えば血液)から単離され得る。

【0119】

「補体依存性細胞傷害」または「CDC」とは、補体の存在下における標的細胞の溶解のことをいう。補体古典経路の活性化は、補体系の第1成分(C1q)が、同族の抗原に結合している抗体(適切なサブクラスの抗体)に結合することによって開始される。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイ(例えば、Gazzano-Santoroら, J. Immunol. Methods 202:163(1996)に記載されているようなもの)が行われ得る。

【0120】

「アポトーシス関連障害」とは、異常なアポトーシスまたは誤制御された(misregulated)アポトーシスによって引き起こされるか、長引くか、またはそれらを特徴とする生理学的状態または疾患状態のことをいう。アポトーシス関連障害としては、細胞増殖性障害、ウイルス性アポトーシス障害、自己免疫障害、血液学的障害、神経障害および望ましくない高速または低速のアポトーシスを特徴とする他の障害が挙げられるが、これらに限定されない。

【0121】

用語「細胞増殖性障害」および「増殖性障害」とは、いくらかの程度、異常な細胞増殖に関連する障害のことをいう。1つの実施形態において、細胞増殖性障害は、癌である。異常なアポトーシスは、異常な細胞増殖の一因である。多くの癌が、1つ以上のアポトー

シス促進性タンパク質（例えば、p 5 3 および f a s）の不活性化または生存促進性タンパク質（例えば、B c 1 - 2）の過剰産生もしくは調節不全と関連づけられている。

【0 1 2 2】

用語「癌」および「癌性」とは、代表的には制御されていない細胞増殖を特徴とする生理学的状態のことをいうか、または記述するものである。癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫および白血病またはリンパ系悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。そのような癌のより詳細な例としては、扁平上皮細胞癌（例えば、上皮の扁平上皮細胞癌）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌を含む肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、消化器癌を含む胃部の癌または胃癌、膵癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿路の癌、ヘパトーム、乳癌、結腸癌、直腸癌、直腸結腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎癌または腎臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、肛門癌、陰茎癌、メラノーマ、多発性骨髄腫およびB細胞リンパ腫、脳および頭頸部の癌ならびに関連の転移が挙げられる。

10

【0 1 2 3】

「腫瘍」とは、本明細書中で使用されるとき、悪性であるか良性であるかに関係なく、すべての腫瘍性細胞の成長および増殖、ならびに、すべての前癌性および癌性の細胞および組織のことをいう。

【0 1 2 4】

用語「ウイルス性アポトーシス障害」とは、ウイルス感染によって引き起こされるか、またはその結果として患者における異常なアポトーシスのことをいうか、または記述するものである。この用語には、ウイルス感染によって直接引き起こされる異常なアポトーシス（例えば、減少したアポトーシスまたは阻止されたアポトーシス）とウイルス感染に応答して過剰であるか、調節されていないか、もしくは誤って標的化された免疫系機能またはウイルス自体によって引き起こされる異常なアポトーシス（例えば、増加した細胞死）の両方が含まれる。ウイルス感染によって直接引き起こされる異常な（減少した）アポトーシスの例としては、エプスタイン・バーウイルスによるB c 1 - 2 様タンパク質（生存促進性B 2 R ポリペプチド）およびB c 1 - 2 産生の刺激物質の産生によって、感染細胞がアポトーシスを起こさないこと；パピローマウイルスによるp 5 3（アポトーシス促進性ポリペプチド）の不活性化または分解によって、感染細胞がアポトーシスを起こさないこと；および牛痘ウイルスによるアポトーシス促進性I C E 様プロテアーゼのインヒビターの産生によって、感染細胞がアポトーシスを起こさないことが挙げられるが、これらに限定されない。ウイルス感染によって引き起こされる異常な（増加した）アポトーシスの例は、感染したヘルパーT細胞が早期のアポトーシスを起こすことによって免疫系の重要な成分が排除される原因となるT細胞の表面におけるf a sの不適切な発現である。ウイルス感染に応答して、過剰な免疫系機能、調節されていない免疫系機能または誤って標的化された免疫系機能によって引き起こされる異常なアポトーシスの例としては、感染細胞に隣接する非感染細胞の不注意な殺滅が挙げられる。なぜなら、その隣接細胞もまた、細胞表面にf a sを発現するように誘導され得るがゆえに、循環細胞傷害性Tリンパ球によるアポトーシス経路の活性化による破壊に対して標的化され得るからである。

20

30

【0 1 2 5】

用語「自己免疫障害」とは、個体自身の組織から生じ、そしてそれに対する非悪性の疾患または障害のことをいう。自己免疫障害は、代表的には、免疫系によって破壊されるべき自己反応性免疫細胞が破壊されないことを特徴とし；生存促進性アポトーシス因子を過剰発現するか、もしくはその因子の活性を別途増加させるか、またはアポトーシス促進性因子の発現もしくは活性を減少させる自己反応性のリンパ球が、同定されている。本明細書中の自己免疫疾患は、悪性または癌性の疾患または状態を特に除外し、特に、B細胞リンパ腫、急性リンパ性白血病（A L L）、慢性リンパ性白血病（C L L）、ヘアリーセル白血病および慢性骨髄芽球性白血病を除外する。自己免疫疾患または自己免疫障害の例としては、乾癬および皮膚炎（例えば、アトピー性皮膚炎）を含む炎症性皮膚疾患のような炎症性応答；全身性強皮症および硬化症；炎症性腸疾患（例えば、クローン病および潰瘍

40

50

性大腸炎)に関連する応答;呼吸窮迫症候群(成人呼吸窮迫症候群;ARDSを含む);皮膚炎;髄膜炎;脳炎;ブドウ膜炎;大腸炎;糸球体腎炎;湿疹および喘息のようなアレルギー性状態ならびにT細胞の浸潤に関連する他の状態ならびに慢性炎症性応答;アテローム性動脈硬化症;白血球接着不全;関節リウマチ;全身性エリテマトーデス(SLE)(ループス腎炎、皮膚ループスが挙げられるがこれらに限定されない);真性糖尿病(例えば、I型真性糖尿病またはインスリン依存性糖尿病);多発性硬化症;レイノー症候群;自己免疫性甲状腺炎;橋本甲状腺炎;アレルギー性脳脊髄炎;シェーグレン症候群;若年発症糖尿病;および、代表的には、結核、サルコイドーシス、多発性筋炎、肉芽腫および血管炎に見られる、サイトカインおよびTリンパ球によって媒介される急性および遅延型の過敏症に関連する免疫応答;悪性貧血(アジソン病);白血球漏出に関連する疾患;中枢神経系(CNS)炎症性障害;多臓器障害症候群;溶血性貧血(クリオグロブリン血症(cryoglobulinemia)またはクームス陽性貧血が挙げられるがこれらに限定されない);重症筋無力症;抗原抗体複合体媒介性疾患;抗糸球体基底膜疾患;抗リン脂質抗体症候群;アレルギー性神経炎;グレーブズ病;イートン・ランバート筋無力症候群;水疱性類天疱瘡;天疱瘡;自己免疫性多腺性内分泌障害;ライター病;スティッフマン症候群;ベーチェット病;巨細胞性動脈炎;免疫複合体腎炎;IgA腎症;IgM多発ニューロパシー;免疫性血小板減少性紫斑病(ITP)または自己免疫性血小板減少症などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0126】

用語「血液学的障害」とは、血液細胞の異常な産生または不適切な血流を特徴とする疾患または障害のことをいうか、または記述するものである。血液学的障害としては、慢性疾患に関連する貧血、再生不良性貧血、慢性好中球減少症および骨髓異形成症候群、心筋梗塞ならびに脳卒中が挙げられるが、これらに限定されない。

【0127】

用語「神経障害」または「神経疾患」とは、代表的には神経組織の変質または神経組織における細胞間の連絡の衰退を特徴とする、中枢神経系および/または末梢神経系および/または特定のニューロンの疾患または障害のことをいうか、または記述するものである。神経障害の例としては、神経変性疾患(レヴィー小体病、ポリオ後(post poliomyelitis)症候群、シャイ・ドレーガー(Shy-Draeger)症候群、網膜色素変性(retinitis pigmentosa)オリブ橋小脳萎縮症、パーキンソン病、脊髄性筋萎縮症、多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、線条体黒質変性症、タウオパチー(アルツハイマー病および核上性麻痺が挙げられるがこれらに限定されない)、プリオン病(ウシ海綿状脳症、スクレイピー、クロイツフェルト・ヤコブ症候群、クールー、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、慢性消耗病および致死性家族性不眠症が挙げられるがこれらに限定されない)、球麻痺、運動ニューロン疾患および神経系異質変性障害(カナバン病、ハンチントン病、神経セロイドリポフスチン症、アレキサンダー病、トゥーレット症候群、メンケス縮れ毛症候群、コケイン症候群、ハラフォルデン・シュパッツ(Hallervorden-Spatz)症候群、ラフォラ病、レット症候群、肝レンズ核変性症、レッシュ・ナイハン症候群およびウンフェルリヒト・ルントボルク症候群が挙げられるがこれらに限定されない)、痴呆(ピック病が挙げられるがこれらに限定されない)、脊髄小脳失調、虚血および低酸素の脳損傷ならびに外傷性および興奮毒性の脳障害が挙げられるがこれらに限定されない)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0128】

「細胞死を誘導する」かまたは「アポトーシスを誘導する」本発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニストまたは組成物は、生存可能な細胞が生育不能になることを引き起こすものである。ある特定の実施形態において、その細胞は、癌細胞、例えば、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、脾臓または膀胱の細胞である。インビトロにおける細胞死は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)または補体依存性細胞傷害(CDC)によって誘導される細胞死と区別するために、補体および免疫エフェク

10

20

30

40

50

ター細胞の非存在下で決定され得る。従って、細胞死についてのアッセイは、熱失活した血清を使用して（すなわち、補体の非存在下において）かつ免疫エフェクター細胞の非存在下で実施され得る。本発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニストまたは組成物が、細胞死を誘導することができるか否かを判定するために、ヨウ化プロピジウム（PI）、トリパンブルー（Mooreら、Cytotechnology 17:1-11（1995）を参照のこと）またはFADの取り込みによって評価するとき、膜の完全性の喪失を未処理細胞と比べて評価することができる。

【0129】

「ZPA発現細胞」は、内在性ZPAポリペプチドまたはトランスフェクトされたZPAポリペプチドを発現する細胞である。「ZPA発現癌」は、ZPAポリペプチドを産生する細胞を含む癌である。ZPAポリペプチドまたはそのホモログを「過剰発現する」癌は、同じ組織型の非癌性細胞と比べて、有意に高いレベルのZPAポリペプチドまたはそのホモログを有する癌である。そのような過剰発現は、遺伝子増幅または転写もしくは翻訳の増加によって引き起こされ得る。ZPAポリペプチドまたはZPAポリペプチドホモログの過剰発現は、細胞内に存在する高レベルのZPAタンパク質またはZPAタンパク質ホモログを評価する（例えば、免疫組織化学アッセイなどを介して）ことによって、診断アッセイまたは予後アッセイにおいて測定され得る。あるいは、または、さらに、例えば、ZPAをコードする核酸またはその相補体に対応する核酸ベースプローブを使用する蛍光インサイチュハイブリダイゼーションを介して、ZPAポリペプチドをコードする核酸もしくはmRNA、または、ZPAポリペプチドホモログをコードする核酸もしくはmRNAの細胞内のレベルを測定することができる；（FISH；1998年10月に公開されたWO98/45479を参照のこと）、サザンブロッティング、ノーザンブロッティングまたはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）手法（例えば、リアルタイム定量的PCR（RT-PCR））。上記のアッセイのほかに、様々なインビボアッセイが、当業者に利用可能である。例えば、検出可能な標識、例えば、放射性同位体で必要に応じて標識されている内部移行抗体に、哺乳動物の体内の細胞を曝露し、そして、例えば、放射能について外部スキャンすることによって、または、事前に上記抗体に曝露した哺乳動物から採取されたバイオプシーを解析することによって、その哺乳動物における上記抗体のZPAポリペプチドまたはZPAポリペプチドホモログへの結合を評価することができる。

【0130】

単語「標識」とは、本明細書中で使用されるとき、「標識された」ポリペプチド、抗体、アンタゴニストまたは組成物を生成するために、ポリペプチド、抗体、アンタゴニストまたは組成物に直接的または間接的に結合体化されている検出可能な化合物または組成物のことをいう。標識は、それ自体で検出可能であり得る（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）か、または、酵素的標識の場合は、検出可能である基質化合物または基質組成物の化学変換を触媒し得る。

【0131】

用語「細胞傷害性薬剤」とは、本明細書中で使用されるとき、細胞の機能を阻害もしくは妨害し、そして／または細胞の破壊を引き起こす物質のことをいう。この用語は、放射性同位体（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} およびLuの放射性同位体）、化学療法剤、例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン（adriamycin）、ビンカルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシンまたは他のインターカレート剤、酵素およびそのフラグメント（例えば、核酸分解酵素、抗生物質およびトキシシン（例えば、細菌、真菌、植物もしくは動物起源の低分子トキシシンまたは酵素的に活性なトキシシン（それらのフラグメントおよび／または改変体を含む））および以下に開示する様々な抗腫瘍剤または抗癌剤を含むと意図される。他の細胞傷害性薬剤は、以下に記載する。殺腫瘍性薬剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【0132】

「化学療法剤」は、癌の処置に有用な化学物質である。化学療法剤の例としては、アルキル化剤（例えば、チオテパおよびCYTOSOXAN（登録商標）シクロスホスファミド）；スルホン酸アルキル類（例えば、ブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファン（*piposulfan*））；アジリジン（例えば、ベンゾドパ（*benzodopa*）、カルボコン、メツレドパ（*meturedopa*）およびウレドパ（*uredopa*））；エチレンイミンおよびメチルアメラミン（*methylamelamine*）（アルトレタミン（*altretamine*）、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド（*triethylenethiophosphoramidate*）およびトリメチロールメラミン（*trimethylolomelamine*）を含む）；アセトゲニン類（特にブラタシンおよびブラタシノン）；カンプトテシン（合成アナログトポテカンを含む）；ブリオスタチン；カリストアチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン（*carzelesin*）およびビゼレシン（*bizelesin*）合成アナログを含む）；クリプトフィシン（*cryptophycin*）類（特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成アナログであるKW-2189およびCB1-TM1を含む）；エレウセロビン（*eleutherobin*）；パンクラチスタチン（*pancratistatin*）；サルコジクチン（*sarcodictyin*）；スポンギスタチン（*spongistatin*）；ナイトロジェンマスタード類（例えば、クロラムブシル、クロルナファジン（*chlornaphazine*）、コロホスファミド（*cholophosphamide*）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベンビキン（*novembichin*）、フェネステリン（*phenesterine*）、プレドニムスチン（*prednimustine*）、トロフォスファミド（*trofosfamide*）、ウラシルマスタード）；ニトロソ尿素類（*nitrosureas*）（例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン（*fotemustine*）、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムヌスチン（*ranimnustine*））；抗生物質（例えば、エンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシニングナム1IおよびカリケアマイシンオメガI1（例えば、Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186（1994）を参照のこと））；ジネマイシン（*dynemicin*）（ジネマイシンAを含む）；ビスホスホネート類（例えば、クロドロネート）；エスペラミシン（*esperamicin*）；ならびにネオカルチノスタチン発色団および関連色素タンパク質のエンジイン抗生物質（*antibiotic*）発色団）、アクラシノマイシン類（*aclacinomysins*）、アクチノマイシン、オースラマイシン（*authramycin*）、アザセリン、ブレオマイシン類、カクチノマイシン、カラビシン（*carabycin*）、カルミノマイシン（*carminomycin*）、カルジノフィリン（*carzinophilin*）、クロモマイシン（*chromomycinis*）、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン（*detorubicin*）、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN（登録商標）ドキソルビシン（モルホリノードドキソルビシン、シアノモルホリノードドキソルビシン、2-ピロリノードドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンを含む）、エビルビシン、エソルビシン（*esorubicin*）、イダルビシン、マルセロマイシン（*marcellomycin*）、マイトマイシン類（例えば、マイトマイシンC）、ミコフェノール酸、ノガラマイシン（*nogalamycin*）、オリボマイシン（*olivomycins*）、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（*potfiromycin*）、ピューロマイシン、クエラマイシン（*quelamycin*）、ロドルビシン（*rodorubicin*）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン（*tubercidin*）、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；抗代謝産物（例えば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU））；葉酸アナログ（例えば、デノプテリン（*denopterin*）、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート）；プリンアナログ（例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン（*thiamiprine*）、チオ

10

20

30

40

50

グアニン) ; ピリミジンアナログ (例えば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン) ; アンドロゲン類 (例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン) ; 抗副腎剤 (例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン) ; 葉酸補充剤 (例えば、フロリン酸 (frolinic acid)) ; アセグラトン ; アルドホスファミドグリコシド (aldophosphamide glycoside) ; アミノレブリン酸 ; エニルウラシル (eniluracil) ; アムサクリン ; ベストラブシル (bestrabucil) ; ビサントレン (bisantrene) ; エダトラキセート (edatraxate) ; デホファミン (defofamine) ; デメコルチン ; ジアジコン ; エルホルニチン (elfornithine) ; 酢酸エリプチニウム (elliptinium acetate) ; エポチロン ; エトグルシド ; 硝酸ガリウム ; ヒドロキシ尿素 ; レンチナン ; ロニダイニン (lonidainine) ; メイタンシノイド類 (maytansinoids) (例えば、メイタンシンおよびアンサミトシン類 (ansamitocins) ; ミトグアゾン (mitoguazone) ; ミトキサントロン ; モピダンモール (mopidanmol) ; ニトラエリン (nitraerine) ; ペントスタチン ; フェナメット (phenamet) ; ピラルビシン ; ロソキサントロン (losoxantnone) ; ポドフィリン酸 (podophyllinic acid) ; 2-エチルヒドラジド ; プロカルバジン ; PSK (登録商標) 多糖複合体 (JHS Natural Products, Eugene, OR) ; ラゾキサン (razoxane) ; リゾキシ 20
ン ; シゾフィラン ; スピロゲルマニウム ; テヌアゾン酸 ; トリアジクォン (triaziquone) ; 2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン ; トリコテシン類 (特にT-2トキシシン、ベラクリン (verracurin) A、ロリジン (roridin) A およびアングイジン (anguidine)) ; ウレタン ; ビンデシン ; ダカルバジン ; マンノムスチン ; ミトブロニトール ; ミトラクトール (mitolactol) ; ピボプロマン ; ガシトシン (gacytosine) ; アラビノシド (「Ara-C」) ; シクロホスファミド ; チオテパ ; タキソイド類、例えば、TAXOL (登録商標) パクリタキセル (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、パクリタキセルの無Cremophorアルブミン加工ナノ粒子形成物であるABRAXANETM (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) およびTAXOTERE (登録商標) ドキセタキセル (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France) ; クロランブシル (chloranbucil) ; GEMZAR (登録商標) ゲムシタビン ; 6-チオグアニン ; メルカプトプリン ; メトトレキサート ; 白金アナログ (例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン) ; ビンブラスチン ; 白金 ; エトポシド (VP-16) ; イホスファミド ; ミトキサントロン ; ビンクリスチン ; NAVELBINE (登録商標) ビノレルビン ; ノバントロン (novantrone) ; テニボシド ; エダトレキサート (edatrexate) ; ダウノマイシン ; アミノプテリン ; キセロダ (xeloda) ; イバンドロネート ; CPT-11 ; トポイソメラーゼインヒビター-RFS2000 ; ジフルオロメチルオルニチン (difluoromethylornithine) (DMFO) ; レチノイン酸のようなレチノイド ; カペシタビン ; およ 40
び上記のいずれかの薬学的に許容可能な塩、酸または誘導体が挙げられる。

【0133】

腫瘍に対するホルモン作用を制御するかまたは阻害するように作用する抗ホルモン剤 (例えば、抗エストロゲン類および選択的エストロゲン受容体調節因子 (selective estrogen receptor modulator) (SERM) (例えば、タモキシフェン (NOLVADEX (登録商標) タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン (trioxifene)、ケオキシフェン (keoxifene)、LY117018、オナプリストン (onapristone) およびFARESTON・トレミフェンを含む)) 50

；副腎におけるエストロゲン産生を制御する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼインヒビター（例えば、4（5）-イミダゾール類、アミノグルテチミド、MEGASE（登録商標）酢酸メゲストロール、AROMASIN（登録商標）エキセメスタン、フォルメスタン（formestane）、ファドロゾール、RIVISOR（登録商標）ボロゾール（vorozole）、FEMARA（登録商標）レトロゾールおよびARIMIDEX（登録商標）アナストロゾール）；および抗アンドロゲン類（例えば、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリドおよびゴセレリン）；ならびにトロキサシタビン（troxacitabine）（1，3-ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な細胞増殖に関連するシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの（例えば、PKC-α、RalAおよびH-Ras）；VEGF発現インヒビター（例えば、ANGIOZYME（登録商標）リボザイム）およびHER2発現インヒビターのようなリボザイム；遺伝子治療ワクチンのようなワクチン、例えば、ALLOVECTIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチンおよびVAXID（登録商標）ワクチン；PROLEUKIN（登録商標）rIL-2；LURTOTECAN（登録商標）トポイソメラーゼIインヒビター；ABARELIX（登録商標）rmRH；および上記のいずれかの薬学的に許容可能な塩、酸または誘導体もまた本定義に含まれる。

【0134】

「増殖阻害性薬剤」とは、本明細書中で使用されるとき、インビトロまたはインビボのいずれかにおいて、細胞、特に癌細胞の増殖を阻害する化合物または組成物のことをいう。従って、増殖阻害性薬剤は、S期の細胞のパーセンテージを有意に低下させるものであり得る。増殖阻害性薬剤の例としては、細胞周期の進行を（S期以外の位置において）阻止する薬剤（例えば、G1停止およびM期停止を誘導する薬剤）が挙げられる。従来のM期遮断薬としては、ビンカ類（ビンクリスチンおよびビンブラスチン）、タキサン類およびトポイソメラーゼIIインヒビター（例えば、ドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシドおよびブレオマイシン）が挙げられる。G1を停止する薬剤（例えば、DNAアルキル化剤（例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシルおよびara-C））はまた、S期停止にも波及する。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, 表題“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”Murakamiら（WB Saunders: Philadelphia, 1995）、特にそのp. 13に見ることができる。タキサン類（パクリタキセルおよびドセタキセル）は、抗癌性の薬物であり、その両方が、イチイ属の木に由来する。ヨーロッパイイチイに由来するドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、Rhône-Poulenc Rorer）は、パクリタキセル（TAXOL（登録商標）、Bristol-Myers Squibb）の半合成アナログである。パクリタキセルおよびドセタキセルは、チューブリン二量体からの微小管の構築を促進し、そして脱重合を防止することによって細胞における有糸分裂の阻害をもたらし、微小管を安定化する。

【0135】

「ドキソルビシン」は、アントラサイクリン系抗生物質である。ドキソルビシンの正式な化学名は、(8S-cis)-10-[(3-アミノ-2, 3, 6-トリデオキシ-α-L-lyxo-ヘキサピラノシル)オキシ]-7, 8, 9, 10-テトラヒドロ-6, 8, 11-トリヒドロキシ-8-(ヒドロキシアセチル)-1-メトキシ-5, 12-ナフタセンジオンである。

【0136】

用語「添付文書」は、そのような治療上の製品の使用に関する適応症、用法、用量、投与方法、禁忌症および／または警告についての情報を含む、治療上の製品の商業的パッケージ内に習慣的に含まれている指示書のことをいうために使用される。

【0137】

本発明の組成物および方法

ZPAポリペプチド改変体

本明細書中に記載される全長ネイティブ配列ZPAポリペプチドに加えて、ZPAポリペプチド改変体が調製され得ることが企図される。ZPAポリペプチド改変体は、ZPA核酸に適切なヌクレオチド変化を導入することおよび／または所望のZPAポリペプチドを合成することによって調製され得る。当業者は、アミノ酸変化によって、ZPAポリペプチドの翻訳後のプロセスが変化し得ること（例えば、グリコシル化部位の数もしくは位置が変化することまたは膜アンカー特性が変化すること）を認識している。

【0138】

ネイティブ全長配列ZPAポリペプチドまたは本明細書中に記載されるZPAポリペプチドの様々なドメインにおいて、例えば、米国特許第5,364,934号に示されている保存的変異および非保存的変異についての手法および指針のいずれかを用いて改変（variation）が行われ得る。改変は、ネイティブ配列ZPAポリペプチドと比べて、ZPAポリペプチドのアミノ酸配列の変化をもたらす、ZPAポリペプチドをコードする1つ以上のコドンの置換、欠失または挿入であり得る。必要に応じて、改変は、ZPAポリペプチドのドメインの1つ以上において少なくとも1つのアミノ酸を他の任意のアミノ酸によって置換することによるものである。アミノ酸残基が、所望の活性に悪影響を及ぼさずに挿入され得るか、置換され得るか、または欠失され得るか否かを判定する指針は、ZPAポリペプチドの配列を相同な公知タンパク質分子の配列と比較し、そして相同性の高い領域におけるアミノ酸配列の変化の数を最小にすることによって見出され得る。アミノ酸置換は、1つのアミノ酸を、類似の構造的特性および／または化学的特性を有する別のアミノ酸で置換（例えば、ロイシンをセリンで置換すること、すなわち、保存的アミノ酸置換）した結果であり得る。挿入または欠失は、必要に応じて、約1～5アミノ酸の範囲であり得る。許容される改変は、その配列内のアミノ酸の挿入、欠失または置換を体系的に行い、そして得られる改変体を全長ネイティブ配列または成熟ネイティブ配列によって示される活性について試験することによって判定され得る。

【0139】

特定の実施形態において、目的の保存的置換を、表1の好ましい置換の項目に示す。そのような置換が、生物学的活性の変化をもたらす場合、より実質的な変化（表1における例示的な置換と命名される置換またはアミノ酸クラスを参照して以下にさらに記載されるような置換）が導入され、その産物がスクリーニングされる。

【0140】

【表 1】

表 1

もとの残基	例示的な置換	好ましい置換	
Ala (A)	val; leu; ile	val	
Arg (R)	lys; gln; asn	lys	
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln	
Asp (D)	glu	glu	
Cys (C)	ser	ser	10
Gln (Q)	asn	asn	
Glu (E)	asp	asp	
Gly (G)	pro; ala	ala	
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe;		
	ノロイシン	leu	
Leu (L)	ノロイシン; ile; val;		20
	met; ala; phe	ile	
Lys (K)	arg; gln; asn	arg	
Met (M)	leu; phe; ile	leu	
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu	
Pro (P)	ala	ala	
Ser (S)	thr	thr	
Thr (T)	ser	ser	
Trp (W)	tyr; phe	tyr	30
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe	
Val (V)	ile; leu; met; phe;		
	ala; ノロイシン	leu	

ZPAポリペプチドの機能または免疫学的独自性の実質的な修飾は、（a）置換領域におけるポリペプチド骨格の構造（例えば、シート立体配座またはヘリックス立体配座）、（b）標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または（c）側鎖のかさ、の維持に対する影響が有意に異なる置換を選択することによって達成される。天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて以下の群に分類される：

- （1）疎水性：ノロイシン、met、ala、val、leu、ile；
- （2）中性で親水性：cys、ser、thr；
- （3）酸性：asp、glu；
- （4）塩基性：asn、gln、his、lys、arg；
- （5）鎖配向に影響する残基：gly、pro；および
- （6）芳香族：trp、tyr、phe。

【0141】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスに交換することを必要とする。そのような置換残基はまた、保存的置換部位または残りの（非保存的）部位に導入され得る。

10

20

30

40

50

【0142】

改変は、当該分野で公知の方法（例えば、オリゴヌクレオチド介在性（部位特異的）突然変異誘発、アラニンスキャニングおよびPCR突然変異誘発）を使用して、行われ得る。部位定方向突然変異誘発 [Carterら、Nuc l. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zollerら、Nuc l. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [Wellsら、Gene, 34: 315 (1985)]、制限部位選択突然変異誘発 (restriction selection mutagenesis) [Wellsら、Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317: 415 (1986)] または他の公知の手法を、クローニングされたDNAに対して行うことによって、ZPA改変体DNAを作製することができる。

10

【0143】

スキャニングアミノ酸解析はまた、連続した配列に沿って1つ以上のアミノ酸を同定するために使用され得る。ある特定の実施形態において、スキャニングアミノ酸は、比較的小型の中性アミノ酸である。そのようなアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリンおよびシステインが挙げられる。アラニンは、代表的には、この群のなかでも好ましいスキャニングアミノ酸である。なぜなら、アラニンは、ベータ炭素を超える側鎖を排除し、その改変体の主鎖の立体配座を変化させる可能性が低いからである [Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。アラニンは最も一般的なアミノ酸であるので、代表的には好ましい。さらに、アラニンは、しばしば埋没した位置と露出した位置の両方において見られる [Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N. Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニン置換が、適切な量の改変体をもたらさない場合、等配電子の (isotERIC) アミノ酸を使用することができる。

20

【0144】

ZPAポリペプチドの修飾

ZPAポリペプチドの共有結合性の修飾は、本発明の範囲内に含まれる。共有結合性の修飾の1つのタイプとしては、ZPAポリペプチドの選択された側鎖またはN末端残基もしくはC末端残基と反応することができる有機誘導体化剤とZPAポリペプチドの標的アミノ酸残基との反応が挙げられる。二官能性薬剤を用いた誘導体化は、例えば、抗ZPA抗体を精製するための方法において使用するためのZPAポリペプチドを水不溶性の支持マトリックスまたは表面に架橋するために有用であり、逆もまた同じである。よく使用される架橋剤としては、例えば、1, 1-ビス (ジアゾアセチル) -2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば、4-アジド-サリチル酸によるエステル、ホモ二官能性イミドエステル (3, 3'-ジチオビス (スクシンイミジル-プロピオン酸エステル) のようなジスクシンイミジルエステルを含む)、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタンのような二官能性マレイミドおよびメチル-3- [(p-アジドフェニル) -ジチオ] プロピオイミデートのような薬剤が挙げられる。

30

40

【0145】

他の修飾としては、グルタミル残基およびアスパラギン残基の、それぞれ対応するグルタミン残基およびアスパルチル残基へのアミド分解、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリル残基またはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン側鎖、アルギニン側鎖およびヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化 [T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化および任意のC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【0146】

