

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4659219号  
(P4659219)

(45) 発行日 平成23年3月30日(2011.3.30)

(24) 登録日 平成23年1月7日(2011.1.7)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/00 G
C O 7 K	14/47 (2006.01)	C O 7 K	14/47
C O 7 K	16/18 (2006.01)	C O 7 K	16/18
C O 7 K	19/00 (2006.01)	C O 7 K	19/00

請求項の数 28 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-602778 (P2000-602778)	(73) 特許権者	509012625
(86) (22) 出願日	平成12年3月2日(2000.3.2)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2002-537812 (P2002-537812A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
(43) 公表日	平成14年11月12日(2002.11.12)		サンフランシスコ ディーエヌエー
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/005746		ウェイ 1
(87) 国際公開番号	W02000/052166	(74) 代理人	100109726
(87) 国際公開日	平成12年9月8日(2000.9.8)		弁理士 園田 吉隆
審査請求日	平成19年3月2日(2007.3.2)	(74) 代理人	100101199
(31) 優先権主張番号	60/123,090		弁理士 小林 義教
(32) 優先日	平成11年3月5日(1999.3.5)	(72) 発明者	デ ソーバージュ, フレデリック ジュー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		.
(31) 優先権主張番号	60/135,736		アメリカ合衆国 カリフォルニア 944
(32) 優先日	平成11年5月25日(1999.5.25)		04, フォスター シティ, シューティン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		グ スター アイル 187
微生物の受託番号	ATCC PTA-127		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F U S E D のヒトサブレッサー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

( a ) F i g 1 ( 配列番号 : 2 ) のアミノ酸残基 1 ~ 4 3 3 の配列を持つ h S u ( f u ) ポリペプチドをコードする DNA 分子 ; 又は ( b ) ( a ) の DNA 分子の相補鎖 ; に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する DNA を含んでなる単離された核酸であって、該核酸によりコードされるポリペプチドが G l i 、 G l i 2 もしくは G l i 3 と結合することのできる核酸。

【請求項 2】

F i g 6 A - 6 B ( 配列番号 : 1 ) の 7 4 ~ 1 3 7 2 のヌクレオチド位置の配列を含んでなる請求項 1 に記載の単離された核酸。

【請求項 3】

F i g 6 A - 6 B ( 配列番号 : 1 ) の配列を含んでなる請求項 1 に記載の単離された核酸。

【請求項 4】

( a ) A T C C 寄託番号 P T A - 1 2 7 ( D N A 3 3 4 5 5 - 1 5 4 8 ) のヒトタンパク質 c D N A にコードされるのと同じ成熟ポリペプチドをコードする DNA 分子である配列番号 : 1 の DNA 分子 ; 又は ( b ) ( a ) の DNA 分子の相補鎖 ; に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する DNA を含んでなる単離された核酸分子であって、該核酸によりコードされるポリペプチドが G l i 、 G l i 2 もしくは G l i 3 と結合することのできる核酸分子。

## 【請求項 5】

A T C C 寄託番号 P T A - 1 2 7 ( D N A 3 3 4 5 5 - 1 5 4 8 ) のヒトタンパク質 c D N A にコードされるのと同じポリペプチドをコードする D N A を含んでなる 請求項 4 に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 6】

( a ) F i g 1 ( 配列番号 : 2 ) のアミノ酸残基 1 ~ 4 3 3 の配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するポリペプチドをコードする D N A ; 又は ( b ) ( a ) の D N A の相補鎖 ;

を含んでなる単離された核酸分子であって、該核酸によりコードされるポリペプチドが G l i 、 G l i 2 もしくは G l i 3 と結合することのできる核酸分子。

10

## 【請求項 7】

( a ) F i g 1 ( 配列番号 : 2 ) のアミノ酸残基 1 ~ 4 3 3 の配列を有するポリペプチドをコードする D N A ; 又は ( b ) ( a ) の D N A の相補鎖 ; を含んでなる 請求項 6 に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 8】

請求項 1 に記載の核酸を含んでなるベクター。

## 【請求項 9】

該ベクターで形質転換された宿主細胞に認識されるコントロール配列に作用可能に結合した 請求項 8 に記載のベクター。

## 【請求項 10】

請求項 9 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

20

## 【請求項 11】

前記細胞が C H O 細胞である 請求項 10 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 12】

前記細胞が大腸菌である 請求項 10 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 13】

前記細胞が酵母細胞である 請求項 10 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 14】

請求項 1 に記載の核酸によりコードされる h S u ( f u ) ポリペプチドの製造方法であって、請求項 10 に記載の宿主細胞を、前記 h S u ( f u ) ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養物から 前記 h S u ( f u ) ポリペプチドを回収することを含んでなる方法。

30

## 【請求項 15】

請求項 1 に記載の D N A によりコードされた単離された h S u ( f u ) ポリペプチドであって、G l i 、 G l i 2 もしくは G l i 3 と結合することのできる h S u ( f u ) ポリペプチド。

## 【請求項 16】

F i g 2 ( 配列番号 : 2 ) のアミノ酸残基 1 ~ 4 3 3 の配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するポリペプチドを含んでなる単離された h S u ( f u ) ポリペプチドであって、G l i 、 G l i 2 もしくは G l i 3 と結合することのできる h S u ( f u ) ポリペプチド。

40

## 【請求項 17】

F i g 2 ( 配列番号 : 2 ) のアミノ酸残基 1 ~ 4 3 3 のアミノ酸残基を含んでなる 請求項 16 に記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 18】

F i g 1 ( 配列番号 : 2 ) のアミノ酸残基 1 ~ 4 3 3 の配列を含んでなる単離された h S u ( f u ) ポリペプチド、又は抗 h S u ( f u ) 抗体のための結合部位を提供するのに十分なその断片。

## 【請求項 19】

A T C C 寄託番号 P T A - 1 2 7 ( D N A 3 3 4 5 5 - 1 5 4 8 ) として寄託されたベ

50

クターの cDNA 挿入断片によりコード化される単離された h S u ( f u ) ポリペプチド。

【請求項 20】

( i ) ( a ) F i g 1 ( 配列番号 : 2 ) のアミノ酸残基 1 ~ 433 の配列を有する h S u ( f u ) ポリペプチドをコードする DNA 分子 ; 又は ( b ) ( a ) の DNA 分子の相補鎖 ; に緊縮性条件下で試験 DNA 分子をハイブリダイズさせ、上記試験 DNA 分子が ( a ) 又は ( b ) に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する場合に、( i i ) 上記ポリペプチドの発現に適した条件下で上記試験 DNA 分子を含んでなる宿主細胞を培養し、( i i i ) 細胞培養物から上記ポリペプチドを回収することにより製造される単離されたポリペプチドであって、G l i、G l i 2 もしくは G l i 3 と結合することのできるポリペ

10

【請求項 21】

異種アミノ酸配列に融合した 請求項 15 ないし 20 の何れか一項に記載の h S u ( f u ) ポリペプチドを含んでなるキメラ分子。

【請求項 22】

上記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列である 請求項 21 に記載のキメラ分子。

【請求項 23】

上記異種アミノ酸配列が免疫グロブリンの F c 領域である 請求項 21 に記載のキメラ分子。

【請求項 24】

請求項 15 ないし 20 の何れか一項に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

20

【請求項 25】

上記抗体がモノクローナル抗体である 請求項 24 に記載の抗体。

【請求項 26】

上記抗体がヒト化抗体である 請求項 24 に記載の抗体。

【請求項 27】

請求項 1 ないし 4、6 又は 7 に記載の核酸の何れか一つに対するアンチセンスヌクレオチドを含んでなる、請求項 1 ないし 4、6 又は 7 に記載の核酸の何れか一つによりコードされる h S u ( f u ) 発現のアンタゴニスト。

【請求項 28】

請求項 15 ないし 20 の何れか一項に記載のポリペプチドの G l i、G l i 2 もしくは G l i 3 への結合あるいは G l i の不活性化のアンタゴニスト又はアゴニストをスクリーニングする方法において、

30

( a ) 培地中で、請求項 15 ないし 20 の何れか一項に記載のポリペプチドを発現する標的細胞を候補化合物に暴露し、

( b ) 処理した細胞における前記ポリペプチドの G l i、G l i 2 もしくは G l i 3 への結合活性、あるいは G l i の不活性化 を評点化し、

候補化合物に暴露していない対照細胞と該結果を比較することを含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

40

(技術分野)

本発明は、一般的に、細胞増殖及び分化に関連するヘッジホッグ ( H h ) シグナル経路に関連する分子に関する。さらに、本発明は、f u s e d のヒトサブレッサー (「h u S u ( f u )」) をコードする DNA と相同性を有する新規 DNA の同定及び単離、またここで h S u ( f u ) あるいは h S u ( f u ) と命名した新規ポリペプチドの組換え生産に関する。

【0002】

多細胞生物の発育は少なくとも部分的に、細胞、組織、又は器官のパターンの位置的情報を特定、指揮又は維持するメカニズムに依存している。種々の分泌されたシグナル伝達分子、例えばトランスフォーミング成長因子-ベータ ( T G F - )、W n t、繊維芽成長因

50

子及びヘッジホッグファミリーのメンバー等は、ショウジョウバエ及び脊椎動物における様々な細胞及び構造のパターン形成に関連している。Perrimon, *Cell*: 80: 517-520 (1995)。

ヘッジホッグ (Hh) は、キイロショウジョウバエにおける遺伝子スクリーニングによりセグメントポラリティ遺伝子として最初に同定され、Nusslein-Volhard等, *Roux. Arch. Dev. Biol.* 193: 267-282 (1984)、広範な発達機能を果たす (Perrimon, 上掲)。1つのショウジョウバエHh遺伝子しか同定されていないが、3つのヒトHh相同体: ソニックHh (SHh)、デザートHh (DHH) 及びインディアンHh (IHH) が単離されている (Echelard等, *Cell* 75, 1417-30 (1993); Riddle等, *Cell* 75: 1401-16 (1993))。SHhは発育中の脊椎動物胚の脊索及び底板で高レベルで発現される。インビトロ外植片アッセイ並びにトランスジェニック動物におけるSHhの異所性発現は、SHhが神経管パターン形成において鍵となる役割を果たすことを示している、Echelard等,

上掲, Ericson等, *Cell* 81: 747-56 (1995); Marti等, *Nature* 375: 322-5 (1995); Krauss等, *Cell* 75, 1432-44 (1993); Riddle等, *Cell* 75: 1401-16 (1993); Roelink等 *Cell* 81:445-44 (1995), 上掲; Hynes等, *Neuron* 19: 15-26 (1997)。また、Hhは、肢 (Krauss等, *Cell* 75: 1431-44 (1993); Laufer等, *Cell* 79, 993-1003 (1994))、体節 (Fan 及びTessier-Lavigne, *Cell* 79, 1175-86 (1994); Johnson等, *Cell* 79: 1165-73 (1994))、肺 (Bellusci等, *Develop.* 124: 53-63 (1997)) 及び皮膚 (Oro等, *Science* 276: 817-21 (1997)) の発達においても役割を果たす。同様に、IHH及びDHHは骨、腸及び胚細胞発育に関連する、Apeqvist等, *Curr. Biol.* 7: 801-4 (1997); Bellusci等, *Dev. Suppl.* 124: 53-63 (1997); Bitgood等, *Curr. Biol.* 6: 298-304 (1996); Roberts等, *Development* 121: 3163-74 (1995)。SHhノックアウトマウスは、SHhが脊椎動物発生の多くの面に重要であるという考えを更に強めた、Chiang等, *Nature* 383: 407-13 (1996)。これらのマウスは、脊索及び底板といった正中線における異常、神経管の腹側細胞型の不存在、末端肢構造の不存在、単眼症、及び脊柱及び殆どの肋骨における不存在を示す。

### 【0003】

細胞表面において、Hhシグナルは、12膜貫通ドメインタンパク質Patchd (Ptch) (Hooper及びScott, *Cell* 59: 751-65 (1989); Nakano等, *Nature* 341: 508-13 (1989)) 及びG-タンパク質結合様レセプターSmoothened (Smo) (Alcedo等, *Cell* 86: 221-232 (1996); van den Heuvel及びIngham, *Nature* 382: 547-551 (1996)) にリレーされると考えられている。遺伝子的及び生化学的証拠が、Ptch及びSmoが多成分レセプター複合体の一部であるレセプターモデルを支持している、Chen及びStruhl, *Cell* 87: 553-63 (1996); Marigo等, *Nature* 384: 176-9 (1996); Stone等, *Nature* 384: 129-34 (1996)。HhのPtchへの結合に際し、PtchのSmoに対する平常の阻害効果が解除され、Smoが細胞質膜を通したHhシグナルの伝達を可能にする。Ptch遺伝子における機能変異の喪失が、多発性基底細胞癌 (BCC) を特徴とする遺伝病である基底細胞母斑症候群 (BCNS) の患者で同定された。また、機能障害Ptch遺伝子変異は、多くの割合で散在性基底細胞癌腫を伴っていた (Chidambaram等, *Cancer Research* 56:

4599-601 (1996); Gailani等, *Nature Genet.* 14: 78-81 (1996); Hahn等, *Cell* 85: 841-51 (1996); Johnson等, *Science* 272: 1668-71 (1996); Uden等, *Cancer Res.* 56: 4562-5; Wicking等, *Am. J. Hum. Genet.* 60: 21-6 (1997))。Ptch機能の喪失は、基底細胞癌における制御不能なSmoシグナル伝達を起こすと考えられる。同様に、Smo変異の活性化が散在性BCC腫瘍で同定され (Xie等, *Nature* 391: 90-2 (1998))、SHhのレセプター複合体におけるシグナル伝達サブユニットとしてのSmoの役割を強調している。しかしながら、PtchがSmoを制御することによる正確な機構は未だ明らかになっていない。

重要なことに、シグナル伝達機構が、レセプターから下流の標的に伝達されることによる

10

20

30

40

50

シグナル伝達機構も明確にされねばならない。ショウジョウバエにおける遺伝子上位分析は、幾つかのセグメントポラリティ遺伝子を同定し、それらはHhシグナル伝達経路の成分として機能することがわかった (Ingham, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 492-8 (1995); Perrimon,

上掲)。これらは、キネシン様分子、C o s t a l - 2 ( C o s - 2 ) (Robbins等, *Cell* 90: 225-34 (1997); Sisson等, *Cell* 90: 235-45 (1997))、f u s e d と命名されたタンパク質 (Preat等, *Genetics* 135: 1047-62

(1990); Therond等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4224-8 (1996))、及びZnフィンガータンパク質C i . (Alexandre等, *Genes*

*Dev.* 10: 2003-13 (1996); Dominguez等, *Science* 272: 1621-5 (1996); Orenic等, *Gene* 10: 1053-67 (1990)) を含む。Hhシグナル伝達に関係する更なる成分は、転写因子C B P [Akimaru等, *Nature* 386: 735-738 (1997)]、ネガティブレギュレーターs l i m b [Jiang及びStruhl, *Nature* 391: 493-496 (1998)]及びS H h 応答成分C O U P - T F I I [Krishnan等, *Science* 278: 1947-1950 (1997)]を含む。さらに、f u s e d の

サブレッサとして示された分子 [Pham等, *Genetics* 140: 587-98 (1995); Preat, *Genetics* 132: 725-36 (1992)] は、ショウジョウバエで見出されたもので、Hhシグナル伝達経路の構成要素であると考えられている。

#### 【 0 0 0 4 】

これらHh経路の分子の機能的役割及び相互作用は、ある部分においては、遺伝学的、構造学的分析に基づいて示唆されてきた。C o s - 2 における変異は胚致死性であり、各セ

グメントの中心成分及びHh応答性遺伝子の拡張ドメインの複製を含むHh過剰発現に類似のフェノタイプを提示する。これに対して、h S u ( f u ) 及びC i についての変異胚は、各セグメント後部の欠失及び前部の鏡像様複製の置換を含むHh機能の喪失に類似の

フェノタイプを示す、Busson等, *Roux. Arch. Dev. Biol.* 197: 221-230 (1988)。C i の分子キャラクタリゼーションは、それがW i n g l e s s 及びD p p などのHh応答性遺伝子を直接活性化する転写因子であることを示唆した、Alexandre等, (1996), 上掲; Dominguez等, (1996), 上掲)。

同様に、f u s e d の分子解析により、セリン、トレオニンキナーゼと関連性があり、インタクトなN末端キナーゼドメイン及びC末端制御領域がその適切は機能に必要であることが明らかになった (Preat等,

*Nature* 347:87-9 (1990); Robbins等, (1997) 上掲; Therond等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4224-8 (1996))。C o s - 2 及びf u s e d の推定反対機能に一致して、f u s e d 変異はC o s - 2 変異体によって、及びf u s e d 変異体のサブレッサによって抑制される、Preat等, *Genetics* 135: 1047-62 (1993)。

しかしながら、f u s e d 無しの変異及びN-末端キナーゼドメイン変異は、f u s e d 変異のサブレッサによって完全に抑制されるが、f u s e d のC-末端変異はf u s e d のサブレッサのバックグラウンドにおいて強いC o s - 2 フェノタイプを示す。このことは、f u s e d キナーゼドメインが、f u s e d のサブレッサが存在しない場合にS H h シグナル伝達の構成アクチベータとして作用することを示唆している。最近の研究は、9 2 k D a ショウジョウバエ f u s e d 、C o s - 2 及びC i が微小管結合性多タンパク質複合体として存在し、Hhシグナル伝達が微小管からのこの複合体の解離を導くことを示した、Robbins等, *Cell* 90: 225-34 (1997); Sisson等, *Cell* 90: 235-45 (1997)。

f u s e d 及びC o s - 2 の両方もがHh処理に反応してリン酸化されるが、Robbins等, 上掲; Therond等, *Genetics* 142: 1181-98 (1996)、この活性の原因となるキナーゼの性質決定は未だ行われていない。

#### 【 0 0 0 5 】

今日までに、これらの成分について知られている脊椎動物相同体は、G l i タンパク質ファミリー (例えば、G l i - 1、G l i - 2 及びG l i - 3 ) のみである。これらは、C i に構造的に関連するZnフィンガー推定転写因子である。これらの中で、G l i - 1 はS H h シグナルのメディエータ候補であることが示され [Hynes等, *Neuron* 15: 35-44 (1995), Lee等, *Development* 124: 2537-52 (1997); Alexandre等, *Genes Dev.* 10: 2003-13 (1996)]、Hhに反応する遺伝子活性化の機構がハエと脊椎動物の間で保存されることを

示している。

最近の研究は、9 2 k D a ショウジョウバエ f u s e d 、C o s - 2 及びC i が微小管結合性多タンパク質複合体として存在し、Hhシグナル伝達が微小管からのこの複合体の解離を導くことを示した、Robbins等, *Cell* 90: 225-34 (1997); Sisson等, *Cell* 90: 235-45 (1997)。

f u s e d 及びC o s - 2 の両方もがHh処理に反応してリン酸化されるが、Robbins等, 上掲; Therond等, *Genetics* 142: 1181-98 (1996)、この活性の原因となるキナーゼの性質決定は未だ行われていない。

#### 【 0 0 0 5 】

今日までに、これらの成分について知られている脊椎動物相同体は、G l i タンパク質ファミリー (例えば、G l i - 1、G l i - 2 及びG l i - 3 ) のみである。これらは、C i に構造的に関連するZnフィンガー推定転写因子である。これらの中で、G l i - 1 はS H h シグナルのメディエータ候補であることが示され [Hynes等, *Neuron* 15: 35-44 (1995), Lee等, *Development* 124: 2537-52 (1997); Alexandre等, *Genes Dev.* 10: 2003-13 (1996)]、Hhに反応する遺伝子活性化の機構がハエと脊椎動物の間で保存されることを

示している。

最近の研究は、9 2 k D a ショウジョウバエ f u s e d 、C o s - 2 及びC i が微小管結合性多タンパク質複合体として存在し、Hhシグナル伝達が微小管からのこの複合体の解離を導くことを示した、Robbins等, *Cell* 90: 225-34 (1997); Sisson等, *Cell* 90: 235-45 (1997)。

f u s e d 及びC o s - 2 の両方もがHh処理に反応してリン酸化されるが、Robbins等, 上掲; Therond等, *Genetics* 142: 1181-98 (1996)、この活性の原因となるキナーゼの性質決定は未だ行われていない。

#### 【 0 0 0 5 】

今日までに、これらの成分について知られている脊椎動物相同体は、G l i タンパク質ファミリー (例えば、G l i - 1、G l i - 2 及びG l i - 3 ) のみである。これらは、C i に構造的に関連するZnフィンガー推定転写因子である。これらの中で、G l i - 1 はS H h シグナルのメディエータ候補であることが示され [Hynes等, *Neuron* 15: 35-44 (1995), Lee等, *Development* 124: 2537-52 (1997); Alexandre等, *Genes Dev.* 10: 2003-13 (1996)]、Hhに反応する遺伝子活性化の機構がハエと脊椎動物の間で保存されることを

示している。

示唆している。Hhカスケードにおける他のシグナル伝達因子が進化的に保存されるか否かを決定し、生化学レベルでのHhシグナル伝達におけるfusedの機能を調べるために、ヒトfused

cDNAが単離され特性決定された(米国仮出願06/076072、1998年2月26日出願、ここにその全体を取り込む)。マウスにおいて、fusedはSHh応答性組織で発現される。生化学的研究は、fusedが機能性キナーゼであることを示した。機能的な研究は、fusedがGliのアクチベータであり、fusedのドミナントネガティブ形態がアフリカツメガエル胚におけるSHhシグナル伝達を阻止できるという証拠を提供する。これらのデータをまとめて、Cos-2とfusedの両方がHhシグナル伝達に直接的に関連していることが示された。

10

#### 【0006】

最近、ショウジョウバエにおいてfusedタンパク質のサブレッサーが同定され、新規PEST-包含タンパク質であることが示された(Monnier等, Curr. Biol. 8: 583-586 (1998), Pham等, Genetics 140: 587-598 (1995), Preat等, Genetics 135: 1047-1062 (1993)及びPreat, Genetics 132: 725-736(1992))。PESTドメインはプロリン、グルタミン酸、(又はアスパラギン酸)、セリン及びトレオニン(一文字コードでそれぞれ、P、E、S、及びT)に富む短い配列で、低疎水性指数のもので組み合わされている。それらは、短い(2時間以内)細胞内半減期をもつ多くのタンパク質に見出される(40)。出願人は、ここにおいて、サブレッサーポリペプチドと相同性のあるポリペプチドをコードするDNAを同定し、記述し、ここにおいてfusedヒトサブレッサー(「hSu(fu)」)と、あるいはhSu(fu)と命名した。体細胞において必要であるpatched遺伝子の変異は、基底細胞癌腫、原発性乳癌腫、髄芽腫、髄膜腫を含む散発性腫瘍において同定された。目下のところ、patchedはガン抑制因子として作用し、これらの変異はpatched遺伝子産物における機能欠損を引き起こすことが信じられている。従って、hedghog/patchedシグナル伝達経路は、腫瘍形成における要因であるかもしれない。細胞増殖の増強及び腫瘍形成に至る遺伝的変化を検出することは、臨床医学にとって非常に興味深いことである。細胞増殖変調に至る特異的な変化を同定することは診断の改善及び関連腫瘍に対する治療可能性へのチャンスになるかもしれない。

20

#### 【0007】

(発明の概要)

「hSu(fu)」又はPRO1280と命名された新規ポリペプチドをコードするcDNAクローン(DNA33455)(配列番号:1)が同定された。一実施態様では、本発明はhSu(fu)ポリペプチドをコードする核酸配列を含んでなる単離された核酸分子を提供する。

30

一実施態様では、単離された核酸は、(a)Fig1のhSu(fu)のアミノ酸1~433の配列(配列番号:2)のアミノ酸配列を持つhSu(fu)ポリペプチドをコードする核酸分子、又は(b)(a)の核酸分子の相補鎖に対して少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%、さらにより好ましくは少なくとも98%、最も好ましくは100%の配列同一性を有する配列により構成される。他の実施態様では、核酸はATCC寄託番号PTA-127のヒトタンパク質cDNA(DNA33455-1548と命名)にコードされるのと同じ成熟ポリペプチドをコードするDNA分子又はその相補鎖と同一性を有する。好適な実施態様では、核酸はATCC寄託番号PTA-127のヒトタンパク質cDNA(DNA33455-1548)にコードされるのと同じ成熟ポリペプチドをコードするDNA分子又はその相補鎖を含む。

40

本発明は、さらに、Fig6A-6Bの約74から約1372残基間の核酸(配列番号:1)の相補鎖にハイブリダイズ化する核酸配列を含み、hSu(fu)ポリペプチドをコードする単離された核酸分子に関する。好ましくは、ハイブリダイゼーションは緊縮性のハイブリダイゼーション及び洗浄の条件下で行われる。

50

さらに、本発明は F i g 1 の h S u ( f u ) のアミノ酸 1 ~ 4 3 3 の配列 ( 配列番号 : 2 ) のアミノ酸配列と少なくとも約 8 0 %、好ましくは少なくとも約 8 5 %、より好ましくは少なくとも約 9 0 %、最も好ましくは少なくとも約 9 5 %、さらにより好ましくは少なくとも約 9 8 %、最も好ましくは 1 0 0 % の配列同一性を有するポリペプチドをコードする核酸配列又はその相補鎖を含む単離された核酸分子に関する。

更なる場合には、本発明は少なくとも 1 0 0 ヌクレオチドを有し、( a ) F i g 1 の h S u ( f u ) のアミノ酸 1 ~ 4 3 3 の配列 ( 配列番号 : 2 ) のアミノ酸配列を有する h S u ( f u ) ポリペプチドをコードする DNA 分子、又は ( b ) ( a ) の相補鎖と緊縮性の条件下で試験 DNA 分子とハイブリダイズ化することにより生産される単離された核酸に関し、その DNA 分子が少なくとも約 8 0 %、好ましくは少なくとも約 8 5 %、より好ましくは少なくとも約 9 0 %、最も好ましくは少なくとも約 9 5 % の配列同一性を有する場合には、その試験 DNA 分子を単離することに関する。

10

特定の場合には、本発明は開始メチオニンを有する、もしくは有さない h S u ( f u ) ポリペプチドをコードする DNA 又はそのコード化 DNA の相補鎖により構成される核酸分子を提供する。

他の面においては、本発明は、( a ) F i g 1 の h S u ( f u ) のアミノ酸 1 ~ 4 3 3 の配列 ( 配列番号 : 2 ) のアミノ酸配列と比較した時、少なくとも約 8 0 % のポジティブ、好ましくは少なくとも約 8 5 % のポジティブ、より好ましくは少なくとも約 9 0 % のポジティブ、最も好ましくは少なくとも約 9 5 % のポジティブのスコアを示すポリペプチドをコードする核酸又は ( b ) ( a ) の DNA の相補鎖により構成される単離された核酸分子に関する。

20

他の実施態様は、ハイブリダイゼーションプローブとしての利用を見出すことができる h S u ( f u ) ポリペプチドをコードする配列断片を対象としている。そのような核酸断片は約 2 0 から約 8 0 ヌクレオチド長で、好ましくは約 2 0 から約 6 0 ヌクレオチド長、さらに好ましくは約 2 0 から約 5 0 ヌクレオチド長、もっとも好ましくは約 2 0 から約 4 0 ヌクレオチド長であり、配列番号 : 1 に示されるヌクレオチド配列から誘導し得る。

#### 【 0 0 0 8 】

他の実施態様では、本発明は h S u ( f u ) 又はその変異体をコードする核酸を含むベクターを提供する。そのベクターはここで同定された単離された核酸分子のいくつかを含む。

30

そのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例えば、宿主細胞は C H O 細胞、大腸菌又は酵母でよい。さらに、宿主細胞を、h S u ( f u ) の発現に適した条件下で培養し、細胞培養物からそれを回収することを含んでなる h S u ( f u ) の製造方法も提供される。

#### 【 0 0 0 9 】

さらに他の実施態様では、本発明は上述の如く同定された単離核酸のいずれかによってコードされた単離 h S u ( f u ) ポリペプチドを提供する。

特に、本発明は単離された天然配列 h S u ( f u ) ポリペプチドを提供し、それは一実施態様において F i g 1 の残基 1 ~ 4 3 3 ( 配列番号 : 2 ) を含んでなるアミノ酸配列を含む h S u ( f u ) である。

40

他の場合には、本発明は単離された h S u ( f u ) ポリペプチドで、F i g 1 の残基 1 ~ 4 3 3 ( 配列番号 : 2 ) のアミノ酸配列と少なくとも約 8 0 % の配列同一性、好ましくは少なくとも約 8 5 % の配列同一性、さらに好ましくは約 9 0 % の配列同一性、最も好ましくは約 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列によって構成されるものに関する。

さらなる場合には、本発明は単離された h S u ( f u ) ポリペプチドで、F i g 1 の残基 1 ~ 4 3 3 ( 配列番号 : 2 ) のアミノ酸配列と少なくとも約 8 0 % の配列同一性、好ましくは少なくとも約 8 5 % の配列同一性、さらに好ましくは約 9 0 % の配列同一性、最も好ましくは約 9 5 % のポジティブスコアを示すアミノ酸配列によって構成されるものに関する。

さらに他の場合において、本発明は単離された h S u ( f u ) ポリペプチドで、F i g 1

50

の残基 1 ~ 4 3 3 (配列番号: 2) のアミノ酸配列又は抗 h S u ( f u ) 抗体に対する結合部位を提供するのに十分な前述配列の断片により構成されるものに関する。好ましくは、h S u ( f u ) 断片は天然 h S u ( f u ) ポリペプチドの定性的生物活性を保持する。更なる場合には、本発明は ( i ) 緊縮性の条件下で試験 DNA 分子と ( a ) 配列番号: 2 の約 1 から約 4 3 3 番のアミノ酸配列を有する h S u ( f u ) をコード化する試験 DNA、又は ( b ) ( a ) の DNA 分子の相補鎖をハイブリダイズ化することにより生産されるポリペプチド、及びその試験 DNA 分子が ( a ) 又は ( b ) と少なくとも約 8 0 % の配列同一性、好ましくは少なくとも約 8 5 % の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも約 9 0 % の配列同一性、最も好ましくは少なくとも約 9 5 % の配列同一性を有する場合、( i i ) ポリペプチドの発現にとって適切な条件下で試験 DNA 分子を含む宿主細胞を培養し、