50

本発明の範囲内に含まれるZPAポリペプチドの別のタイプの共有結合性の修飾は、そのポリペプチドのネイティブグリコシル化パターンを変化させることを含む。「ネイティブグリコシル化パターンを変化させること」は、ネイティブ配列ZPAポリペプチドに見られる1つ以上の炭水化物部分を欠失させること（化学的手段および／もしくは酵素的手段によって潜在的なグリコシル化部位を除去することまたはグリコシル化を欠失させることによって）および／またはネイティブ配列ZPAポリペプチド内に存在しない1つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味すると本明細書中の目的のために意図される。さらに、この語句は、存在する様々な炭水化物部分の性質および割合の変化をはじめとした、ネイティブタンパク質のグリコシル化の定性的な変化を含む。

【0147】

ZPAポリペプチドに対するグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を変化させることによって達成され得る。この変化は、例えば、ネイティブ配列ZPAポリペプチドに1つ以上のセリン残基またはトレオニン残基を付加することまたはそれらによって置換することによってなされ得る（O結合型グリコシル化部位に対しては）。ZPAアミノ酸配列は、必要に応じて、DNAレベルでの変化によって、特に、予め選択された塩基においてZPAポリペプチドをコードするDNAを変異させることによって、変更され得、所望のアミノ酸に翻訳するコドンが生成される。

【0148】

ZPAポリペプチドにおいて炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、グリコシドをそのポリペプチドに化学的または酵素的に結合することによるものである。そのような方法は、当該分野で報告されており、例えば、1987年9月11日に公開されたWO87/05330およびApplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)において報告されている。

【0149】

ZPAポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的または酵素的に達成され得るか、またはグリコシル化に対する標的として作用するアミノ酸残基をコードするコドンの変異性置換によって達成され得る。化学的な脱グリコシル化の手法は、当該分野で公知であり、例えば、Hakimuddin, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)およびEdge, Anal. Biochem., 118:131 (1981)によって報告されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura, Meth. Enzymol., 138:350 (1987)によって報告されているような種々のエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼを使用することによって達成され得る。

【0150】

ZPAポリペプチドの別のタイプの共有結合性の修飾は、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号または同第4,179,337号に示される様式で、ZPAポリペプチドを種々の非タンパク質性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシエチレンアルキルのうちの1つに連結することを含む。

【0151】

本発明のZPAポリペプチドはまた、別の異種ポリペプチド配列または異種アミノ酸配列に融合されたZPAポリペプチドを含むキメラ分子を形成する方法で修飾され得る。

【0152】

1つの実施形態において、そのようなキメラ分子は、ZPAポリペプチドを様々な組織に送達するために標的化するタンパク質導入ドメインと、ZPAポリペプチドとの融合物を含む。1つの局面において、ZPAポリペプチドは、例えば、ヒト免疫不全ウイルスTATタンパク質のタンパク質導入ドメインを使用して、脳血液関門を越えて脳を標的化する（Schwarze, 1999, Science 285:1569-72）。

【0153】

別の実施形態において、そのようなキメラ分子は、抗tag抗体が選択的に結合し得るエピトープを提供するタグポリペプチドとZPAポリペプチドとの融合物を含む。エピトープタグは、通常、ZPAポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に配置される。ZPAポリペプチドのそのようなエピトープタグ化型の存在は、そのタグポリペプチドに対する抗体を使用して検出され得る。また、エピトープタグの提供により、抗tag抗体またはそのエピトープタグに結合する別のタイプの親和性マトリックスを使用することで、親和性精製によってZPAポリペプチドを容易に精製することが可能になる。様々なタグポリペプチドおよびその各々の抗体は、当該分野で公知である。例としては、ポリヒスチジン（ポリHis）タグまたはポリヒスチジングリシン（ポリ-His-gly）；flu-HAタグポリペプチドおよびその抗体12CA5 [Fieldら、Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグならびにそれに対する8F9抗体、3C7抗体、6E10抗体、G4抗体、B7抗体および9E10抗体 [Evanら、Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]；および単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD) タグおよびその抗体 [Paborskyら、Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)] が挙げられる。他のタグポリペプチドとしては、Flag-ペプチド [Hoppら、Biotechnology, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド [Martinら、Science, 255:192-194 (1992)]； α -チューブリンエピトープペプチド [Skinnerら、J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；およびT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuthら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)] が挙げられる。

【0154】

代替の実施形態において、キメラ分子は、免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定領域とZPAポリペプチドとの融合物を含み得る。二価型のキメラ分子（「イムノアドヘシン」とも呼ばれる）については、そのような融合物は、IgG分子のFc領域に対するものであり得る。1つの実施形態において、免疫グロブリン融合物は、ヒンジ、IgG1分子のCH2およびCH3、または、ヒンジ、IgG1分子のCH1、CH2およびCH3領域を含む。免疫グロブリン融合物の作製については、米国特許第5,428,130号も参照のこと。

【0155】

ZPAポリペプチドの調製

以下の説明は、主に、ZPAポリペプチドをコードする核酸を含むベクターで形質転換されたか、またはトランスフェクトされた細胞を培養することによるZPAポリペプチドの作製に関する。当然のことながら、当該分野で公知の代替方法が、ZPAポリペプチドを調製するために使用され得ることが企図される。例えば、ZPAポリペプチド配列またはその一部は、固相手法を用いる直接的なペプチド合成によって作製され得る。例えば、Stewartら、Solid-Phase Peptide Synthesis (W. H. Freeman Co.: San Francisco, CA, 1969)；Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)を参照のこと。インビトロタンパク質合成は、手動の手法を使用するかまたは自動化によって行われ得る。自動化された合成は、例えば、Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA)を用い、製造者の指示書を使用して達成され得る。ZPAポリペプチドの様々な部分は、別々に化学合成され、そして、化学的方法または酵素的方法を使用して組み合わされることにより、全長ZPAポリペプチドが作製され得る。

【0156】

宿主細胞の選択および形質転換

宿主細胞は、ZPAポリペプチド産生のための本明細書中に記載される発現ベクターま

たはクローニングベクターでトランスフェクトされるか、または形質転換され、そして、プロモーターの誘導、形質転換体の選択または所望の配列をコードする遺伝子の増幅に適するように変更された従来の栄養培地において培養される。培養条件（例えば、培地、温度、pHなど）は、過剰な実験をすることなく当業者によって選択され得る。通常、細胞培養物の生産性を最大にするための原理、プロトコルおよび実際の手法は、*Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) および Sambrookら、前出に見ることができる。

【0157】

トランスフェクションの方法は、当業者に公知であり、例えば、CaPO₄ 処理およびエレクトロポレーションである。使用される宿主細胞に応じ、その細胞に適切な標準的な手法を用いて形質転換が行われる。Sambrookら、前出に記載されているような塩化カルシウムを使用するカルシウム処理またはエレクトロポレーションは、通常、原核生物または実質的な細胞壁障壁を含む他の細胞に使用される。ある特定の植物細胞の形質転換には、Shawら、Gene, 23:315 (1983) および1989年6月29日に公開されたWO89/05859によって記載されているようなAgrobacterium tumefaciensによる感染が使用される。細胞壁を有しない哺乳動物細胞については、Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978) のリン酸カルシウム沈降法を使用することができる。哺乳動物細胞宿主系形質転換の一般的な態様は、米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母に対する形質転換は、代表的には、Van Solingenら、J. Bact., 130:946 (1977) およびHsiaoら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979) の方法に従って行われる。しかしながら、DNAを細胞に導入するための他の方法（例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、インタクトな細胞と細菌とのプロトプラスト融合またはポリカチオン、例えば、ポリブレンもしくはポリオルニチンによる方法）もまた使用され得る。哺乳動物細胞を形質転換するための様々な手法については、Keownら、Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) およびMansourら、Nature, 336:348-352 (1988) を参照のこと。

【0158】

本明細書中のベクターにおけるDNAのクローニングまたは発現に適した宿主細胞としては、原核生物、酵母または高等な真核細胞が挙げられる。適当な原核生物としては、真正細菌（例えば、グラム陰性生物またはグラム陽性生物、例えば、E. coliのようなEnterobacteriaceae）が挙げられるが、これらに限定されない。E. coli K12株MM294 (ATCC31,446); E. coli X1776 (ATCC31,537); E. coli W3110株 (ATCC27,325); およびK5772 (ATCC53,635) のような様々なE. coli株が、公的に入手可能である。他の適当な原核生物宿主細胞としては、Enterobacteriaceae（例えば、Escherichia、例えば、E. coli）、Enterobacter、Erwinia、Klebsiella、Proteus、Salmonella（例えば、Salmonella typhimurium）、Serratia（例えば、Serratia marcescans）およびShigellaならびにBacilli（例えば、B. subtilisおよびB. licheniformis（例えば、1989年4月12日に公開されたDD266,710に開示されているB. licheniformis 41P））、Pseudomonas（例えば、P. aeruginosa）およびStreptomycesが挙げられる。これらの例は、限定的ではなく例示的である。W3110株は、組換えDNA産物の発酵に対する一般的な宿主株であるので、W3110株は、1つの実施形態において宿主または親宿主である。ある特定の実施形態において、宿主細胞は、最少量のタンパク分解性酵素を分泌する。例えば、W3110株は、宿主に対して内在性であるタンパク質をコードする遺伝子における遺伝的

変異に影響を及ぼすように変更され得、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型 *tonA* を有する *E. coli* W3110 株 1A2；完全な遺伝子型 *tonA ptr3* を有する *E. coli* W3110 株 9E4；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r* を有する *E. coli* W3110 株 27C7 (ATCC 55, 244)；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs 7 ilvG kan^r* を有する *E. coli* W3110 株 37D6；非カナマイシン耐性 *degP* 欠失変異を有する 37D6 株である *E. coli* W3110 株 40B4；および 1990 年 8 月 7 日に発行された米国特許第 4, 946, 783 号に開示されている、ペリプラズムプロテアーゼ変異を有する *E. coli* 株が挙げられる。あるいは、クローニングのインビトロにおける方法、例えば、PCR または他の核酸ポリメラーゼ反応が適当である。

10

【0159】

原核生物に加えて、真核生物の微生物（例えば、糸状菌または酵母）が、ZPA ポリペプチドをコードするベクターに適したクローニング宿主または発現宿主である。*Saccharomyces cerevisiae* は、よく使用される下等な真核生物宿主微生物である。他のものとしては、*Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290:140 [1981]；1985 年 5 月 2 日に公開された EP139, 383)；*Kluyveromyces hosts* (米国特許第 4, 943, 529 号；Fleer ら、Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) (例えば、*K. lactis* (MW98-8C、CBS683、CBS4574；Louvencourt ら、J. Bacteriol., 737 [1983])、*K. fragilis* (ATCC12, 424)、*K. bulgaricus* (ATCC16, 045)、*K. wickerhamii* (ATCC24, 178)、*K. waltii* (ATCC56, 500)、*K. drosophilae* (ATCC36, 906；Van den Berg ら、Bio/Technology, 8:135 (1990))、*K. thermotolerans* および *K. marxianus*)；*Yarrowia* (EP402, 226)；*Pichia pastoris* (EP183, 070；Sreekrishna ら、J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988])；*Candida*；*Trichoderma reesia* (EP244, 234)；*Neurospora crassa* (Case ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979])；*Schwanniomyces* (例えば、*Schwanniomyces occidentalis* (1990 年 10 月 31 日に公開された EP394, 538))；ならびに糸状菌（例えば、*Neurospora*、*Penicillium*、*Tolyposcladium* (1991 年 1 月 10 日に公開された WO91/00357)) および *Aspergillus hosts* (例えば、*A. nidulans* (Ballance ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]；Tilburn ら、Gene, 26:205-221 [1983]；Yelton ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 [1984]) および *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985])) が挙げられる。メチロトロピック (Methylotropic) 酵母が本明細書中において適当であり、その酵母としては、*Hansenula*、*Candida*、*Kloeckera*、*Pichia*、*Saccharomyces*、*Torulopsis* および *Rhodotorula* からなる属から選択される、メタノールにおいて増殖することができる酵母が挙げられるが、これらに限定されない。このクラスの酵母の例示的な特定の種の列挙は、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982) に見られ得る。

20

30

40

【0160】

50

ZPAポリペプチドをコードする核酸の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物から得られる。無脊椎動物細胞の例としては、昆虫細胞（例えば、*Drosophila* S2および*Spodoptera* Sf9）ならびに植物細胞が挙げられる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞およびCOS細胞が挙げられる。より特定の例としては、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1系統（COS-7, ATCC CRL1651）；ヒト胚腎臓系統（293細胞または懸濁培地における増殖のためにサブクローン化された293細胞, Grahamら、*J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／-DHFR（CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)）；マウスセルトリ細胞（TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)）；ヒト肺細胞（W138, ATCC CCL75）；ヒト肝臓細胞（Hep G2, HB8065）；およびマウス乳癌（MMT060562, ATCC CCL51）が挙げられる。適切な宿主細胞の選択は、当該分野の技術の範囲内であるとみられる。

【0161】

複製可能なベクターの選択および使用

本発明のポリペプチドまたは抗体をコードする核酸（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）は、クローニング（DNAの増幅）または発現に向けて複製可能なベクターに挿入され得る。様々なベクターが、公的に入手可能である。そのベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子またはファージの形態であり得る。適切な核酸配列は、種々の手順によってベクターに挿入され得る。一般に、DNAは、当該分野で公知の手法を使用して適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、シグナル配列（その配列が分泌されるべきものである場合）、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーターおよび転写終結配列のうちの1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。これらの成分の1つ以上を含む適当なベクターの構築には、当業者に公知の標準的なライゲーション手法を使用する。

【0162】

本発明のポリペプチドまたは抗体は、直接作製され得るだけでなく、異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても組換え的に作製され得、その異種ポリペプチドは、シグナル配列であり得るか、または成熟タンパク質もしくは成熟ポリペプチドのN末端に特定の切断部位を有する他のポリペプチドであり得る。一般に、シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはそのベクターに挿入されるポリペプチドもしくは抗体をコードするDNAの一部であり得る。シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppまたは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物のシグナル配列であり得る。酵母の分泌については、シグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（*Saccharomyces* および *Kluyveromyces* の α -因子リーダーを含む（後者は、米国特許第5,010,182号に記載されている））または酸ホスファターゼリーダー、*C. albicans* グルコアミラーゼリーダー（1990年4月4日に公開されたEP362,179）または1990年11月15日に公開されたWO90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現において、哺乳動物のシグナル配列（例えば、同じ種または関連する種の分泌ポリペプチドからのシグナル配列ならびにウイルスの分泌リーダー）は、そのタンパク質の分泌を指示するために使用され得る。

【0163】

発現ベクターとクローニングベクターの両方が、1つ以上の選択された宿主細胞においてそのベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は、種々の細菌、酵母およびウイルスについて知られている。プラスミドpBR322の複製起点は、ほとんどのグラム陰性菌に適しており、2 μ プラスミド起点は、酵母に適しており、様々なウイルス起源（SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSVまたはBPV）が、哺乳動物細胞においてクローニングベクターに有用である。

【0164】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、選択可能マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含む。代表的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質または他のトキシン、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサートもしくはテトラサイクリンに対する耐性を付与するタンパク質、(b) 栄養要求性欠損を補完するタンパク質、または(c) 複合培地から利用不可能な極めて重要な栄養分を供給するタンパク質をコードし、例えば、Bacilliに対するD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子である。

【0165】

哺乳動物細胞に適した選択可能マーカーの例は、ポリペプチドまたは抗体（例えば、DHFRまたはチミジンキナーゼ）をコードする核酸を取り込む能力のある細胞の同定を可能にするマーカーである。野生型DHFRが使用されるとき、適切な宿主細胞は、Urbauerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980) によって記載されているように調製されて増殖される、DHFR活性が欠損しているCHO細胞株である。酵母における使用に適した選択遺伝子は、酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である。Stinchcombら、Nature, 282:39 (1979); Kingsmanら、Gene, 7:141 (1979); Tschemperら、Gene, 10:157 (1980)。trp1遺伝子は、トリプトファン中で生育する能力を喪失している酵母の変異株（例えば、ATCC番号44076またはPEP4-1）に、選択マーカーを提供する。Jones, Genetics, 85:12 (1977)。

【0166】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、通常、本発明のポリペプチドまたは抗体をコードする核酸配列に作動可能に連結されており、mRNA合成を指示するプロモーターを含む。宿主細胞となり得る種々の細胞によって認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主を用いる使用に適しているプロモーターとしては、 β -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系（Changら、Nature, 275:615 (1978); Goeddelら、Nature, 281:544 (1979)）、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系（Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP36, 776）およびハイブリッドプロモーター（例えば、tacプロモーター（deBoerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)））が挙げられる。細菌の系において使用するためのプロモーターは、本発明のポリペプチドまたは抗体をコードするDNAに作動可能に連結されたシャイン・ダルガノ(S. D.)配列を含む。

【0167】

酵母宿主を用いる使用に適したプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ（Hitzemanら、J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)）または他の解糖酵素（Hessら、J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)）（例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼおよびグルコキナーゼ）に対するプロモーターが挙げられる。

【0168】

増殖条件によって調節される転写のさらなる利点を有する誘導プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼならびにマルトース利用およびガラクトース利用に關与する酵素に対するプロモーター領域である。酵母発現における使用に適したベクターおよびプロモーターは、EP73, 657にさらに記載されている。

【0169】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの核酸転写は、以下のようなプロモーターが宿主細胞系に適合である場合、例えば、ウイルス（例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス（1989年7月5日に公開されたUK2, 211, 504）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス2）、ウシバビローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよびサルウイルス40（SV40））のゲノムから得られるプロモーターによって；異種哺乳動物のプロモーター、例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターによって；および熱ショックプロモーターによって、調節される。

【0170】

高等真核生物による本発明のポリペプチドまたは抗体をコードするDNAの転写は、エンハンサー配列をベクターに挿入することによって増加し得る。エンハンサーは、転写を増加させるようにプロモーターに対して作用する、通常約10～300bpの、DNAのシス作用性エレメントである。哺乳動物の遺伝子（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテインおよびインスリン）由来の多くのエンハンサー配列が、現在知られている。しかしながら、代表的には、真核細胞ウイルスからのエンハンサーが使用される。例としては、複製起点の後ろ側におけるSV40エンハンサー（100～270 bp）、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後ろ側におけるポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。エンハンサーは、本発明のポリペプチドまたは抗体をコードする配列に対して5'位または3'位においてベクターにつなが合わされ得るが、好ましくはプロモーターに対して5'位に位置する。真核生物の宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒトまたは他の多細胞生物由来の有核細胞）において使用される発現ベクターはまた、転写の終結およびmRNAの安定化に必要な配列を含む。そのような配列は、通常、真核生物またはウイルスのDNAもしくはcDNAの非翻訳領域の5'から利用可能であり、時折3'からも利用可能である。これらの領域は、ポリペプチドまたは抗体をコードするmRNAの非翻訳部分においてポリアデニル化フラグメントとして転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

【0171】

組換え脊椎動物細胞培養物において本発明のポリペプチドまたは抗体の合成を適応させるのに適している、なおも他の方法、ベクターおよび宿主細胞は、Gethingら、Nature, 293:620-625 (1981)；Manteiら、Nature, 281:40-46 (1979)；EP117, 060；およびEP117, 058に記載されている。

【0172】

遺伝子の増幅／発現の検出

遺伝子の増幅および／または発現は、サンプル中で直接、例えば、本明細書中に提供される配列に基づいて適切に標識されたプローブを用いる、従来のサザンブロッティング、mRNAの転写を定量化するノーザンブロッティング（Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)）、ドットブロッティング（DNA解析）またはインサイチュハイブリダイゼーションによって測定され得る。あるいは、特定の二重鎖（DNA二重鎖、RNA二重鎖およびDNA-RNAハイブリッド二重鎖またはDNA-タンパク質二重鎖を含む）を認識することができる抗体を使用することができる。そして、その抗体を標識し、そして、ある表面上で二重鎖が形成されているときにその二重鎖に結合している抗体の存在を検出することができるようにその二重鎖が表面に結合している場合にアッセイを行うことができる。

【0173】

あるいは、遺伝子発現は、免疫学的方法（例えば、細胞または組織切片の免疫組織化学的染色）および遺伝子産物の発現を直接定量化する細胞培養物または体液のアッセイによって測定され得る。免疫組織化学的染色および／またはサンプル体液のアッセイに有用な抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかであり得、任意の哺乳動物にお

いて調製され得るか、または合成され得る（例えば、本発明のモノクローナル抗体）。好都合なことには、その抗体は、ネイティブ配列ZPAポリペプチドまたは本明細書中に提供されるDNA配列に基づいた合成ペプチドまたはZPAポリペプチドをコードするDNAおよび特定の抗体エピトープをコードするDNAに融合された外来性配列に対して調製され得る。

【0174】

ZPAポリペプチドの精製

ZPAポリペプチドの形態は、培養液または宿主細胞可溶化物から回収され得る。それが膜結合型である場合、適当な界面活性剤溶液（例えば、TRITON-XTM100）を使用するかまたは酵素的切断によって膜から放出され得る。ZPAポリペプチドをコードする核酸の発現において使用される細胞は、様々な物理的手段または化学的手段（例えば、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破碎または細胞溶解剤）によって破壊され得る。1つの実施形態によれば、ZPAポリペプチドが、組換え細胞タンパク質またはポリペプチドから精製されることが望ましい。以下の手順は、適当な精製手順の例示である：イオン交換カラムにおける分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカまたはDEAEのような陽イオン交換樹脂におけるクロマトグラフィ；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸塩析；例えばSephadex G-75を使用するゲル濾過；IgGのような夾雑物を除去するプロテインAセファロースカラム；およびZPAポリペプチドのエピトープタグ化型に結合する金属キレートカラム。様々なタンパク質精製方法が使用され得、そのような方法は、当該分野で公知であり、例えば、Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (Springer-Verlag: New York, 1982)に記載されている。選択される精製工程は、例えば、使用される生成プロセスの性質および生成される特定のZPAポリペプチドの性質に依存する。1つの実施形態によれば、ZPAポリペプチドは、本発明の抗体を使用したアフィニティークロマトグラフィによって精製される。

【0175】

細胞増殖の阻害のアッセイ

細胞の成長および増殖に対する、本発明の1つ以上のZPAポリペプチドおよび／またはアゴニストの阻害活性は、本明細書中に記載されるアッセイおよび当該分野で公知の他のアッセイを使用して測定され得る。

【0176】

腫瘍および癌（例えば、乳癌、結腸癌、前立腺癌、肺癌など）の動物モデルとしては、非組換え動物と組換え（トランスジェニック）動物の両方が挙げられる。非組換え動物モデルとしては、例えば、げっ歯類モデル、例えば、マウスモデルが挙げられる。そのようなモデルは、標準的な手法、例えば、皮下注射、尾静脈注射、脾臓注入、腹腔内注入、腎被膜下注入またはオルトピン（orthopin）注入、例えば、結腸組織に移植された結腸癌細胞を使用することによって、同系マウスに腫瘍細胞を導入することによって作製され得る。例えば、1997年9月18日に公開されたPCT公開番号WO97/33551を参照のこと。おそらく、腫瘍学的研究において最もよく使用される動物種は、免疫不全マウス、特にヌードマウスである。胸腺形成不全／無形成であるヌードマウスがヒト腫瘍異種移植片に対する宿主として首尾よく作用し得るという観察結果から、この目的でのその広範な用途がもたらされる。常染色体の劣性nu遺伝子は、非常に多数の別々の共通遺伝子系統のヌードマウス（例えば、ASW、A/He、AKR、BALB/c、B10.LP、C17、C3H、C57BL、C57、CBA、DBA、DDD、I/st、NC、NFR、NFS、NFS/N、NZB、NZC、NZW、P、RIIIおよびSJLが挙げられる）に導入されている。さらに、ヌードマウス以外の、免疫学的欠損が遺伝した多岐にわたる他の動物が、育種され、腫瘍異種移植片のレシピエントとして使用されている。さらなる詳細については、例えば、The Nude Mouse in Oncology Research, E. Boven and B. Winograd, e

ds. (CRC Press, Inc., 1991) を参照のこと。

【0177】

そのような動物に導入される細胞は、公知の腫瘍細胞株／癌細胞株（例えば、上に列挙した腫瘍細胞株のいずれかおよび例えばB104-1-1細胞株（neu癌原遺伝子がトランスフェクトされた安定なNIH-3T3細胞株）；rasがトランスフェクトされたNIH-3T3細胞；Caco-2（ATCC HTB-37）；または中程度に十分に分化したグレードIIヒト結腸腺癌細胞株であるHT-29（ATCC HTB-38））；または腫瘍および癌から得ることができる。腫瘍細胞または癌細胞のサンプルは、液体窒素中での凍結および保存を含む標準的な条件下で、手術を受けている患者から得ることができる。Karmaliら、Br. J. Cancer, 48:689-696 (1983)。

10

【0178】

腫瘍細胞は、種々の手順によってヌードマウスのような動物に導入され得る。マウスにおける皮下（s. c.）の空間が、腫瘍注入に非常に適している。腫瘍は、固体の塊として、トロカールを使用することによるニードルバイオプシーとして、または細胞懸濁液として、s. c. 移植され得る。固体の塊またはトロカール注入については、適当なサイズの腫瘍組織フラグメントが、s. c. 空間に導入される。細胞懸濁液は、原発腫瘍または安定な腫瘍細胞株から新たに調製され、そして皮下に注射される。腫瘍細胞はまた、皮下移植片として注射され得る。この位置では、接種材料は、皮膚結合組織の下部とs. c. 組織との間に堆積する。

20

【0179】

乳癌の動物モデルは、例えば、ラット神経芽細胞腫細胞（neu癌遺伝子が最初に単離された細胞）またはneuで形質転換されたNIH-3T3細胞を、特にDrebinら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83:9129-9133 (1986) によって報告されているように、ヌードマウスに移植することによって作製され得る。

【0180】

同様に、結腸癌の動物モデルは、動物、例えば、ヌードマウスに結腸癌細胞を接種し、これらの動物において腫瘍の出現を導くことによって作製され得る。ヌードマウスにおけるヒト結腸癌の同所性移植モデルは、例えば、Wangら、Cancer Research, 54:4726-4728 (1994) およびTooら、Cancer Research, 55:681-684 (1995) によって報告されている。このモデルは、AntiCancer, Inc., (San Diego, California) が販売しているいわゆる「METAMOUSETM」に基づくものである。

30

【0181】

動物において生じる腫瘍を取り出してインビトロにおいて培養することができる。次いで、そのインビトロ培養物からの細胞を動物に接種することができる。そのような腫瘍は、さらなる試験または薬物スクリーニングに対する標的として働き得る。あるいは、接種によって生じる腫瘍を単離して、接種前の細胞および1回以上の接種後に単離される細胞から単離されたRNAが、目的の遺伝子の発現の差について解析され得る。そのような接種手法は、任意の公知の腫瘍細胞株または癌細胞株を用いて行われ得る。

40

【0182】

例えば、Meth A、CMS4、CMS5、CMS21およびWEHI-164は、BALB/c雌マウスの化学的に誘導された線維肉腫であり（DeLeoら、J. Exp. Med., 146:720 (1977)）、これは、様々な薬剤の抗腫瘍活性の研究に高度に制御可能なモデル系を提供するものである。Palladinoら、J. Immunol., 138:4023-4032 (1987)。簡潔には、腫瘍細胞は、細胞培養においてインビトロで増殖される。動物に注射する前に、その細胞株を洗浄し、約 $10 \times 10^6 \sim 10 \times 10^7$ 細胞/mlの細胞密度で緩衝液中に懸濁する。次いで、 $10 \sim 100 \mu\text{l}$ の上記細胞懸濁液を、動物の皮下に注射することにより、1～3週間で腫瘍が出現し得る。

50

【0183】

さらに、最も徹底的に研究されている実験腫瘍の1つであるルイス肺（3LL）癌のマウスを研究用の腫瘍モデルとして使用することができる。この腫瘍モデルにおける有効性は、肺の小細胞癌（SCLC）と診断されたヒト患者の処置における有益な効果と相関している。この腫瘍は、罹患マウスからのまたは培養において維持された細胞の腫瘍フラグメントを注射する際に、正常なマウスに導入され得る。Zupira、Br. J. Cancer, 41: suppl. 4, 30 (1980)。腫瘍がたった1つの細胞の注射から生じ得、そして非常に高い割合で注射された罹患腫瘍細胞が生存するという証拠が示されている。この腫瘍モデルについてのさらなる情報については、Zacharski, Haemostas, 16: 300-320 (1986)を参照のこと。

10

【0184】

腫瘍が移植された動物モデルにおいて試験化合物の有効性を評価する1つの方法は、処置の前後の腫瘍のサイズを測定することである。従来、移植された腫瘍のサイズは、ノギスを用いて2次元または3次元で測定されてきた。2次元に限定した測定は、腫瘍のサイズを正確に反映しない；ゆえに、通常、数式を使用することによって、その腫瘍サイズに対応する体積に変換する。しかしながら、腫瘍サイズの測定値は、非常に不正確である。薬物候補の治療上の効果は、処置誘導性の増殖遅延および特定の増殖遅延としてよりよく記載され得る。腫瘍増殖の記載における別の重要な変量は、腫瘍体積倍加時間である。腫瘍増殖の計算および記載に対するコンピュータプログラム（例えば、Rygaard and Spang-Thomsen, Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals, Wu and Sheng eds. (Basel, 1989), p. 301によって報告されているプログラム）もまた利用可能である。しかしながら、実際には、処置後のネクロシスおよび炎症性応答が、少なくとも最初において、腫瘍サイズの増加をもたらし得ることに注意されたい。ゆえに、これらの変化は、形態計測方法とフローサイトメトリーによる解析とを組み合わせることによって慎重にモニターする必要がある。