10

( i i i ) 細胞培養物からポリペプチドを回収することにより生産されるポリペプチドを提供する。

他の実施態様では、本発明は異質性ポリペプチド又はアミノ酸配列と融合した h S u ( f u ) ポリペプチドを含むキメラ分子を提供する。そのようなキメラ分子の例には、エピトープタグ配列又はイムノグロブリンの F c 領域と融合した h S u ( f u ) ポリペプチドを含む。

他の実施態様では、本発明は h S u ( f u ) ポリペプチドと特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、その抗体はモノクローナル抗体である。

さらに他の実施態様では、本発明は天然 h S u ( f u ) ポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストに関する。特別な実施態様では、そのアゴニスト又はアンタゴニストは抗 h S u ( f u ) 抗体である。

20

更なる実施態様では、本発明は天然 h S u ( f u ) ポリペプチドを候補分子に接触させ、当該ポリペプチドによって仲介される生物学的な活性を検出することにより天然 h S u ( f u ) ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法に関する。好ましい実施態様において、生物学的活性はヘッジホッグシグナル経路において f u s e d ポリペプチドの活性を抑制するものである。

さらなる実施態様では、本発明は製薬的に受容可能な担体と組み合わせて、h S u ( f u ) ポリペプチドもしくは上述に定義したようなアゴニスト又はアンタゴニストを含んでなる組成物に関する。

他の実施態様では、本発明は h S u ( f u ) によるヘッジホッグシグナル伝達調節の促進に対するアンタゴニストもしくはアゴニストを開発するための化合物及び方法を提供する。特に、生物有機化学的小分子及びアンチセンスヌクレオチドを含む、S H シグナル伝達経路において h S u ( f u ) の正常な機能発現を阻止、防止、阻害、及び/又は、中和する h S u ( f u ) のアンタゴニストである。

30

#### 【 0 0 1 0 】

さらに他の実施態様において、本発明は、ヒト h S u ( f u ) の選択的スプライシングされた変異体を提供する。

またさらに他の実施態様では、本発明は、ヘッジホッグシグナル伝達の h S u ( f u ) による調節を転調させる分子を同定するためのスクリーニング又はアッセイ方法を提供する。好ましくは、その分子は、h S u ( f u ) のその結合性複合体 ( f u s e d のような) 形成タンパク質との相互作用を阻止するか、複合体の分解を阻止又は阻害するかのいずれかである。このアッセイは、h S u ( f u ) 及び基質を含む混合物の候補分子とのインキュベーション、及び h S u ( f u ) によるヘッジホッグシグナル伝達を調節する候補分子の能力の検出を含む。スクリーニングされた分子は、好ましくは小分子薬候補である。

40

他の実施態様では、この方法は、特定の疾患がヘッジホッグシグナル伝達によって調節されるか否かを決定する診断方法に関係し、

( a ) 試験細胞又は組織を培養し；

( b ) h S u ( f u ) によるヘッジホッグシグナル伝達調節を阻害できる化合物を投与し；そして

( c ) ヘッジホッグシグナル伝達に変調されるかどうか決定する；

50

ことを含む。

【0011】

(好適な実施態様の詳細な説明)

I. 定義

ここで使用される際の「h S u ( f u ) ポリペプチド」、「h S u ( f u ) タンパク質」及び「h S u ( f u )」という用語は、天然配列 h S u ( f u ) 及び h S u ( f u ) の生物学的活性を有する h S u ( f u ) 変異体(ここで更に詳細に定義する)を含む。h S u ( f u ) は、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、あるいは組換え及び/又は合成方法によって調製してもよい。

「天然配列 h S u ( f u )」は、天然由来の h S u ( f u ) ポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでいる。このような天然配列 h S u ( f u ) は、自然から単離することもできるし、組換え及び/又は合成手段により生産することもできる。

「天然配列 h S u ( f u )」という用語には、特に、h S u ( f u ) の自然に生じる切断形態、分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及び h S u ( f u ) ポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明の一実施態様において、天然配列ヒト h S u ( f u ) は、F i g 1 に示す配列番号: 2 のアミノ酸 1 ~ 4 3 3 を含有する成熟又は全長天然 h S u ( f u ) である。

【0012】

「h S u ( f u ) 変異体」とは、h S u ( f u ) について F i g 1 に示した推定アミノ酸配列(配列番号: 2)を有する h S u ( f u ) のアミノ酸残基 1 から 4 3 3 番目と少なくとも約 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有し、以下に定義されるような活性を有する h S u ( f u ) を意味する。このような h S u ( f u ) 変異体は、例えば、F i g 1 (配列番号: 2)の配列の N-又は C-末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失された h S u ( f u ) ポリペプチドを含む。通常、h S u ( f u ) 変異体は、F i g 1 に示す配列番号: 2 のアミノ酸 1 ~ 4 3 3 番目までのアミノ酸配列と、少なくとも約 8 0 %、より好ましくは少なくとも約 8 5 %、さらにより好ましくは少なくとも約 9 0 %、さらにより好ましくは少なくとも約 9 5 %、よりさらに好ましくは少なくとも約 9 8 % の配列同一性を有する。変異体は、天然配列もしくは F i g 1 (配列番号: 4)に示されているショウジョウバエの f u s e d サプレッサーのような既知のサプレッサーを含まない。

【0013】

h S u ( f u ) 配列に対してここで同定されている「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、h S u ( f u ) 配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。ここで用いられるパーセント同一性値は、入手可能 WU-BLAST-2 (Altschul 等, Methods in Enzymology, 266: 460-480 (1996); またここに参考文献として記載してある <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>, を参照のこと)を使用することにより達成可能である。WU-BLAST-2はその多くが初期設定値に対してセットされるようなサーチパラメータを利用する。適切なパラメータは以下の値を有する組である: オーバーラップ スパン=1, オーバーラップ フラクション=0.125, ワード 閾値(T)=11である。

【0014】

上述のように実施される配列比較の文脈における「ポジティブ(陽性)」という用語は、比較された配列において同一であるばかりでなく類似の性質を有するものも含む(例えば、結果として保存的な置換となるような)。ポジティブ%値は上記定義のように、より長い配列における全残基数により除した B L O S U M 6 2 マトリックスにおけるポジティブ値のスコアされるアミノ酸残基の画分によって決定される。

同様に、ここで同定されている h S u ( f u ) ポリペプチドのコード配列に関して「パーセント(%)核酸配列同一性」は、h S u ( f u ) コード配列中のヌクレオチド残基と同一である候補配列中のヌクレオチド残基のパーセントとして定義される。ここで使用される

10

20

30

40

50

同一性値は、オーバーラップ スパンと オーバーラップ フラクションがそれぞれ 1 及び 0.125 である組み合わせをもつ、初期設定値に対する WU-BLAST-2 セットの BLASTIN モジュールにより算出される。

【 0 0 1 5 】

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために使用するときは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の狭雑成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも 15 残基の N 末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(2)非還元あるいは還元条件下での SDS-PAGE を行い、クーマシブルーあるいは好ましくは銀染色によって、均一になるまで精製される。単離されたポリペプチドには、h S u ( f u ) の自然環境の少なくとも 1 つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのタンパク質が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも 1 つの精製工程により調製される。

「単離された」h S u ( f u ) ポリペプチド核酸分子は、同定され、h S u ( f u ) 核酸の天然源に通常付随している少なくとも 1 つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離された h S u ( f u ) コード化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。ゆえに、単離された h S u ( f u ) コード化核酸分子は、天然の細胞中に存在する h S u ( f u ) 核酸分子から区別される。しかしながら、h S u ( f u ) をコードする単離された核酸分子は、例えば、核酸分子が天然の細胞の場合とは異なる染色体上の位置に存在するような、通常 h S u ( f u ) を発現している細胞に含まれるような h S u ( f u ) -コード化核酸分子を包含する。

【 0 0 1 6 】

「コントロール配列」という表現は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要な DNA 配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーの DNA は、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドの DNA に作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合した DNA 配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読み枠の合った状態にあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

【 0 0 1 7 】

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、特に単一の抗 h S u ( f u ) 抗体モノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト及び中和抗体を含む)、及び多エピトープ特異性を持つ抗体組成物を包含している。ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団、すなわち、構成する個々の抗体が、少量存在する自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である集団から得られる抗体を指す。

【 0 0 1 8 】

ハイブリッド形成反応の「緊縮性」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くな

10

20

30

40

50

ると適切なアニーリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度は低くなる。ハイブリッド形成は、一般的に、相補的鎖がその融点より低い環境に存在する場合における変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリッド形成可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をより緊縮性にするが、低い温度は緊縮性を低下させる。さらに、緊縮性は塩濃度に逆比例する。ハイブリッド形成反応の緊縮性の更なる詳細及び説明は、Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

ここで定義される「緊縮性条件」、「高緊縮性条件」は、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2)ハイブリッド形成中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42において50% (vol/vol)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；(3)42における50%ホルムアミド、5xSSC(0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5xデンハード液、超音波処理サケ精子DNA(50µg/ml)、0.1%SDS、及び10%デキストラン硫酸を42で用い、洗浄を0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)及び0.1%SDS中で42で行うもの；もしくは(4)10%のデキストラン硫酸と2xSSC及び55での50%ホルムアミド、ついで55におけるEDTAを含む0.1xSSCからなる高緊縮性洗浄を用いるものによって同定される。

「中程度の緊縮性条件」は、Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989、に記載されているように同定され、上記の緊縮性より低い洗浄溶液及びハイブリッド形成条件(例えば、温度、イオン強度及び%SDS)の使用を含む。中程度の緊縮性条件は、20%ホルムアミド、5xSSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハード液、10%デキストラン硫酸、及び20mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の37での終夜インキュベーション、ついで1xSSC中37-50でのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識するであろう。

#### 【0019】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したhSu(fu)ポリペプチドを意味する。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するに十分な残基を有しているが、hSu(fu)ポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8~約50のアミノ酸残基(好ましくは約10~約20の残基)を有する。

#### 【0020】

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質(「アドヘシン」)の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインとを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である(即ち「異種の」)アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3又はIgG-4サブタイプ、IgA(IgA-1及びIgA-2を含む)、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

## 【 0 0 2 1 】

「変調」又は「変調する」という語句は、シグナル伝達経路のアップレギュレーション又はダウンレギュレーションを意味する。シグナル伝達の制御下での細胞プロセスは、これらに限られないが、特定遺伝子の転写；代謝、増殖、分化、接着、アポトーシス及び生存などの正常な細胞機能、並びに、形質転換、分化及び転移の阻止といった異常なプロセスを含みうる。

「ポリメラーゼ連鎖反応」又は「PCR」の技術は、ここで用いられる場合、一般に核酸、RNA及び/又はDNAの特定の切片の少量が1987年7月28日発行の米国特許第4,683,195号に記載されたように増幅される方法を意味する。一般的に、対象とする領域の両末端から又は利用可能な必要な部分をカバーする配列情報は、オリゴヌクレオチドプライマーの設計を可能にし；これらのプライマーは増幅されるテンプレートの反対鎖の配列と同一又は類似している。2つのプライマーの5'末端ヌクレオチドは増幅された物質の末端と一致する。PCR配列は、全ゲノムDNA、及び全細胞性RNAから転写されたcDNA、バクテリオファージ、又はプラスミド配列等を形成する。一般的に、Mullis等, Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol. 51: 263 (1987); Erlich, Ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989)を参照のこと。ここで用いられるように、PCRは、プライマーとして公知の核酸を、そして核酸の特定の切片を増幅又は生成するために核酸ポリメラーゼを使用することを含む核酸試験試料の唯一ではない一例であると考えられる。

10

## 【 0 0 2 2 】

ここで意図している「活性な」及び「活性」とは、天然又は天然発生hSu(fu)の生物学的及び/又は免疫学的活性を保持するhSu(fu)の形態を意味する。好ましい活性は、例えば、ヘッジホッグシグナル伝達経路を調節する能力、最も好ましくはfusedの活性を調節し、活性化し、抑制する能力を含む。

20

## 【 0 0 2 3 】

ここで用いられる「アンタゴニスト」なる用語は、最も広い意味において、ここに開示の天然hSu(fu)ポリペプチドの生物学的活性を阻止、防止、阻害、中和する任意の分子を含む。同様に、ここで用いられる「アゴニスト」なる用語は、最も広い意味において、ここに開示の天然hSu(fu)ポリペプチドの生物学的活性を模倣するいかなる分子をも含む。特に、適切なアゴニスト又はアンタゴニスト分子には、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体、天然hSu(fu)ポリペプチド、ペプチド、小分子有機的分子の断片もしくはアミノ酸配列上の変異体等が含まれる。

30

「処置」は、治療的処置及び予防的又は防護的処置の両方を意味し、目的は、対象である病的な状態、疾患を防ぎ、進行を遅らせる（減少させ）ことである。治療を必要とする対象には、既に障害を受けているもの並びに障害を予防されるべきものが含まれる。

「慢性的」投与とは、長期的に初期の治療効果（活性）を維持するために、急性的な機序に対して連続的な薬剤の投与をすることを意味する。「断続的な」投与とは、中断することなしに連続的ということではなく、むしろ自然なサイクルでの治療のことである。

治療の対象となる「哺乳動物」とは、ヒト、イヌ、ウマ、ネコ、ウシのような家庭及び農場の家畜、動物園の動物、スポーツ用の動物、又はペット動物を含む、哺乳類として分類されるあらゆる動物を意味する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

40

一又は複数の薬剤とさらに「組み合わせる」の投与とは、同時に（併用して）そして任意な順序での断続的な投与を含む。

## 【 0 0 2 4 】

## II. 本発明の組成物と方法

分泌性シグナル伝達タンパク質であるヘッジホッグ(HH)ファミリーのメンバーは、脊椎動物及び無脊椎動物の初期胚発生期の多数組織のパターン化現象において重要な役割を果たす(1, 2)。ショウジョウバエハッジホッグ(Hh)シグナル伝達は、幼虫の適切な分節化、及び成虫における成育及び羽及びその他の外肢形成において必要とされる。哺乳動物HHタンパク質ファミリーには3つのメンバー、ソニックヘッジホッグ(Shh)、インディアンヘッジホッグ(Ihh)、デザートヘッジホッグ(Dhh)が含まれる。これ

50

ら3つのタンパク質は組織特異的に発現され、多くの発生過程において重要な役割を果たしている：中枢神経系における腹側細胞の特定化、左右非対称性の制御、体節、肢の生育及びパターン化、軟骨の分化、器官形成、精子形成を含む。多くの脊椎動物HH経路のシグナル伝達因子における遺伝子の変異は、ヒトのガン、発達障害と関連性が認められており(3に総説されている)、従って正常細胞の増殖制御におけるこの経路の重要な役割が確立されている。

Hhシグナル伝達機構は十分に理解されてはいない。しかしながら、ショウジョウバエにおける遺伝学的研究により、Hhシグナル伝達経路における特異的因子として役割を果たしている、多くの膜貫通及び細胞内タンパク質が同定されてきた(3、4、5に総説されている)。この経路はキュピタス インターラプタス(Ci)(6,7)、脊椎動物のGli 10  
タンパク質のジंकフィンガー転写因子ホモログ(8)の活性化によって最高潮に達する。Hhシグナル伝達機構が保存されているという事実は、アフリカツメガエルもしくはヒトのGli(hGli)を異所的に発現させたものが、カエル(9)及びマウス(10)の底板特異的マーカー及と腹側神経細胞の誘導において、Shhの機能を模倣し得るといえる能力により示唆された。サイクリックAMP依存的プロテインキナーゼ(PKA)は、ハエ(11,12)及びげっ歯類(13-16)に双方におけるHHシグナル伝達に対して、共通の負の制御効果を発揮する。遺伝学的解析によりHhよりも下流のシグナル伝達を阻害するように機能することが明らかとなり(18,19)となった複数膜透過性膜貫通タンパク質であるショウジョウバエではPatchedに対して脊椎動物のホモログが同定され(17)、  
さらに7回膜貫通タンパク質であって、Hhシグナル伝達過程において絶対的に必要とされ  
20  
られる(18,21)ショウジョウバエのSmoothenedの脊椎動物ホモログも同定された(20)。脊椎動物の系から得られる生化学的なデータとショウジョウバエにおける遺伝学的分析結果を合わせると、Patchedはリガンド結合因子として、Smoothenedはシグナル伝達因子としてHHタンパク質に対する多数サブユニット受容体複合体中に存在していることが予想される(20,22-24)。以上の結果を総合すると、進化上保存されているという証拠により、他に同定されたショウジョウバエのシグナル伝達経路におけるメンバーが脊椎動物のカウンターパートであるであろうことが示唆される。

#### 【0025】

fusedのショウジョウバエサプレッサー(dSu(fu))は新規細胞質性PESTタンパク質であり(25)、野生型のバックグラウンドにおいて変異した場合、構成的なHhシグナルを示唆するような中間的表現型を与える(26)。さらに、同様の変異は、Hhシグナル伝達において必要とされるセリン-トレオニンキナーゼである幼虫及び成虫のFused(Fu)(28)における突然変異の表現型を完全に抑制する(27)。dSu(fu)はFu及びCiと物理的に相互作用し(29)、後者の相互作用はCiを細胞質に取り込むことにより、及び/又は活性化状態に移行することを防ぐことにより(26)、Ciを不活性な状態に維持していると予想されているものである。Hhシグナル伝達が存在しない場合、おそらく、PKAによるリン酸化Ci(23)をFボックスタンパク質であるSlimb(31)によるユビキチン-プロテアソーム経路にターゲットすることを通じて、アミノ末端の75kDaの転写抑制形(30)を産生するように、全長のCiはタンパク的に  
40  
切断される。Hhシグナルを受容すると、Fuを活性化し、dSu(fu)を不活性化することが予想され、さらに下流の諸現象を誘引し、最終的にはCiをHh標的遺伝子に対する転写活性化因子に変換することになる。

#### 【0026】

HHシグナル伝達におけるSu(fu)の役割に対する生化学的、機能的な見識をさらに得るために、このタンパク質ヒトホモログを取得し、発生過程及び成体における発現パターンが調べられた。さらに、hSu(fu)と脊椎動物のGliタンパク質ファミリー及び脊椎動物のSlimbホモログ等を含むHH経路における他のシグナル伝達構成因子との間における物理的な相互作用が解析され、これら相互作用における機能的意味が確定された。

ショウジョウバエのfused(Su(fu))サプレッサーは、468アミノ酸残基で

10

20

30

40

50

構成される新規細胞質タンパク質であり、遺伝学的な解析によりヘッジホッグのセグメントポラリティー経路における負の制御因子として機能することが明らかとなっている。ここにおいて、脊椎動物の *Su(fu)* - ヒト *Su(fu)* の生化学的及び機能的解析と共に、その一次構造と組織分布について報告する。ここで明らかにしたように、ヒト *Su(fu)* は予想される分子量48 kDaの433アミノ酸残基で構成されるPESTタンパク質で、相当するショウジョウバエのタンパク質と全体で37.7%の同一性(63%の相同性)を有するものである。ラット *Su(fu)* に対するメッセンジャーRNAは、神経板、体節、精巣、腸、皮膚を含む胎児のヘッジホッグ応答組織において広く発現されていた。成体においては、増殖能が残っていることが知られている精巣及び脳の領域において強くその発現が残存していた。ヒト *Su(fu)* 遺伝子座は、染色体10q24-q25にマップされ、その領域はグリア芽細胞腫、前立腺癌、悪性メラノーマ及び子宮内膜癌においては欠失している。ヒト *Su(fu)* は、脊椎動物においてヘッジホッグシグナル伝達を媒介するジnkフィンガーモチーフを有する転写活性化因子 *Gli* による転写活性化を阻害し、物理的に *Gli*、*Gli2*、及び *Gli3* と相互作用することが見出された。また、ヒト *Su(fu)* は、Fボックスタンパク質であり、八エにおいて八エ *Gli* ホモログの分解を *Slimb* と促すことである程度ヘッジホッグ反応を抑制する因子である *Slimb* と複合体を形成している。以上を総合すると、ここに示されたデータは(実施例を参照のこと)、*Su(fu)* が脊椎動物のヘッジホッグシグナル伝達経路における主要な負の制御因子であるとの仮説に対する生化学的、機能的証拠を提供する。さらに、本データは *Su(fu)* が、*Gli* を *Slimb* 依存的プロテアソームの分解経路へ誘導するようなアダプタータンパク質として役に立つことと同様に、*Gli* と結合し *Gli* 媒介転写活性化を阻害することにより作用しうる事を示す。

#### 【0027】

ここに開示のものは、以下の実施例において示すように、*dSu(fu)* に対して63%の相同性を示し、発生における発現プロファイルは脊椎動物のHHシグナル伝達における役割と一致する。*hSu(fu)* は、*dSu(fu)* における保存された潜在的なリン酸化部位を含み、それらの3個所の部位はPKAリン酸化部位の候補であり、さらにそのC末端半分側には低スコアのPEST領域を含んでいる。PEST領域はアスパラギン酸、プロリン、グルタミン酸、セリン、トレオニンに富む短い配列であり、低い疎水性インデックスで混成されている。それらは、細胞内における短い半減期(2時間以内)を有する多くのタンパク質において見出される(40)。ヒト及びショウジョウバエ *Su(fu)* タンパク質において同定されたPEST領域は、最低限のスコアのみ(それぞれ、2.56及び1.48で、5以上が有意なスコアと考えられる)を受けている;それ故、それらはこのような観点からは機能的に関連し得ない。FISH解析により、*hSu(fu)* 遺伝子は染色体10q24-25(以下の実施例を参照のこと)にマップされた。興味深いことに、癌抑制遺伝子における2箇所の遺伝子座が10q.23-qter間に存在し、そのことは、グリア芽細胞腫の多形体、前立腺癌、悪性ミエローマ、子宮内膜癌を含む多くの腫瘍におけるヘテロ接合性欠失に基づく(44-47)。この観点から、多くのガンにおいて変異が見出されている2つの候補となるガン抑制遺伝子も、この領域にマップされるものとして最近記述された:10q23.3におけるMMA1/P16(48、49)及び10q25.3-26.1におけるDMBT1(悪性脳腫瘍において欠損されている)(50)。*hSu(fu)* の染色体上の局在は、*hSu(fu)* が活発な細胞増殖領域において高度に発現されており、HHシグナル伝達の阻害因子であるという事実と合わせて考えると、Patchdのような *hSu(fu)* は腫瘍のサプレッサーである可能性がかなり高いという事を示している。

#### 【0028】

インサツハイブリダイズ化分析により(以下の実施例を参照のこと)、胎児の組織において、げっ歯類の *Su(fu)* mRNAはかなり偏在的に発現しており、それはラット *Smoot her ned* のmRNAを連想させるような発生過程における発現プロファイルである(20:データは示さず)。Shh応答胎児性神経褶及び神経管(1、2)、前原体節中胚葉及び体節、胎性前腸、食道及び肺(51、52)、Ihh応答軟骨(53)、及びDhh応

10

20

30

40

50

答精巢(41)を含む多くのHH応答組織は、顕著にSu(fu)のmRNAを発現する(Fig. 3Dを参照のこと)。さらに、調査された多くの組織においてSu(fu)のmRNAは発生過程において下方制御される一方で、発現は成体の精巢、及び海馬の錐体、顆粒細胞、小脳顆粒、プルキンエ細胞、嗅球顆粒細胞、において維持されており、依然として分裂が活発であり、又はそのような活性を維持している領域はSu(fu)の連続した発現を必要とする。成体ラット脳において、Su(fu)の発現はShh、Smootherned、及びPatchedのmRNAの小脳プルキンエ細胞における発現と重複していた(Fig. 3J)(Traiffort等, 1998)。変異体Patched遺伝子に対するヘテロ接合体が小脳髄様上皮腫において発達しているという事実により、これらの発見は成体小脳におけるShhシグナル伝達の潜在的な役割を示唆する。精巢において、Dhhは発育中の一次及び二次精母細胞と非常に近接して存在するセルトリ細胞(41)において発現されている。生殖細胞におけるSu(fu)のmRNAの発現は、Patchedと相同性のある第二の脊椎動物HH結合タンパク質であるPatched2のmRNA(55)、及び脊椎動物Fuホモログ(55)のmRNAの発現と重複していた。さらに、Gli及びGli3の双方は、発育中の精母細胞において発現されており(56); 総合すると、このデータはこれらの細胞が機能的なHHシグナル伝達系を保持し、Su(fu)はこの系において不可欠な部分であることを示唆する。細胞内でDhhレセプターが3つの仮想的細胞内HHシグナル伝達タンパク質と同一の個所に局在をすることから、セルトリ細胞由来のDhh(41)がPatched2受容体を通じた発育中の生殖細胞に直接影響を与えているという仮説を、さらに支持することになる。Su(fu)は、腸のレイディック細胞、成体の精巢におけるPatched遺伝子の発現部位には見出されない(41、55)。Shh, Ihh, 及びDhhに応答する組織にSu(fu)のmRNAが存在するという事は、同様な伝達因子及び伝達機構が全ての哺乳動物のHHファミリーのメンバーによって利用するという事を示唆する。

#### 【0029】

脊椎動物のHHシグナル伝達におけるhSu(fu)の役割に一致して、培養細胞における共発現されたhSu(fu)とhGli免疫組織的な局在により、2つのタンパク質がお互いに微小管上に共局在していることが明らかになった(Fig. 5A及び、データは示さず)。これらの結果はショウジョウバエHhシグナル伝達因子Ci及びFuの細胞内局在と相関し、それらの微小管との相互作用はキネシン関連タンパク質Costal2(57, 58)によって仲介されている。Hh非存在下において、Costal2はシグナル伝達装置(FuはdSu(fu)及びCiと複合体を形成して)を細胞骨格に繋ぎとめることによりシグナル伝達を抑制していると考えられる。脊椎動物のCostal2に対するホモログは未だに記述されてない。

関連する生化学的実験によると(実施例を参照のこと)、2通りの異なる系においてhGliが物理的にhSu(fu)と相互作用することが見出された。まず一つに、エピトプタグを付与したhSu(fu)に対する抗体もしくはエピトプタグを付与したhGliを用いることで、hSu(fu)及びhGliを共形質転換させたNIH-3T3細胞から共免疫沈降させることができた(Fig. 5B)。二つには、インビトロにおいて翻訳された<sup>35</sup>S標識化hGliは、特異的にGST融合hSu(fu)タンパク質とインビトロ結合分析において結合することが示された(Fig. 5C)。これらのデータはショウジョウバエCiとdSu(fu)の間の類似の相互作用を証明したMonnierと同僚(29)のものを補完する。酵母のTwoハイブリッドシステムを用いることで、セリントレオニンキナーゼであるFuの制御ドメインであると予想されるカルボキシ末端がdSu(fu)と直接的に、Ciと間接的に結合し三分子複合体を形成している(29)ことがわかる。後者の結合はdSu(fu)がリンカー分子として機能することに依存している。結果として、Fuの活性化がdSu(fu)とCiとの分離の引き金となり、それはおそらくdSu(fu)におけるPEST配列のリン酸化その結果として生じるdSu(fu)の分解を通じて行われているというモデルが得られた。内在性のShh受容体を発現している形質転換体NIH-3T3細胞(Marigo等, 1996)からの共免疫沈降することにより、

10

20

30

40

50

S h hの存在下にてh S u ( f u )とh G l iとの相互作用の僅かな減少しかここにおいて見られていない(実施例を参照のこと)。しかしながら、ここにおいて免疫組織化学的なデータがh S u ( f u )はh G l iと核内において共局在し得る( F i g . 5 A参照)ことを示しているため、G l iからS u ( f u )が分離することは、S h hに誘導されるG l iの活性化に対して必要ではないようである。その代わりに、シグナル伝達は、S u ( f u )の翻訳後修飾(リン酸化)により伝達され得るのである。

#### 【0030】

ジンクフィンガー転写因子であるG l iのさらなる2つのメンバーのG l i 2及びG l i 3がh S u ( f u )と相互作用する能力は、ここにおいて決定された(実施例参照のこと)。3つのG l iタンパク質は、それらの異なる発現パターン(59)、及びG l i 2、G l i 3変異体マウスの観察された表現型(60-63)により証拠づけられるように、H h媒介の発育過程において、特異的及び重複的な機能を補足的に発揮しているように見える。m G l i 2及びh G l i 3はG S T-h S u ( f u )タンパク質と我々のインヴィトロにおける結合解析において特異的に結合していることが分かった( F i g . 5 C)。従って、我々のデータはG l iタンパク質ファミリーの全てのメンバーの活性制御における、h S u ( f u )の役割を支持する。

これまでの遺伝学的な研究により、d S u ( f u )とC iの相互作用がC iの活性型の転写活性因子を阻害するように機能することができ(26,29)、その阻害はH hシグナルを受容することにより解除されると考えられる。ここにおいて、h S u ( f u )がG l iの転写活性化レポーターアッセイにおいてh G l i活性を阻害し得るかどうかが、結論づけられた(24)。h G l iがレポーターの発現を100倍近く活性化することができ、この誘導はh S u ( f u )によって劇的に抑制されることが見出された(実施例及びF i g . 5 D参照)。逆に言うと、共発現されたh G l i非存在下において、h S u ( f u )はレポーターの発現の増加を誘発することも見出された。これらの結果は、G l i活性化の負の内在性制御因子(例えば、S l i m b , C o s t a l 2もしくはP K A)を希釈するような過発現されたh S u ( f u )の能力を示す。この解釈は、細胞の応答を決定する際に、H hシグナル伝達カスケードにおいてC iとd S u ( f u )の間のストイキオメトリカルな比率の重要性を示すショウジョウバエの遺伝学的研究(26)に由来する証拠によって支持される。