20

【0185】

さらに、組換え（トランスジェニック）動物モデルは、トランスジェニック動物を作製するための標準的な手法を使用して、本明細書中で同定されるZPA遺伝子のコード領域を目的の動物のゲノムに導入することによって操作され得る。トランスジェニック操作に対する標的として働き得る動物としては、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ゼブラフィッシュならびに非ヒト霊長類、例えば、ヒヒ、チンパンジーおよびサルが挙げられるがこれらに限定されない。そのような動物にトランスジーンを導入する当該分野で公知の手法としては、前核（pronucleic）マイクロインジェクション（米国特許第4, 873, 191号）；生殖細胞系列へのレトロウイルス媒介性遺伝子導入（例えば、Van der Puttenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6148-615 (1985)）；胚性幹細胞における遺伝子ターゲティング（Thompsonら、Cell, 56: 313-321 (1989)）；胚のエレクトロポレーション（Lo, Mol. Cell. Biol., 3: 1803-1814 (1983)）；および精子媒介性遺伝子導入が挙げられる。Lavitranoら、Cell, 57: 717-73 (1989)。概説としては、例えば、米国特許第4, 736, 866号を参照のこと。

30

40

【0186】

本発明の目的で、トランスジェニック動物には、その動物の一部の細胞にトランスジーンを有する動物（「モザイク動物」）が含まれる。トランスジーンは、単一のトランスジーンとして組み込まれ得るか、またはコンカテマー内に（例えば、頭部と頭部または頭部と尾部のタンデム型）組み込まれ得る。特定の細胞型へのトランスジーンを選択的な導入は、例えば、Laskoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6232-636 (1992)の手法に従うことによるものでもあり得る。トランスジェニック動物におけるトランスジーンの実現は、標準的な手法によってモニターされ得る。例

50

えば、サザンブロット解析またはPCR増幅を使用することによって、トランスジーンの組み込みを確認することができる。次いで、mRNA発現レベルは、インサイチュハイブリダイゼーション、ノーザンブロット解析、PCRまたは免疫細胞化学のような手法を使用して解析され得る。さらに、上記動物は、腫瘍または癌の発生の徴候について検査される。

【0187】

あるいは、ZPAポリペプチドをコードする内在性遺伝子と、動物の胎児性細胞内に導入された同じポリペプチドをコードする変化したゲノムDNAとの相同組換えの結果として、本明細書中において同定されるZPAポリペプチドをコードする遺伝子が欠損しているか、または変化している「ノックアウト」動物、例えば、ゼブラフィッシュを作製することができる。例えば、特定のZPAポリペプチドをコードするcDNAを使用することによって、そのポリペプチドをコードするゲノムDNAを、確立された手法に従ってクローニングすることができる。特定のZPAポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部は、欠失し得るか、または別の遺伝子（例えば、組み込みをモニターするために使用され得る選択可能マーカーをコードする遺伝子）で置換され得る。同様に、ZPAホモログをコードする内在性遺伝子と、動物の胎児性細胞内に導入された相同なZPAポリペプチドをコードする変化したゲノムDNAとの相同組換えの結果として、ZPAポリペプチドの内在性ホモログをコードする遺伝子が欠損しているか、または変化しているゼブラフィッシュ以外のノックアウト動物を作製することができる。代表的には、数千ベースの変化していないフランキングDNA（5'末端と3'末端の両方において）が、ベクター内に含まれている。相同組換えベクターの説明については、例えば、Thomas and Capecechi, Cell, 51:503 (1987)を参照のこと。上記ベクターを胚性幹細胞系統に導入し（例えば、エレクトロポレーションによって）、その導入されたDNAが内在性DNAと相同組換えした細胞を選択する。例えば、Liら、Cell, 69:915 (1992)を参照のこと。次いで、その選択された細胞を動物（例えば、マウスまたはラット）の胚盤胞に注射することにより、凝集キメラが形成される。例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL: Oxford, 1987), pp. 113-152を参照のこと。次いで、キメラ胚を適当な偽妊娠雌育成動物に移植し、そして、「ノックアウト」動物が作製されるまでの時間をその胚にもたらし得る。その生殖細胞内に相同組換えしたDNAを有する子孫は、標準的な手法によって同定され得、その子孫を使用して、すべての細胞が相同組換えしたDNAを含む動物を育てることができる。ノックアウト動物は、例えば、ある特定の病理学的状態に対して防御する能力および1つ以上のZPAポリペプチドが存在しないことが原因の病理学的状態の発生によって特徴付けられ得る。

【0188】

ZPAポリペプチドをコードする遺伝子の転写および／または翻訳が選択的に妨害されている「ノックダウン」動物（例えば、ゼブラフィッシュ）を作製することができる。例えば、RNAサイレンシングまたはモルホリノを使用することによって、1つ以上のZPAポリペプチドの翻訳が阻止され得る。そのような動物において、ZPAポリペプチドをコードする遺伝子は、インタクトなままであるが、その遺伝子によってコードされるタンパク質は、産生されない。

【0189】

本明細書中において同定されるZPAポリペプチドに特異的に結合する抗体および他の薬物候補の有効性はまた、自然発症の動物腫瘍の処置において試験され得る。そのような研究に適した標的は、ネコ口腔扁平上皮癌（SCC）である。ネコ口腔SCCは、高度に侵襲性の悪性腫瘍であり、ネコにおいて報告されている口腔腫瘍の60%超を占める、この種において最もよくある口腔悪性疾患である。ネコ口腔SCCは、めったに遠位部位に転移しないが、この転移の発生率が低いという事実は、単にこの腫瘍を有するネコの生存時間が短いことの反映であり得る。これらの腫瘍は、ネコの口腔の解剖学的構造が主な原

10

20

30

40

50

因で、通常外科手術を受け入れられない。現在、この腫瘍に対する有効な処置法はない。この研究に入る前に、各ネコの完全な臨床検査および生検を行い、また、各ネコをコンピュータ断層撮影（CT）でスキャンする。舌下口腔扁平上皮細胞腫瘍と診断されたネコは、本研究から除外する。そのような腫瘍の結果として舌が麻痺するようになり得、処置によって腫瘍が殺滅されたとしても、その動物は、自力で食べることができないかもしれない。各ネコは、長期間にわたって繰り返し処置される。処置期間中の毎日およびその後の各再検査の際に、腫瘍の写真を撮影する。処置後、各ネコは、さらにCTスキャンに供される。その後8週間ごとに、CTスキャンおよび胸部放射線写真を評価する。コントロール群と比べ、生存時間、反応および毒性の差について、データを評価する。正の反応には、腫瘍退行のエビデンスが、好ましくは、生活の質の改善および／または寿命の延長とともに必要であり得る。

10

【0190】

さらに、他の事前発症の動物腫瘍（例えば、イヌ、ネコおよびヒヒの線維肉腫、腺癌、リンパ腫、軟骨腫または平滑筋肉腫）もまた試験され得る。これらのうち、イヌおよびネコの乳腺癌は、その外見および挙動が、ヒトにおけるそれらと非常に似ているので、好ましいモデルである。しかしながら、このモデルの使用は、動物におけるこのタイプの腫瘍の発生頻度の低さによって制限される。

【0191】

トランスジェニックゼブラフィッシュの作製

トランスジェニックゼブラフィッシュが、本明細書中に記載されるようにまたは当該分野で周知のとおり作製され得る（例えば、Westfield, The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio). 4th ed., Univ. of Oregon Press: Eugene (2000)を参照のこと）。ゼブラフィッシュ細胞（例えば、発生の1～4細胞期における細胞）にトランスジェニック構築物が導入され得、次いで、トランスジェニックの効果を検査するのに適切な時間まで、その注射された胚を発生させる。トランスジェニック構築物は、直線状または環状のポリヌクレオチドであり得、必要に応じて、本明細書中の別の部分に記載するような制御配列を含み得る。トランスジェニック構築物を胚性ゼブラフィッシュ細胞に導入する方法としては、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、パーティクルガン照射、ウイルス感染およびリポソームを介する方法が挙げられるが、これらに限定されない。成体ゼブラフィッシュにおけるトランスジェニックの存在の判定を容易にするためにトランスジェニック構築物内にレポーター分子（例えば、GFPまたは他のいくつかの容易に同定可能な標識）を含めることができる；構築物内にレポーターが含まれていない場合、ゼブラフィッシュ核酸（例えば、成体ゼブラフィッシュから切除された尾から単離されたもの）が、PCRまたはサザンブロッティングのような周知の遺伝的方法によってトランスジェニックの存在について検査され得る。

20

30

【0192】

研究室用のまたは市販のゼブラフィッシュの任意の系統および／または品種が、本明細書中に記載される方法において使用され得る。いくつかの実施形態において、ゼブラフィッシュは、近交系（SJD、C32およびWIKが挙げられるがこれらに限定されない）由来である。いくつかの実施形態において、トランスジェニック活性の可視化は、他の変異を有するゼブラフィッシュ、例えば、メラニン保有細胞沈着を実質的に欠いている（例えば、アルビノ変異体）または虹色素胞（irridiphore）沈着を実質的に欠いている（例えば、roy orbison、透明変異体）「非色素沈着」変異ゼブラフィッシュを使用することによって促進される。

40

【0193】

アポトーシス活性を評価するためのアッセイ

本発明のアゴニスト、前駆体およびアンタゴニストのアポトーシス促進性活性または抗アポトーシス活性の測定に有用なアッセイとしては、実施例3のアッセイまたは以下に含

50

められるアッセイのような当該分野で公知の他の適当なアッセイが挙げられる。

【0194】

アポトーシス活性に対するアッセイとしては、例えば、細胞傷害性アッセイ（例えば、膜透過性の増加を測定する放射測定アッセイもしくは非放射測定アッセイまたはミトコンドリアの代謝活性の低下を測定する比色定量アッセイ）；DNA断片化を測定するアッセイ（インサイチュニクトランスレーション（ISNT）およびTdT媒介性X-dUTPニック端標識（TUNEL）（Cole and Ross, Devel. Biol. 240:123-142 (2001)）が挙げられるがこれらに限定されない）；細胞構成および細胞死に対する前駆体である凝縮（packaging）の変化（例えば、膜非対称性の変化（ホスファチジルセリンの転位置（Nicolettiら、“Common Methods for Measuring Apoptotic Cell Death by Flow Cytometry”, The Purdue Cytometry CD-ROM Volume 3, J. Parker, C. Stewart, Guest Eds., J. Paul Robinson, Publisher. Purdue University, West Lafayette, 1997, ISBN 1-890473-02-2）およびミトコンドリアから細胞質へのシトクロムCまたはAIFの放出が挙げられるがこれらに限定されない）を測定するアッセイ；およびアポトーシスをもたらす1つ以上の生化学的なカスケードの活性化（カスパーゼ活性化（例えば、実施例3を参照のこと）およびポリ-ADP-リボースポリメラーゼ（PARP）の切断が挙げられるがこれらに限定されない）を測定するアッセイが挙げられる。アポトーシス活性についてのアッセイは、単一細胞および／または細胞集団において行われ得る。

10

20

【0195】

抗体結合性研究

抗体結合性研究は、公知のアッセイ法（例えば、競合結合アッセイ、直接のおよび間接的なサンドイッチアッセイならびに免疫沈降アッセイ）を使用して行われ得る。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (CRC Press, Inc., 1987), pp. 147-158。

【0196】

競合結合アッセイは、標識された標準物質が、限られた量の抗体との結合性について試験サンプル被検体と競合する能力に依存する。試験サンプル中の標的タンパク質の量は、抗体に結合するようになる標準物質の量と逆比例する。結合するようになる標準物質の量の測定を容易にするために、抗体に結合している標準物質および被検体を、結合していないままの標準物質および被検体から便利に分離することができるように、競合の前後に抗体を不溶化し得る。

30

【0197】

サンドイッチアッセイは、2つの抗体の使用を含み、その抗体の各々は、検出されるタンパク質の異なる免疫原性部分またはエピトープに結合することができる。サンドイッチアッセイにおいて、試験サンプル被検体は、固体支持体上に固定化されている第1抗体と結合し、その後、第2抗体がその被検体に結合することによって、不溶性の3部複合体が形成される。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。第2抗体は、それ自体が検出可能な部分で標識されているか（直接的なサンドイッチアッセイ）または検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を使用して測定され得る（間接的なサンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの1つのタイプは、ELISAアッセイであり、この場合、検出可能な部分は、酵素である。

40

【0198】

競合ELISAアッセイは、ZPAポリペプチドとの特異的な結合性について、ポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするために行われ得、その結合性は、本発明のモノクローナル抗体によって阻害され得る。

【0199】

1つの例において、競合ELISAアッセイは、当該分野で公知の方法に従って行われ

50

得る。完全長または切断型のネイティブZPAタンパク質(PBS中 $2\mu\text{g}/\text{ml}$)は、 4°C で一晩または室温で2時間、マイクロタイタープレート上にコーティングされ得る。そのウェルは、 $65\mu\text{l}$ の1%BSAを30分間加えた後、 $40\mu\text{l}$ の1%Tween 20をさらに30分間加えることによってブロッキングされ得る。次に、そのウェルをPBS-0.05%Tween 20で5回洗浄し得る。様々な濃度の抗体(ELISA緩衝液中)を、そのウェル内にて室温で30分間インキュベートし得る。次いで、試験されるポリペプチドまたは抗体を、抗体の非存在下で90%結合能を正常にもたらし得る濃度において10分間、様々なウェルに加え得る。次に、そのウェルをPBS-0.05%Tween 20で5回洗浄し得る。結合は、当該分野で公知の方法によって定量化され得る。

【0200】

免疫組織化学に向けて、組織サンプルは、新鮮であり得るか、または凍結され得るか、または、パラフィン内に包埋され、そして、例えば、ホルマリンのような保存剤で固定され得る。

【0201】

細胞ベースの腫瘍アッセイ

腫瘍のような増殖性障害に対する細胞ベースのアッセイおよび動物モデルは、本発明のアンタゴニストの阻害活性を確認するために使用され得る。適切なアッセイは、当該分野で公知である。例えば、増殖性障害に関与すると知られている細胞型の細胞は、本明細書中において1つ以上のZPA cDNAでトランスフェクトされ得、そしてアンタゴニストの存在下または非存在下で、これらのcDNAが増殖を阻害する能力が解析される。増殖性障害が癌である場合、適当な腫瘍細胞としては、例えば、安定な腫瘍細胞株(例えば、B104-1-1細胞株(neu癌原遺伝子をトランスフェクトされた安定なNIH-3T3細胞株)およびrasがトランスフェクトされたNIH-3T3細胞(ZPA配列をトランスフェクトされ、そして、腫瘍原性増殖についてモニターすることができる細胞))が挙げられる。次いで、そのようなトランスフェクトされた細胞株を使用することにより、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体または抗体組成物が、形質転換された細胞の増殖に対して細胞分裂抑制活性または細胞傷害活性を発揮することによってまたは抗体依存性細胞傷害(ADCC)を媒介することによって腫瘍原性細胞増殖を阻害する能力を試験することができる。

【0202】

さらに、トランスジェニック動物(上に記載したようなもの)における腫瘍に由来する初代培養物が、本明細書中の細胞ベースのアッセイにおいて使用され得るが、安定な細胞株が好ましい。トランスジェニック動物から持続的な細胞株を得る手法は、当該分野で公知である。例えば、Smallら、Mol. Cell. Biol., 5:642-648(1985)を参照のこと。

【0203】

遺伝子治療

疾患症状を改善し得る方法および組成物を以下に記載する。本明細書中に記載されるZPAポリペプチド(ZPAポリペプチド改変体を含む)ならびに本発明のアンタゴニストおよび抗体は、各々インビボにおいて発現すること(しばしば遺伝子治療と呼ばれる)によって本発明に従って使用され得る。例えば、ZPAポリペプチド改変体は、これらの方法を使用して細胞内で発現し得る。1つの実施形態によれば、ZPAポリペプチド(改変体を含む)を発現させるために使用される方法またはベクターは、ZPAポリペプチドまたは核酸分子を含むビヒクルを所望の組織に向ける標的化剤の使用を含む。

【0204】

核酸(必要に応じて、ベクター内に入っている)を哺乳動物細胞に導入する主なアプローチが2つある:インビボおよびエキソビボ。インビボ送達については、核酸を、哺乳動物に、通常、ZPAポリペプチドが必要とされる部位に、すなわちZPAポリペプチドの合成部位に(分かっている場合)、および、ZPAポリペプチドの生物学的活性が必要とされる部位(例えば、創傷)に直接注射する。エキソビボ処置については、哺乳動物の細

10

20

30

40

50

胞が取り出され、これらの単離された細胞に核酸を導入し、そして変更された細胞を直接哺乳動物に投与するか、または、例えば哺乳動物に移植される多孔性膜内に被包される（例えば、米国特許第4,892,538号および同第5,283,187号を参照のこと）。核酸を生存可能な細胞に導入するために利用可能な種々の手法が存在する。その手法は、インビトロにおいて核酸を培養細胞に導入するか、またはインビボにおいて意図される宿主の細胞内に導入するかに応じて変化する。インビトロにおいて核酸を哺乳動物細胞に導入するのに適した手法としては、リボソームの使用、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などが挙げられる。形質導入は、複製欠損の組換えウイルス（レトロウイルスが挙げられるがこれらに限定されない）粒子と細胞のレセプターとの会合、そして、その細胞への、その粒子に含まれる核酸の導入を含む。遺伝子のエキソビボ送達のために通常使用されるベクターは、レトロウイルスである。

10

【0205】

通常使用されるインビボ核酸導入法としては、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レンチウイルス、I型単純疱疹ウイルスまたはアデノ随伴ウイルス（AAV））を用いたトランスフェクションおよび脂質ベースの系（遺伝子の脂質媒介性の導入に有用な脂質は、例えば、DOTMA、DOPEおよびDC-Cholである；例えば、Tonkinsonら、Cancer Investigation, 14(1):54-65(1996)を参照のこと）が挙げられる。そのようなベクターを使用して、本発明のアンタゴニストおよび核酸分子のような薬剤を送達するためのビヒクルとして使用され得るウイルスが合成される。遺伝子治療において使用するために最もよく使用されるベクターは、ウイルス、例えば、アデノウイルス、AAV、レンチウイルスまたはレトロウイルスである。レトロウイルスベクターのようなウイルスベクターは、少なくとも1つの転写プロモーター／エンハンサーまたは遺伝子座を規定するエレメントもしくは他の手段（例えば、選択的スプライシング、核RNA搬出またはメッセンジャーの翻訳後修飾）によって遺伝子発現を制御する他のエレメントを含む。さらに、レトロウイルスベクターのようなウイルスベクターは、ZPAポリペプチドをコードする遺伝子の存在下で転写されるときに、それに作動可能に連結され、翻訳開始配列として作用する核酸分子を含む。そのようなベクター構築物はまた、パッケージングシグナル、末端反復配列（LTR）またはそれらの部分ならびに使用されるウイルスに適切なプラス鎖およびマイナス鎖のプライマー結合部位を含む（これらがウイルスベクターにすでに存在しない場合）。さらに、そのようなベクターは、代表的には、そのベクターが配置される宿主細胞からのZPAポリペプチドの分泌についてのシグナル配列を含む。ある特定の実施形態において、この目的のためのシグナル配列は、哺乳動物のシグナル配列であり、それらとしては、ZPAポリペプチドに対するネイティブシグナル配列が挙げられるがこれに限定されない。必要に応じて、ベクター構築物はまた、ポリアデニル化を指示するシグナルならびに1つ以上の制限酵素認識部位および翻訳終結配列を含み得る。例としては、そのようなベクターは、代表的には、5'LTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、第2鎖DNA合成の起点および3'LTRまたはそれらの一部を含む。陽イオン性脂質、ポリリジンおよびデンドリマーのような非ウイルス性である他のベクターが使用され得る。

20

30

40

【0206】

いくつかの場合において、核酸の起源に、標的細胞を標的化する物質（例えば、細胞表面膜タンパク質または標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンドなど）を提供することが望ましい。リボソームを使用する場合、エンドサイトーシスに関連する細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質（例えば、特定の細胞型に向性であるキャプシドタンパク質またはそのフラグメント、循環中で内部移行を起こすタンパク質に対する抗体および細胞内局在性を標的化し、そして細胞内の半減期を延長するタンパク質）は、標的化するために使用され得、そして／または取り込みを促進するために使用され得る。レセプター媒介性のエンドサイトーシスの手法は、例えば、Wuら、J. Bio

50

l. Chem., 262:4429-4432 (1987); およびWagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3410-3414 (1990) によって説明されている。現在知られている遺伝子マーキングおよび遺伝子治療プロトコルの概説については、Andersonら、Science, 256:808-813 (1992)を参照のこと。また、WO93/25673およびこれに引用されている参考文献を参照のこと。

【0207】

適当な遺伝子治療ならびにレトロウイルス粒子および構造タンパク質を作製するための方法は、例えば、米国特許第5,681,746号に見ることができる。

【0208】

ZPA変異の検出

本発明はまた、診断薬としてZPAポリペプチドをコードする遺伝子を使用することに関する。変異型のZPAポリペプチドが検出されることにより、アポトーシス関連障害を発症する傾向が示唆され得る。ゼブラフィッシュのある組織におけるZPAポリペプチドの検出レベルが、正常なゼブラフィッシュにおける同じ組織のレベルよりも高いことによってもまた、アポトーシス関連障害を発症する傾向が示唆され得る。同様に、ゼブラフィッシュ以外の生物におけるZPAポリペプチドのホモログの変異型が検出されることによって、アポトーシス関連障害を発症する傾向が示唆され得る。ある生物（例えば、哺乳動物）の組織におけるZPAポリペプチドのホモログの検出レベルが、正常な生物における同じ組織のレベルよりも高いことによってもまた、アポトーシス関連障害を発症する傾向が示唆され得る。

【0209】

ZPAポリペプチドのヒトホモログをコードする遺伝子内に変異を有する個体は、種々の手法によってDNAレベルにおいて検出され得る。診断用の核酸は、哺乳動物の細胞（例えば、血液、尿、唾液、組織バイオプシーおよび剖検材料）から得ることができる。ゲノムDNAは、検出に直接使用され得るか、または解析の前にPCR（Saikiら、Nature, 324:163-166 (1986)）を使用することによって酵素的に増幅され得る。RNAまたはcDNAも、同じ目的で使用され得る。例として、ZPAポリペプチドをコードする核酸に相補的なPCRプライマーを使用して、ZPAポリペプチドのヒトホモログにおける変異を同定および解析することができる。例えば、欠失および挿入は、正常な遺伝子型との比較における増幅産物のサイズの違いによって検出され得る。点変異は、増幅したDNAと、ZPAポリペプチドをコードする放射性標識RNAまたはZPAポリペプチドをコードする放射性標識アンチセンスDNA配列とがハイブリダイズすることによって同定され得る。完全に一致した配列は、RNaseA消化または融解温度の差によって、ミスマッチ二重鎖と区別され得る。

【0210】

DNA配列の差に基づく遺伝子検査は、変性剤を含むかまたは含まないゲル中のDNAフラグメントの電気泳動移動度の変化の検出によって達成され得る。小さな配列の欠失および挿入は、高分解能ゲル電気泳動によって可視化され得る。異なる配列のDNAフラグメントは、変性ホルムアミジン勾配ゲル上で区別され得、ここで、様々なDNAフラグメントの移動度は、特定の融解温度または部分的な融解温度に従って様々な位置でゲル内において遅れる。例えば、Myersら、Science, 230:1242 (1985)を参照のこと。

【0211】

特定の位置における配列の変化もまた、ヌクレアーゼ保護アッセイ（例えば、RNase保護およびS1保護）または化学的切断法、例えば、Cottonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:4397-4401 (1988)によって明らかにされ得る。

【0212】

従って、特定のDNA配列の検出は、ハイブリダイゼーション、RNase保護、化学

10

20

30

40

50

的切断、直接的なDNA配列決定または制限酵素の使用、例えば、ゲノムDNAの制限断片長多型（RFLP）およびサザンブロッティングのような方法によって達成され得る。

【0213】

従来のゲル電気泳動およびDNA配列決定に加えて、ZPAポリペプチド内の変異は、インサイチュ解析によっても検出され得る。

【0214】

ZPAポリペプチドレベルまたは核酸レベルの検出

ZPAポリペプチドまたは核酸分子のレベルは、例えば、本明細書中に開示される試薬を当該分野で公知の方法（例えば、インサイチュハイブリダイゼーション、RT-PCR、ノーザンブロット、ウエスタンブロット）と組み合わせて使用して、または、本明細書中において提供される実施例および試薬を使用することによって検出され得る。同様に、ZPAポリペプチドまたは核酸分子に相同なポリペプチドまたは核酸分子のレベルは、例えば、本明細書中に開示される試薬を当該分野で公知の方法（例えば、インサイチュハイブリダイゼーション、RT-PCR、ノーザンブロット、ウエスタンブロット）と組み合わせて使用して、または、本明細書中において提供される実施例および試薬を使用することによって検出され得る。

10

【0215】

ZPAポリペプチドに特異的な抗体が固体支持体に付着していて、そして標識されたZPAポリペプチドと、1つ以上のZPAポリペプチドに相同な少なくとも1つのポリペプチドを含む宿主に由来するサンプルとを、上記固体支持体の上を通過させて、そしてその固体支持体に付着していて検出される標識の量が上記サンプル中の1つ以上のZPAポリペプチドに相同な少なくとも1つのポリペプチドの量と相関し得る、競合アッセイが使用され得る。1つの実施形態において、本明細書中に記載されるようなZPAポリペプチドに特異的に結合する抗体は、ZPAポリペプチドレベルまたはZPAポリペプチドホモログのレベルをモニターするために使用される。

20

【0216】

薬物候補についてのスクリーニングアッセイ

本発明は、ZPAポリペプチド活性を模倣する化合物（アゴニスト）またはZPAポリペプチドの効果を妨害する化合物（アンタゴニスト）を同定する化合物をスクリーニングする方法を包含する。通常、ZPAポリペプチドを、様々な条件下でインキュベートするかまたは接触させることによって薬物候補に曝露する。アンタゴニスト薬物候補についてのスクリーニングアッセイは、ネイティブZPAポリペプチドに特異的に結合する化合物、またはネイティブZPAポリペプチドと複合体を形成する化合物を同定するように設計される。そのようなスクリーニングアッセイは、化学ライブラリーのハイスループットスクリーニングを受け入れられるアッセイを含み、特に低分子薬物候補を同定するために適合される。

30

【0217】

上記アッセイは、ZPAポリペプチド、そのフラグメントまたはZPAポリペプチドもしくはそのフラグメントを発現する細胞と組み合わせて、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的なスクリーニングアッセイ、イムノアッセイおよび細胞ベースのアッセイをはじめとした種々の様式で行われ得る。

40

【0218】

アンタゴニストに対するすべてのアッセイは、薬物候補と本明細書中において同定される核酸によってコードされるZPAポリペプチドとが相互作用できるのに十分な条件下および時間にわたって、これらの2つの成分を接触させることが必要である点で共通する。

【0219】

結合アッセイにおいて、相互作用は、結合であり、形成される複合体は、単離され得るか、または反応混合物中で検出され得る。例えば、ZPAポリペプチドと、1つ以上の生化学的経路において正常に相互作用するポリペプチドとの結合を候補アンタゴニストの非存在下または存在下で行うことにより、アンタゴニストが、それが正常に相互作用するポ

50

リペプチドとZPAポリペプチドとの結合を阻止したか否かが評価され得る。別の実施形態において、本明細書中において同定される遺伝子によってコードされるZPAポリペプチドまたは薬物候補が、固相、例えば、マイクロタイタープレート上に、共有結合または非共有結合によって固定化される。非共有結合は、一般に、固体表面をZPAポリペプチドの溶液でコーティングし、そして乾燥することによって達成される。あるいは、固定化された抗体、例えば、固定されたZPAポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を使用して、そのポリペプチドを固体表面に固着させることができる。上記アッセイは、固定化されていない成分（検出可能な標識で標識することができる）を、固定化された成分、例えば、固着された成分を含むコーティングされた表面に加えることによって行われる。その反応が完了すると、反応していない成分を例えば洗浄することによって除去し、そして固体表面上に固着した複合体を検出する。最初に固定化されていない成分が、検出可能な標識を有するとき、表面上に固定化された標識が検出されることにより、複合体形成が生じたことが示唆される。最初に固定化されていない成分が標識を有しない場合、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識された抗体を使用することによって検出され得る。

10

【0220】

候補化合物が、特定のZPAポリペプチドと相互作用するが、結合しない場合、そのポリペプチドとのその相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するための公知の方法によってアッセイされ得る。そのようなアッセイとしては、従来のアプローチ（例えば、架橋、共免疫沈降および勾配またはクロマトグラフィカラムによる共精製）が挙げられる。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Chevray and Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5789-5793 (1991)によって開示されているような、Fieldsおよび共同研究者が報告した酵母ベースの遺伝系（Fields and Song, Nature (London), 340:245-246 (1989); Chienら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)）を使用することによってモニターされ得る。酵母GAL4のような多くの転写活性化因子は、2つの物理的に不連続なモジュラードメインからなり、一方は、DNA結合ドメインとして作用し、他方は、転写活性化ドメインとして機能する。前述の刊行物に記載されている酵母発現系（一般に、「ツーハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性を利用しており、2つのハイブリッドタンパク質（一方は、標的タンパク質をGAL4のDNA結合ドメインに融合して、他方は、タンパク質を活性化する候補を活性化ドメインに融合する）を使用する。GAL4活性化プロモーターの制御下でのGAL1-lacZレポーター遺伝子の発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、β-ガラクトシダーゼに対する色素生産性基質を用いて検出される。ツーハイブリッド技術を使用した、2つの特定のタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（MATCHMAKER™）は、Clontechから市販されている。この系はまた、特定のタンパク質相互作用に関与するタンパク質ドメインをマッピングすることならびにこれらの相互作用にきわめて重要なアミノ酸残基を正確に指摘するために拡張され得る。

20

30

40

【0221】

ZPAポリペプチドと別のZPAポリペプチドを含む別のタンパク質との結合を妨害する化合物は、以下のとおり試験され得る：通常、ZPAポリペプチドおよび他のタンパク質を含む反応混合物を、相互作用および上記2つのタンパク質の結合を可能にする条件下および時間にわたって調製する。候補化合物が結合を阻害する能力を試験するために、試験化合物の非存在下および存在下で反応を行う。さらに、ポジティブコントロールとして機能させるために、第3の反応混合物にプラセボを加え得る。混合物中に存在する試験化合物と他のポリペプチドとの結合（複合体形成）は、本明細書中の上に記載されるようにモニターされる。コントロール反応物中では複合体が形成されるが、試験化合物を含む反応混合物中では形成されないことによって、試験化合物が、ZPAポリペプチドと他のポ