#### 【0031】

G l iファミリーメンバーに加えて、h S u ( f u )はそれ自身及びS l i m bの脊椎動物のホモログと結合することが見出された( F i g . 5 C)。前者の相互作用は、酵母2ハイブリッドスクリーンにおいて独立に同定されたもので、そのスクリーニングに用いたヒト精巢のライブラリーに由来するh S u ( f u )はベイトとして用いた全長のh S u ( f u )タンパク質の結合相手として単離された(データは示さず)。関連する共免疫沈降実験において、m S l i m bはh G l iとの物理的な複合体中にも見出される事が分かった。この相互作用は間接的であり、リンカータンパク質としての内在性のh S u ( f u )を利用している。H I V-1タンパク質であるV p uは T r C pと関連していることが示され、明らかにヒトS l i m bの選択特異的スプライシング型(33)、及び同様な方法によるC D 4である(34)。h S u ( f u )の二量体化により、S u ( f u )G l i活性を制御する異なるエフェクタータンパク質を引き合わせる事を可能ならしめ、一方、S l i m bとの結合は、S u ( f u )たG l iの分解を制御することを可能にしている。S l i m bは、Fボックス及び幾つかのW D 40リピートドメイン(64-66)を含み、それぞれユビキチン結合E 2タンパク質分解複合体の構成因子に対する結合領域、(34,65)及びタンパク質-タンパク質相互作用領域として(64)機能している。ショウジョウバエでは、S l i m bの欠失が、細胞におけるインタクトなC iの自己蓄積(26,31)、活性なH hシグナルの示唆的な効果を誘導する。さらに、ショウジョウバエのT G F ホモログであるdeceptaplegic( d p p )及びW n tファミリーメンバーであるwingless( w g )、これらは二つのH h応答遺伝子であるが、そのような変異体の前-後軸において異所的に発現されている(31,33)。データを総合すると、S l i m bは通常C i/G l i

10

20

30

40

50

を分解を促進することにより、リガンドの非存在下、Hhシグナルを抑えるように機能することができることが示される。我々の知見は、hSu(fu)及び/又はhGliの細胞内活性を制御することに脊椎動物のSlimbが潜在的に関与していることに一致する。しかしながら、これに関連してSlimbの正確な役割において明確にすべきことが残されている。Ciとは異なり、Gliの活性化/抑制化機能の制御においてタンパク質分解に対する役割は報告されていなかった。Yoon及び共同実験者は(67)、Gliが転写抑制因子に変換するような条件を見出すことができなかった。本発明者は、培養細胞において過発現されたhGliの異なるカルボキシ末端欠失切断産物を見出したが、これらの切断産物がShhによって制御されていること示すことができなかった。にもかかわらず、Slimb/Gli/Su(fu)の相互作用が、ある程度Gli及びSu(fu)の定常状態レベルを維持し、直接的にHHシグナル伝達には関与していない可能性もある。

10

## 【0032】

要するに、ここに示されるhSu(fu)とGliファミリーメンバーとの生化学的相互作用は、Gli活性アッセイから得られる結果と共に、ショウジョウバエにおける遺伝学的研究を補完し、Su(fu)はGliの直接的な負の制御因子であることを示すものである。これらの研究は、HHファミリーメンバーに対する細胞内応答を決定するにあたり、様々なシグナル伝達因子の相対的な細胞内濃度の重要性をさらに強調するものである。これらの結果および腫瘍サプレッサー遺伝子座として知られている染色体上へhSu(fu)が局在しているという観点から、hSu(fu)における突然変異が発ガン過程において重要な役割を担っている可能性がある。ここでの発見は、Hhシグナル伝達構成因子及び機構の保存性(いくつかの顕著な相違はあるものの)をショウジョウバエからヒトへと拡張するものである。

20

## 【0033】

## A. 全長hSu(fu)ポリペプチド

本発明は、本出願においてhSu(fu)(UNQ650)と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離された核酸配列を提供する。特に、以下に示す実施例においてさらに詳細に開示するように、hSu(fu)ポリペプチドをコードするcDNAが同定され、単離された。異なる発現ラウンドで生成されたタンパク質は異なるPRO番号が与えられるが、UNQ番号は任意の与えられたDNA及びコードされたタンパク質に独特であり変化しない。しかしながら、単純化のために、本明細書では、DNA33455-1548によりコードされるタンパク質並びに前述のhSu(fu)定義に含まれる更なる天然相同体及び変異体は、それらの起源又は調製方法に関わらず「hSu(fu)」と呼ばれる。

30

WU-BLAST-2配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、ヒトhSu(fu)の全長配列(Fig 2に示す(配列番号:2))の一部がショウジョウバエメラノガスターのfusedタンパク質のサプレッサーに対するヒトホモログ(S55695)の一部と39%のアミノ酸配列同一性を有することが見出された。従って、現在では、本出願で開示されるヒトhSu(fu)がヘッジホッグシグナル伝達カスケードの新たに同定されたメンバーであり、ショウジョウバエfusedタンパク質のサプレッサーポリペプチドの典型的な活性を有することができると考えられている。

40

## 【0034】

## B. hSu(fu)変異体

ここに記載した全長天然配列hSu(fu)に加えて、hSu(fu)変異体も調製できると考えられる。hSu(fu)変異体は、公知のhSu(fu)DNAに適当なヌクレオチド変化を導入することにより、及び/又は所望のhSu(fu)ポリペプチドを合成することにより調製できる。当業者は、適切なアミノ酸変化が、グリコシル化部位の番号を変えたりもしくは膜固着特性を変更するようなhSu(fu)ポリペプチドの翻訳後プロセスを変えうることを理解するであろう。

天然全長配列hSu(fu)又はここに記載したhSu(fu)の種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第5,364,934号に記載されている保存的及び非保存的変異に

50

ついで任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列 h S u ( f u ) と比較して h S u ( f u ) のアミノ酸配列が変化する h S u ( f u ) をコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも1つのアミノ酸の h S u ( f u ) 一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。いずれのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、h S u ( f u ) の配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸を類似した構造及び/又は化学特性を持つ他のアミノ酸で置換した結果、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては1から5のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、全長配列又は成熟天然配列により示される活性に対して、得られる変異体を試験することにより決定される。

#### 【0035】

変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びPCR突然変異誘発等のこの分野で周知の技術を用いてなすことができる。部位特異的突然変異誘発 [Carter等, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [Wells等, Gene, 34: 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発 [Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)] 又は他のこの分野で知られた技術をクローニングしたDNAに実施して、h S u ( f u ) 変異体DNAを作成することもできる。

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。中でも好ましいスキャンニングアミノ酸は、比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham 及びWells,

Science, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

#### 【0036】

C . h S u ( f u ) の修飾

h S u ( f u ) の共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一型は、h S u ( f u ) の標的とするアミノ酸残基を、h S u ( f u ) の選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることである。二官能性試薬での誘導体化が、例えばh S u ( f u ) を水不溶性支持体マトリクスあるいは抗h S u ( f u ) 抗体の精製方法又はその逆で用いるための表面に架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤は、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、3, 3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬を含む。

他の修飾は、グルタミル及びアスパラギン残基の各々対応するグルタミル及びアスパラギンへの脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の -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、及び任

10

20

30

40

50

意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

本発明の範囲内に含まれるh S u ( f u )ポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンを変更することを含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、H S U ( F U )に見出される1つ又は複数の炭水化物部分の欠失(存在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び/又は酵素的手段によるグリコシル化の削除による)、及び/又はh S u ( f u )に存在しない1つ又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。さらに、この語句は、存在する種々の炭水化物部分の性質及び比率の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化の定性的変化を含む。

【 0 0 3 7 】

h S u ( f u )ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列の変更によって達成されうる。この変更は、例えば、h S u ( f u )への一又は複数のセリン又はスレオニン残基の付加、又はこれによる置換によってもなされる(O-結合グリコシル化部位の場合)。場合によっては、h S u ( f u )アミノ酸配列はDNAレベルでの変化によって、特に所望のアミノ酸に翻訳されるコドンが産生されるように予め選んだ塩基でh S u ( f u )ポリペプチドをコードしているDNAを突然変異させることによって変更される。h S u ( f u )ポリペプチド上の炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、ポリペプチドへのグリコシドの化学的又は酵素的結合による。これらの方法は1987年9月11日公開の国際特許出願第W0 87/05330号及びAplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp259-306 (1981)に記載されている。

10

h S u ( f u )ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的あるいはグリコシル化の標的となるアミノ酸残基をコードするコドンの突然変異的置換によりなされる。例えば、化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, Arch. Biochem Biophys., 259:52 (1987)及びEdge等, Anal. Biochem., 118:131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的開裂は、Thotakura等, Meth. Enzymol., 138:350 (1987)に記載されているように種々のエンド-及びエキソ-グリコシダーゼを使用して達成することができる。

20

【 0 0 3 8 】

h S u ( f u )の共有結合的修飾の他の型は、h S u ( f u )ポリペプチドの、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール(P E G)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つへの、米国特許第4,640,835号;第4,496,689号;第4,301,144号;第4,670,417号;第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。

30

また、本発明のh S u ( f u )は、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したh S u ( f u )を含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。

【 0 0 3 9 】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗-タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとh S u ( f u )との融合を含む。エピトープタグは、一般的にはh S u ( f u )のアミノ-又はカルボキシル-末端に位置する。このようなh S u ( f u )のエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってh S u ( f u )を容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン(poly-his)又はポリ-ヒスチジン-グリシン(poly-his-gly)タグ;flu HAタグポリペプチド及びその抗体1 2 C A 5 [Field等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)];c-mycタグ及びそれに対する8 F 9、3 C 7、6 E 1 0、G 4、B 7及び9 E 1 0抗体[Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)];及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD)タグ及びその抗体[Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、Flag-ペプチド[Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)];K T 3エピトープペプチド[Martin等, Science, 255:192-194 (1992)];-チューブリンエピト-

40

50

プペプチド [ Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991) ] ; 及び T 7 遺伝子 10 タンパク質プペプチドタグ [ Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990) ] を含む。

これに換わる実施態様では、キメラ分子は h S u ( f u ) の免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態 ( 「イムノアドヘシン」とも呼ばれる ) については、そのような融合体は I g G 分子の F c 領域であり得る。I g 融合体は、好ましくは I g 分子内の少なくとも 1 つの変領域に換えて h S u ( f u ) ポリペプチドの可溶化 ( 膜貫通ドメイン欠失又は不活性化 ) 形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、I g G 分子のヒンジ、C H 2 及び C H 3、又はヒンジ、C H 1、C H 2 及び C H 3 領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5,428,130号を参照のこと。

10

#### 【 0 0 4 0 】

##### D . h S u ( f u ) の調製

以下の説明は、主として、h S u ( f u ) 核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することにより特定の h S u ( f u ) を生産する方法に関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いて h S u ( f u ) を調製することはできると考えられる。例えば、h S u ( f u ) 配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい [ 例えば、Stewart等, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969) ; Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963) 参照 ]。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機 ( Foster City, CA ) を用いて、製造者の指示により実施してもよい。h S u ( f u ) の種々の部分を、別々に化学的に合成し、化学的又は酵素的な方法を用いて結合させて全長 h S u ( f u ) を生産してもよい。

20

#### 【 0 0 4 1 】

##### 1 . h S u ( f u ) をコードする DNA の単離

h S u ( f u ) をコードする DNA は、h S u ( f u ) m R N A を保有してそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製された c D N A ライブラリから得ることができる。従って、ヒト h S u ( f u ) DNA は、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製された c D N A ライブラリから簡便に得ることができる。また h S u ( f u ) コード化遺伝子は、ゲノムライブラリから又はオリゴヌクレオチド合成により得ることもできる。

30

ライブラリは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計された h S u ( f u ) に対する抗体又は少なくとも約 2 0 - 8 0 塩基のオリゴヌクレオチド等の)プローブによってスクリーニングできる。選択されたプローブによる c D N A 又はゲノムライブラリのスクリーニングは、例えば Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。h S u ( f u ) をコードする遺伝子を単離する他の方法は P C R 法を使用するものである [ Sambrook 等, 上掲 ; Dieffenbach 等, PCR Primer : A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995) ]。

40

#### 【 0 0 4 2 】

下記の実施例は、c D N A ライブラリのスクリーニング技術を記載している。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、十分な長さで、疑陽性が最小化されるよう十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリ内の DNA とのハイブリッド形成時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、<sup>32</sup>P 標識された A T P のような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用が含まれる。中程度の緊縮性及び高度の緊縮性を含むハイブリッド形成条件は、上掲の Sambrook 等に与えられている。

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列は、GenBank等の公共

50

データベース又は個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の一定の領域内又は全長に渡っての(アミノ酸又は核酸レベルのいずれかでの)配列同一性は、相同性測定のための種々のアルゴリズムを用いるALIGN、DNAstar、BLAST、BLAST-2及びINTERNHERIT等のコンピュータソフトウェアプログラムを用いた配列アラインメントを通して決定することができる。

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、cDNAに逆転写されなかったmRNAの生成中間体及び前駆体を検出する上掲のSambrook等に記述されているような従来のプライマー伸張法を使用することにより得られる。

#### 【0043】

##### 2. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したhSu(fu)生成のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler編 (IRL Press, 1991)及びSambrook等、上掲に見出すことができる。

形質移入の方法、例えば、CaPO<sub>4</sub>及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、原核生物又は実質的な細胞壁障壁を含む他の細胞に対して用いられる。アグロバクテリウム・トウメファシエンスによる感染が、Shaw等、Gene, 23:315 (1983)及び1989年6月29日公開のWO 89/05859に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が好ましい。哺乳動物細胞の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。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van

Solingen等、J. Bact., 130:946 (1977)及びHsiao等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、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、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown等、Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)及びMansour等、Nature, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

#### 【0044】

ここに記載のベクターにおいてDNAをクローン化あるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294(ATCC31,446);大腸菌X1776(ATCC31,537);大腸菌株W3110(ATCC27,325)及びK5772(ATCC53,635)である。

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、hSu(fu)をコードするベクターのための適切なクローン化又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。

hSu(fu)の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエS2及びスポドスペラSf9等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)及びCOS細胞を含む。より詳細な例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓

10

20

30

40

50

C V 1 株 (COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株 (293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); チャイニーズハムスター卵巣細胞ノ-D H F R (CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8065); 及びマウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562, ATCC CCL51)を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

#### 【 0 0 4 5 】

##### 3 . 複製可能なベクターの選択及び使用

h S u ( f u ) をコードする核酸(例えば、c D N A 又はゲノム D N A )は、クローニング ( D N A の増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、D N A はこの分野で周知の技術を用いて適当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、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカータンパク質、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

h S u ( f u ) は直接組換え的に生産されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるh S u ( f u ) -コード化D N A の一部である。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、l p p あるいは熱安定なエンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、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(酵母菌属(Saccharomyces)及びクイロマイシス(Kluyveromyces) 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリーダー、白体(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行のE P 362,179)、又は1990年11月15日に公開された国際特許出願第WO 90/13646号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は、同一あるいは関連する種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列、ウイルス分泌リーダーのような他の哺乳動物のシグナル配列をタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

#### 【 0 0 4 6 】

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母菌及びウイルスに対してよく知られている。プラスミドp B R 3 2 2 に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 : プラスミド開始点は酵母菌に適しており、様々なウイルス開始点(S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V 又はB P V)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

#### 【 0 0 4 7 】

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選択マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)例えばバシリに対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

哺乳動物細胞に適当な選択マーカーの他の例は、D H F R あるいはチミジンキナーゼのように、h S u ( f u ) 核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型D H F R を用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub 等により、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたD

10

20

30

40

50

HFR活性に欠陥のあるCHO株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母菌プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である[Stinchcomb等, Nature, 282:39(1979); Kingman等, Gene, 7:141(1979); Tschemper等, Gene, 10:157(1980)]。trp1遺伝子は、例えば、ATCC第44076号あるいはPEP4-1のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する[Jones, Genetics, 85:12(1977)]。

#### 【0048】

発現及びクローニングベクターは、通常、hSu(fu)核酸配列に作用可能に結合し、mRNA合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識される好適なプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系[Chang等, Nature, 275:615(1978); Goeddel等, 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); EP 36,776]、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーター[deBoer等, Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 80:21-25(1983)]を含む。細菌系で使用するプロモーターもまたhSu(fu)をコードするDNAと作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ(S.D.)配列を有する。

酵母菌宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ[Hitzeman等, J. Biol. Chem., 255:2073(1980)]又は他の糖分解酵素[Hess等, 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-ホスホグリセラートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

#### 【0049】

他の酵母菌プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝と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、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターはEP 73,657に更に記載されている。

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのhSu(fu)転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス(1989年7月5日公開のUK 2,211,504)、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、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型肝炎ウイルス及びサルウイルス40(SV40)のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物から得られるプロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

#### 【0050】

より高等の真核生物によるhSu(fu)をコードしているDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス作用要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、hSu(fu)コード化配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

また真核生物宿主細胞(酵母菌、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、hSu(fu)をコードしているmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養でのhSu(fu)の合成に適応化するのに適切なさらに他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei等, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060; 及びEP 117,058に記載されている。

#### 【0051】

##### 4. 遺伝子増幅/発現の検出

遺伝子の増幅及び/又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンプロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンプロット法 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、ドットプロット法(DNA分析)、又はインサイトハイブリッド形成法によって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。ついで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果二本鎖の表面での形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び/又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列hSu(fu)ポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はhSu(fu)DNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

#### 【0052】

##### 5. ポリペプチドの精製

hSu(fu)の形態は、培地又は宿主細胞の溶解液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-X100)又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。hSu(fu)の発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

hSu(fu)を、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAEによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過；IgGのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラム；及びhSu(fu)のエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutcher, *Methodes in Enzymology*, 182 (1990)；Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産されるhSu(fu)の性質に依存する。

#### 【0053】

##### E. hSu(fu)の用途

hSu(fu)をコードする核酸配列(又はそれらの補体)は、ハイブリッド形成プローブとしての使用を含む分子生物学の分野において、染色体及び遺伝子マッピングにおいて、及びアンチセンスRNA及びDNAの生成において種々の用途を有している。また、h

10

20

30

40

50

S u ( f u ) 核酸は、ここに記載される組み換え技術による h S u ( f u ) ポリペプチドの調製にも有用であろう。

全長天然配列 h S u ( f u ) 遺伝子 ( 配列番号 : 1 )、又はその一部は、全長遺伝子の単離又は F i g 1 ( 配列番号 : 1 ) に開示された h S u ( f u ) 配列に対して所望の配列同一性を持つ更に他の遺伝子 ( 例えば、h S u ( f u ) の天然発生変異体又は他の種からの h S u ( f u ) をコードするもの ) の単離のための c D N A ライブラリ用のハイブリッド形成プローブとして使用できる。場合によっては、プローブの長さは約 20 ~ 約 50 塩基である。ハイブリッド形成プローブは、配列番号 : 1 の核酸配列から、又は天然配列 h S u ( f u ) のプロモーター、エンハンサー成分及びイントロンを含むゲノム配列から誘導され得る。例えば、スクリーニング法は、h S u ( f u ) 遺伝子のコード化領域を周知の D N A 配列を用いて単離して約 40 塩基の選択されたプローブを合成することを含む。ハイブリッド形成プローブは、<sup>32</sup>P 又は <sup>35</sup>S 等の放射性ヌクレオチド、又はアビジン/ビオチン結合系を介してプローブに結合したアルカリホスファターゼ等の酵素標識を含む種々の標識で標識されうる。本発明の h S u ( f u ) 遺伝子に相補的な配列を有する標識されたプローブは、ヒト c D N A、ゲノム D N A 又は m R N A のライブラリーをスクリーニングし、それらのライブラリーの何れのメンバーがプローブにハイブリッド形成するかを決定するのに使用できる。ハイブリッド形成技術は、以下の実施例において更に詳細に記載する。

10

また、プローブは、P C R 技術に用いて、密接に関連した h S u ( f u ) 配列の同定のための配列のプールを作成することができる。

20

#### 【 0 0 5 4 】

また、h S u ( f u ) をコードする核酸配列は、その h S u ( f u ) をコードする遺伝子のマッピングのため、及び遺伝子疾患を持つ個体の遺伝子分析のためのハイブリッド形成プローブの作成にも用いることができる。ここに提供される核酸配列は、インサイツハイブリッド形成、既知の染色体マーカーに対する結合分析、及びライブラリーでのハイブリッド形成スクリーニング等の周知の技術を用いて、染色体及び染色体の特定領域にマッピングすることができる。

本発明は、H h 関連腫瘍、好ましくは h S u ( f u ) に関連するものを検出するために使用することができる。異常な H H シグナル伝達を伴うことが疑われる腫瘍を持つ患者からの D N A について、h S u ( f u ) 遺伝子中の発癌性突然変異の有無を分析する。散発性腫瘍の遺伝的特徴付けには、一般に、簡便には細胞診試料を用いた腫瘍細胞 D N A 又は R N A の分析が必要となる。ここに提示した正常な配列と比較して、核酸について、発癌性突然変異の有無をスクリーニングする。H h シグナル伝達の変化を伴う散発性腫瘍には、基底細胞癌、メラノーマ、扁平上皮癌、乳癌、移行膀胱細胞癌、髄膜腫、心臓及び卵巣の線維腫、肺、大腸、卵巣、腎臓及び食道癌、及び多の腸の癌が含まれる。

30

ここに教示するものを含み、ゲノム D N A 配列を分析するための多くの方法が利用できる。多量の D N A が利用できる場合にはゲノム D N A を直接用いる。あるいは、対象領域を適当なベクター中にクローニングし、分析のために十分な量になるように増殖させ、あるいはポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) のような一般的な方法により増幅させることができる。異常な h S u ( f u ) タンパク質の有無についての腫瘍細胞の分析は、以下に検討するイムノアッセイにより実施することができる。

40

#### 【 0 0 5 5 】

h S u ( f u ) のコード配列が他のタンパク質に結合するタンパク質をコードするときは ( 例、h S u ( f u ) がレセプターである場合 )、h S u ( f u ) は結合相互作用に關与する他のタンパク質又は分子を同定するアッセイにおいて使用することができる。このような方法により、レセプター/リガンド結合相互作用のインヒビターを同定することができる。このような結合相互作用に關与するタンパク質はまた結合相互作用のペプチドもしくは小分子インヒビター又はアゴニストをスクリーニングするために使用することもできる。また、レセプター h S u ( f u ) は相関するリガンド ( 類 ) を単離するために使用することができる。スクリーニングアッセイは、h S u ( f u ) のレセプター又は天然 h S

50

u ( f u ) の生物活性を模倣するリード化合物を見出すように構築することができる。このようなスクリーニングアッセイには、化学ライブラリの高性能スクリーニングに受け入れられるアッセイが含まれ、小分子薬物候補を同定するためにこれを特に適したものにす。考えられる小分子には、合成の有機もしくは無機化合物が含まれる。アッセイは、当該分野において十分に特徴付けられているタンパク質間結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ及び細胞ベースアッセイを含む様々な形態で実施することができる。

【 0 0 5 6 】

h S u ( f u ) 又はその修飾形態をコードする核酸は、トランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物を産生するのに用いることができ、該動物は順に治療的に有用な試薬の開発とスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物（例えば、マウス又はラット）は、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれたDNAである。一実施態様では、h S u ( f u ) をコードするcDNAを、確立された技術によりh S u ( f u ) をコードするゲノムDNAをクローン化するために使用することができ、ゲノム配列を、h S u ( f u ) をコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を産生するために使用することができる。特にマウス又はラット等のトランスジェニック動物を産生する方法は当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第4,736,866号や第4,870,009号に記述されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサーでのh S u ( f u ) 導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入されたh S u ( f u ) をコードする導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物は、h S u ( f u ) をコードするDNAの増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理的状态に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスター動物として使用できる。発明のこの側面においては、動物を試薬で処理し、導入遺伝子を有する未処理の動物に比べ病状の発病率が低ければ、疾患に対する治療的処置の可能性が示される。

【 0 0 5 7 】

あるいは、h S u ( f u ) の非ヒト相同体は、動物の胚性細胞に導入されたh S u ( f u ) をコードする変更ゲノムDNAと、h S u ( f u ) をコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、h S u ( f u ) をコードする欠陥又は変更遺伝子を有するh S u ( f u ) 「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、h S u ( f u ) をコードするcDNAは、確立された技術に従い、h S u ( f u ) をコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。h S u ( f u ) をコードするゲノムDNAの一部を欠失したり、組み込みを監視するために使用する選択可能なマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングDNA (5' と 3' 末端の両方) を数キロベース含む [ 例えば、相同的組換えベクターについては Thomas and Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) を参照のこと ]。ベクターは胚性幹細胞に (例えば電気穿孔法等によって) 導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する [ 例えば、Li等, *Cell*, 69:915 (1992) 参照 ]。選択された細胞は次に動物 (例えばマウス又はラット) の胚盤胞内に注入され、集合キメラを形成する [ 例えば、Bradley, *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152 参照 ]。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、「ノックアウト」動物を作ると言われる。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、h S u ( f u ) ポリペプチドが不在であることによるある種の病理的状态及び病理的状态の進行に対して防御する能力によって特徴付けられる。

【 0 0 5 8 】

h S u ( f u ) ポリペプチドをコードする核酸はまた遺伝子療法に使用することができる。遺伝子療法の用途では、例えば欠陥遺伝子の置換のために治療的有効量の遺伝子産物の

10

20

30

40

50

インビボ合成を達成するために遺伝子が細胞に導入される。「遺伝子療法」には、持続効果が単一の治療によって達成される一般的な遺伝子療法と、治療的有効量のDNA又はmRNAの一回又は繰り返し投与を含む遺伝子治療剤の投与の双方が含まれる。アンチセンスRNA及びDNAを、ある種の遺伝子のインビボでの発現を阻止するための治療剤として使用することができる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞膜によるその制限された取り込みにより引き起こされるその低細胞内濃度にもかかわらず、阻害剤として作用する細胞中に移入されうることは既に示されている。(Zamecnik等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986])。オリゴヌクレオチドは、例えば負に荷電したホスホジエステル基を無電荷基により置換することにより、その取り込みを亢進するように修飾することができる。

10

一実施態様では、製薬組成物は、遺伝子療法のための腫瘍抑制活性を有するhSu(fu)の非突然変異型をコード化するヌクレオチド配列を含む。当該分野において知られているように、腫瘍又は他の疾患は、細胞が癌抑制遺伝子の双方の機能性コピーを失うか、あるいは欠陥型に突然変異した一又は複数のコピーを有しているときにしばしば進化する。そのような場合、hSu(fu)の機能性コピーを導入すると状態を改善するのに役立つ。

#### 【0059】

生細胞中に核酸を導入するために利用できる様々な技術がある。その技術は、核酸がインビトロで培養細胞中に移されるか、意図した宿主の細胞中にインビボで移されるかどうかによって変わる。哺乳動物細胞へのインビトロでの核酸の移送に好適な技術には、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、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法等々が含まれる。現在好適なインビボでの遺伝子移送技術には、ウイルス(典型的にはレトロウイルス)ベクターでの形質移入とウイルスコートタンパク質-リボソーム媒介形質移入(Dzau等, Trends in Biotechnology 11:205-210[1993])が含まれる。ある状況では、核酸源に標的細胞をターゲティングする薬剤、例えば細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に対して特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンドを提供することが望ましい。リボソームが用いられる場合、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は、例えば特定の細胞型向けのキャプシドタンパク質又はその断片、サイクリングにおいて内部移行を受けるタンパク質の抗体、細胞内局在化を標的にし細胞内半減期を亢進するタンパク質を標的とする、及び/又は取り込みを容易にするために使用しうる。レセプター媒介エンドサイトーシスの方法は、例えばWu等, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987);及びWagner等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414(1990)に記載されている。遺伝子標識及び遺伝子療法プロトコールのレビューについてはAnderson等, Science 256:808-813 (1992)を参照されたい。

20

30

#### 【0060】

本発明のhSu(fu)ポリペプチドは、製薬的に有用な組成物を調製するための既知の方法で製剤化することができ、それにより、本hSu(fu)産物は製薬的に許容可能な担体ビヒクルと混合して組み合わされる。治療用製剤は、所望の純度を持つ活性成分を、任意の生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Osol, A.編, (1980))と混合することにより、凍結乾燥製剤又は水溶液として調製されて保存される。許容可能な担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、例えばホスファート、シトラート及び他の有機酸のような緩衝液;アスコルビン酸を含む抗酸化剤;低分子量(約10残基以下)のポリペプチド;血清アルブミン、ゼラチン、免疫グロブリンのようなタンパク質;ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジンのようなアミノ酸;グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類及び他の炭水化物;EDTAのようなキレート剤;マンニトール又はソルビトールのような糖アルコール;ナトリウムのような塩形成対イオン;及び/又はトゥイーン(Tween)、プルロニクス(Pluronics)又はPEGのような非イオン性界面活性剤を含む。イ

40

50

ンビボ投与のために使用される製剤は殺菌したものでなければならない。これは、凍結乾燥及び再構成に先だって、又はその後、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

ここに記載する治療用組成物は、一般に、無菌のアクセスポート、例えば、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針が貫通可能なストッパーを備えたバイアルに入れられる。

投与経路は、既知の方法、例えば、静脈内、腹膜内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内、又は病巣内経路での注射又は注入、局所投与、あるいは徐放システムに従う。

本発明の製薬組成物の容量と所望される薬物濃度は考えられる特定の用途に依存して変わりうる。適切な用量と投与経路の決定は通常、医師の技量の範囲内である。動物実験はヒトの治療のために効果的な用量を決定するための信頼のある指針を提供する。有効用量の種間スケリングは、Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi等, 編, Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96のMordenti, J.とChappell, W.「The use of interspecies scaling in toxicokinetics」に記載された原理に従って実施できる。

#### 【0061】

F. 抗hSu(fu)抗体

本発明は、さらに抗hSu(fu)抗体を提供するものである。抗体の例としては、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロ抱合体抗体が含まれる。

1. ポリクローナル抗体

本発明の抗hSu(fu)抗体はポリクローナル抗体を含む。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫化剤、及び所望するのであればアジュバントを、一又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫化剤及び/又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫化剤は、hSu(fu)ポリペプチド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫化剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に抱合させるのが有用である。このような免疫原タンパク質の例は、これらに限られないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びMPL-TDMアジュバント(モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコラート)が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

#### 【0062】

2. モノクローナル抗体

あるいは、抗hSu(fu)抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature, 256:495 (1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用することで調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫化剤により免疫化することで、免疫化剤に特異的に結合する抗体を生成するかあるいは生成可能なリンパ球を誘発する。また、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。