50

リペプチドとの相互作用を妨害することが示唆される。

【0222】

1つの実施形態によれば、本明細書中に記載されるアッセイは、本発明のアンタゴニストを試験するために行われる。あるいは、アンタゴニストは、競合阻害アッセイに適切な条件下で、ZPAポリペプチドおよび潜在的なアンタゴニストを非標識ZPAポリペプチドと結合させることによって検出され得る。ZPAポリペプチドは、放射能または比色定量法によって標識され得、結合しているZPAポリペプチド分子の数は、潜在的なアンタゴニストの有効性を判定するために使用され得る。ZPAポリペプチドは、ヨウ素化または部位特異的なタンパク質キナーゼに認識部位を含めることをはじめとした種々の手段によって標識され得る。固定およびインキュベーションの後、スライドをオートラジオグラフィ解析に供する。

10

【0223】

薬物候補としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体ならびに抗体フラグメント、一本鎖抗体、抗イディオタイプ抗体ならびにそのような抗体またはフラグメントのキメラバージョンまたはヒト化バージョンならびにヒト抗体および抗体フラグメントを含む抗ZPA抗体が挙げられるがこれらに限定されない。あるいは、薬物候補は、内在性ZPAポリペプチドまたは内在性ZPAポリペプチドホモログの作用を競合的に阻害する、ZPAポリペプチドと密接な関係があるタンパク質、例えば、ZPAポリペプチドの変異型であり得る。

20

【0224】

投与のプロトコル、スケジュール、用量および製剤

本明細書中の分子およびそれに対するアンタゴニストは、上に示したような様々な障害および疾患に対する予防薬および治療薬として薬学的に有用である。

【0225】

本発明のポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストの治療上の組成物は、適切な程度の純度を有する所望の分子を、任意の薬学的に許容可能なキャリア、賦形剤または安定剤と混合することによって、凍結乾燥された製剤または水溶液の形態で、貯蔵のために調製される (Remington's Pharmaceutical Science, 16th edition, Osol, A. ed. (1980))。許容可能なキャリア、賦形剤または安定剤は、使用される投与量および濃度においてレシピエントに対して無毒性であり、それらとしては、緩衝液 (例えば、リン酸、クエン酸および他の有機酸)；酸化防止剤 (アスコルビン酸およびメチオニンを含む)；保存剤 (例えば、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン (例えば、メチルパラベンまたはプロピルパラベン)；カテコール；レソルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール)；低分子量 (約10残基未満) ポリペプチド；タンパク質 (例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン)；親水性ポリマー (例えば、ポリビニルピロリドン)；アミノ酸 (例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリシン)；単糖類、二糖類および他の炭水化物 (グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む)；キレート剤 (例えば、EDTA)；糖 (例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール)；塩形成対イオン (例えば、ナトリウム)；金属錯体 (例えば、Zn-タンパク質錯体)；および/または非イオン性界面活性物質 (例えば、TWEENTM、PLURONICSTMまたはポリエチレングリコール (PEG)) が挙げられる。

30

40

【0226】

そのようなキャリアのさらなる例としては、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質 (例えば、ヒト血清アルブミン)、緩衝物質 (例えば、リン酸、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、植物性飽和脂肪酸の部分的なグリセリド混合物、水、塩または電解質 (例えば、硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドケイ酸、三ケイ酸マグ

50

ネシウム))、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質およびポリエチレングリコールが挙げられる。アゴニストまたはアンタゴニストの局所用またはゲルベースの形態のキャリアとしては、多糖類（例えば、カルボキシルメチルセルロースナトリウムまたはメチルセルロース）、ポリビニルピロリドン、ポリアクリレート、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレンーブロックポリマー、ポリエチレングリコールおよびウッドワックス (wood wax) アルコールが挙げられる。すべての投与について、従来のデポー形態が適当に使用される。そのような形態としては、例えば、マイクロカプセル、ナノカプセル、リポソーム、硬膏、吸入形態、鼻用スプレー、舌下錠剤および徐放調製物が挙げられる。ZPAポリペプチドまたはアゴニストまたはアンタゴニストは、代表的には、約 0.1 mg/ml ~ 100 mg/ml の濃度でそのようなビヒクル中に製剤化される。

10

【0227】

別の製剤は、ZPAポリペプチドまたはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを、形成された部材に組み込んでいるものを含む。そのような部材は、内皮細胞の増殖および血管新生を調節する際に使用され得る。さらに、腫瘍の浸潤および転移は、これらの部材を用いて調節され得る。

【0228】

インビボ投与に使用されるZPAポリペプチドまたはアゴニストもしくはアンタゴニストは、滅菌されていなければならない。これは、凍結乾燥および再構成の前後における、滅菌された濾過膜による濾過によって容易に達成される。ZPAポリペプチドは、全身投与される場合、通常、凍結乾燥形態または溶液で保存される。凍結乾燥形態である場合、ZPAポリペプチドまたはそれに対するアゴニストもしくはアンタゴニストは、代表的には、使用時に適切な希釈剤を用いて再構成するために他の材料と組み合わせて製剤化される。ZPAポリペプチドまたはアゴニストもしくはアンタゴニストの液体製剤の例は、皮下注射用の単回用量のバイアル内に満たされた、滅菌された無色透明の新鮮な溶液である。反復使用に適した保存型の薬学的組成物は、例えば、主にポリペプチドの効能およびタイプに応じて以下を含み得る：

20

- a. ZPAポリペプチドまたはそれに対するアゴニストもしくはアンタゴニスト；
- b. そのポリペプチドまたは溶液中の他の分子の一連の最大安定性におけるpH（例えば、pH約4~8）を維持することができる緩衝液；
- c. 主に、振動によって誘導される凝集に対してポリペプチドまたは分子を安定化する界面活性剤／界面活性物質；
- d. 等張剤 (isotonicifier)；
- e. フェノール、ベンジルアルコールおよびベンゼトニウムハロゲン化物、例えば、塩化ベンゼトニウムの群から選択される保存剤；および
- f. 水。

30

【0229】

使用される界面活性剤が、非イオン性である場合、それは、例えば、ポリソルベート（例えば、POLYSORBATETM (TWEENTM) 20、80など）またはポロキサマー（例えば、POLOXAMERTM 188）であり得る。非イオン性界面活性物質の使用によって、製剤が露出することにより、ポリペプチドの変性を引き起こさずに表面応力を壊すことが可能になる。さらに、そのような界面活性物質含有製剤は、エアロゾルデバイス（例えば、肺投与において使用されるものおよび針無しジェット式注射器 (needleless jet injector gun)（例えば、EP257, 956を参照のこと）において使用され得る。

40

【0230】

等張剤は、ZPAポリペプチドまたはそれに対するアゴニストもしくはアンタゴニストの液体組成物の等張性を保証するために存在し得、それらとしては、多価糖アルコール、例えば、三価糖アルコールまたは高級糖アルコール（例えば、グリセリン、エリトリール、アラビトール、キシリトール、ソルビトールおよびマンニトール）が挙げられる。これらの糖アルコールは、単独で使用しても、組み合わせて使用してもよい。あるいは、塩

50

化ナトリウムまたは他の適切な無機塩を使用して、溶液を等張にすることができる。

【0231】

緩衝液は、例えば、所望のpHに応じて酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、コハク酸緩衝液またはリン酸緩衝液であり得る。本発明の1つのタイプの液体製剤のpHは、約4～8の範囲、好ましくは生理学的pHあたりに緩衝される。

【0232】

保存剤であるフェノール、ベンジルアルコールおよびベンゼトニウムハロゲン化物、例えば、塩化ベンゼトニウムは、使用することができる公知の抗菌剤である。

【0233】

治療上のZPAポリペプチド組成物、アゴニスト組成物および／またはアンタゴニスト組成物は、一般に、滅菌された接続口を有する容器、例えば、静脈内投与用溶液バッグまたは皮下組織への注射針が貫通可能なストッパーを有するバイアル内に入れられる。ある特定の実施形態において、製剤は、反復静脈内(i. v.)注射、反復皮下(s. c.)注射もしくは反復筋肉内(i. m.)注射として、または鼻腔内送達もしくは肺内送達に適したエアロゾル製剤として(肺内送達については、例えば、EP257, 956を参照のこと)投与され得る。

【0234】

ZPAポリペプチド、それに対するアゴニストおよび／またはアンタゴニストはまた、徐放調製物の形態で投与され得る。徐放調製物の適当な例としては、タンパク質を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、そのマトリックスは、成形された部材の形態、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルである。徐放マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、Langerら、J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277(1981)およびLanger, Chem. Tech., 12:98-105(1982)によって記載されているようなポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール)、ポリ乳酸(米国特許第3,773,919号、EP58,481)、L-グルタミン酸とガンマエチル-L-グルタメートとの共重合体(Sidmanら、Biopolymers, 22:547-556(1983))、非分解性エチレン-酢酸ビニル(Langerら、前出)、分解性乳酸-グリコール酸共重合体(例えば、Lupron DepotTM(乳酸-グリコール酸共重合体および酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なミクロスフェア)およびポリ-D-(+)-3-ヒドロキシ酪酸(EP133,988)が挙げられる。

【0235】

エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸のようなポリマーが、100日間を超えて分子の放出を可能にする一方で、ある特定のヒドロゲルは、それよりも短い期間タンパク質を放出する。被包性タンパク質が、長時間体内に残存するとき、そのタンパク質は、37℃の水分との曝露の結果として、変性し得るか、または凝集し得、その結果、生物学的活性を喪失し、免疫原性が変化し得る。関与するメカニズムに応じて、タンパク質安定性に対する合理的なストラテジーが考案され得る。例えば、凝集メカニズムが、チオージスルフィド交換による分子間のS-S結合形成であると発見される場合、安定性は、スルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、適切な添加剤を使用して水分含有量を調節し、そして特定のポリマーマトリックス組成物がもたらされることによって、達成され得る。

【0236】

徐放ZPAポリペプチド組成物、アゴニスト組成物および／またはアンタゴニスト組成物は、リボソームに封入されたZPAポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストも含む。ZPAポリペプチド、抗体、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを含むリボソームは、本質的に公知の方法によって調製される：DE3,218,121；Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692(1985)；Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4034(1980)；EP52,322；EP36,676；EP

88, 046; EP 143, 949; EP 142, 641; 日本特許出願 83-118008; 米国特許第 4, 485, 045 号および同第 4, 544, 545 号; および EP 102, 324。通常、リポソームは、小型 (約 200~800 オングストローム) の単層型であり、ここで、その脂質含有量は、約 30 mol % を超えるコレステロールであり、選択される割合は、最適な治療に適合される。

【0237】

ZPA ポリペプチド、それに対するアゴニストおよび／またはアンタゴニストの治療的に有効な用量は、当然のことながら、処置 (予防を含む) される障害、投与方法、処置に使用される化合物のタイプ、関与する任意の同時治療、患者の年齢、体重、全般的な病状、病歴などのような因子に応じて変化し、その決定は、十分、実際の医師の技術の範囲内である。従って、療法士が、投与量を滴定し、そして最大の治療上の効果を得るために必要な投与の経路を変更することが必要である。臨床医は、対象の状態を処置するために所望の効果を達成する投与量に達するまで、ZPA ポリペプチド、それに対する抗体、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを投与する。例えば、目的が、癌の処置である場合、その量は、癌の増殖を阻害する量であり得る。

【0238】

上記の指針を用いて、有効な用量は、一般に、約 0.001~約 1.0 mg/kg、約 0.01~1.0 mg/kg および／または約 0.01~0.1 mg/kg の範囲内である。

【0239】

アポトーシスの関連障害を処置する際の非経口使用に対しては、注射の形態で、体重 1 kg あたり約 0.01~50 mg、約 0.05~20 mg および／または約 1~20 mg で、1日1~3回、静脈内注射によって、ZPA ポリペプチド、それに対するアゴニストおよび／またはアンタゴニストを投与することが有益である。経口投与については、ある特定の実施形態において、ZPA ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストに基づく分子は、体重 1 kg あたり約 5 mg~1 g および／または約 10~100 mg で、1日1~3回投与される。エンドトキシン混入は、安全なレベルで、例えば、0.5 ng/mg 未満のタンパク質で、最小に維持されるべきであることが理解されるはずである。さらに、ヒト投与に対しては、製剤は、好ましくは、FDA Office および Biologics standards が要求するような無菌性、発熱性、全般的な安全性および純度を満たす。

【0240】

組織再生において使用される ZPA ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを含む薬学的組成物の投与レジメンは、ポリペプチドの作用を変更する様々な因子 (例えば、形成されるのに望まれる組織重量、損傷部位、損傷組織の状態、創傷のサイズ、損傷組織のタイプ (例えば、骨)、患者の年齢、性別および食事、任意の感染症の重症度、投与の時間および他の臨床上的因子) を考慮して主治医によって決定される。投与量は、再構成において使用されるマトリックスのタイプおよび薬学的組成物中に他のタンパク質を含むことによって変化し得る。例えば、IGF-I のような他の公知の成長因子を最終的な組成物に加えることもまた投与量に影響し得る。進行は、例えば、X線、組織形態計測的な測定およびテトラサイクリン標識によって、組織／骨の成長および／または修復を定期的に評価することによってモニターされ得る。

【0241】

ZPA ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストの投与経路は、例えば、静脈内、筋肉内、脳内、腹腔内、脳脊髄内 (intracerebrospinal)、皮下、眼内、関節内、滑液包内、髄腔内、経口、局所的もしくは吸入経路による注射または点滴あるいは以下に述べるような徐放系による公知の方法に従う。ZPA ポリペプチド、そのアゴニストおよび／またはアンタゴニストはまた、局所的な治療上の効果ならびに全身性の治療上の効果を発揮するために、腫瘍内、腫瘍周囲、病巣内または病変部周囲への経路によって、適当に投与される。

【0242】

ペプチドまたは低分子が、アンタゴニストまたはアゴニストとして使用される場合、それらは、好ましくは、液体または固体の形態で哺乳動物に経口的または非経口的に投与される。

【0243】

塩を形成し、そして本明細書中の上において有用な分子の薬理的に許容可能な塩の例としては、アルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩）、アルカリ土類金属塩（例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩）、アンモニウム塩、有機塩基塩（例えば、ピリジン塩、トリエチルアミン塩）、無機酸塩（例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩）および有機酸の塩（例えば、酢酸塩、シュウ酸塩、p-トルエンスルホン酸塩）が挙げられる。

10

【0244】

本発明のZPAポリペプチド、それに対するアゴニストおよび／またはアンタゴニストの所望の作用の位置が、そのポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストの調製および投与において考慮され得る。所望の作用が、細胞内における作用であるとき、本発明のある特定の実施形態は、その細胞に導入されるポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを提供する。1つの実施形態において、ポリペプチド、タンパク質性アゴニストおよび／またはタンパク質性アンタゴニストの細胞内の発現は、そのポリペプチド、タンパク質性アゴニストおよび／またはタンパク質性アンタゴニストをコードする核酸（そのような分子をコードする遺伝子に通常関連する野生型のリーダー配列および分泌シグナルを欠く）を標的細胞に導入することによって影響される。核酸を細胞に導入する任意の標準的な方法が使用され得、それらとしては、マイクロインジェクション、弾道注入（ballistic injection）、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、リポソーム、ならびに、目的の核酸を有するレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよびワクシニアベクターによるトランスフェクションが挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0245】

別の実施形態において、内部移行分子が提供される。ポリペプチドは、細胞への送達を促進するある特定の特性を有し得るか、またはそのような特性を有するように修飾され得る。このことを達成するための手法は、当該分野で公知である。例えば、カチオン化、リポフェクションまたはリポソームを使用することによって、抗体を細胞に送達することができる。細胞への分子の導入は、導入される分子にpH（低）挿入ペプチド（「pHLIP」）を結合体化することによって（例えば、ジスルフィド結合によって、例えば、Reshetnyakら、Proc. Natl. Acad. Sci. 103（17）：6460-6465（2006）を参照のこと）および細胞外pHを低下させることによっても促進され得る。フラグメントが使用される場合、所望の機能を発揮する最も小さいフラグメントが、一般に有益である。例えば、抗アポトーシス活性を保持しつつも膜アンカー領域を有しないZPAポリペプチドは、細胞内導入に対して野生型ポリペプチドよりも有益であり得る。そのようなペプチドは、化学的に合成され、そして／または組換えDNA技術によって作製され得る。

30

【0246】

調節因子であるポリペプチド、アゴニストおよびアンタゴニストが標的細胞に入っていくことは、当該分野で公知の方法によって促進され得る。例えば、ある特定の配列（例えば、HIV TatまたはAntennapediaホメオドメインタンパク質から得られる配列）は、細胞膜を超えて異種タンパク質を効率的に取り込むことを指示することができる。例えば、Chenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA（1999），96：4325-4329を参照のこと。

40

【0247】

ZPAポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストの所望の活性の位置が、脳であるとき、本発明のある特定の実施形態は、血液脳関門を通り抜けるZPAポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを提供する。ある特定の神経変性疾患

50

は、血液脳関門の透過性の増大に関連し、抗体または抗原結合フラグメントは、容易に脳に導入され得る。血液脳関門が、インタクトなままであるとき、そこを超えて分子を輸送するためのいくつかの当該分野で公知のアプローチが存在し、そのアプローチとしては、物理的な方法、脂質ベースの方法ならびにレセプターおよびチャネルベースの方法が挙げられるがこれらに限定されない。

【0248】

血液脳関門を越えてZPAポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを輸送する物理的な方法としては、もっぱら血液脳関門を回避することによる方法または血液脳関門に開口部を創り出すことによる方法が挙げられるが、これらに限定されない。回避方法としては、脳に直接注射する方法（例えば、Papanastassiouら、Gene Therapy 9:398-406 (2002)を参照のこと）、間隙性点滴／対流を促進する送達（例えば、Boboら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994)を参照のこと）および脳に送達デバイスを埋め込むこと（例えば、Gillら、Nature Med. 9:589-595 (2003)；およびGliadel WafersTM, Guildford Pharmaceuticalを参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。その関門に開口部を創り出す方法としては、超音波（例えば、米国特許公開番号2002/0038086を参照のこと）、浸透圧（例えば、高浸透圧性マンニトールの投与によって（Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989)）、例えば、ブラジキニンまたは透過剤A-7による透過処理（例えば、米国特許第5,112,596号、同第5,268,164号、同第5,506,206号および同第5,686,416号を参照のこと）ならびにZPAポリペプチド、タンパク質性アゴニストおよび／またはタンパク質性アンタゴニストをコードする遺伝子を含むベクターによる血液脳関門をまたぐニューロンのトランスフェクション（例えば、米国特許公開番号2003/0083299を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0249】

血液脳関門を超えてZPAポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを輸送する脂質ベースの方法としては、血液脳関門の血管内皮上のレセプターに結合する抗体結合フラグメントに結合したZPAポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストをリポソーム内に封入する方法（例えば、米国特許出願公開番号20020025313を参照のこと）ならびに低密度リポタンパク質粒子（例えば、米国特許出願公開番号20040204354を参照のこと）またはアポリポタンパク質E（例えば、米国特許出願公開番号20040131692を参照のこと）にZPAポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストをコーティングする方法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0250】

血液脳関門を越えてZPAポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを輸送するレセプターベースおよびチャネルベースの方法としては、血液脳関門の透過性を増加させる糖質コルチコイド遮断剤を使用する方法（例えば、米国特許出願公開番号2002/0065259、2003/0162695および2005/0124533を参照のこと）；カリウムチャネルを活性化する方法（例えば、米国特許出願公開番号2005/0089473を参照のこと）、ABC薬物トランスポーターを阻害する方法（例えば、米国特許出願公開番号2003/0073713を参照のこと）；上記分子をトランスフェリンでコーティングして、1つ以上のトランスフェリンレセプターの活性を調節する方法（例えば、米国特許出願公開番号2003/0129186を参照のこと）および上記分子をカチオン化する方法（例えば、米国特許第5,004,697号を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0251】

併用療法

アポトーシス関連障害を予防または処置する際のZPAポリペプチドまたはそのアゴニストもしくはアンタゴニストの有効性は、活性な薬剤を、連続的に、またはこの目的に対して有効な別の薬剤と併用して、同じ組成物においてまたは別個の組成物として、投与することによって改善され得る。

【0252】

例えば、細胞増殖性障害の処置について、ZPAポリペプチドおよび／またはZPAポリペプチドアゴニストによる治療は、細胞増殖の他のインヒビター（例えば、細胞傷害性薬剤）の投与と併用され得る。

【0253】

10

さらに、癌を処置するために使用されるZPAポリペプチドおよび／またはアゴニストは、上で同定したような細胞傷害性薬剤、化学療法剤または増殖阻害剤と併用され得る。また、癌の処置に対しては、ZPAポリペプチドおよび／またはそのアゴニストは、放射性物質の照射を含むのか投与を含むのか否かに関係なく、放射線学的処置と連続的にまたは併用して適当に投与される。

【0254】

処置が癌に対するものである場合、腫瘍関連抗原に対する抗体（例えば、ErBB2、EGFR、ErBB3、ErBB4またはVEGFレセプターのうちの1つ以上に結合する抗体）を投与することも望ましい場合がある。あるいは、またはさらに、本明細書中に開示される同じ抗原または2つ以上の異なる抗原に結合する2つ以上の抗体が、患者に同時投与され得る。時折、1つ以上のサイトカインを患者に投与することも有益な場合がある。1つの実施形態において、本明細書中に記載されるZPAポリペプチドおよび／またはそのアゴニストは、増殖阻害剤とともに同時投与される。例えば、増殖阻害剤がまず投与された後、本発明のZPAポリペプチドおよび／またはそのアゴニストが投与され得る。しかしながら、同時投与または本発明のZPAポリペプチドおよび／またはそのアゴニストを先に投与することもまた企図される。増殖阻害剤に適した投与量は、現在使用されている量であり、その量は、増殖阻害剤と本明細書中に記載されるポリペプチドおよびアゴニストとの結合作用（相乗作用）に起因して減少し得る。

20

【0255】

1つの実施形態において、腫瘍の血管新生は、併用療法において攻撃される。本発明のZPAポリペプチドおよび／またはそのアゴニストならびに抗体（例えば、抗VEGF）は、例えば、腫瘍またはその転移巣（もしあれば）のネクロシスを観察することによって決定されるような、治療的に有効な用量で腫瘍を有する患者に投与される。この治療は、さらなる有益な効果が観察されなくなるまでまたは臨床検査によって腫瘍の痕跡もしくは任意の転移巣が示されなくなるまで、継続される。次いで、TNFが、単独で投与されるか、あるいは補助剤（例えば、アルファー、ベーターもしくはガンマーインターフェロン、抗HER2抗体、ヘレグリン、抗ヘレグリン抗体、D因子、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-2（IL-2）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）または腫瘍における微小血管凝固を促進する薬剤（例えば、抗プロテインC抗体、抗プロテインS抗体またはC4b結合タンパク質（1991年2月21日に公開されたWO91/01753を参照のこと））または熱もしくは放射線照射と併用して、投与される。

30

40

【0256】

ZPAポリペプチドまたはそのアンタゴニストと併用して投与される治療薬の有効量は、医師または獣医師の判断である。その投与量の投与および調節は、処置される状態の最大の管理が達成されるように行われる。その用量は、使用される治療薬のタイプおよび処置される特定の患者のような因子にさらに依存する。代表的には、使用される量は、所与の治療薬が、ZPAポリペプチドなしで投与される場合に使用される用量と同じである。

【0257】

製品

50

上に記載した障害の診断または処置に有用な1つ以上のZPAポリペプチドまたはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを備えるキットのような製品は、少なくとも容器およびラベルを含む。適当な容器としては、例えば、ビン、バイアル、注射器および試験管が挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックのような種々の材料から形成され得る。容器は、状態の診断または処置に有効な組成物を保持しており、滅菌された接続口を有し得る（例えば、容器は、皮下注射用針によって貫通可能なストッパーを有する静脈内投与用溶液バッグまたはバイアルであり得る）。組成物中の活性な薬剤は、1つ以上のZPAポリペプチドまたはそれに対するアゴニストもしくはアンタゴニストである。その容器上のラベルまたはその容器に関連するラベルは、その組成物が、最適な状態を診断または処置するために使用されることを示している。その製品は、さらに、薬学的に許容可能な緩衝液（例えば、リン酸緩衝食塩水、リンガー溶液およびデキストロース溶液）を含む第2の容器を備え得る。さらに、その製品は、商業的視点およびユーザーの視点から望ましい他の材料も備え得、それらとしては、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、注射器および使用についての指示を含む添付文書が挙げられる。製品はまた、上に記載したような別の活性な薬剤を含む第2または第3の容器を備え得る。

【0258】

ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体を調製する方法は、当業者に公知である。ポリクローナル抗体は、例えば、免疫剤および所望であればアジュバントの1回以上の注射によって、哺乳動物において産生され得る。代表的には、免疫剤および／またはアジュバントは、複数回の皮下または腹腔内への注射によって哺乳動物に注射される。免疫剤としては、ZPAポリペプチドまたはその融合タンパク質が挙げられ得る。免疫される哺乳動物において免疫原性であることが知られているタンパク質に免疫剤を結合体化することが有用であり得る。そのような免疫原性のタンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリンおよびダイズトリプシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。使用され得るアジュバントの例としては、フロイント完全アジュバントおよびMPL-TDMアジュバント（モノホスホリル脂質Aまたは合成トレハロースジコリノミコレート）が挙げられる。免疫プロトコルは、過剰な実験をすることなく当業者によって選択され得る。

【0259】

モノクローナル抗体

抗ZPA抗体は、モノクローナル抗体であり得る。モノクローナル抗体は、例えば、Köhler and Milstein, Nature, 256:495 (1975)によって報告されたようなハイブリドーマ法を使用して調製され得るか、または、組換えDNA法（米国特許第4,816,567号）によって作製され得るか、または、本明細書中の実施例の項に記載される方法によって作製され得る。ハイブリドーマ法では、代表的には、抗体を産生するリンパ球または抗体を産生することができるリンパ球を誘発する免疫剤で、マウス、ハムスターまたは他の適切な宿主動物を免疫する。ここで、これらのリンパ球は、免疫剤に特異的に結合する。あるいは、リンパ球は、インビトロにおいて免疫され得る。

【0260】

免疫剤は、代表的には、ZPAポリペプチドまたはその融合タンパク質を含む。一般に、ヒト起源の細胞が所望である場合、末梢血リンパ球（「PBL」）が使用されるか、または、非ヒト哺乳動物の起源が所望である場合、脾臓細胞もしくはリンパ節細胞が使用される。次いで、そのリンパ球を、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を使用して、不死化された細胞株と融合することにより、ハイブリドーマ細胞が形成される。Goding, Monoclonal Antibody: Principles and Practice (New York: Academic Press, 1986), pp. 59-103。不死化された細胞株は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特に、げっ歯類、ウシおよびヒト起源のミエローマ細胞である。通常、ラットまたはマウスの

ミエローマ細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、融合していない不死化された細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を含む適当な培養液中で培養され得る。例えば、親細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRPT）を欠いている場合、ハイブリドーマに対する培養液は、代表的には、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含み（「HAT培地」）、これらの物質は、HGPRT欠損細胞の増殖を妨害する。

【0261】

例示的な不死化された細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞によって安定した高レベルな抗体の発現を補助し、そして、HAT培地のような培地に感受性である細胞株である。ある特定の実施形態において、不死化された細胞株は、マウスのミエローマ系統であり、これは、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CaliforniaおよびAmerican Type Culture Collection, Manassas, Virginiaから入手可能である。ヒトミエローマ細胞株およびマウスーヒトヘロミエローマ細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について報告されている。Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp. 51-63。

【0262】

次いで、ハイブリドーマ細胞が培養される培養液は、ZPAポリペプチドに対して産生されたモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。ある特定の実施形態において、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ（例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA））によって測定される。そのような手法およびアッセイは、当該分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)のScatchard解析によって測定され得る。

【0263】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈手順によってサブクローン化し、そして標準的な方法によって生育し得る。Goding, 前出。この目的に適した培養液としては、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地およびRPMI-1640培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物における腹水としてインビボにおいて生育され得る。

【0264】

上記サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順（例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析またはアフィニティークロマトグラフィ）によって培養液または腹水から単離または精製され得る。

【0265】

モノクローナル抗体はまた、米国特許第4,816,567号に記載されているような組換えDNA法によっても作製され得る。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）、容易に単離され得、配列決定され得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの起源として機能し得る。いったん単離されると、そのDNAを発現ベクター内に入れることができ、そしてそのベクターを宿主細胞（例えば、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞または免疫グロブリンタンパク質を別途産生しないミエローマ細胞）にトランスフェクトすることにより、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成がもたらされる。例えば、相同なマウス配列の代わりに、ヒト重鎖および軽

鎖の定常ドメインに対するコード配列を置換することによって（米国特許第4, 816, 567号；Morrisonら、前出）、または、非免疫グロブリンポリペプチドに対するコード配列の全部または一部を、免疫グロブリンコード配列に共有結合させることによって、上記DNAを修飾することもできる。そのような非免疫グロブリンポリペプチドを、本発明の抗体の定常ドメインで置換し得るか、または本発明の抗体の1つの抗原連結部位の可変ドメインで置換し得ることにより、キメラ二価抗体が作製され得る。

【0266】

抗体は、一価抗体であり得る。一価抗体を調製するための方法は、当該分野で公知である。例えば、1つの方法は、免疫グロブリン軽鎖および修飾重鎖の組換え発現を含む。その重鎖は、重鎖架橋を回避するために、通常、Fc領域中の任意の点で切断されている。あるいは、架橋を回避するために、関連するシステイン残基を別のアミノ酸残基で置換するか、または欠失させる。

10

【0267】

インビトロ方法はまた、一価抗体の調製に適している。そのフラグメント（特にFabフラグメント）をもたらすような抗体の消化は、当該分野で公知の手法を使用して達成され得る。

【0268】

ヒト抗体およびヒト化抗体

抗ZPA抗体は、さらに、ヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。非ヒト（例えば、マウスの）抗体のヒト化型は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合部分配列）である。ヒト化抗体としては、レシピエントのCDR由来の残基が所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）（例えば、マウス、ラットまたはウサギ）のCDR由来の残基で置換されているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）が挙げられる。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基で置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体と、移入される（imported）CDRまたはフレームワーク配列との両方において見られない残基を含み得る。通常、ヒト化抗体は、そのCDR領域のすべてまたは実質的にすべてが、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、FR領域のすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のFR領域である、少なくとも1つおよび代表的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含む。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域（Fc）、代表的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含み得る。Jonesら、Nature, 321:522-525 (1986)；Riechmannら、Nature, 332:323-329 (1988)；Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)。