免疫化剤は、典型的にはhSu(fu)ポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「PBL」)が使用され、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。ついで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髓腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髓腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素の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又はHPRT)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプチリン及びチミジンを含み(「HAT培地」)、この物質がHGP

R T 欠乏性細胞の増殖を阻止する。

【 0 0 6 3 】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、H A T 培地のような培地に対して感受性のものである。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髄腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやメリーランド州ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒト異種骨髄腫株化細胞も開示されている [K ozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]。

10

ついてハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、h S u ( f u ) に対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ ( R I A ) や酵素結合免疫測定法 ( E L I S A ) 等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキヤッチャード分析法によって測定することができる。

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを制限希釈工程によりサブクローニングし、標準的な方法で成長させることができる [ Goding, 上掲 ]。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地及びR P M I - 1 6 4 0 培地が含まれる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として成長させることもできる。

20

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテイン A - セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製方法によって培養培地又は腹水液から単離又は精製される。

【 0 0 6 4 】

また、モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作成することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常套的な方法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。

30

ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に配することができる。これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) 細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成などしない骨髄腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより [ US. Patent No. 4,816,567 ; Morrison等, 上掲 ]、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインの代わりに置換するか、本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインの代わりに置換し、キメラ性二価抗体を産生することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

40

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られてる。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するようにFc領域の任意のポイントで切断される。あるいは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。一価抗体の調製にはインビトロ法がまた適している。抗体の消化による、その断片、特にFab断片の生成は、当該分野において知られている慣用的技術を使用して達成できる。

50

## 【 0 0 6 5 】

## 3 . ヒト化抗体

本発明の抗 h S u ( f u ) 抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片(例えば F v、F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub> あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域(C D R)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の C D R の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンの F v フレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入された C D R もしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全ての C D R 領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全ての F R 領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(F c)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる [ Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992) ]。

10

## 【 0 0 6 6 】

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯動物の C D R 又は C D R 配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンター(winter)及び共同研究者 [ Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536 (1988) ] の方法に従って、齧歯類 C D R 又は C D R 配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかの C D R 残基及び場合によっては幾つかの F R 残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

20

また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリ [ Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 27:381

(1991); Marks等, J. Mol. Biol., 222:581 (1991) ] を含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作成することもできる。また、Cole等及びBoerner等の技術も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる [ Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss. p.77(1985)及びBoerner等, J. Immunol., 147(1):86-95(1991) ]。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。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;同第5,661,016号、及び次の科学文献: Marks等, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg等, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild等, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)に記載されている。

30

40

## 【 0 0 6 7 】

## 4 . 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクロー

50

ナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本発明の場合において、結合特異性の一方はh S u ( f u ) に対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づく [Milstein及びCuello, Nature, 305:537-539 (1983)]。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のWO 93/08829、及びTraunecker等、EMBO J., 10:3655-3656 (1991)に開示されている。

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を免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、C H 2 及びC H 3 領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C H 1)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするDNA、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作成するための更なる詳細については、例えばSuresh等、Methods in Enzymology, 121:210(1986)を参照されたい。

#### 【 0 0 6 8 】

##### 5 . ヘテロ抱合体抗体

ヘテロ抱合抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロ抱合抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため [米国特許第4,676,980号] 及びH I V 感染の治療のために [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089] 提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されているものが含まれる。

#### 【 0 0 6 9 】

##### G . 抗 h S u ( f u ) 抗体の用途

本発明の抗 h S u ( f u ) 抗体は様々な有用性を有している。例えば、抗 h S u ( f u ) 抗体は、h S u ( f u ) の診断アッセイ、例えばその特定細胞、組織、又は血清での発現の検出に用いられる。競合的結合アッセイ、直接又は間接サンドウィッチアッセイ及び不均一又は均一相で行われる免疫沈降アッセイ [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158] 等のこの分野で知られた種々の診断アッセイ技術が使用される。診断アッセイで用いられる抗体は、検出可能な部分で標識される。検出可能な部分は、直接的にか又は間接的に検出可能なシグナルを発生することができる。例えば、検出可能な部分は、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S 又は<sup>125</sup>I等の放射性同位体、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン又はルシフェリン等の蛍光又は化学発光化合物、あるいはアルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ又はセイヨウワサビペルオキシダーゼ等の酵素であってよい。Hunter等 Nature, 144:945 (1962); David等, Biochemistry, 13: 1014 (1974); Pain等, J. Immunol. Meth., 40:219 (1981); 及びNygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982)に記載された方法を含む、抗体を検出可能な部位に抱合するためにこの分野で知られた任意の方法が用いられる。

より好ましくは、異常なh S u ( f u ) タンパク質の有無のための腫瘍細胞の分析はイムノアッセイによって実施することができる。H h 関連腫瘍を疑われる患者から試料を採取する。ここで使用される試料としては、生物学的体液、例えば血液、脳脊髄液、涙、唾液

、リンパ液、透析液等々；器官又は組織培養由来の流体；及び生理組織から抽出した流体が含まれる。該用語にまた含まれるのは、このような流体の誘導体及びフラクションである。皮膚損傷、器官組織断片等々の生検試料が特に興味深い。転移が疑わしい場合には、血液試料が好適となりうる。試料中の細胞の数は一般に少なくとも $10^3$ 、通常は少なくとも $10^4$ 、より通常は少なくとも $10^5$ である。細胞は、固形組織の場合には分離でき、あるいは組織切片を分析してもよい。あるいは細胞の溶解物を調製することができる。

#### 【0070】

診断は多くの方法によって実施することができる。異なる方法は全て発癌性突然変異を有することが疑われる患者の細胞における異常なhSu(fu)の有無を決定する。ここで検討した本発明の組成物と方法を用いることができる。例えば、一般的な方法に従って実施される無傷の細胞又は組織切片の染色を利用することができる。対象の抗体を細胞試料に加え、エピトープへの結合を可能にするのに十分な時間、通常は少なくとも約10分の間、インキュベートする。抗体は放射性同位元素、酵素、蛍光剤、化学発光剤、又は他の直接検出用の標識で標識することができる。あるいは、第二段階の抗体又は試薬を用いてシグナルを増幅させる。このような試薬は当該分野においてよく知られている。例えば、一次抗体は第二段階の試薬として添加される西洋わさびペルオキシダーゼコンジュゲートアビジンを用いて、ビオチンにコンジュゲートさせることができる。最終の検出はペルオキシダーゼの存在下で色彩変化を受ける基質を検出する。抗体結合の有無は、解離細胞のフローサイトメトリー、顕微鏡検査、放射線写真撮影、シンチレーション計数等々を含む様々な方法により決定することができる。

診断の更に他の代替方法は、腫瘍細胞が活性なhSu(fu)タンパク質を分泌（又は細胞死のときに放出）しうる細胞溶解物、上清又は他の流体中における抗体とhSu(fu)の間の結合のインビトロでの検出に依存する。試料又はそのフラクション中のhSu(fu)結合濃度の測定は、ここで検討した様々な特定のアッセイによって達成できる。一般的なサンドイッチ型のアッセイを使用することができる。例えば、サンドイッチアッセイは、最初にhSu(fu)特異的抗体を不溶性表面又は支持体に付着させうる。結合の特定の形式は、それが本発明の試薬と全体的な方法と適合性がある限り、重要ではない。それらはプレートに共有的に又は非共有的に、好ましくは非共有的に結合されうる。不溶性支持体はポリペプチドが結合しうる任意の組成物であり得、それは可溶性物質から容易に分離され、方法全体と適合性等がある。そのような支持体の表面は中実か多孔性であり得、任意の一般的な形状であり得る。レセプターが結合させられる好適な不溶性支持体の例としては、ビーズ、例えば磁性ビーズ、膜及びマイクロタイタープレートが含まれる。これらは典型的にはガラス、プラスチック（例えばポリスチレン）、多糖類、ナイロン又はニトロセルロースである。マイクロタイタープレートは、少量の試薬と試料を使用して、非常に多数のアッセイを同時に行うことができるので、特に好都合である。

抗hSu(fu)抗体はまた組換え細胞培養もしくは天然源からのhSu(fu)のアフィニティー精製に対して有用である。この方法では、hSu(fu)に対する抗体を、当該分野に置いてよく知られた方法を用いてセファデックス樹脂又は濾過紙のような適当な支持体上に固定化する。ついで、固定化した抗体を、精製されるhSu(fu)を含む試料に接触させ、ついで支持体を、固定化抗体に結合するhSu(fu)を除く試料中の実質的に全ての物質を取り除く適当な溶媒で洗浄する。最後に、抗体からhSu(fu)を切り離す他の好適な溶媒で支持体を洗浄する。

#### 【0071】

H．hSu(fu)アンタゴニスト及びアゴニスト

最近、ヒトのヘッジホッグシグナル伝達経路における興味は、発育異常と度重なる皮膚癌により特徴づけられた希な常染色体優性疾患である基底細胞母斑症候群を持つ患者における遺伝した継ぎ接ぎ(patched)遺伝子突然変異の発見によって掻き立てられた。patched遺伝子の体細胞性に獲得した変異が、基底細胞癌、一次性乳癌、髄芽細胞腫及び髄膜種を含む散発性癌において特定されている。継ぎ接ぎは腫瘍抑制剤として作用し、これらの突然変異が継ぎ接ぎ遺伝子産物における機能の喪失を引き起こしていると現在は考えら

10

20

30

40

50

れている。従って、ヘッジホッグ / patchedシグナル伝達経路は腫瘍形成の因子でありうる。増加した細胞成長と腫瘍形成に至る遺伝子改変の検出は臨床医学にとって非常に興味深い。改変した細胞成長に至る特定の変化を特定することは関連した腫瘍の改良された診断と可能な治療法への扉を開ける可能性がある。

本発明の h S u ( f u ) アンタゴニスト及びアゴニスト化合物を生成するのに幾つかの方法を好適に用いることができる。アンタゴニスト分子が細胞内部に標的化でき、変異体 h S u ( f u ) (例えば、腫瘍形成に本質的な、腫瘍抑制機能を喪失した変異体) を作用から阻害又は防止する任意の方法が好適である。例えば、ドミナント変異体等の変異体 h S u ( f u ) を含む競合的阻害剤は、欠陥性又は構成的 h S u ( f u ) を補足して G l i 10  
ネガティブ調節の正常な h S u ( f u ) 機能を回復させ、もって H h シグナル伝達を阻止する。膜貫通輸送に適したサイズ、電荷及び疎水性等の、かかるアンタゴニスト又はアゴニスト分子の更なる特性は、当業者によって容易に決定される。

h S u ( f u ) の模倣物又は他の相同体が同定され評価される場合、細胞を試験化合物に暴露し、ヒト h S u ( f u ) のみに暴露したポジティブ対照、化合物にも天然リガンドにも暴露していないネガティブ対照と比較する。h S u ( f u ) シグナル変調のアンタゴニスト又はアゴニストを同定死評価する場合は、細胞を天然リガンドの存在下で本発明の化合物に暴露し、試験化合物に暴露していない対照と比較する。

本発明のスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングに適用でき、特に、小分子薬剤候補の同定に適している。

#### 【 0 0 7 2 】

##### 1. アンタゴニスト及びアゴニスト分子

正常な h S u ( f u ) タンパク質のアンタゴニストは、不十分な H h シグナル伝達経路活性に特徴付けられる状態、又は H h シグナル伝達の増加が望ましい場合に治療的に投与することができる。ヘッジホッグ生物活性には、胎児の頭、肢、肺、中枢神経系又は中胚葉パターン形成を含む、様々な組織の生成と分化を誘発もしくは変調等する能力が含まれる。増殖はまた多数の組織の H h によって変調される。このような変調はインビトロ、エキソピボ又はインピボの状態で達成することができる。例えば、創傷治癒、骨形成、低増殖性又は過剰増殖性皮膚疾患の治療、分化の誘発は対象のアンタゴニストの投与に影響を受ける。

H h は運動神経誘発活性、神経分化誘発活性又は神経生存促進活性のような神経形成を調節することができる。H h はまた軟骨細胞誘発能力又は精子形成における関与を含む、幹細胞又は胚細胞分化の誘発及び器官形成を調節する。関節炎、例えば骨関節炎、関節リウマチ等々の治療は、h S u ( f u ) アンタゴニストの投与と、続く軟骨細胞及び軟骨形成の誘発により恩恵を受けうる。H h は毛鞘中の細胞の成長を変調することにより毛髪成長を調節することができ、この目的のために h S u ( f u ) アンタゴニストを投与することができる。

H H の投与は、T G F ファミリーのメンバー、骨形成タンパク質、及び線維芽細胞成長因子ファミリーのような二次シグナル伝達分子の発現を誘発するので、h S u ( f u ) のアンタゴニストが同じことをしうる。

多くの神経性疾患がニューロン要素の離散集合の変性に関連しており、アンタゴニストによって治療されうる。特定の疾患には、外傷、卒中から生じる虚血症から生じる損傷、神経系の感染症及びノ又は炎症から生じる損傷、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳失調、及び中枢神経系の慢性免疫疾患、例えば多発性硬化症が含まれる。アンタゴニストはまた末梢神経系の自律神経障害、例えば心臓の横紋筋を神経支配する神経の変性状態から生じる心房心不整脈又は頻脈を治療するのにも有用である。

#### 【 0 0 7 3 】

また興味があるのはインビトロ及びエキソピボでの用途であり、そこでは、特定の細胞培養物、例えば神経前駆細胞に加えられる H h はニューロンとグリアに末期的に分化しうることが予想されもしくは知られている。H h は当該分野で知られているように、適切な培

10

20

30

40

50

地と組み合わせられて、培養中のそのような細胞の再生産を維持する。h S u ( f u ) のアンタゴニストを同様に使用することができる。

本発明の化合物の投与に対してはここで検討されたように様々な方法を使用することができる。

薬物スクリーニングは、異常な細胞における h S u ( f u ) 機能の代替品を提供する薬剤を同定する。腫瘍サプレッサーとしての h S u ( f u ) の役割は、その機能にアゴニズする（又は腫瘍抑制活性を失った突然変異 h S u ( f u ) 型の機能をアンタゴナイズする）薬剤が腫瘍形成プロセスを阻害することを示す。逆に、正常な h S u ( f u ) 機能をアンタゴナイズする薬剤は調節された成長と治癒を刺激することができる。特に興味深いものは、ヒト細胞に対して低毒性の薬剤に対するスクリーニングアッセイである。標識インビトロタンパク質間結合アッセイ、電気泳動度シフトアッセイ、タンパク質結合、酵母ハイブリッド系等のイムノアッセイを含む広範なアッセイをこの目的に対して使用することができる。ここで使用される「薬剤」という用語は所望の生理的機能を変化もしくは模倣する能力を持つ任意の分子、例えばタンパク質又は医薬を記述する。一般に、複数のアッセイ混合物を異なった薬剤濃度で平行して流して、様々な濃度に対する差次的な応答を得る。典型的には、これらの濃度の一つが負の対照、つまりゼロ濃度又は検出レベル以下である。