20

30

【0269】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で公知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである起源に由来し、そのヒト化抗体に導入される1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、「移入」残基と呼ばれ、これは、代表的には、「移入」可変ドメインに由来する。ヒト化は、げっ歯類CDRまたはCDR配列をヒト抗体の対応配列で置換することによって、Winterおよび共同研究者の方法に従って本質的に実施され得る（Jonesら、Nature, 321:522-525 (1986)；Riechmannら、Nature, 332:323-327 (1988)；Verhoeyenら、Science, 239:1534-1536 (1988)）。従って、そのような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体（米国特許第4, 816, 567号）であり、ここで、実質的にインタクトでないヒト可変ドメインは、非ヒト種由来の対応配列で置換されている。実際には、ヒト化抗体は、代表的には、いくつかのCDR残基およびおそらくいくつかのFR残基が、げっ歯類抗体における類似の部位由来の残基で置換されている、ヒト抗体である。

40

50

【0270】

ヒト化に対する代替として、ヒト抗体が作製され得る。例えば、現在、免疫時に内因性免疫グロブリン産生が行われずに、ヒト抗体の完全なレパートリーを産生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を作製することが可能である。例えば、キメラマウスおよび生殖細胞系列変異マウスにおける抗体重鎖結合領域（JH）遺伝子のホモ接合性の欠失によって、内因性の抗体産生の完全な阻害がもたらされることが報告されている。そのような生殖細胞系列変異マウスにヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子配列を導入することにより、抗原チャレンジ時にヒト抗体の産生がもたらされる。例えば、Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovitsら、Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemannら、Year in Immunol., 7:33 (1993); 米国特許第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,591,669号（すべてGenPharm）; 同第5,545,807号; およびWO97/17852を参照のこと。あるいは、ヒト抗体は、内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されているトランスジェニック動物、例えば、マウスにヒト免疫グロブリン遺伝子座を導入することによって作製され得る。チャレンジ時には、遺伝子再構成、構築および抗体レパートリーをはじめとしたすべての局面においてヒトにおいて見られるものと非常によく似たヒト抗体産生が観察される。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; および同第5,661,016号ならびに以下の科学的刊行物: Marksら、Bio/Technology, 10:779-783 (1992); Lonbergら、Nature, 368:856-859 (1994); Morrison, Nature, 368:812-813 (1994); Fishwildら、Nature Biotechnology, 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14:826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)に記載されている。

【0271】

あるいは、ファージディスプレイ技術（McCaffertyら、Nature 348:552-553 [1990]）を使用することにより、免疫されていないドナー由来の免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロにおいてヒト抗体および抗体フラグメントを作製することができる。この手法によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、M13またはfdのような繊維状バクテリオファージの、主要なまたは比較的重要でないコートタンパク質遺伝子のいずれかにインフレイムでクローニングし、ファージ粒子の表面上に機能的な抗体フラグメントとしてディスプレイする。その繊維状粒子は、ファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、その抗体の機能的な特性に基づく選択によってもまた、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択がもたらされる。従って、ファージは、B細胞の特性の一部を模倣する。ファージディスプレイは、種々の様式で実施され得、例えば、Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)に概説されている。V遺伝子セグメントのいくつかの起源が、ファージディスプレイに使用され得る。Clacksonら、Nature, 352:624-628 (1991)は、免疫されたマウスの脾臓由来のV遺伝子の小さなランダムコンビナトリアルライブラリーから抗オキサゾロン抗体の多様な配列を単離した。免疫されていないヒトドナー由来のV遺伝子のレパートリーが構築され得、そして多様な配列の抗原（自己抗原を含む）に対する抗体が、Marksら、J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)またはGriffithsら、EMBO J. 12:725-734 (1993)によって報告された手法に従って本質的に単離され得る。米国特許第5,565,332号および同第5,573,905号もまた参照のこと。

【0272】

上に記述したように、ヒト抗体はまた、インビトロにおいて活性化されたB細胞によって産生され得る（米国特許第5,567,610号および同第5,229,275号を参照のこと）。

【0273】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーをはじめとした当該分野で公知の様々な手法を使用して作製され得る。Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marksら、J. Mol. Biol., 222:581 (1991)。ColeらおよびBoernerらの手法もまた、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である。Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) およびBoernerら、J. Immunol., 147 (1):86-95 (1991)。

【0274】

二重特異性抗ZPA抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体であり、必要に応じて、ヒト抗体またはヒト化抗体である。本発明の場合、一方の結合特異性は、ZPAポリペプチドに対するものであり、もう一方は、他の任意の抗原に対するものである。

【0275】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当該分野で公知である。従来、二重特異性抗体の組換え作製は、2つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現に基づくものであり、ここでその2つの重鎖は、異なる特異性を有する。Milstein and Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の組合せがランダムであるので、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、10個の異なる抗体分子の混合物（そのうちの1つだけが、正しい二重特異性構造を有する）であり得るものを産生する。その正しい分子の精製は、通常、アフィニティークロマトグラフィ工程によって達成される。同様の手順が、1993年5月13日に公開されたWO 93/08829およびTraunecckerら、EMBO J., 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

【0276】

所望の結合特異性（抗体－抗原結合部位）を有する抗体可変ドメインは、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合され得る。ある特定の実施形態において、その融合は、ヒンジ、CH2およびCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。ある特定の実施形態において、軽鎖結合に必要な部位を含む第1重鎖定常領域（CH1）は、その融合物の少なくとも1つに存在する。免疫グロブリン重鎖融合物をコードするDNAおよび所望であれば免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別個の発現ベクターに挿入され、適当な宿主生物に同時にトランスフェクトされる。二重特異性抗体の作製に関するさらなる詳細については、例えば、Sureshら、Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照のこと。

【0277】

二重特異性抗体フラグメントを作製し、組換え細胞培養物から直接単離するための様々な手法もまた、報告されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを使用して作製されている。Kostelnyら、J. Immunol., 148 (5):1547-1553 (1992)。Fosタンパク質およびJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合によって、2つの異なる抗体のFab'部分に連結した。その抗体ホモ二量体をヒンジ領域において還元することにより、モノマーが形成され、次いで、再度酸化することにより、抗体ヘテロ二量体が形成される。この方法は、抗体ホモ二量体の作製にも利用され得る。Hollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)によって報告された「ダイア

ボディ」技術は、二重特異性抗体フラグメントを作製するための代替のメカニズムを提供した。そのフラグメントは、同じ鎖において2つのドメインの間で対を形成することができないくらい短いリンカーによってVLに接続されたVHを含む。従って、1つのフラグメントのVHドメインおよびVLドメインが、別のフラグメントの相補的なVLドメインと対を形成せざるを得ないことによって、2つの抗原結合部位が形成される。一本鎖Fv(sFv)二量体を使用することによって二重特異性抗体フラグメントを作製するための別のストラテジーもまた、報告されている。Gruberら、J. Immunol., 152:5368(1994)を参照のこと。

【0278】

2より高い結合価を有する抗体が企図される。例えば、三重特異性抗体が調製され得る。Tuttrら、J. Immunol. 147:60(1991)。

10

【0279】

ヘテロ結合体(Heteroconjugate)抗体

ヘテロ結合体抗体は、2つの共有結合した抗体から構成される。そのような抗体は、例えば、免疫系細胞を不必要な細胞に標的化するため(米国特許第4,676,980号)およびHIV感染を処置するために提案されている。WO91/00360;WO92/200373;EP03089。その抗体は、架橋剤を必要とする方法をはじめとした合成タンパク質化学における公知の方法を使用してインビトロにおいて調製され得ることが企図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を使用するかまたはチオエーテル結合を形成することによって構築され得る。この目的に適当な試薬の例としては、イミ

20

【0280】

エフェクター機能の操作

例えば、癌を処置する際の抗体の有効性を増大させるために、エフェクター機能に関して本発明の抗体を修飾することが望ましい場合がある。例えば、システイン残基をFc領域に導入することによって、この領域において鎖間ジスルフィド結合の形成が可能になる。このように作製されるホモ二量体の抗体は、改善された内部移行能力ならびに/または高い補体媒介性細胞殺滅および抗体依存性細胞傷害(ADCC)を有し得る。Caronら、J. Exp. Med., 176:1191-1195(1992)およびShopes, J. Immunol., 148:2918-2922(1992)を参照のこと。増強された抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体はまた、Wolffら、Cancer Research, 53:2560-2565(1993)に記載されているようにヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製され得る。あるいは、二重のFc領域を有し、それによって、増強された補体溶解能力およびADCC能力を有し得る抗体が、操作され得る。Stevensonら、Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230(1989)を参照のこと。

30

【0281】

免疫結合体

本発明はまた、細胞傷害性薬剤(例えば、化学療法剤、トキシシン(例えば、細菌、真菌、植物もしくは動物起源の酵素的に活性なトキシシンまたはそれらのフラグメント)または放射性同位体(すなわち、放射性結合体))に結合体化された抗体を含む免疫結合体に関する。

40

【0282】

そのような免疫結合体の作製に有用な化学療法剤は、上に記載した。使用され得る酵素的に活性なトキシシンおよびそれらのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリアトキシシンの非結合型活性フラグメント、外毒素A鎖(Pseudomonas aeruginosa由来のもの)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、アルファーサルシン(sarcin)、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンシン(dianthin)タンパク質、Phytolacca americanaタンパク質(

50

P A P I、P A P I I および P A P - S)、ニガウリインヒビター、クルシン (c u r c i n)、クロチン (c r o t i n)、s a p a o n a r i a o f f i c i n a l i s インヒビター、ゲロニン (g e l o n i n)、マイトゲリン (m i t o g e l l i n)、レストリクトシン (r e s t r i c t o c i n)、フェノマイシン (p h e n o m y c i n)、エノマイシン (e n o m y c i n) およびトリコテセン (t r i c o t h e c e n e s) が挙げられる。放射性結合体化抗体の作製に、種々の放射性核種が利用可能である。例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y および ^{186}Re が挙げられる。

【0283】

抗体と細胞傷害性薬剤との結合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤（例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール) プロピオネート (S P D P)、イミノチオラン (I T)、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジプイミデート H C l)、活性なエステル（例えば、ジスクシンイミジルスベレート)、アルデヒド類（例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物（例えば、ビス (p-アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス- (p-ジアゾニウムベンゾイル) -エチレンジアミン)、ジイソシアナート（例えば、トリエン2, 6-ジイソシアナート) および二活性フッ素化合物（例えば、1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン)）を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、V i t e t t a ら、S c i e n c e, 238:1098 (1987) において記載されているように調製され得る。炭素-14で標識された1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸 (M X - D T P A) は、上記抗体に放射性ヌクレオチドを結合体化するための例示的なキレート剤である。W O 94/11026を参照のこと。

【0284】

別の実施形態において、上記抗体は、腫瘍を前標的化する (p r e t a r g e t i n g) 際に利用するために「レセプター」（例えば、ストレプトアビジン) に結合体化され得、ここで、その抗体-レセプター結合体が、患者に投与された後、結合していない結合体は、清浄剤 (c l e a r i n g a g e n t) を使用して循環から除去され、次いで、細胞傷害性薬剤（例えば、放射性ヌクレオチド) に結合体化された「リガンド」（例えば、アビジン) が投与される。

【0285】

免疫リボソーム

本明細書中に開示される抗体はまた、免疫リボソームとして製剤化され得る。抗体を含むリボソームは、E p s t e i n ら、P r o c. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); H w a n g ら、P r o c. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); および米国特許第4, 485, 045号および同第4, 544, 545号に記載されているような当該分野で公知の方法によって調製される。循環時間が増大したリボソームは、米国特許第5, 013, 556号に開示されている。

【0286】

特に有用なリボソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよび P E G 誘導体化ホスファチジルエタノールアミン (P E G - P E) を含む脂質組成物を用いて逆相蒸発法によって作製され得る。リボソームは、所定のポアサイズのフィルターに通して押し出されることにより、所望の直径を有するリボソームが得られる。本発明の抗体の F a b ' フラグメントは、ジスルフィド交換反応を介して M a r t i n ら、J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982) に記載されているようなりボソームに結合体化され得る。化学療法剤（例えば、ドキソルビシン) が、必要に応じて、リボソーム内に含まれる。G a b i z o n ら、J. National Cancer Inst., 81(19):1484 (1989) を参照のこと。

【0287】

抗体の薬学的組成物

本明細書中において同定されるZPAポリペプチドに特異的に結合する抗体ならびに本明細書中のこれより前に開示されたスクリーニングアッセイによって同定される他の分子は、上で述べたようなおおよび下で述べるような様々な障害の処置のために薬学的組成物の形態で投与され得る。

【0288】

リポフェクチンまたはリポソームを使用することにより、本発明のポリペプチド、核酸分子、抗体、アンタゴニストまたは組成物を細胞に送達することができる。抗体フラグメントが使用される場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最も小さい阻害性フラグメントが、使用され得る。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するペプチド分子が、設計され得る。そのようなペプチドは、化学的に合成され得、そして／または組換えDNA技術によって作製され得る。例えば、Marascoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893 (1993)を参照のこと。

【0289】

本明細書中の製剤はまた、処置される特定の徴候に対して必要とされる、2つ以上の活性な化合物を含み得、それらの化合物は、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない補完的な活性を有する。あるいは、またはさらに、その組成物は、その機能を増強する薬剤（例えば、細胞傷害性薬剤、化学療法剤または増殖阻害剤）を含み得る。そのような分子は、意図される目的にとって有効な量で、適当に組み合わせられて存在する。

【0290】

活性成分はまた、例えば、コアセルベーション手法または界面重合によって調製されるマイクロカプセル内に、例えば、コロイド性薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）またはマクロエマルジョンにおける、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ（メチルメタシレート）マイクロカプセル内に、封入され得る。そのような手法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出に開示されている。

【0291】

インビボ投与に使用される製剤は、滅菌されていなければならない。これは、滅菌された濾過膜による濾過によって容易に達成される。

【0292】

徐放性調製物が調製され得る。徐放性調製物の適当な例としては、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、成形された物品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とγエチル-L-グルタミン酸との共重合体、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸共重合体（例えば、LUPRON DEPOSITTM（乳酸-グリコール酸共重合体および酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なミクロスフェア））およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸のようなポリマーは、100日超にわたって分子を放出することができるが、ある特定のヒドロゲルは、それよりも短い時間にわたってタンパク質を放出する。被包性抗体が、体内に長時間残存するとき、その抗体は、37℃の水分との曝露の結果として、変性し得るか、または凝集し得、その結果、生物学的活性を喪失し、免疫原性が変化し得る。関与するメカニズムに応じて、安定性に対する合理的なストラテジーが考案され得る。例えば、凝集メカニズムが、チオ-ジスルフィド交換による分子間のS-S結合形成であると発見される場合、安定性は、スルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、適切な添加剤を使用して水分含有量を調節し、そして特定のポリマーマトリックス組成物がもたらされることによって、達成され得る。

【0293】

抗ZPA抗体またはそのフラグメントを使用した処置方法

ZPAポリペプチドに対する抗体を使用することにより、上で述べたような様々なアポトーシス関連障害を処置することができることが企図される。抗ZPAポリペプチド抗体の抗原結合フラグメントがまた、以下の方法において使用され得ることが理解されるだろう。

【0294】

上記抗体は、公知の方法を踏まえて（例えば、ボラスとしての静脈内投与、または、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、静脈内、皮下、関節内、滑液包内、髄腔内、経口、局所的もしくは吸入経路による長期間にわたる持続注入によって）、哺乳動物、例えば、ヒトに投与される。

【0295】

本発明の抗体の結合標識の位置は、その抗体の調製および投与において考慮に入れられ得る。結合標的が細胞内分子であるとき、本発明のある特定の実施形態は、結合標的が存在する細胞に導入される抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。1つの実施形態において、本発明の抗体は、細胞内抗体として細胞内に発現し得る。用語「細胞内抗体」とは、本明細書中で使用されるとき、Marasco, Gene Therapy 4: 11-15 (1997); Kontermann, Methods 34: 163-170 (2004); 米国特許第6,004,940号および同第6,329,173号; 米国特許出願公開番号2003/0104402およびPCT公開番号WO2003/077945に記載されているような、細胞内に発現し、標的分子に選択的に結合することができる抗体またはその抗原結合部分のことをいう。細胞内抗体の細胞内での発現は、所望の抗体またはその抗原結合部分（その抗体または抗原結合フラグメントをコードする遺伝子に通常関連する野生型リーダー配列および分泌のシグナルを欠く）をコードする核酸を標的細胞に導入することによって影響される。核酸を細胞に導入する任意の標準的な方法が使用され得、それらとしては、マイクロインジェクション、弾道注入、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、リボソーム、ならびに、目的の核酸を有するレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよびワクシニアベクターによるトランスフェクションが挙げられるがこれらに限定されない。本発明の抗ZPA抗体の全部または一部をコードする1つ以上の核酸が、標的細胞に送達され得、細胞内でZPAタンパク質に結合することができ、そして1つ以上のZPA媒介性細胞経路を調節することができる1つ以上の細胞内抗体が発現する。

【0296】

別の実施形態において、内部移行抗体が提供される。抗体は、細胞への抗体の送達を促進するある特定の特性を有し得るか、またはそのような特性を有するように修飾され得る。これを達成するための手法は、当該分野で公知である。例えば、抗体のカチオン化は、細胞への取り込みを促進すると知られている（例えば、米国特許第6,703,019号を参照のこと）。リボフェクションまたはリボソームを使用することによってもまた、抗体を細胞に送達することができる。抗体フラグメントが使用される場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最も小さな阻害性フラグメントが、一般に有益である。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するペプチド分子が、設計され得る。そのようなペプチドは、化学的に合成され得、そして／または組換えDNA技術によって作製され得る。例えば、Marascoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)を参照のこと。

【0297】

標的細胞への抗体の移入は、当該分野で公知の方法によって増加され得る。例えば、HIV TatまたはAntennapediaホメオドメインタンパク質から得られる配列のようなある特定の配列は、細胞膜を超えた異種タンパク質の効率的な取り込みを指示することができる。例えば、Chenら、Proc. Natl. Acad. Sci. US

A (1999), 96:4325-4329を参照のこと。

【0298】

結合標的が、脳に存在するとき、本発明のある特定の実施形態は、血液脳関門を越える抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。ある特定の神経変性疾患は、血液脳関門の透過性の増大に関連し、抗体または抗原結合フラグメントは、容易に脳に導入され得る。血液脳関門がインタクトなままであるとき、血液脳関門を越えて分子を輸送するための、当該分野で公知のアプローチがいくつか存在し、それらとしては、物理的方法、脂質ベースの方法ならびにレセプターおよびチャネルベースの方法が挙げられるがこれらに限定されない。

【0299】

血液脳関門を越えて抗体または抗原結合フラグメントを輸送する物理的方法としては、もっぱら血液脳関門を回避する方法または血液脳関門に開口部を創り出すことによる方法が挙げられるが、これらに限定されない。回避方法としては、脳に直接注射する方法（例えば、Papanastassiouら、Gene Therapy 9:398-406 (2002)を参照のこと）、間隙性点滴／対流を促進する送達（例えば、Boboら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994)を参照のこと）および脳に送達デバイスを埋め込むこと（例えば、Gillら、Nature Med. 9:589-595 (2003)；およびGliadel WafersTM, Guildford Pharmaceuticalを参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。その関門に開口部を創り出す方法としては、超音波（例えば、米国特許公開番号2002/0038086を参照のこと）、浸透圧（例えば、高浸透圧性マンニトールの投与によって（Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989)））、例えば、ブラジキニンまたは透過剤A-7による透過処理（例えば、米国特許第5,112,596号、同第5,268,164号、同第5,506,206号および同第5,686,416号を参照のこと）および抗体または抗原結合フラグメントをコードする遺伝子を含むベクターによる血液脳関門をまたぐニューロンのトランスフェクション（例えば、米国特許公開番号2003/0083299を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0300】

血液脳関門を越えて抗体または抗原結合フラグメントを輸送する脂質ベースの方法としては、抗体または抗原結合フラグメントを、血液脳関門の血管内皮上のレセプターに結合する抗体結合フラグメントに結合するリポソーム内に封入すること（例えば、米国特許出願公開番号20020025313を参照のこと）および抗体または抗原結合フラグメントを、低密度リポタンパク質粒子（例えば、米国特許出願公開番号20040204354を参照のこと）またはアポリポタンパク質E（例えば、米国特許出願公開番号20040131692を参照のこと）にコーティングすることが挙げられるが、これらに限定されない。

【0301】

血液脳関門を超えて抗体または抗原結合フラグメントを輸送するレセプターベースおよびチャネルベースの方法としては、血液脳関門の透過性を増大させる糖質コルチコイド遮断剤を使用すること（例えば、米国特許出願公開番号2002/0065259、2003/0162695および2005/0124533を参照のこと）；カリウムチャネルを活性化すること（例えば、米国特許出願公開番号2005/0089473を参照のこと）、ABC薬物トランスポーターを阻害すること（例えば、米国特許出願公開番号2003/0073713を参照のこと）；抗体をトランスフェリンでコーティングし、そして1つ以上のトランスフェリンレセプターの活性を調節すること（例えば、米国特許出願公開番号2003/0129186を参照のこと）および抗体をカチオン化すること（例えば、米国特許第5,004,697号を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定さ

れない。

【0302】

上で述べたような本発明の抗体の投与と他の治療レジメンとを併用することができる。例えば、抗体が癌を処置するものである場合、そのような抗体で処置される患者は、放射線治療も受け得る。あるいは、またはさらに、化学療法剤が、上記患者に投与され得る。そのような化学療法剤についての調製および投薬のスケジュールは、製造者の指示に従って、または当業者によって経験的に決定されたとおりに、使用され得る。そのような化学療法剤の調製および投薬のスケジュールは、Chemotherapy Service, Ed., M. C. Perry (Williams & Wilkins: Baltimore, MD, 1992) にも記載されている。化学療法剤は、抗体の投与の前または後に投与され得るか、または抗体と同時に投与され得る。抗体は、抗エストロゲン化合物（例えば、タモキシフェンまたはEVIStaTM）または抗プロゲステロン（例えば、オナプリストン（onapristone）（EP616812を参照のこと））と、そのような分子に対する公知の投与量で併用され得る。

【0303】

抗体が、癌を処置するために使用される場合、それらは、必要に応じて、1つ以上の腫瘍関連抗原に対する抗体（例えば、ErbB2、EGFR、ErbB3、ErbB4またはVEGFレセプターの1つ以上に結合する抗体）とともに投与され得る。これらは、上で示した薬剤も含む。また、抗体は、放射性物質の照射を含むのか投与を含むのか否かに関係なく、放射線学的処置と連続的にまたは併用して適当に投与される。あるいは、またはさらに、同じ抗原または本明細書中に開示される2つ以上の異なる抗原に結合する2つ以上の抗体を患者に同時に投与することができる。1つの実施形態において、本明細書中の抗体は、増殖阻害剤と同時に投与される。例えば、増殖阻害剤を初めに投与して、その後、本発明の抗体を投与することができる。しかしながら、同時投与または本発明の抗体の初めの投与も企図される。増殖阻害剤に対する適当な投与量は、現在使用されている量であり、増殖阻害剤と本明細書中の抗体との結合作用（相乗作用）に起因して、減少させることができる。

【0304】

1つの実施形態において、腫瘍の血管新生は、併用療法で攻撃される。抗ZPAポリペプチド抗体および別の抗体（例えば、抗VEGF）は、例えば、腫瘍のネクロシスまたは転移巣（もしあれば）を観察することによって決定されるような治療的に有効な用量で、腫瘍を有する患者に投与される。この治療は、さらなる有益な効果が観察されなくなるまでまたは臨床検査によって腫瘍の痕跡もしくは任意の転移巣が示されなくなるまで、継続される。次いで、TNFが、単独で投与されるか、あるいは補助剤（例えば、アルファ-ベクターもしくはガンマーインターフェロン、抗HER2抗体、ヘレグリン、抗ヘレグリン抗体、D因子、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-2（IL-2）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）または腫瘍における微小血管凝固を促進する薬剤（例えば、抗プロテインC抗体、抗プロテインS抗体またはC4b結合タンパク質（1991年2月21日に公開されたWO91/01753を参照のこと））または熱もしくは放射線照射と併用して、投与される。

【0305】

補助剤の有効性が多様なので、従来の様式でのマトリックススクリーニングによって腫瘍に対する影響を比較することが望ましい。抗ZPAポリペプチド抗体およびTNFの投与は、所望の臨床上的効果が達成されるまで繰り返される。あるいは、抗ZPAポリペプチド抗体は、TNFおよび必要に応じて補助剤とともに投与される。固形腫瘍が、肢または全身循環から隔離しやすい他の位置に見られる場合、本明細書中に記載される治療薬は、隔離された腫瘍または器官に投与される。他の実施形態において、FGFアンタゴニストまたはPDGFアンタゴニスト（例えば、抗FGF中和抗体または抗PDGF中和抗体）が、抗ZPAポリペプチド抗体と組み合わせて患者に投与される。

【0306】

アポトーシス関連障害の予防または処置に対して、本明細書中の抗体の適切な投与量は、上で定義したような処置される障害のタイプ、その疾患の重症度および経過（その抗体が予防目的か治療目的かに関わらず）、以前の治療、患者の病歴および抗体に対する応答ならびに主治医の判断に依存する。抗体は、一度にまたは一連の処置にわたって、適当に患者に投与される。

【0307】

例えば、障害のタイプおよび重症度に応じて、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 50 \text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1 \sim 20 \text{mg}/\text{kg}$ ）の抗体が、例えば、1回以上の別個の投与または持続注入によって患者に投与される最初の候補投与量である。代表的な1日または1週間の投与量は、上で述べた因子に応じて、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \text{mg}/\text{kg}$ またはそれ以上の範囲であり得る。数日またはそれ以上にわたる反復投与については、状態に応じて、障害症状の所望の抑制が起きるまで、処置が繰り返されるか、または持続される。しかしながら、他の投与レジメンも有用であり得る。この治療の経過は、例えば、X線撮影の腫瘍イメージングをはじめとした従来の手法およびアッセイによって容易にモニターされる。

10

【0308】

抗体を備えた製品

抗体およびラベルを含む容器を備えた製品もまた提供される。活性な薬剤が抗ZPA抗体であるそのような製品は、上に記載した。

【0309】

抗体を使用したアポトーシス関連障害の診断および予後診断

20

1つ以上のZPAポリペプチドに対して産生された抗体は、アポトーシス関連障害を診断するためおよび／またはその予後を決定するために使用され得る。例えば、1つ以上のZPAポリペプチドに対して産生された抗体は、腫瘍の診断薬または予後診断薬（prognostics）として使用され得る。

【0310】

例えば、抗原に結合する抗体フラグメントを含む抗体が、インタクトな細胞または細胞可溶化物のいずれかにおけるZPAポリペプチドをコードする遺伝子を含む遺伝子の発現を定性的または定量的に検出するために、使用され得る。ある特定の実施形態において、抗体は、検出可能な標識、例えば、蛍光標識を備えており、結合は、顕微鏡観察、フローサイトメトリー、蛍光測定または当該分野で公知の他の手法によってモニターされ得る。そのような結合アッセイは、本質的に上で記載したように行われる。

30

【0311】

本明細書中に引用されるすべての刊行物（特許および特許出願を含む）は、それらの全体が参考として本明細書中に援用される。

【0312】

実施例において言及される市販の試薬は、別段記載がない限り、製造者の指示書に従って使用した。以下の実施例および本明細書全体においてATCCアクセッション番号で特定される細胞の供給源は、American Type Culture Collection, Manassas, VAである。別段述べられない限り、本発明は、本明細書の上に記載したようなおよび以下のテキスト：Sambrookら、前出；Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y., 1989)；Innisら、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc.: N. Y., 1990)；Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988)；Gait, Oligonucleotide Synthesis (IRL Press: Oxford, 1984)；Freshney, Animal Cell Culture, 1987；Colliganら、Current Protocols in I

40

50

immunology, 1991に記載されているような組換えDNA技術の標準的な手順を使用する。

【0313】

本明細書および特許請求の範囲を通じて、単語「含む (comprise)」または「含む (comprises)」もしくは「含む (comprising)」のような変形は、述べられる整数または整数の群を含むことを示すが、他の任意の整数または整数の群を排除しないことを示すと理解される。

【0314】

前述の記載は、当業者が本発明の実施を可能にするのに十分であると考えられる。以下の実施例は、単に例示する目的で提供され、決して本発明の範囲を限定すると意図されない。実際、本明細書中に示され、そして記載されるものに加えて、本発明の様々な変更が、前述の記載から当業者に対して明らかになり、また、その変更は、添付の特許請求の範囲の範囲内に入る。

【実施例】

【0315】

(実施例1：推定的なゼブラフィッシュBcl-2ファミリーメンバーの同定)

ヒトBcl-2ファミリーのある特定のメンバーのホモログが、これまでに、従来の配列検索方法を使用してゼブラフィッシュにおいて同定されている (Inohara and Nunez, Cell Death Diff. 7:509-510 (2000); Coultasら, Cell Death Diff. 9:1163-1166 (2002); Aouacheriaら, Mol. Biol. Evol. 22(12):2395-2416 (2005))。いくつかのグループによるかなりの数の試みにも関わらず、哺乳動物の内因性アポトーシス経路において重要な多くのタンパク質に対する等価物は、ゼブラフィッシュにおいて見出されなかった (同文献)。本出願人は、最も通常の配列データベース内に現われず、また、従来の配列に基づく検索によっては容易に発見できない新規のBcl-2遺伝子および多岐にわたるBcl-2遺伝子がゼブラフィッシュにおいて存在するのではないかと推測した。ゆえに、カスタマイズされた隠れマルコフモデルをUnisonデータベース (<http://unison-db.org>) と組み合わせ用い、カスタマイズされた配列データベースおよび特徴に基づくデータベースのマイニングにおいて、従来のBLAST検索とPROSITE検索の両方を使用した、これらの配列に対する包括的検索を行った。

【0316】

a. BLAST/PROSITEデータベースのマイニング

他のグループによる以前のBLAST検索およびPROSITE検索は、Bak、Bik、BimおよびPUMAを含むいくつかのBcl-2ファミリーメンバーに対するゼブラフィッシュホモログを同定できなかった (Inohara and Nunez, Cell Death Diff. 7:509-510 (2000); Coultasら, Cell Death Diff. 9:1163-1166 (2002); Aouacheriaら, Mol. Biol. Evol. 22(12):2395-2416 (2005))。それらの以前の研究に使用されたデータベースが、十分に広範でなかったか否かを調べるために、136,655個のゼブラフィッシュアミノ酸配列を含むカスタムデータベースを構築した。このカスタムデータベースを、デフォルトのアーギュメントならびにクエリーとしてBcl-2ファミリーの公知のヒト、マウスおよびニワトリメンバーを使用し、標準的なBLAST (バージョン2.2.10) およびPROSITE (リリース18) の検索手法によってクエリーした。

【0317】

この検索により、多くの配列が同定され、そのうちの2つは、ゼブラフィッシュにおけるBcl-2関連配列に対する同様の検索において以前に同定されなかったものであった。第1の配列 (Ensembl: ENSDARP00000040899 (配列番号1)) は、その配列の51%にわたってヒトBaxと33%同一であり、e値は1e-14で

あった。ENSDARP00000040899は、いずれのPROSITE BHパターンともアラインメントされず、Ensemblデータベース(www.ensembl.org)において利用可能; Birneyら、Nucleic Acids Res. 34:D556-561(2006))は、上記遺伝子が仮説上のものであると注釈を付けている。第2の配列(XP_693331(配列番号3))は、その配列の68%にわたってヒトBadと33%同一であり、e値は、1.3であった。

【0318】

PROSITEパターンを用いた検索では、既知のゼブラフィッシュBcl-2ファミリーメンバーのいずれも同定されず、また、PROSITEパターンのみを使用して新規ゼブラフィッシュ配列は同定されなかった。

【0319】

b. 特徴に基づくデータベースのマイニング

ゼブラフィッシュ配列(実施例1(a)に記載したもの)に対してカスタマイズされた配列データベースを使用しても、たった1つの新規の推定的なBcl-2ファミリーメンバーが同定されただけであった。標準的なBLASTおよびPROSITEデータベース検索が、さらなるゼブラフィッシュBcl-2メンバーを明らかに同定できなかったので、ファミリーメンバーが、ゼブラフィッシュとヒトとで有意に異なる塩基配列全体を有し得るが、なおも機能を共有し得るという可能性が考えられた。この可能性に立ち向かうために、特徴に基づく配列マイニングを使用した。特徴に基づくマイニングは、一連の特定の特徴と一致する配列を同定する。

【0320】

(1) 特徴に基づく配列マイニングの情報源

特徴に基づくマイニングをUnisonデータベースにおいて行った。簡潔には、Unisonは、多くのソースデータベースからの配列の非冗長の概論およびリレーショナルデータベース内の予め計算された広範なプロテオミクスの予測を含む(<http://unison-database.org>)。Unisonの概要、非機密のデータおよび予測、ツールならびにインターネットインターフェースは、Academic Free Licenseのもとでリリースされており、<http://unison-database.org/>において使用またはダウンロードが可能である。本研究時に、Unisonは、RefSeqデータベース(Wheelerら、Nucleic Acids Res. 34:D173-180(2006))、UniProt/Swiss-ProtおよびUniProt/TrEMBLデータベース(Wu, Nucleic Acids Res. 34:D187-191(2006))ならびにEnsembl Release 35(Birneyら、Nucleic Acids Res. 34:D556-561(2006))からの136,655個の異なるゼブラフィッシュ配列を含む650万個の異なる配列を含んでいた。

【0321】

(2) Bcl-2ドメインおよびBHドメインに対するカスタム隠れマルコフモデルの構築

複数の配列アラインメントをPROSITEパターンおよびマトリックスから構築した(Sigristら、Brief Bioinform. 3:265-274(2002))。パターンPS01080(BH1)、PS01258(BH2)、PS01259(BH3)およびPS01260(BH4)ならびにマトリックスPS50063(BH4)については、偽陰性配列を、PROSITEウェブサイト(<http://us.expasy.org/cgi-bin/nicedoc.po?pdoc00829>)から得られる真の陽性配列のアラインメントに手動で組み込んだ。PS50062(Bcl-2)マトリックスについては、3つの偽陰性の手動のアラインメントは、明らかでなく、真の陽性のみを使用した。それらのアラインメントを使用し、デフォルトのアーギュメントを組み込んだHMMER v. 2.3.2(Eddy, Bioinformatics 14:755-763(1998))からのhmmbuildおよびhmmcalibrateプログラムを使用して、「グローバル」隠れマルコフモデル(HMM)を構築し

10

20

30

40

50

た。再現率 (recall) および精度を評価するために、ならびに、適切なスコア閾値を決定するために、6つの構築されたHMMをUniProt/Swiss-Prot配列データベースに対してアラインメントした(図1)。この結果から、構築されたHMMが、適当なスコア閾値において精度を損なうことなく改善された再現率を有することが示された。上記の結果から、HMMアラインメントスコアカットオフは、以下のとおり選択された: BH1: 21; BH2: 13; BH3: 12; BH4: 22; BH4マトリックス: 20; およびBcl2マトリックス: 20。

【0322】

Unisonのクラスターに基づく最新版のフレームワークを使用して、136, 655個すべてのゼブラフィッシュ配列に対する結果のhmm検索を実行した。すべてのゼブラフィッシュ配列に対してHMMアラインメントを計算し、Unisonの自動化更新設備を使用してUnisonの社内コピーにロードした。デフォルトのオプションを用いたTMHMM v. 2.0c (Kroghら、J. Mol. Biol. 305: 567-580 (2001))を使用して、膜貫通ドメイン解析も行った。いったん結果がロードされると、特徴に基づくマイニングには、予め計算されたプロテオミクス予測の適切な共起が表わされるようにSQLクエリーを作成することが必要であった。クエリーを作成することにより、上で定義したスコア基準を使用して、HMMのいずれかに対してアラインメントされるすべてのゼブラフィッシュ配列が同定される。そのクエリーによって、既知のBcl-2ファミリーメンバーとゲノムの重複する各配列が同定された。ゼブラフィッシュBcl-2ファミリーメンバーとこれまで同定されていなかった4つの最も有望な候補遺伝子をさらに解析した。

【0323】

(実施例2: 同定された配列の解析)

推定的なBcl-2関連(「B2R」)ゼブラフィッシュ遺伝子(実施例1(a)に記載したBLAST検索から同定されたENSDARP00000040899およびXP_693331ならびに実施例1(b)に記載した特徴に基づくマイニングから同定されたENSDARP00000066976、FGENSESH00000065416、FGENSESH00000065416およびFGENSESH00000082230)の各々をさらに解析することにより、Bcl-2ファミリーの特定のメンバーとして固有のアイデンティティを割り当てた。各配列をBLAST検索に供し、そして、同定された最も相同な配列とアラインメントすることにより、e値、スコア、同一性パーセントおよびカバーパーセントがもたらされた(表2を参照のこと)。コードされるタンパク質における推定的な膜貫通ドメインの存在の有無を判定した。ゼブラフィッシュゲノム内の隣接遺伝子も調べて、任意の保存されたシンテニーを評価した(表2を参照のこと)。

【0324】

a. zBak (ENSDARP00000040899)

BLAST検索(実施例1(a)に記載した)により、配列ENSDARP00000040899がその配列の51%にわたってヒトBaxと33%同一であり、e値が $1e-14$ であると同定された(表2を参照のこと)。ENSDARP00000040899のアミノ酸配列およびそれをコードするヌクレオチド配列を以下に示す。

【0325】

ENSDARP00000040899:
MACEASQDDQIGEALLIGVVRQELMEVMEVTEGNAAPPAL
PEAKPISNSQDQILVQQQLANTIKVIGDKLDQDQAFNDMID
GLVKVADKSSFVKLVFKVFTDQGQINWGRIVLVFYSVGKLS
AKMVVARLPRIVSDILSLSLDYFKRNLLQWIRTVGGWMNS
IPALACFSVDQFSGSSMRKYSPLYVGVVFVFAFTGGLLLGGFI
VSRFQKT (配列番号1)。

【0326】

ENSDARG00000030881:

ATGGCTTGTGAAGCCTCACAGGATGATCAGATTGGAGAGG
CACTCTTAATAAGGGGTAGTAAGGCAGGAGCTAATGGAGGT
GATGGAGGTGACTGAAGGAAATGCAAGCTCCTCCAGCTCTT
CCTGAAGCTAAACCAATAAGCAACAGCCAGGACCAGATTTC
TGGTTTCAGCAGCTGGCGAACAACAATCAAAGTGATCGGGTGA
CAAACCTCGACCAAGGATCAAGCATTTAAACGACATGATCGAT
GGCTTAGTAAGAAGGTAGCTGATAAAGCAGTTTCTGGAAAC
TTGTGGAAAGAAGGTGTTTCACAGATGGGCCAGATCAACTGGGG
CAGAAATTATCGTGTCTGTTTTATTCTGTGTGGAAAACTGTCA
GCCAAGATGGTCTGTCGCTCGCCTACCCAGAAATTGTTTTCA
ATATTTTTATCATTTAAGTCTTTGATTACTTCAAAGGAATCT
GTTGCAGTGGATTTCGCACAGTAGGAGGATGGATGAACAGT
ATCCCTTGCACCTGGCCCTGTTTTCTCTGTGTGACCAATTTTCTG
GTTCTTTCAAATGAGAAATAATTCTCCTTACGTTTGGAGTTGT
GTTTTCCTTCACTGCTGGTGGCCTACTGCTGGGTGGCTTTCATC
GTCTCGAGATTTTCAGAAACCTGA (SEQ ID NO: 2)。

【0327】

Ensemblは、ENSDARP00000040899が仮説上のものであると注釈を付け、アイデンティティを割り当てなかった。いずれのPROSITE BHパターンも、上記配列とアラインメントされなかった。実施例1(b)において構築されたHMMのうち、Bcl-2、BH1、BH2およびBH3 HMMの各々は、上記配列とアラインメントされ、スコアは、それぞれ33、14、6.1および2.4であり、e値は、それぞれ 7.5×10^{-7} 、 0.031 、 1.10 および 1.300 であった。いくつかの既知のまたは提案されたBcl-2ファミリーメンバーのBH3ドメインと上記配列をアラインメントし、そしてJalview 2.05 (Clampら、Bioinformatics 12:426-427 (2004))を使用してそのアラインメントを調べた(図2)。ENSDARP00000040899に対するBH3 HMMアラインメントのスコアが不良であるにもかかわらず、その配列は、他のBcl-2ファミリーメンバーのBH3ドメインと定性的に良好な類似性を示し、また、すべての位置において保存されていない妥当と思われるアミノ酸置換を示した(図2を参照のこと)。TMHMM解析もまた、上記配列が、アミノ酸約180~202から膜貫通ドメインを含むと予測した。

【0328】

ENSDARP00000040899および本明細書中に記載される他のすべての配列について、公的に利用可能なENSEMBLデータベース(www.ensembl.orgにおいて利用可能; Birneyら、Nucleic Acids Res. 34:D556-561 (2006))を使用して、そのゼブラフィッシュ遺伝子に対する隣接遺伝子と、ヒト機能的ホモログに対する隣接遺伝子とを比較することによって、保存されたシンテニー関係の存在を調べた。このゼブラフィッシュ遺伝子は、ゼブラフィッシュ遺伝子の片側または両側における2つ以上の隣接遺伝子が、ヒト遺伝子でも隣接するヒト等価物を有する場合に、ヒト遺伝子と保存されたシンテニー関係を共有すると明示された。ENSDARP00000040899は、ヒトBakとは保存されたシンテニー関係になかったが、ヒトBaxに対してはシンテニー関係にあった。

【0329】

ENSDARP00000040899は、BLASTを使用した、ヒトBcl-2配列に対するゼブラフィッシュBcl-2ファミリーメンバー候補のアラインメントに含まれており、逆もまた同じであったことから、相互の最も好ましいBLASTアラインメント、ペアワイズアイデンティティ(pairwise identity)およびアラインメントカバー度が同定された(表2)。ヒトBaxに対する候補配列のアラインメントは、最も好ましいe値をもたらしたが、最も好ましい全体的な配列カバー度は、ヒトBakに対するアラインメントによって得られた。BH2およびBH3 HMMアラインメン

トは、有意にスコア付けしなかったが、B c l-2およびB H 1に対して有意なスコアでそれらのドメインが存在すること、予測されるB H 4ドメインが存在しないこと、B H 3ドメインと他のB c l-2メンバーのB H 3ドメインとの類似性、T Mドメインの予測および相互のB L A S T解析を、組み合わせることにより、E N S D A R 0 0 0 0 0 0 4 0 8 9 9が、B a kと最も機能的に相同であり得る、B c l-2ファミリーのアポトーシス促進性メンバーであることが示唆された。

【0330】

b. z B a d 2 (X P__693331)

実施例1(a)に記載したように、X P__693331も、カスタマイズされたゼブラフィッシュ配列データベースにおけるB L A S T検索によって同定された。X P__693331のアミノ酸配列およびそれをコードするm R N A配列を以下に示す。

【0331】

X P__693331:

M E N T S H D H Q D D S S T L D E K E R S H L K G T I K N H G Q H Q D R T S A N
I S P Q G R V R L Y S E S Q V Y T V S R W Q D T E T Q D G A S V E E N G D G L P
F R G R S Q S A P A A L W K A K K Y G R Q L R R M S D E F D T W L D K G E V K R
A N S Q K Q T Y R G W F S F L W S P K E E E G R E (配列番号3)。

【0332】

X M__688239 (ヌクレオチド367-804):

A T G G A G A A C A C C T C G C A T G A C C A T C A A G A T G A T T C C A G C A
C C T T G G A T G A A A A G A G A G A T C A C A T C T G A A A G G G A C A A T
C A A G A A C C A T G G A C A A C A T C A G G A T C G A A C A T C G G C C A A C
A T T T C T C C T C A A G G G C G T G T G C G G C T C T A T T C G G A A T C T C
A A G T G T A T A C A G T C A G C C G C T G G C A G G A C A C A G A G A C C C A
G G A T G G A G C A T C G G T G G A G G A G A A C G G A G A T G G A C T T C C A
T T C A G G G G T C G T T C T C A A T C A G C A C C T G C T G C A C T G T G G A
A A G C A A A A A A G T A T G G C C G T C A G T T G A G G A G A A T G A G C G A
T G A A T T C G A C A C A T G G C T C G A T A A A G G G G A G G T C A A G A G A
G C G A A C A G C C A G A A A C A G A C C T A C C G A G G A T G G T T T T C G T
T C C T C T G G A G T C C C A A A G A A G A A G A G G G C A G A G A A T G A

(配列番号4)。

【0333】

X P__693331に対するG e n B a n kアノテーションは、この配列が、B H 3のみアポトーシス促進性タンパク質であるB a dと類似であると予測した。ヒトB a dとX P__693331とのアラインメントから、これら2つのタンパク質が、その配列の72%にわたって33%の同一性を有すると示された。B H 3ドメインに対するH M M e rスコアは、12.6であり、e値は、1.3であった。X P__693331のT M H M M解析から、ヒトB a dと類似のその配列において膜貫通ドメインは予測されないことが示された。X P__693331のクローンを入手し(O p e n B i o s y s t e m s)、ゼブラフィッシュゲノム内の周辺の配列を同定した。

【0334】

X P__693331に隣接する遺伝子は、ヒトB a dに隣接する遺伝子と異なっていたので、X P__693331は、ヒトB a dとは保存されたシンテニー関係になかった。しかしながら、別のゼブラフィッシュ遺伝子(A I 332008)が、ヒトB a dと有意な相同性を有すると以前に同定されており、それは、ヒトb a dとシンテニーであった(I n o h a r a a n d N u n e z, C e l l D e a t h D i f f. 7:509-510(2000); C o u l t a s ら, C e l l D e a t h D i f f. 9:1163-1166(2002))。X P__693331は、その以前に同定された配列と約32%同一であった。従って、上記データは、X P__693331が、ヒトB a dに関連するB c l-2ファミリーメンバーであることを示唆した。ヒトB a dとの配列類似性および

保存されたシンテニーを有するゼブラフィッシュ遺伝子が、以前に知られているので、X P_693331を、ヒトBadに対する同一性を有する第2のゼブラフィッシュ遺伝子として、「zBad2」と命名した。

【0335】

c. zBik (ENSDARP00000066976)

ゼブラフィッシュ配列ENSDARP00000066976は、実施例1(b)に記載したような特徴に基づくデータベースのマイニングによって、B2Rタンパク質と同定された。ENSDARP00000066976のアミノ酸配列およびそれをコードするヌクレオチド配列を以下に示す。

【0336】

ENSDARP00000066976:

MVEETRQQKNATTLQAGPAEVDHSNLYAFNMRVTQTIGRQLAQIGDEMDNKRQEPVPWQNLNFGIYPYVLSRRVFSGRILANLWGSKIMPIFRTSWLLPQLQNGCQEARKWAAWVSNLHVSDWSRSTTYTLASALLLVTVSIFLVNWN EYEG (配列番号5)。

【0337】

ENSDARG00000045549:

ATGGTGGAAGAAACTAGACAGCAGAAAAACGCCACCAACCC
TGCAAGGCTGGACCTGCTGAGGTGACCAACAGTAATCTCTA
TGCAATTCAATATGAGAGTCAACCCAGACTATCGGACGACAG
CTGGCTCAAAATAGGGGACGAAAAATGGACAATAAATGGCGCC
AAGAACC CGCCTGTCCCATGGCAGAACCTGAATTTCTGGGAT
TTATCTCTTATGTCTCTAAGTAGGAGAGTGTCTCTCTGGAAGA
ATCCTCTGCTAATCTTTGGGGGTCTAAGATTATGCCGATAT
TCAGGACGCTCCTGGTTGCTTCCACAGCTTCAAAATGGCTG
TCAGGAGGCTAGAAAGTGGGCAGCTTGGGTGTCCAACTTG
CATGTTTCTGACTGGTCTCGCAGCACTACATACACCCCTGG
CATCTGCTTTACTACTGGTCACTGTGTCTATCTTCTCTTGT
AAACTTGGAAATGAGTATGAAGGCTGA (配列番号6)。

【0338】

カスタマイズされたゼブラフィッシュ配列データベース(実施例1(a)に記載したようなもの)におけるBLAST検索からは、ENSDARP00000066976は同定されなかった。この配列のTMHMM解析から、アミノ酸約130~149に膜貫通ドメインが存在すると予測された。ENSDARP00000066976は、BH1、BH2およびBH4 HMMと一致しなかった。この配列は、スコア18およびe値0.023でBH3 HMMと一致した。BH3関連領域および膜貫通ドメインが存在することならびにBH1、BH2およびBH4関連領域が存在しないことから、ENSDARP00000066976が、Bcl-2タンパク質のアポトーシス促進性BH3のみサブファミリーのメンバーであり得ることが示唆された。

【0339】

ゼブラフィッシュゲノムにおけるENSDARP00000066976配列は、ヒトBikと保存されたシンテニー関係を共有した。ENSDARP00000066976の推定的なBH3領域を、これまでに知られているヒトゼブラフィッシュBcl-2遺伝子と比較した(図2を参照のこと)。ENSDARP00000066976のBH3ドメインは、ヒトBikとシンテニーおよびBLAST類似性を有しているにもかかわらず、ヒトBidのBH3ドメインと最も類似していた(図3B)。しかしながら、その2つの配列の比較に基づいて、ENSDARP00000066976は、推定的なカスパーゼ切断部位を欠いていたが、ヒトBidは、そのような部位を含んでいる。BH3ドメインが存在すること、他のBHドメインが存在しないこと、膜貫通ドメイン予測、全体的な

配列類似性およびシンテニー関係解析のすべてから、ENSDARP00000066976が、ヒトBikとオーソログなゼブラフィッシュアポトーシス促進性BH3のみBcl-2サブファミリーメンバーであることが示唆された。

【0340】

d. zBim (FGENESH00000065416)

ゼブラフィッシュ配列FGENESH00000065416は、実施例1(b)に記載されたような特徴に基づくデータベースのマイニングによって、B2Rタンパク質と同定された。カスタマイズされたゼブラフィッシュ配列データベース(実施例1(a)に記載したようなもの)におけるBLAST検索からは、FGENESH00000065416は同定されなかった。FGENESH00000065416は、BH1、BH2およびBH4 HMMと一致しなかった。この配列は、スコア18およびe値0.023でBH3 HMMと一致した。BH3関連領域および膜貫通ドメインが存在することならびにBH1、BH2およびBH4関連領域が存在しないことから、FGENESH00000065416が、Bcl-2タンパク質のアポトーシス促進性BH3のみサブファミリーのメンバーであり得ることが示唆された。

10

【0341】

FGENESH00000065416配列とのBLASTアラインメントから、その配列のN末端の半分が、ヒトBimの47%にわたってヒトBimと、e値 9×10^{-7} で32%同一であることが示されたことから、Bcl-2タンパク質のアポトーシス促進性BH3のみサブファミリーのメンバーとしてのFGENESH00000065416の割り当てがさらに支持された。しかしながら、FGENESH00000065416のC末端の半分は、神経発生に関連していると推定されるマウスおよびラットのRNA結合タンパク質である、発生的に調節されているRNA結合タンパク質1と最も類似していた(32%同一)。

20

【0342】

Bim相同物と、近接する同じ領域における無関係のタンパク質/機能に対する相同物の並置は、ゼブラフィッシュゲノム内のアセンブリエラー(assembly error)に起因し得る。実際、RNA産物は、配列全体またはBim様フラグメント単独から増幅され得なかった。明らかなアセンブリエラーにもかかわらず、BH3ドメインが存在すること、他のBHドメインが存在しないことおよび配列類似性から、FGENESH00000065416の少なくともN末端部分が、ヒトBimと相同であることが示唆された。

30

【0343】

e. zPuma (FGENESH00000078270)

ゼブラフィッシュ配列FGENESH00000078270は、実施例1(b)に記載したような特徴に基づくデータベースのマイニングによって、B2Rタンパク質と同定された。FGENESH00000078270のアミノ酸配列およびそれをコードするヌクレオチド配列(アクセッション番号CN323956)を以下に示す。

【0344】

FGENESH00000078270:

40

MTLCFLNTSAA LADEEGDPLPTALINSLDLAVNQPVSGSG
FCKLKLANEQT VVTLQQ LATREPMGDEEEVQGFQSTDPHG
TTVCGMARP EMESRVDEHNSGTPNSCRM EVLRQDAWPNGS
IIQPCHRRRTIATQTSTLSAPLPHIPSHDAFSLDSVQQQD
SLLRDN SGTEQEVS RPLPLPDLLADNQSSSEESTSSSSST
AEEDPTLEEQAVERVAVQLRTIGDEMNAVFLQRNAVPHWQ
NWRGLYRGLMALVSDTINALYQHGLR (配列番号7)。

【0345】

FGENESH00000078270:

50

ATGACTTTGTGCTTTTAAACACAAGCGCAGCGCTCGCTG

ATGAAGAGGGCGATCCTCTGCCCCACTGCTCTGATAAACAG
TCTTGACCTAGCAGTGAAATCAGCCGGTGTCAGGTTCTTGGC
TTTTTGTA AAC TCAAACTGGCCAAATGAGCAAAC TGT TGTGA
CTCTCCAACAATTAGCAAACAAGAGAAACCCATGGGGGATGA
AGAGGAGGTGCAGGGCTTTTCAGAGCACAGACCCACACGGG
ACAAC TGTATGTGGAAATGGCCCGACCAAGAGATGGAAAGCA
GAGTGGACGAACATAACTCTGGCACGCGCGAACAGCTGCAG
GATGGAGGTGCTGCGTCAAGGACGCGCTGGCCAAATGGCAGC
ATCATCCAGGCCCTGCCATCGACGCGCGAACCAATTGCCACTC
AAACCAGCAC TCTCTCTCTGCAACCACTGCCCCACATCCCCCTC
ACATGATGCCTTTCAGCTTTGGACAGCGTCCAGCAGCAGGAC
AGTCTACTCAGGGACAATTCAGGAACAGAAACAGGAAGTGT
CCAGGCCCTCTTCTCTCTGCCCAGATCTGCTAGCAGACAACCA
GAGCTCCTCAGAGGAGTCCACGTCACAGCAGCAGCTCGACC
GCTGAGGAGGACCCCACTGAGGAGCAGGCTGTGGAGA
GGGTGGCCGTACAAC TGAAGGACAATTTGGGGACGAGATGAA
CGCTGTCTTCTCTTCAAGAGGAATGCCGTCCCGCACTGGCAG
AACTGGAGAGGCCCTGTACCGCGGGCTCATGGCGCTGGTCT
CGGACACCATCAATGCCCTCTACCAAGCACGGCCCTCAGATG
A (配列番号8)。

10

20

【0346】

カスタマイズされたゼブラフィッシュ配列データベース（実施例1(a)に記載したようなもの）におけるBLAST検索からは、FGENESH00000078270は同定されなかった。TMHMM解析は、この配列に対して膜貫通ドメインを予測しなかった。FGENESH00000078270は、BH1、BH2およびBH4 HMMと一致しなかった。この配列は、スコア13およびe値0.77でBH3 HMMと一致した。FGENESH00000078270は、e値2.1e1で25%の同一性を示すBLASTアラインメントに基づいてヒトPumaと類似であった。ゼブラフィッシュゲノムにおけるFGENESH00000078270周辺の遺伝子の同定から、FGENESH00000078270が、ヒトPumaと保存されたシンテニー関係を共有することが示唆された。

30

【0347】

BH3関連領域が存在すること、ならびに、BH1、BH2およびBH4関連領域ならびに膜貫通ドメインが存在しないことを、配列類似性および保存されたシンテニーと併せることにより、FGENESH00000078270が、Bcl-2タンパク質のアポトーシス促進性BH3のみサブファミリーのメンバーであることおよびより詳細にはヒトPumaとオーソログであることが強く示唆された。

【0348】

f. zBmf2 (FGENESH00000082230)

ゼブラフィッシュ配列FGENESH00000082230は、実施例1(b)に記載したような特徴に基づくデータベースのマイニングによって、B2Rタンパク質と同定された。FGENESH00000082230のアミノ酸配列およびそれをコードするヌクレオチド配列を以下に示す。

40

【0349】

FGENESH00000082230:

MDDEEDEQLPRCCETPLRNKRSEKRD AHGGDVGQTAHRHA
STQTAGSVLNSARDADMAPFQGSQREASSLCRVVGARTAF
RAPCGTGG LVSLTMGPGARGGPRA LFHGNAGFRAHFPA LF
EPALDGLQNAEQREQDEGRPEEKEEDRDAGISVEVQIGRK
LREMGDQFQQEHLQLIILDETRYRI (配列番号9)。

50

【0350】

FGENESH00000082230:

ATGGATGATGAGGAGGATGAACAGCTTCTCTCGCTGCTGTG
AAACGCCCGCTAAGAAACAAGCGCTCAGAGAAAGAGAGACGC
CCACGGTGAGACGTGGGACAAACAGCTCACAGACACGCA
TCCACACAGACTGCTGGCTCTGTCTCTCAATTTCAGCGAGAG
ACGCAGATATGGCACCATTCACAGGGCTCACAGAGAGAAAGC
ATCATCTCTTTTGCAGAGTTGTGGGTGCTAGGACTGCATTC
AGGGCTCCCTGTGGAACCTGGGGGGCCTTGTGTCTACTTACTA
TGGGGCCCCGGAGCCCGGGGTGGGGCCAAGAGCACCTTTTTC A
TGGAAACGCTGGATTTCGTGCACACTTCCCTGCGCTGTTTC
GAACCCCGCCCTGGATGGCTTACAAAAACGCCGAACAGAGAG
AGCAGGACGAAGGCAGACCAGAAAGAAAAAGAGAGGATCG
CGACGCGAGGGATTAGCGTGGAGGTTTCAGATTGGACGTAA A
TTACGTGA AATGGGGGATCAGTTTTCAGCAAAGAGCATCTTC
AGCTGATTATATTAGATGA AAC CAGATACAGGATTTAA

(配列番号10)。

【0351】

カスタマイズされたゼブラフィッシュ配列データベース(実施例1(a)に記載したようなもの)におけるBLAST検索からは、FGENESH00000082230は同定されなかった。TMHMM解析からは、この配列に対して膜貫通ドメインは予測されなかった。FGENESH00000082230は、BH1、BH2およびBH4 HMMと一致しなかった。この配列は、スコア18.6およびe値0.02でBH3 HMMと一致した。FGENESH00000082230は、BLASTアラインメントに基づいてヒトBmfと類似であった(その分子の42%にわたってe値2.1e1で41%の同一性)。このアラインメントからは、FGENESH00000082230が、ヒトBmfに類似の推定的なダイニン軽鎖結合ドメインを含むことも示された(Dayら、Biochem J. 377:597-605(2004))。ゼブラフィッシュゲノムにおけるFGENESH00000082230周辺の遺伝子の同定により、FGENESH00000082230が、同様にヒトBmfと保存されたシンテニー関係を共有することが示唆された。BH3関連領域が存在すること、ならびに、BH1、BH2およびBH4関連領域ならびに膜貫通ドメインが存在しないことを、配列類似性および保存されたシンテニーと併せることにより、FGENESH00000082230が、Bcl-2タンパク質のアポトーシス促進性BH3のみサブファミリーのメンバーであることおよびより詳細にはヒトBmfとオーソログであることが強く示唆された。

【0352】

ヒトBmfと相同な別のゼブラフィッシュ遺伝子が、ゼブラフィッシュにおいてすでに同定されていた(Coultrasら、Cell Death Diff. 9:1163-1166(2002);アクセッション番号BI891121)。その遺伝子は、FGENESH00000082230とは異なり、ヒトBmfと保存されたシンテニーを共有しなかった。FGENESH00000082230とBI891121との類似性は、その分子の27%にわたって43%であった。従って、FGENESH00000082230は、先に同定された遺伝子と区別するために、zBmf2と命名された。

【0353】

【表 2】

表 2: ゼブラフィッシュにおける推定的なBcl-2ファミリーメンバーの特徴

割り当て	タンパク質アクセッション番号	e-値	スコア	% 同一性	% カバレッジ	ヒト遺伝子	シンテニ-?
zBim	FGENESH00000065416	9e-7	55	32	47	Bim	Y
zBak	ENSDARP00000040899	4e-5	50	25	86	Bak	N
		1e-14	81	33	51	Bax	Y
zBax	ENSDARP00000023687	2e-6	54	29	68	Bak	N
		2e-47	189	51	98	Bax	N
zBik	ENSDARP00000066976	1.41e4	20	47	12	Bik	Y
zPuma	FGENESH00000078270	2.1e1	30	25	49	Puma	Y
zBmf2	FGENESH00000082230	0.011	42	41	42	Bmf	Y
zBad2	XP_693331	8e-12	64	33	72	Bad	N

10

g. ゼブラフィッシュ B 2 R 遺伝子に関する全般的な知見

概して、B c l - 2 ファミリー遺伝子の、これまで知られていたゼブラフィッシュホモログおよび本明細書中で同定されたゼブラフィッシュホモログは、それらのヒト対応物とよく似ており（表 3）、マルチドメイン B c l - 2 ファミリーメンバーは、最も高い類似性を有した（図 3 A）。ゼブラフィッシュ B H 3 のみタンパク質は、27%（z P u m a）～46%（z B a d および z B m f 2）の全体的な類似性の範囲で（表 3 を参照のこと）ヒト遺伝子と最も異なっていた（図 3 A）。しかしながら、B H 3 のみタンパク質は、脊椎動物 B c l - 2 サブファミリーのうちで最も異なることが知られている。一層高い程度の類似性が、66～79%の範囲で、B H 3 ドメイン自体の中で観察された（表 3；図 3 B）。

20

【0354】

【表 3】

表 3: ゼブラフィッシュB2Rタンパク質とヒトB2Rタンパク質の比較

ゼブラフィッシュ遺伝子	哺乳動物ホモログ	% 相同性	アクセッション番号	魚類染色体	ヒト染色体	シンテニ-?
生存促進性						
zBip1	Bcl-x _L	67%	AF317837	5	20q11.21	Yes
zBip2	Bcl-2	57%	NM_001030253.1	24	18q21.33	No
zMcl-1a	Mcl-1	43%	NM_131599	19	1q21.2	Yes
zMcl-1b	Mcl-1	38%	NM_194394.2	16	1q21.2	Yes
zNR13	Boo/ DIVA	30%	AF441285	18	15q21.2	Yes
アポトーシス促進性BH3のみ						
zBad1	Bad	46% (79%)	BC097099.1	7	11q13.1	Yes
zBad2	Bad	35% (66%)	XP_693331	21	11q13.1	Yes
zBid	Bid	30% (66%)	XM_698543.1	18	22q11.21	No
zBik	Bik	38% (66%)	ENSDARP0000006697	4	22q13.2	Yes
zBmf1	Bmf	46% (72%)	XM_695596.1	23	15q15.1	No
zBmf2	Bmf	38% (66%)	FGENESH00000082230	20	15q15.1	Yes
zNoxa	Noxa	27% (66%)	DV595521.1 (EST)	19	18q21.32	No
zPuma	Puma	86%	FGENESH00000078270	16	19q13.32	Yes
zBim	Bim	ND	FGENESH00000065416	13	2q13	ND
アポトーシス促進性マルチドメイン						
zBak	Bak	41%	ENSDARP00000040899	3	6p21.31	hBax へ
zBax	Bax	73%	ENSDARP00000023687	ND	19q13.33	No
zBok1	Bok	81%	NM_001003612.1	ND	2q37.3	ND
zBok2	Bok	74%	BC053218.1	2	2q37.3	Yes

NDは、決定されていないことを示す。括弧内のパーセンテージは、BH3ドメインのみ内の%相同性を示す。

【0355】

(実施例3: Bcl-2 候補遺伝子の実験検証)

実施例1および2における研究によって、上で同定されたタンパク質が、ある特定のBcl-2ファミリーメンバーと相同性を共有し、そして内因性アポトーシス経路の有望なメンバーであることが証明された。それらの割り当てを確かめるために、各タンパク質の機能をゼブラフィッシュにおいて評価した。

【0356】

a. ゼブラフィッシュB2R遺伝子の発現パターン

これまでに知られているゼブラフィッシュB2Rタンパク質および本明細書中で同定されたゼブラフィッシュB2Rタンパク質の正常な発現を評価するために、各タンパク質をコードするmRNAを、特定の発生段階において、また、特定の成体組織において、RT-PCRによって解析した(図3Cおよび3D)。成体のTubingen長鰭魚(long-fin fish)をZebrafish International Resource Centerから得た。Zebrafish Book (Westerfield, The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)).

4th ed., Univ. of Oregon Press: Eugene (2000)) に従って魚を維持した。RNAを、示された時点においてQiaShredder (Qiagen) を使用して30サイクルにわたって、コリオン除去された (dechorionated) 野生型ゼブラフィッシュ胚 (100ng) から単離した後、DNase I 消化を使用し、製造者の指示書に従ってRNAeasy Miniキット (Qiagen) を用いて精製した。成体組織を成体雌ゼブラフィッシュから単離し、そしてそれらの組織からRNA (50ng) を、胚組織からの抽出と同様の様式で抽出した。投入RNAの量のコントロールとしてGAPDHを含めた。得られた産物を0.8%エーゲル (Invitrogen) 上で分離し、写真撮影した。

【0357】

zBikおよびzBokを除外すると、実験したゼブラフィッシュB2R遺伝子のすべてが、母系的に発現していた (1000細胞ステージにおいて) (図3C)。接合体の転写の開始後 (受精の約5時間後)、zBad1、zBik、zBad、zBmf1、zNoxa、zBax、zMcl-1a、zMcl-1b、zBlp1およびzNR13は、一定レベルで適切に発現していた (図3C)。逆に、zBak、zBmf2およびzBlp2の転写は、発生後、再度増加する前に劇的に低下した (図3C)。zBok2は、母系的に強く発現していたが、胚発生後はほとんど存在しなかった (図3C)。

【0358】

実験された7つの成体ゼブラフィッシュ組織のうち、卵巣は、zBmf2を除く遺伝子の各々において著しい転写を示した (図3D)。対照的に、肝臓は、zBid、zMcl-1aおよびzMcl-1bのごく弱い発現を示した (図3D)。ゼブラフィッシュBH3のみ遺伝子のうちのいくつかは、数個の組織のみにおいて発現した (図3D)。

【0359】

b. インビボにおける推定的なゼブラフィッシュB2Rタンパク質のアポトーシス効果

これまでに知られているゼブラフィッシュB2R遺伝子および本明細書中で同定されたゼブラフィッシュB2R遺伝子の各々が、内因性アポトーシス経路を活性化する能力を評価した。ゼブラフィッシュcDNAを、標準的なプロトコルを使用して、発現ベクターpCS108 (Fletcherら、Gene Expr. Patterns 5 (2): 225-30 (2004); http://tropicalis.berkeley.edu/home/genomic_resources/Ests/vectors/cs108.pdf, 2001年8月13日付) に定方向にクローニングした。そのクローニングに使用したプライマーは、以下のとおりであった (すべて5'から3'):

zBak順方向: GGGGGTTGTTGTAAAGTACAGTTGG (配列番号65)

zBak逆方向: TCAGGTTTTCTGAAATCTCGAGACG (配列番号66)

zBik順方向: ACTGTACTGAGACACATCACAGCAACA (配列番号67)

zBik逆方向: TCAGCCTTTCATCTCATTTCCAG (配列番号68)

zPuma順方向: CTAACCTGAGTACTCATCTAATGAATTAAACA (配列番号69)

zPuma逆方向: TCATCTGAGGCCGTGCTGGTAGAG (配列番号70)

zBmf1順方向: ATGGATGAGGACGAGGATGAT (配列番号71)

zBmf1逆方向: TCACCTGCGGTTCTCTCTG (配列番号72)

zBmf2順方向: ATGGATGATGAGGAGGATGAAC (配列番号73)

zBmf2逆方向: TTAAATCCTGTATCTGGTTTTCATCTA (配列番号74)

zBad1順方向: CTTCCACAAACACTTCCACTGGATAC (配列番号75)

10

20

30

40

50

号 7 5)

z B a d 1 逆方向 : T T C A C T G T C A G T C A C T C T G C G G G G C (配列番号 7 6)

z B l p 1 順方向 : G C C G A A T T C C A C C A T G T C T T A C T A T A A C C G A G A A C T G (配列番号 7 7)

z B l p 1 逆方向 : G G C C T C G A G T C A C A G G C G T T T C T G T G C A A T G A G T C C (配列番号 7 8)

z B l p 2 順方向 : A T G G C T A A C G A A A T T A G C (配列番号 7 9)

z B l p 2 逆方向 : T C A C T T C T G A G C A A A A A G G C (配列番号 8 0)

z B o k 1 順方向 : A T G G A G A T G T T G C G C C G C T (配列番号 8 1)

z B o k 1 逆方向 : T C A T T T C T C T C T C A G C A G G T A G A A A A C (配列番号 8 2)

z B o k 2 順方向 : A T G A A C G T G T T C G C G C G C T (配列番号 8 3)

z B o k 2 逆方向 : G C G C A A G T C T A C T T C G T C A G G T A (配列番号 8 4)

z M c l - 1 a 順方向 : A A G G G G C T G C A G C T G G A C G (配列番号 8 5)

z M c l - 1 a 逆方向 : A G C G G G G C T C A G G T C A G T A C A G (配列番号 8 6)

z M c l - 1 b 順方向 : C A T C T T C G A T T G A T T T G A T T (配列番号 8 7)

z M c l - 1 b 逆方向 : A T A G T T T G A A A G T T C T G A A T C C (配列番号 8 8)

z N R 1 3 順方向 : A T G T C C T G T T G G T T G A G G G (配列番号 8 9)

z N R 1 3 逆方向 : T C A G C G T A C T A A G A G G A A G G T (配列番号 9 0)

z B a d 2 に対するクローンは、Open Biosystems から入手した。

【0360】

z B i d、z B a d 1、z B m f 1、z B m f 2、z P u m a、z B i k、z N o x a、z B a k および z B a x に対するキャッピングされた合成 (Capped synthetic) mRNA を、Ambion mMessage mMachineTM (Ambion) によって製造者の説明書に従って作製し、NucAway スピンカラム (Ambion) で精製した。得られたメッセンジャー RNA を、0.2% フェノールレッドを含む 1×Daniellu 溶液中に適切な濃度 (0.11 mg/mL ~ 3.5 × 10⁻⁵ mg/mL の範囲) に希釈した。1 細胞期 ~ 4 細胞期の胚に、Nanoliter 2000 (World Precision Instruments) 微量注入器を使用して、4.6 nL の希釈 mRNA 溶液を注射した。割球に流し込まれた薄桃色は、注入溶液の残留フェノールレッドであった。

【0361】

ほとんどの BH3 のみアポトーシス促進性タンパク質またはマルチドメインアポトーシス促進性 Bcl-2 タンパク質をコードする合成 mRNA の注射により、割球および卵黄細胞の崩壊を特徴とする用量依存的なアポトーシスがもたらされた (図 4A および 4B)。z B a d、z B o k 1 および z B o k 2 は、最大 500 pg の上記合成 mRNA を注射された初期胚において、著しいアポトーシスを誘導しなかった。

【0362】

アポトーシス経路に関与することによって胚を殺滅したゼブラフィッシュアポトーシス促進性 B2R 遺伝子の異所性の発現を確かめるために、胚に低用量の各合成 mRNA を注射し、そして生じたアポトーシスエフェクターカスパーゼ-3 の活性化の程度を免疫組織化学によってモニターした。

【0363】

ゼブラフィッシュ胚に、500 pg の GFP、500 pg の z B a d、100 pg の z B i d、20 pg の z B i k、0.8 pg の z B m f 1、4 pg の z B m f 2、20 pg の

の z N o x a、20 p g の z P u m a、20 p g の z B a k または 20 p g の z B a x を 1～4 細胞期において注射した。注射された胚を、受精の 10 時間後に、室温で約 4 時間、または 4℃で一晩、4%パラホルムアルデヒド P B S 溶液中に固定した。続いて、胚を最低 2 時間、メタノール中で脱水した。再水和後、胚を水で洗浄し、-20℃で 7 分間、アセトン中で浸透処理し、そして、再度水で洗浄した。胚をさらに数回、0.5% T w e e n を含む P B S (P B S T) で洗浄した。洗浄された胚を、5%ウシ胎児血清、2 m g / m L P B S T 中の B S A において室温で 2 時間ブロッキングした。胚を、ブロッキング溶液に 1:500 希釈されたウサギ抗活性化カスパーゼ-3 抗体 (P h a r m i n g e n) とともに 4℃で一晩インキュベートした。次いで、胚を P B S T で数回洗浄した後、ブロッキング溶液に 1:500 希釈された二次抗体であるヤギ抗ウサギ C y 3 (J a c k s o n I m m u n o l o g y) とともに室温で 2 時間インキュベートした。胚を再度 P B S T で洗浄した後、L e i c a M Z F L 3 蛍光顕微鏡を用いて可視化した。

10

【0364】

野生型胚およびモックを注射した (m o c k - i n j e c t e d) 胚と比較すると、アポトーシス促進性 B 2 R タンパク質の異所性の発現が、カスパーゼ-3 活性の劇的な増加をもたらしたことから、B a x 様および B H 3 のみ B 2 R タンパク質の異所性の発現は、ゼブラフィッシュ胚においてアポトーシスプログラムを開始したことが示唆される (図 4 C)。唯一の例外は、z B a d、z B o k 1 および z B o k 2 であり、これらは、異所的に発現されるときアポトーシスを開始しなかった (図 4 A および 4 C)。

【0365】

20

c. ゼブラフィッシュ B 2 R タンパク質誘導性アポトーシスの救済

ゼブラフィッシュ胚におけるゼブラフィッシュアポトーシス促進性 B 2 R タンパク質の異所性の発現が、哺乳動物のアポトーシス経路と類似するメカニズムを介してアポトーシスを誘導した場合、生存促進性 B 2 R タンパク質を同時発現することによって、致死性を防ぐことが可能であるはずである。z M c l - 1 a、z M c l - 1 b、z B l p 1 および z B l p 2 は、実施例 3 (b) に示したプライマーおよびプロトコルを使用して、各々クローニングされた。z M c l - 1 a、z M c l - 1 b、z B l p 1 および z B l p 2 の各々について合成 m R N A を作製し、それらの m R N A は、以下の B 2 R タンパク質 m R N A 注射量: 500 p g の各生存促進性 m R N A、500 p g の z B i d、20 p g の z B m f 1、100 p g の z B m f 2、50 p g の z N o x a、100 p g の z B i k、100 p g の z P u m a、100 p g の z B a x および 100 p g の z B a k で、実施例 3 (b) において記載したプロトコルに従ってゼブラフィッシュ胚に同時に注射した。その結果を図 4 D に示す。z B i d、z B i k、z B m f 1、z B m f 2、z N o x a、z P u m a または z B a x の異所性の発現によって誘導されるアポトーシスは、z M c l - 1 a、z M c l - 1 b、z B l p 1 または z B l p 2 との同時発現によって救済された (図 4 D)。しかしながら、z B a k の異所性の発現は、z M c l - 1 a、z M c l - 1 b または z B l p 1 との同時発現によって救済されたが、z B l p 2 との同時発現によって救済されなかった (図 4 D) ことから、z B a k は、z B l p 2 と相互作用しないことが示唆される。ヒト B l p 2 は、B c l - 2 の公知のホモログである。以前の研究では、ヒト B a k が、ヒト B c l - 2 と相互作用しないことが示された。従って、z B l p 2 が z B a k 誘導性のアポトーシスを救済できないことから、E N S D A R P 0 0 0 0 0 0 4 0 8 9 9 をヒト z B a k のゼブラフィッシュオソログと指摘することがさらに支持された。

30

40

【0366】

d. インビボにおけるガンマ放射線照射に対するゼブラフィッシュ B 2 R 遺伝子の応答

外来性のアポトーシス刺激に応答するゼブラフィッシュ B 2 R 遺伝子の役割を調べるために、胚をガンマ照射に供した。ガンマ照射は、内因性経路を介して哺乳動物細胞においてアポトーシスを引き起こすことにより、p 5 3 依存性様式でカスパーゼ-3 活性の増加をもたらすと知られていた (G o n g r a、C e l l G r o w t h D i f f e r. 10 (7): 491-502 (1999))。ゆえに、ゼブラフィッシュ生存促進性分子がゼブラフィッシュ胚をガンマ放射線照射媒介性アポトーシスから保護する能力を調べた。

50

【0367】

受精の約7時間後に、1 mLの胚培地中において50 Gyガンマ照射線量で、胚を照射した。続いて、胚を、より大きい容積の胚培地が入った組織培養皿に移し、さらに解析するまで28.5℃でインキュベートした。実施例3(b)に記載したようなゼブラフィッシュ生存促進性B2R遺伝子(zB1p1、zMcl-1a、zMcl-1bおよびzB1p2)の各々の異所性(Ecotoxic)発現(500 pgの注射に変更)によって、ガンマ照射誘導性のアポトーシスから胚が保護された(図5A)。従って、ガンマ放射線照射は、哺乳動物細胞における効果と同様に、内因性経路を介してゼブラフィッシュ胚においてアポトーシスを引き起こした。

【0368】

どのゼブラフィッシュB2R遺伝子が、ゼブラフィッシュ胚に対するガンマ放射線照射のアポトーシス効果の媒介に関与したのかを決定するために、アポトーシス促進性B2Rゼブラフィッシュ遺伝子の翻訳のノックダウンを、モルホリノアプローチを使用して行った。異所的に発現したzNoxaの同属のmRNA媒介性の救済を取り消す能力に基づいて、各生存促進性B2R遺伝子に対するモルホリノを選択した。同族のmRNAの異所性の発現を救済する能力に基づいて、各アポトーシス促進性B2R遺伝子に対するモルホリノを選択した。モルホリノの有効性は、zBok1、zBok2またはzBadに対して検証することができないので(それらの遺伝子が、異所的に発現するときにアポトーシスを誘導しなかったという事実に起因して。図4Aおよび4Cを参照のこと)、それらの遺伝子をノックダウン解析に含めなかった。

【0369】

モルホリノは、各転写物の翻訳開始部位周辺に設計され(Nasevicius and Etker, Nat. Genet. 26:216-220(2000))、GeneToolsから入手した。モルホリノ(「MO」)配列は、以下のとおりであった(すべて5'から3'):

zMcl-1a MO: GCCTAAAATCCAAACTCAGAGCCAT
(配列番号91)

zMcl-1b MO: TGTCGTTTGTTTCTTCCAGCGAACAT
(配列番号92)

zB1p1 MO: AGGTTGTGTGCTCGTTCTCCGATGTC
(配列番号93)

zB1p2 MO: GTCATAGCTAATTTCTGTTAGCCATG
(配列番号94)

zBax MO: TGAAAATAAGCGAACTGAAGAAGAC
(配列番号95)

zBak MO: ATTTTTTCGGCTAAAACGTGTATGGG
(配列番号96)

zBid MO: GGTCAAAAGTTCTCTGTTGAAGTCCAT
(配列番号97)

zBmf MO: ACACATCATCTCTGTCCTCATCCAT
(配列番号98)

zNoxa MO: CTTTCTTTCGCCATTTTCAGCAAAGTTT
(配列番号99)

zPuma MO: TGCTTTTCCATCTCTGCTCGGGCCAT
(配列番号100)

zBik MO: CTACAAACAAGGACACAATGGTGGA
(配列番号101)

p53 MO: GCGCCATTGCTTTTGCAAGAATTG
(配列番号102)

コントロールMO: CCTCTTACCTCAGTTACAAATTTATA (配列番号103)

10

20

30

40

50

号103)。

【0370】

コントロールモルホリノは、変異ベータサラセミアスプライス部位を含む正常なヒトベータグロビンmRNA配列メッセージを復帰するように設計され、ゼブラフィッシュ胚において効果を有しないと考えられた。p53モルホリノは、Langheinrichら、Curr. Biol. 12:2023-2028(2002)に従った。

【0371】

モルホリノを、1×Daniellu溶液+0.2%フェノールレッド中に1mg/mLに希釈した。合計4.6ngまたは9.2ngのモルホリノを注射した。2つのモルホリノの組み合わせを使用する実験では、4.6ngの各モルホリノを注射した。その実験に、二重モルホリノ注射サンプルとの比較を含めるとき、4.6ngのコントロールモルホリノを単回のモルホリノ注射にさらに加え、各サンプルを9.2ngのモルホリノとともに注射した。1~4細胞期の胚に、Nanoliter 2000(World Precision Instruments)微量注入器を使用して4.6nLの希釈モルホリノを注射した。

【0372】

ほとんどの哺乳動物細胞型において、BaxまたはBakのいずれかが、ほとんどのアポトーシス刺激を伝達するために必要である(Weiら、Science 292:727-730(2001))。zBaxおよびzBakが、ゼブラフィッシュにおいて機能的に重複性であるか否かを判定するために、zBaxおよびzBakに対するモルホリノを単独でまたは対で胚に注射し、続いて、その胚をガンマ照射に供した。zBaxの翻訳のノックダウンは、胚をガンマ放射線照射の効果から保護するのに十分であった(図5Bおよび5C)。低いパーセンテージのクラッチにおいて、zBaxとzBakの両方のノックダウンが、ガンマ照射誘導性のカスパーゼ-3活性化を取り消すために必要であった。zBaxおよびzBakモルホリノを注射され、照射された胚では、いくらかのカスパーゼ-3活性が残存しており(図5Bおよび5C)、これは、不完全なノックダウンまたは胚に存在する母系性のタンパク質の機能に起因し得る。zBaxは、ガンマ照射に応答してアポトーシスプログラムの実行に主に関与するとみられた。

【0373】

いくつかのBH3のみアポトーシス促進性遺伝子の翻訳のノックダウンから、zPuma翻訳が損なわれているとき、カスパーゼ-3活性化は、ガンマ照射に応答して劇的に低下することが明らかになった(図5D)。zNoxaの機能障害によってもまた、カスパーゼ-3活性化が大きく低下したが、zPumaの不活性化ほど完全ではなかった。この効果は、p53ノックダウンの保護作用を反映しており(図5E)、また、哺乳動物細胞における以前の研究によって支持されたことから、Pumaが、ガンマ照射誘導性アポトーシスの主要なメディエーターであることが示唆される(Erlacherら、Blood 106:4131-4138(2005); Jeffersら、Cancer Cell 4:321-328(2003))。

【0374】

ガンマ照射中のzNoxaおよびzPumaの作用をよりよく理解するために、定量的PCR解析を行った。製造者の指示書に従って、7500 Real Time PCR System(Applied Biosystems)を使用して、Taqman解析を行った。各遺伝子に対するプライマーおよびプローブ配列を以下に示す(5'から3'):

zGAPDH順方向: TGC GTT C GT C T C T G T A G A T G T (配列番号104)

zGAPDH逆方向: G C C T G T G G A G T G A C A C T G A (配列番号105)

zGAPDHプローブ: T G T G T G T G T G T G T T A G T T T C T T T T G A C A G T A T T T G (配列番号106)

z N o x a 順方向： C G A A C C T G T G A C A G A A A C T T G (配列番号 107)

z N o x a 逆方向： C T G C G C G C A C T C T A C T A C A (配列番号 108)

z N o x a プローブ： C G G T T T G C T C T T T C T T C G C C A T T T C (配列番号 109)

z P u m a 順方向： G A A C A C A C G G G T T A C A A A A G A C (配列番号 110)

z P u m a 逆方向： G A A A A T T C C C A G A G T C T G T A A G T G (配列番号 111)

z P u m a プローブ： A C G A G T G C A G G C G C T C T C C T T (配列番号 112)

受精の約30分後に胚を回収し、さらなる解析にむけて胚培地中で維持した。One Step RT-PCRキット (Qiagen) を製造者の説明書に従って使用して、各B2R遺伝子に対するコード領域をRT-PCRによって増幅した。正確なコード配列を検証するために、複数のRT-PCR産物を配列決定した。増幅した各配列を、Topo TA (Invitrogen) クローニングによってプラスミドpCRII (Invitrogen) にクローニングした。受精の7時間後に50 Gyで胚を照射し、そして受精の10時間後にRNAを回収した。

【0375】

定量的PCR解析から、ガンマ照射に応答して、z N o x a転写は、3～4倍アップレギュレートされるのに対し、z P u m a転写は、およそ100倍アップレギュレートされることが明らかになった(図5F)。他のゼブラフィッシュBH3のみ遺伝子のいずれもが、ガンマ照射に応答して転写の増加を示した。z P u m aのアップレギュレーションは、p53依存性であり(図5F)、p53のノックダウンによって、z P u m aアップレギュレーションは低下した。このことから、ゼブラフィッシュにおいて、ガンマ照射がp53活性を誘導し、それによってその後、z P u m aの転写がアップレギュレートすることが示唆された。P u m aのアップレギュレーションは、哺乳動物系においてB a xおよびB a kを活性化すると知られており(Liuら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 310(3):956-62(2003)) (これは上記データと

【0376】

e. 正常な発生中のゼブラフィッシュ生存促進性B2Rタンパク質のノックダウン

内因性アポトーシス経路が、ゼブラフィッシュに存在し、かつ、機能的であることが確立されたので、ゼブラフィッシュ内因性経路を、既知の哺乳動物の内因性経路系と比較した。ゼブラフィッシュ生存促進性B2R遺伝子を、モルホリノノックダウンに供し、そして発生中の胚に対して生じる効果をモニターした。モルホリノは、実施例3(d)に記載される方法に従って、z M c l - 1 a、z M c l - 1 bおよびz B l p 2の翻訳開始部位

【0377】

z B l p 2のノックダウンは、初期のゼブラフィッシュ発生に対して明らかな効果を有しなかった(図6A)。z B l p 2ノックダウン魚の肉眼的な形態は、正常であった。z B l p 2ノックダウンの結果として、カスパーゼ3活性の増加はなかった。同様に、z M c l - 1 aまたはz M c l - 1 bのノックダウンは、魚の胚の生存に対して明らかな効果を有しなかった。しかしながら、z M c l - 1 aとz M c l - 1 bの両方のノックダウンによって、受精の8時間後までの生存率に、可変であるが、著しい減少がもたらされた(図6A)。z B l p 2と組合わされた、いずれかのz M c l遺伝子の対でのノックダウ

ンは、生存率に対して影響がなかった（図6A）。従って、zMc1-1の両コピーの転写の障害のみが、注射されたゼブラフィッシュ胚の生存率に有意に影響した。特に、以前の研究では、マウスにおける哺乳動物のMc1-1のノックアウトが、移植前に致死性であることが証明されていた（Rinkenbergerら、Genes Dev. 14: 23-27 (2000)）。

【0378】

f. ゼブラフィッシュ生存促進性B2Rタンパク質およびAp2Lシグナル伝達

zMc1-1aモルホリノとzMc1-1bモルホリノの両方を注射されたゼブラフィッシュ胚は、生存率の大きな範囲を示した（実施例3（e））。この生存率の範囲は、そのクラッチのすべての「健常」を伴って変化するとみられた。この変動性についての1つのあり得る説明としては、zMc1-1a/bが、初期のゼブラフィッシュ胚を内因性または環境性のアポトーシス刺激から保護し得るということであった。Mc1-1は、以前に、いくつかの細胞株においてAp2L誘導性のアポトーシスに対する感受性に影響することに関係づけられていた（Hensonら、J. Cell Biochem. 89: 1177-1192 (2003)；Taniaiら、Cancer Res. 64: 3517-3524 (2004)；Wirthら、Cancer Res. 65: 7393-7402 (2005)；Kobayashiら、Gastroenterology 128: 2054-2065 (2005)）。従って、Ap2L誘導性の外因性アポトーシス経路に対するzMc1-1aおよびzMc1-1bのノックダウンの効果を調べた。

【0379】

zMc1-1aおよびzMc1-1bのノックダウンを実施例3（e）に記載したように行った。ゼブラフィッシュAp2LホモログzDL1bおよび他のTNF関連遺伝子を、以下のプライマー配列を使用して、実施例3（b）に記載したようにクローニングした：

zDL1a順方向： ACCATGATGGTCCCGGCGAACAGCCGC （配列番号113）

zDL1a逆方向： ACTTTACAGATCCAAATCGGAAAGCTCC （配列番号114）

zDL1b順方向： ATCATGGTGCAGCCCTAAAAATCGT （配列番号115）

zDL1b逆方向： CCTTCAGAGGTCAAACAGGAAGGC （配列番号116）

zDL2順方向： CACGCGATGGTGCAGCATGACAAAGC （配列番号117）

zDL2逆方向： TACTGACTAGCTCACCCAGAAATGC （配列番号118）

zDL3順方向： ACCATGACATCCAAACCTTCTATCGGT （配列番号119）

zDL3逆方向： AGTTTATTTTAATCATGAATGCCCCAAA （配列番号120）

zFasL順方向： ATGAGTGCTAACTTTCGGCCACTCG （配列番号121）

zFasL逆方向： TCAGTGGATCTTTAAAGAGGCCGAA （配列番号122）

zTNF1順方向： GCAACCATGAAGCTTGAGAGTCTGGGCGTTT （配列番号123）

zTNF1逆方向： TTTCGTTTCACAAACCAAACACCCCAAAGAA （配列番号124）

zTNF2順方向： ATGGTGAGATACGAAACAACATTAA （配列番号125）

z T N F 2 逆方向： A T T A A A T C A C A A C G C G A A C A C C C C G A A G A A
(配列番号 1 2 6)。

【0380】

合成 z D L 1 b m R N A を作製し、そして実施例 3 (b) に記載したようにゼブラフィッシュ胚に注射した。

【0381】

野生型胚において、ゼブラフィッシュ A p o 2 L オーソログ z D L 1 b の異所性の発現は、初期の胚の生存率に対して最小の効果を有した (図 6 B)。しかしながら、z M c l - 1 a および z M c l - 1 b のノックダウンを z D L 1 b の異所性の発現と組み合わせたとき、胚は、急速に広範囲なアポトーシス死を起こした (図 6 B)。この効果は、z M c l - 1 a および z M c l - 1 b に特異的であった。なぜなら、z B l p 2 と組み合わせられた z M c l - 1 a または z M c l - 1 b のノックダウンが、z D L 1 b 誘導性のアポトーシスに対する感受性を増加させなかったからである (図 6 B)。

【0382】

異なる効果は、z D L 1 b 以外の他の A p o 2 L / T N F 関連分子とともに得られた (図 6 C を参照のこと)。例えば、z M c l - 1 a および z M c l - 1 b の二重の翻訳ノックダウンと組み合わせられた z D L 1 a の異所性の発現によって、z D L 1 b のときとほぼ同程度に大きなゼブラフィッシュ胚の生存の低下がもたらされた (図 6 C)。この二重ノックダウンは、z D L 3 が異所的に発現されるとき、生存を著しく低下させた (図 6 C)。z D L 2、z T N F 1 または z T N F 2 の発現が、二重の z M c l - 1 a / b 翻訳ノックダウンと対にされるとき、生存率の有意に小さい減少がもたらされた (図 6 C)。z F a s L は、単独でまたは z M c l - 1 a および z M c l - 1 b のノックダウンと組み合わせて、アポトーシスを誘導しなかった。胎児性細胞上での z T N F 1、z T N F 2 および z F a s L に対するレセプターの発現は、まだ確立されていない。

【0383】

従って、z M c l - 1 a および z M c l - 1 b は、ともに、z D L 1 a および z D L 1 b (A p o 2 L) 誘導性のアポトーシスからゼブラフィッシュ胚を保護し、z D L 3 誘導性のアポトーシスからの、より小さいが、なおも有意な保護作用を有した。

【図面の簡単な説明】

【0384】

【図 1】図 1 は、実施例 1 (b) に記載されるように P R O S I T E パターンおよびマトリックスから構築された隠れマルコフモデル (HMM) に対する精度-再現率プロットを示している。P R O S I T E パターンの精度および再現率は、菱形で示されており；様々なスコアにおけるパターン由来 HMM に対する精度および再現率は、線としてプロットされており；漏刻形は、本明細書中で使用された HMM スコア 閾値における精度および再現率を表わしている。

【図 2】図 2 は、実施例 2 に記載されるような既知および候補の B c l - 2 関連 (「B 2 R」) タンパク質の B H 3 ドメインのアラインメント結果を示している。類似の物理化学的な特性を有するアミノ酸は、標準的な C l u s t a l X カラーパターンに従って、同様に陰影をつけている。

【図 3 A】図 3 A は、実施例 2 (g) に記載されるような、既知のゼブラフィッシュ B 2 R タンパク質およびゼブラフィッシュ B 2 R タンパク質候補と、ヒト (h)、マウス (m) およびニワトリ (g g) 対応物とのアラインメント結果を示している。生存促進性タンパク質は、1 番上および中央の陰影のない区分として表わされており；B H 3 のみタンパク質は、1 番下の陰影のない区分として表わされており；そして、残りの陰影のある区分は、マルチドメインアポトーシス促進性タンパク質である。

【図 3 B】図 3 B は、実施例 2 に記述されるように、遺伝子に従って分類されたヒト、マウスおよびゼブラフィッシュ B H 3 のみタンパク質の B H 3 ドメインのアラインメント結果を示している。類似の物理化学的な特性を有するアミノ酸に同様に陰影をつけた。

【図 3 C】図 3 C および 3 D は、実施例 3 (a) に記載される実験結果を示している。図

10

20

30

40

50

3 Cは、ステージ特異的なR T-P C Rの電気泳動の結果を示しており、受精の7 2時間後（h p f）まで母系性の寄与によって、ほとんどのゼブラフィッシュB c 1-2ファミリーメンバーが、一定レベルで発現していることを示している。

【図3 D】図3 Cおよび3 Dは、実施例3（a）に記載される実験結果を示している。図3 Dは、組織特異的R T-P C Rの電気泳動の結果を示しており、種々の成体ゼブラフィッシュ組織における多くのゼブラフィッシュB c 1-2ファミリーメンバーの発現を示している。

【図4 A】図4 Aおよび4 Bは、実施例3（b）に記載されるような、インビボにおける異所性のゼブラフィッシュB 2 Rタンパク質発現の結果を示しているグラフである。z B a d、z B o k 1およびz B o k 2を除くと、各アポトーシス促進性z B c 1-2ファミリーメンバーの異所性の発現は、用量依存的様式で死を誘導した。

10

【図4 B】図4 Aおよび4 Bは、実施例3（b）に記載されるような、インビボにおける異所性のゼブラフィッシュB 2 Rタンパク質発現の結果を示しているグラフである。z B a d、z B o k 1およびz B o k 2を除くと、各アポトーシス促進性z B c 1-2ファミリーメンバーの異所性の発現は、用量依存的様式で死を誘導した。

【図4 C】図4 Cは、実施例3（b）に記載されるように、合成ゼブラフィッシュB 2 Rタンパク質または緑色蛍光タンパク質（G F P）コントロールを注射されたゼブラフィッシュ胚における、明視野顕微鏡像（左のパネル）および活性化されたカスパーゼ-3に対する蛍光免疫染色（右のパネル）を示している。

【図4 D】図4 Dは、実施例3（c）に記載される実験から得られたデータのグラフによる描写を示している。生存している胚のパーセントを、異所的に発現するゼブラフィッシュB 2 Rタンパク質の示される組み合わせについてプロットしている。グラフの上に、各組み合わせに対して実験した胚の総数を示している。

20

【図5 A】図5 A～5 Fは、実施例3（d）に記載される実験の結果を示している。図5 Aは、ゼブラフィッシュ生存促進性B 2 Rタンパク質（z B l p 1、z M c l-1 a、z M c l-1 bまたはz B l p 2）のうちの1つまたはコントロール（W T（無注射）またはG F P）を異所的に発現している、未処置の（左のパネル）またはガンマ照射された（右のパネル）ゼブラフィッシュ胚におけるカスパーゼ-3活性の免疫染色を示している。

【図5 B】図5 A～5 Fは、実施例3（d）に記載される実験の結果を示している。図5 Bは、p 5 3に対するモルホリノまたはコントロールモルホリノ単独あるいはz B a xもしくはz B a kに対するモルホリノと組み合わせて注射された、未処置の（左のパネル）またはガンマ照射された（右のパネル）ゼブラフィッシュにおけるカスパーゼ-3活性についての免疫染色を示している。

30

【図5 C】図5 A～5 Fは、実施例3（d）に記載される実験の結果を示している。図5 Cは、z B a xおよびz B a k単一ノックダウンおよびダブルノックダウンからの蛍光を定量しているグラフを示している。

【図5 D】図5 A～5 Fは、実施例3（d）に記載される実験の結果を示している。図5 Dは、コントロールモルホリノまたはゼブラフィッシュB H 3のみB 2 Rタンパク質（z B i d、z B a d 1、z B m f 1、z N o x a、z P u m aまたはz B i k）に対するモルホリノを注射された、未処置（左のパネル）またはガンマ照射された（右のパネル）ゼブラフィッシュ胚におけるカスパーゼ-3活性に対する免疫染色を示している。

40

【図5 E】図5 A～5 Fは、実施例3（d）に記載される実験の結果を示している。図5 Eは、コントロールモルホリノまたはp 5 3に対するモルホリノを注射されていないか、または注射された、未処置（左のパネル）またはガンマ照射された（右のパネル）ゼブラフィッシュ胚におけるカスパーゼ-3活性に対する免疫染色を示している。

【図5 F】図5 A～5 Fは、実施例3（d）に記載される実験の結果を示している。図5 Fは、処置されていないか、またはコントロールもしくはp 5 3モルホリノで処置された、ガンマ照射されたゼブラフィッシュ胚におけるz P u m aまたはz N o x aの転写の増加の定量的P C R解析の結果をグラフで示している。

【図6 A】図6 Aは、実施例3（e）において記載される実験の結果を示している。この

50

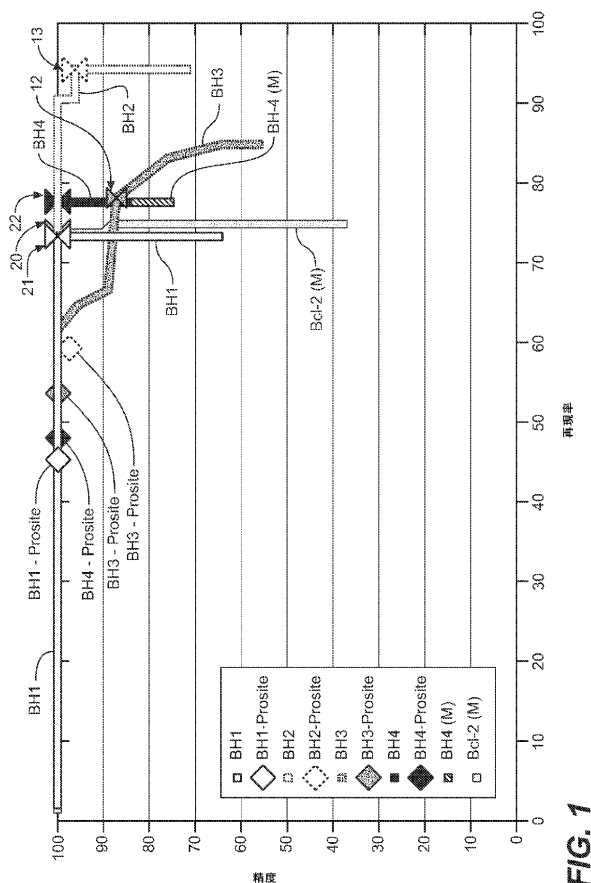
図は、zMc1-1a、zMc1-1bおよび／またはB1p2のモルホリノノックダウンに供されたゼブラフィッシュ胚の生存率を示しているグラフである。

【図6B】図6Bおよび6Cは、実施例3(f)に記載される実験の結果を示している。これらの図は、zMc1-1aおよび／またはzMc1-1bのモルホリノノックダウンならびにApo2L誘導性アポトーシス（ゼブラフィッシュApo2LオーソログDL1bまたは別のApo2L経路関連分子（例えば、zDL1a、zDL2、zDL3、zTNF1、zTNF2またはzFasL）によるもの）に供されたゼブラフィッシュ胚の生存率のグラフを示している。

【図6C】図6Bおよび6Cは、実施例3(f)に記載される実験の結果を示している。これらの図は、zMc1-1aおよび／またはzMc1-1bのモルホリノノックダウンならびにApo2L誘導性アポトーシス（ゼブラフィッシュApo2LオーソログDL1bまたは別のApo2L経路関連分子（例えば、zDL1a、zDL2、zDL3、zTNF1、zTNF2またはzFasL）によるもの）に供されたゼブラフィッシュ胚の生存率のグラフを示している。

10

【図1】



【図2】

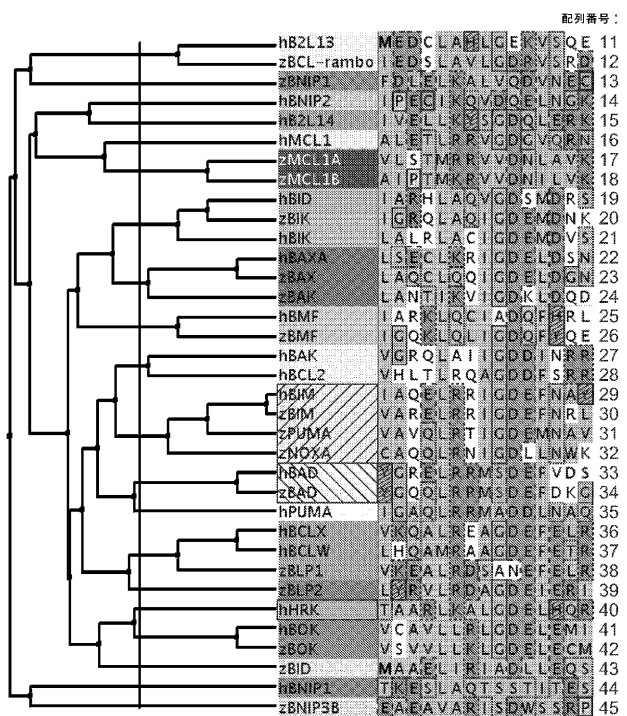


FIG. 2

【 図 3 B 】



										配列番号:							
hBik	L	A	L	R	L	L	A		I	G	D	E		D	V	S	46
mBik	V	A	L	R	L	L	Q		I	A	D	Q		F	H	R	47
zBik	I	G	R	Q	L	A	Q		I	G	D	E		D	N	K	48
hBid	I	A	R	H	L	A	Q		V	G	D	S		D	R	S	49
mBid	I	A	R	H	L	A	Q		I	G	D	E		D	H	N	50
zBid		A	A	E	L	I	R		I	A	D	L		Q	F	S	51
hBmf	I	A	R	K	L	Q			I	A	D	Q		F	H	R	52
mBmf	I	A	R	K	L	Q			I	A	D	Q		F	H	R	53
zBmf1	I	G	Q	K	L	Q			I	G	D	Q		F	Y	Q	54
zBmf2	I	G	R	K	L	R	E		G	D	Q	F		Q	Q	E	55
hBad	Y	G	R	E	L	R	R		S	D	E	F		V	D	S	56
mBad	Y	G	R	E	L	R	R		S	D	E	F		E	G	S	57
zBad	Y	G	Q	K	L	R	R		S	D	E	F		D	K	G	58
hNoxa		A	T	Q	L	R	R		F	G	D	K		L	N	F	59
mNoxa	E		A	Q	L	R	R		I	G	D	K		V	N	L	60
zNoxa	E		A	Q	L	R	N		I	G	D	L		N	W	K	61
hPuma	I	G	A	Q	L	R	R		A	D	D	L		N	A	Q	62
mPuma	I	G	A	Q	L	R	R		A	D	D	L		N	A	Q	63
zPuma	V	A	V	Q	L	R	T		I	G	D	E		N	A	V	64

FIG. 3B

【图 3 D】



【図 4 A】

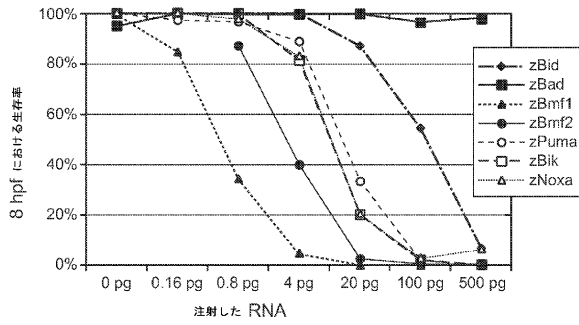


FIG. 4A

【図 4 B】

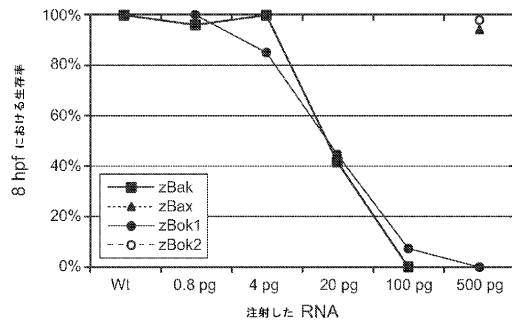


FIG. 4B

【図 4 D】

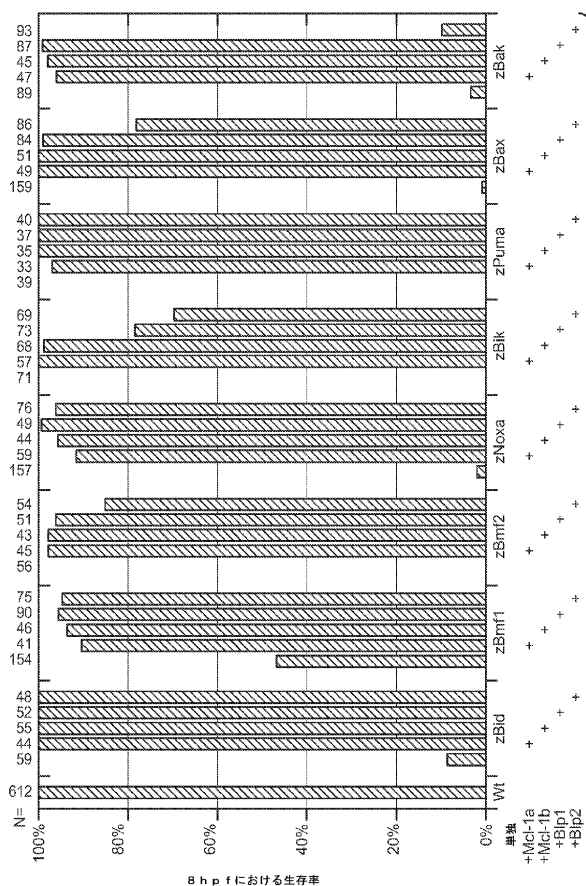
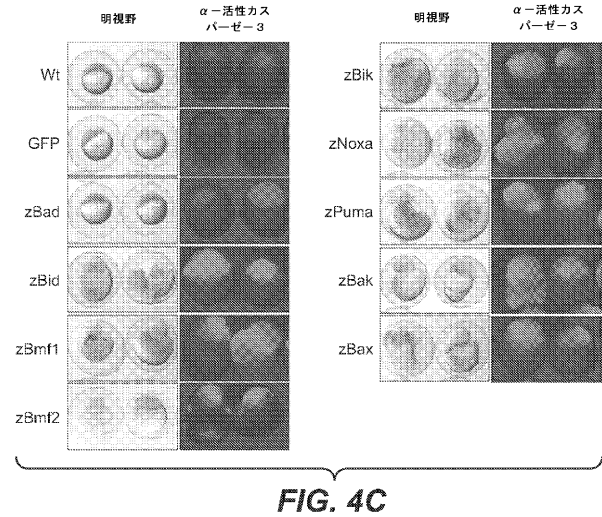
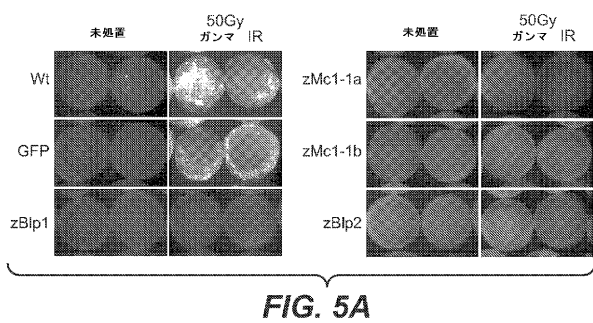


FIG. 4D

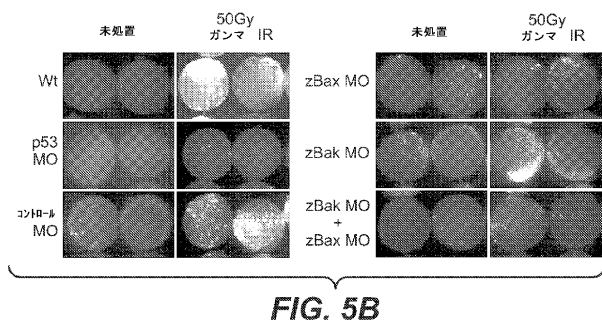
【図 4 C】



【図 5 A】



【図 5 B】



【図 5 C】

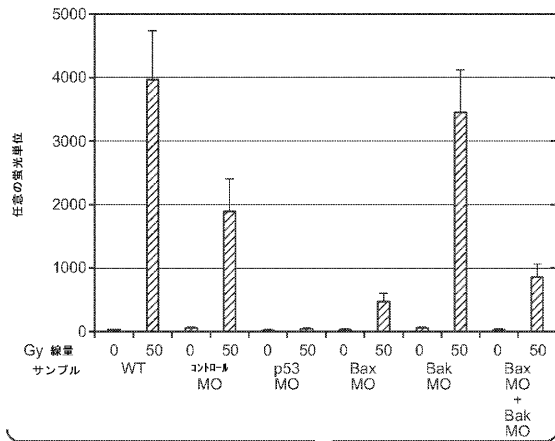


FIG. 5C

【図 5 D】

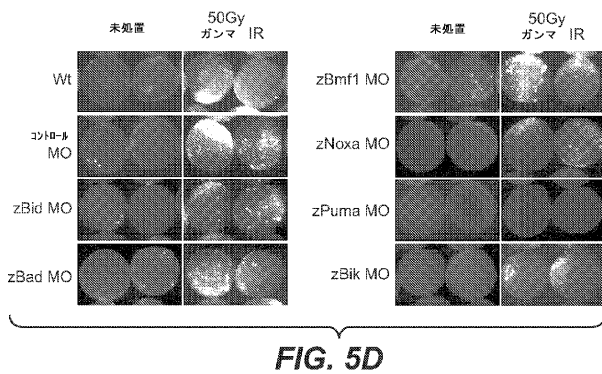


FIG. 5D

【図 5 E】

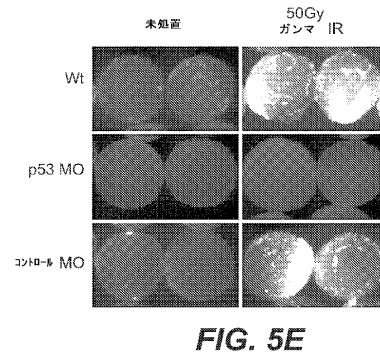


FIG. 5E

【図 5 F】

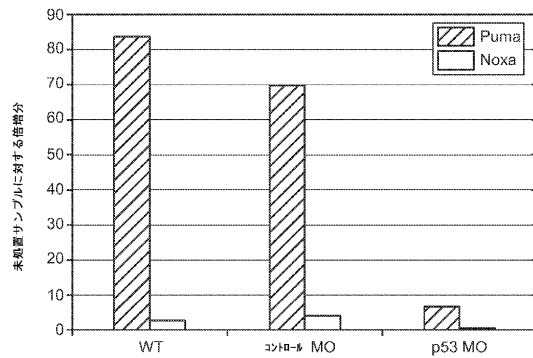


FIG. 5F

【図 6 A】

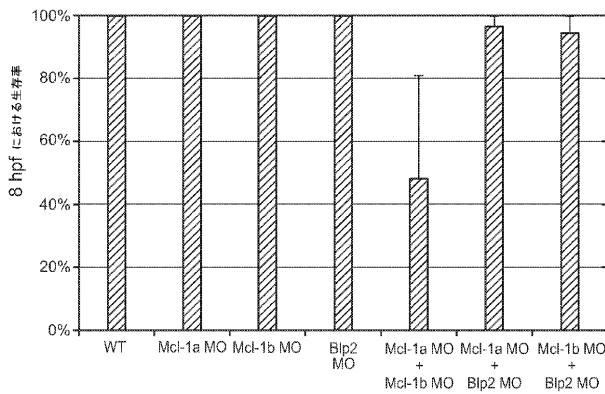


FIG. 6A

【図 6 B】

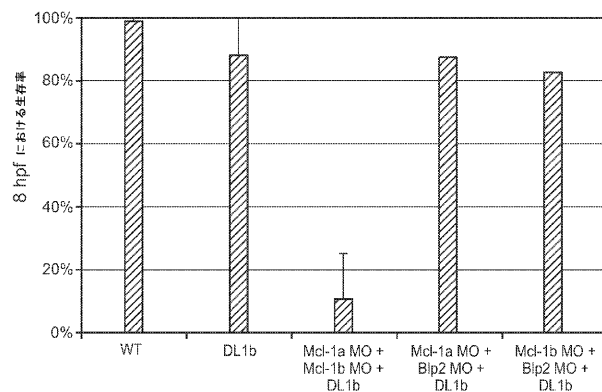


FIG. 6B

【図 6 C】

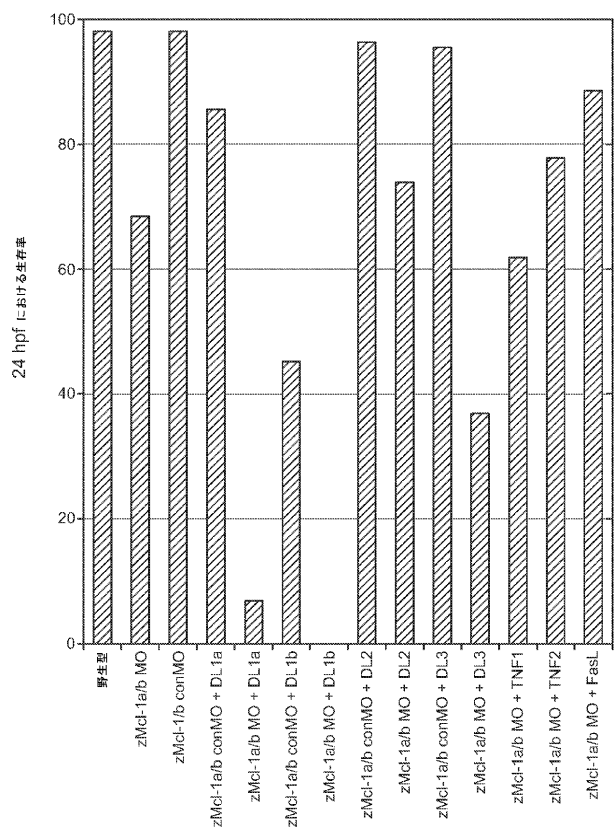


FIG. 6C

【配列表】

2009536526000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/068180

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/46		
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) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, 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 A	DATABASE EMBL 15 March 2005 (2005-03-15), "Zgc:112983 (Bax2)," XP002466264 Database accession no. Q5EAR7 the whole document ----- -/--	1,2 3-52, 56-62, 66-73
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 January 2008		Date of mailing of the international search report 26/05/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Loubradou-Bourges, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/068180

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	INOHARA N ET AL: "Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish" CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, EDWARD ARNOLD, OXFORD, GB, vol. 7, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 509-510, XP002212414 ISSN: 1350-9047 cited in the application sequence Q919N4 abstract	1-52, 56-62, 66-73
A	CHEN MING-CHYUAN ET AL: "Cloning and characterization of zfBLP1, a Bcl-XL homologue from the zebrafish, <i>Danio rerio</i>" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1519, no. 1-2, 28 May 2001 (2001-05-28), pages 127-133, XP002466260 ISSN: 0006-3002 abstract; sequence Q90Z98	1-52, 56-62, 66-73
A	AQUACHERIA ABDEL ET AL: "Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-only, and BNip families of apoptotic regulators" MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION, vol. 22, no. 12, December 2005 (2005-12), pages 2395-2416, XP002466261 ISSN: 0737-4038 cited in the application abstract; table 2	1-52, 56-62, 66-73
A	COULTAS L ET AL: "Pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family members in vertebrate model organisms suitable for genetic experimentation." CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, vol. 9, no. 11, November 2002 (2002-11), pages 1163-1166, XP002466262 ISSN: 1350-9047 cited in the application page 1163, left-hand column; table 1	1-52, 56-62, 66-73
P,X	KRATZ E ET AL: "Functional characterization of the Bcl-2 gene family in the zebrafish" CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, vol. 13, no. 10, October 2006 (2006-10), pages 1631-1640, XP002466263 ISSN: 1350-9047 the whole document	1-52, 56-62, 66-73

International Application No. PCT/US2007/068180

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 52-57, 67-68 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
Although claims 69-70 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 53-55 all, 63-65 all, 66-68 part, 71 part, 73 part

The present claims 53-55 all, 63-65 all, 66-68 part, 71 part, 73 part encompass compounds defined only by their desired function, namely being "antagonist", "agonist", "agent that reduces or inhibit expression" of SEQ ID N°1 or 2, contrary to the requirements of clarity of Article 6 PCT, because the result-to-be-achieved type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The fact that any compound could be screened does not overcome this objection, as the skilled person would not have knowledge beforehand as to whether it would fall within the scope claimed. Undue experimentation would be required to screen compounds randomly. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search for said claims.

As a consequence, said claims were not searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that 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. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/068180

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210.
2. ☒ Claims Nos.: 53-55 all, 63-65 all, 66-68 part, 71 part, 73 part
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
see additional sheet(s)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2007/068180

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-52,56-62,66-73 part

polypeptide, polynucleotide, transgenic fish, model system for apoptosis, method for identifying a compound, method for identifying an agent, method of treating an apoptosis-related disorder, composition for increasing apoptosis, composition for reducing or preventing apoptosis, method for detecting the presence or severity of an apoptosis-related disorder, kit, article of manufacture relating to SEQ ID N°1 or 2

2. claims: 1-52,56-62,66-73 part

polypeptide, polynucleotide, transgenic fish, model system for apoptosis, method for identifying a compound, method for identifying an agent, method of treating an apoptosis-related disorder, composition for increasing apoptosis, composition for reducing or preventing apoptosis, method for detecting the presence or severity of an apoptosis-related disorder, kit, article of manufacture relating to SEQ ID N°5 or 6

3. claims: 1-52,56-62,66-73 part

polypeptide, polynucleotide, transgenic fish, model system for apoptosis, method for identifying a compound, method for identifying an agent, method of treating an apoptosis-related disorder, composition for increasing apoptosis, composition for reducing or preventing apoptosis, method for detecting the presence or severity of an apoptosis-related disorder, kit, article of manufacture relating to SEQ ID N°7 or 8

4. claims: 1-52,56-62,66-73 part

polypeptide, polynucleotide, transgenic fish, model system for apoptosis, method for identifying a compound, method for identifying an agent, method of treating an apoptosis-related disorder, composition for increasing apoptosis, composition for reducing or preventing apoptosis, method for detecting the presence or severity of an apoptosis-related disorder, kit, article of manufacture relating to SEQ ID N°9 or 10

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 H 0 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
	G 0 1 N 33/50	Z

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,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,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 アシュケナジ, アビ ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 2, サン マテオ, タリータウン ストリート
1 4 5 6

(72)発明者 ハート, リース
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 3 1, サンフランシスコ, サセックス ストリート
1

(72)発明者 クラッツ, エリカ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 3, サン マテオ, ウェイン ウェイ 1 3 3 7

(72)発明者 ムヒヤラ, キラン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 2, ベルモント, マリン ビュー ストリート
5 1 6

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA40 CB17 CB19 DA20 DA36 FB01 FB03
4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04 GA11
HA01 HA11
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ08 QQ13 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35
QR55 QR59 QR62 QS25 QS32 QX01
4C084 AA02 AA07 AA17 BA01 BA22 BA23 NA14 ZA012 ZA512 ZB022
4C085 AA13 AA14 DD88 EE01
4H045 AA10 AA30 BA10 CA52 EA20 FA74