#### 【 0 0 7 4 】

候補薬剤は無数の化学クラスを包含するが、典型的には有機分子、好ましくは 50 を越え約 2500 ダルトン未満の分子量を有する小有機分子である。候補薬剤はタンパク質との構造的な相互作用、特に水素結合に必要な官能基を含み、典型的には少なくともアミン、カルボニル、ヒドロキシルもしくはカルボキシル基、好ましくは少なくとも 2 つの官能化学基を含む。候補薬剤はしばしば環状炭素又は複素環構造及び / 又は芳香族又は多芳香族構造で、一又は複数の上記官能基で置換されているものを含む。候補薬剤はまたペプチド、糖、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、それらの誘導體、構造類似体又は組み合わせを含む生体分子から見出される。

候補薬剤は、合成又は天然の化合物のライブラリを含む広範な供給源から得ることができる。例えば、無作為化オリゴヌクレオチド及びオリゴペプチドの発現を含む無数の手段が、広範な有機化合物及び生体分子の無作為及び定方向合成のために利用できる。あるいは、細菌、真菌、植物及び動物抽出物の形態の天然化合物のライブラリが利用できもしくは直ぐに作り出せる。また、天然又は合成的に作られたライブラリと化合物は通常の化学的、物理的及び生化学的手段によって容易に変更され、コンビナトリアルライブラリを作るのに使用することができる。既知の薬物に、定方向もしくは無作為化学修飾、例えばアシル化、アルキル化、エステル化、アミド化等々を施して構造類似体を作ってもよい。

#### 【 0 0 7 5 】

スクリーニングアッセイが結合アッセイである場合、一又は複数の分子を標識に結合させることができ、標識が検出可能なシグナルを直接的に又は間接的に提供しうる。様々な標識には放射性元素、蛍光剤、化学発光剤、酵素、特異的結合分子、粒子、例えば磁性粒子等々が含まれる。特異的結合分子には、対、例えばビオチンとストレプトアビジン、ジゴキシンと抗ジゴキシン等々が含まれる。特異的結合メンバーに対して、相補的メンバーは、通常は、既知の手順に従って、検出をもたらす分子で標識される。

様々な他の試薬がスクリーニングアッセイにおいて含まれる。これらには、最適なタンパク質間結合塩類を容易にし、及び / 又は非特異的又はバックグラウンド相互作用を低減するために使用される中性タンパク質、例えばアルブミン、洗浄剤等々のような試薬が含まれる。プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗菌剤等々のようなアッセイの効率を改善する試薬を使用してもよい。成分の混合物は、必要な結合をもたらす任意の順序で添加される。インキュベーションは、任意の好適な温度、典型的には 4 と 40 の間で実施される。インキュベーション時間は最適な活性が得られるように選択されるが、また高速の高性能スクリーニングを容易にするために最適化することでも、典型的には 0.1 時間と 1 時間の間とするのが十分であろう。

所望の薬理活性を有する化合物は、Hh経路機能又はhSu(fu)の不足に帰する癌又は発達異常の治療のために宿主に生理的に許容可能な担体にて投与される。

hSu(fu)は、転写活性化因子Gliの負の調節に参与しているHhのずっと下流のモジュレーターであるので、本発明の候補分子は非常に多くの状況、例えば上流の経路分子に欠陥があり腫瘍形成に至るか、又は不十分な成長及び治癒に至るときに、有用であるという利点を有する。本発明の化合物はHh経路の重要な転写工程に影響を及ぼすことによってこれらの妨害と欠陥を克服することができる。従って、本発明の化合物は、創傷治癒、加齢、腫瘍形成等々におけるヘッジホッグ経路機能を亢進（又はHh経路の上流の欠陥を解消する）ために使用することができる。ここで検討したように、薬剤は、様々な形で、経口的に、局所的に、非経口的に、例えば皮下的に、腹腔内に、ウィルス感染により、血管内等々に投与することができる。

10

#### 【0076】

hSu(fu)シグナル伝達のアンタゴニスト及び/又はアゴニストをスクリーニングするために、アッセイ混合物を、候補となる製剤の存在下であるが、hSu(fu)が参照活性でヘッジホッグシグナル伝達を誘発する条件下でインキュベートする。混合物成分は、必要なヘッジホッグ活性を与えるために任意の順序で添加できる。インキュベーションは、最適な結合を促進する任意の温度、典型的には4 から40、より通常は15 から40 で実施する。インキュベーション時間も同様に最適結合のために選択されるが、迅速で高スループットのスクリーニングを促進するために最小化され、典型的には約0.1から10時間、好ましくは5時間未満、より好ましくは2時間未満である。インキュベーションの後、候補製剤のhSu(fu)シグナル伝達に対する効果を任意の便利な方法で決定する。無細胞結合型アッセイでは、結合及び非結合成分を分離するための分離工程がしばしば用いられる。分離は、例えば、沈殿（例えばTCA沈殿、免疫沈降など）、固定化（例えば、固体基体上）によってなされ、ついで洗浄される。結合したタンパク質は、それに結合した検出可能な標識により、例えば放射活性放出、光学又は電子密度を測定することにより、あるいは、例えば抗体抱合を用いて間接的な検出により検出される。

20

例えば、hSu(fu)アンタゴニスト及び/又はアゴニストに適したスクリーニング方法は、hSu(fu)発現組織における候補アンタゴニスト及び/又はアゴニストの存在下又は不存在下でのインサイツハイブリッド形成の比較、並びにhSu(fu)変調細胞成長の不存在の確認を含む。このようなhSu(fu)結合リガンドを同定するために、hSu(fu)を細胞表面で発現させ、合成候補化合物又は（例えば、血清又は細胞などの内因性供給源からの）天然に生じる化合物のライブラリのスクリーニングに用いることができる。

30

#### 【0077】

hSu(fu)のタンパク質-タンパク質相互作用に影響する好適な分子及びその結合タンパク質は、後者の断片又は相互作用及び正しい複合体形成を阻害する小分子、例えばペプチド模倣物を含む。そのような小分子は、通常10K分子量未満であり、細胞に等価しやすいので治療薬として好適であり、種々の細胞機構による分解を受けにくく、タンパク質のように免疫を生じやしない。小分子は、これらに限られないが、合成有機又は無機化合物を含む。多くの製薬会社が、そのような分子のライブラリを有しており、それは本発明のアッセイを用いて便利にスクリーニングできる。非限定的な例は、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、グリコペプチド、糖脂質、多糖類、オリゴ糖、核酸、生物有機分子、ペプチド模倣物、薬理的試薬、及びそれらの代謝物、転写及び翻訳制御配列等を含む。

40

hSu(fu)に結合する分子の同定に好ましい技術は、アッセイ用プレートのウェルなどの固相に結合したキメラ基質（例えば、エピトープタグhSu(fu)又はhSu(fu)イムノアドヘシン）を利用する。場合によっては標識された（例えば放射性標識された）候補分子の、固定化レセプターへの結合が測定できる。あるいは、Gliの活性化についての競合が測定できる。アンタゴニスト及び/又はアゴニストのスクリーニングにお

50

いて、h S u ( f u ) は h S u ( f u ) 基質に暴露され、ついで推定アンタゴニスト及び / 又はアゴニスト、又は h S u ( f u ) 結合タンパク質及びアンタゴニスト及び / 又はアゴニストが同時に添加され、アンタゴニスト及び / 又はアゴニストの h S u ( f u ) 活性化を阻止する能力が評価される。

【 0 0 7 8 】

2. 検出アッセイ

h S u ( f u ) ポリペプチドは、h S u ( f u ) ヘッジホッグシグナル伝達を変調させる治療的活性薬のためのリード化合物を同定するアッセイにおいて有用である。特に、腫瘍成長を生じる欠陥性 h S u ( f u ) の場合には、h S u ( f u ) シグナル伝達複合体の生成を防止するか又は h S u ( f u ) 変調ヘッジホッグシグナル伝達を防止又は減弱し ( 例 10  
例えば、h S u ( f u ) 自身又は基質に結合し ) - よって G l i 活性をダウンレギュレーションする - リード化合物が簡便に同定できる。特に、候補化合物を、G l i への結合と G l i のダウンレギュレーションに対する活性でスクリーニングすることができる。このような候補分子は G l i との結合について正常な h S u ( f u ) と競合すべきで、G l i 結合に対する h S u ( f u ) の破壊を測定するアッセイで容易に同定することができる。この分野で知られた種々の方法が、本発明の h S u ( f u ) タンパク質の活性阻害の同定、評価又は検定に使用できる。

【 0 0 7 9 】

( a ) 生化学的検出技術

生化学的分析技術は種々の技術によって評価できる。本発明で使用できる一つの典型的なアッセイ混合物は、h S u ( f u ) 及び通常は h S u ( f u ) に付随するタンパク質 ( 例 20  
例えば G l i ) を、通常は単離された、部分的に純粋又は純粋な形態で含有する。これらの成分の一方又は両方は、例えばアッセイ条件下でタンパク質 - タンパク質結合を提供又は促進し、安定性を向上させる他のペプチド又はポリペプチドに融合してよい。さらに、成分の一方は、通常検出可能な標識を含むかそれに結合している。標識は、放射活性、蛍光、光学又は電子密度等の測定による直接検出、あるいはエピトープタグ、酵素等の間接的検出を提供する。アッセイ混合物は候補製薬剤をさらに含み、場合によっては、結合を促進し、安定性を向上させ、非特異的又はバックグラウンド相互作用を減少させ、又はアッセイの効率又は感度を向上させる種々の他の成分、例えば塩、バッファー、担体タンパク質、例えばアルブミン、洗浄剤、プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗微生物剤 30  
等を含む。

以下の検出方法は、シグナル伝達基質分子及び h S u ( f u ) を含む細胞溶解物が本発明の化合物と混合された無細胞系で使用できる。結果は、化合物を添加しない反応混合物で得られた結果と比較する。無細胞系は、天然リガンド又はその同定の知識を必要としない。無細胞系は、化合物を添加しない混合物を必要としない。無細胞系は、天然リガンド又はその同定の知識を必要としない。

【 0 0 8 0 】

( b ) 生物学的検出技術

本発明のアンタゴニスト / アゴニスト化合物の、それ自身がヘッジホッグシグナル伝達を変調する h S u ( f u ) の活性を変調させる能力は、リガンド結合に伴う形態又は機能変化 40  
についての評点化によって測定することができる。当該分野で知られている任意の定性的又は定量的技術を、h S u ( f u ) の制御下で起こる細胞プロセスを観察し測定するために利用できる。また、本発明の化合物の活性は、ヘッジホッグシグナル伝達の機能不全によって生ずるか又はそれに関連する疾患の実験的モデルを用いて動物で評価することもできる。例えば、マウスにおける効果のない D H h ヘッジホッグシグナル伝達は、生存できるが繁殖できないマウスを導く。また、変異体 h f u s e d - D N の効果も、I H h 発現によって調節される腸の発達に影響する。さらに、正しい S H h シグナル伝達は、脊索及び底板、神経管、末端肢構造、脊柱及び肋骨におけるマウス胚成長に重要である。また、不正な S H h シグナル伝達は単眼症に相関している。これらのフェノタイプ特性の何れも、h S u ( f u ) アンタゴニスト及び / 又はアゴニストについてのスクリーニングアッ 50

セイにおいて評価され定量化される。ヘッジホッグの過剰発現に伴う疾患状態は、基底細胞癌に関連するが、不活性なソニックヘッジホッグシグナル伝達は、異常な神経発達に至る。

本発明の基礎は、h S u ( f u ) タンパク質が生理的条件下で G l i 及び / 又は S l i m b タンパク質と複合体を形成するという驚くべき知見である。この知見は、h S u ( f u ) タンパク質が G l i 及び / 又は S l i m b 機能のモジュレーターとなり、H h シグナル経路を変調することを示している。従って、G l i 及び / 又は S l i m b への h S u ( f u ) の結合を阻害又は増強する薬剤の能力を検出するアッセイは、h S u ( f u ) 又は G l i 及び / 又は S l i m b アンタゴニスト又はアゴニストを同定するための薬剤バンク（例えば、化合物ライブラリ、ペプチドライブラリ等々）の容易な高性能スクリーニング法  
10

#### 【 0 0 8 1 】

h S u ( f u ) / G l i 及び / 又は S l i m b 複合体形成又は h S u ( f u ) / G l i 及び / 又は S l i m b 複合体形成を特異的に阻害可能な有効量の薬剤の患者への投与は、h S u ( f u ) 及び / 又は G l i 及び / 又は S l i m b 活性を変調することにより効果的に治療される病理状態（例えば、癌、炎症、リンパ増殖性疾患、自己免疫疾患、神経変性疾患等々）を治療するための治療もしくは予防方法として使用することができる。

結合アッセイは一般に二つの形態のうち一つを取る：固定化 h S u ( f u ) ポリペプチド（類）が標識 G l i 及び / 又は S l i m b ポリペプチド（類）を結合するために使用され  
20

るか、逆に、固定化された G l i 及び / 又は S l i m b ポリペプチド（類）が標識 h S u ( f u ) ポリペプチド類を結合するために使用されうる。あるいは、h S u ( f u ) ポリペプチドが結合して h S u ( f u ) ポリペプチドとホモ二量体を形成することを検出するために結合アッセイを実施することができる；典型的には、標識 h S u ( f u ) ポリペプチドを水性結合条件下で固定化 h S u ( f u ) ポリペプチドと接触させ、結合の度合いを固定化標識 h S u ( f u ) の量を測定することによって決定する。それぞれの場合、標識ポリペプチドを、ポリペプチドが特異的に結合して、添加される薬剤がない状態で h S u ( f u ) の G l i 及び / 又は S l i m b との複合体の形成が可能になる条件下で固定化  
30

ポリペプチドに接触させる。特定の水性条件は一般的な方法に従って実務家によって選択  
30

されうる。一般的な目安としては、次の緩衝水性条件を使用することができる：10 - 250 mM の N a C l 、5 - 50 mM トリス H C l 、p H 5 - 8 で、二価カチオン及び / 又は金属キレート剤及び / 又は非イオン性洗浄剤及び / 又は膜フラクションが任意に添加される。付加、欠失、修飾（例えば p H ）及び置換（例えば N a C l に K C l を置換又は緩衝液の置換）をこれらの基本的条件に加えることができることは当業者により理解されるであろう。h S u ( f u ) ポリペプチド（類）の G l i 及び / 又は S l i m b ポリペプチドに対する特異的結合がコントロール反応において生じる限り、基礎的結合反応条件に修飾を行うことができる。ある実施態様では、アッセイが h S u ( f u ) / h S u ( f u ) ホモ二量体の形成を検出する場合、h S u ( f u ) ポリペプチドの h S u ( f u ) ポリペ  
40

プチドに対する特異的結合がコントロール反応において生じる限り、基礎的結合反応条件に修飾を行うことができる。コントロール反応（薬剤を含まず）において特異的結合を生じない条件は結合アッセイでの使用には適していない。予め決められたポリペプチド配列に結合するポリペプチド配列を同定するアプローチは、その予め決められたポリペプチド配列が融合タンパク質に存在しているいわゆる「ツーハイブリッド (two-hybrid)」系を使用することである（Chien等, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88:9578）。このアプローチは転写活性化因子、酵母 G a 1 4 転写タンパク質の再構成を通して（Fields S 及び Song O (1989) Nature 340:245）インピボでのタンパク質間相互作用を同定する。典型的には、該方法は、D N A - 結合と転写活性化の役割を担う分離可能なドメインからなる酵母 G a 1 4 転写タンパク質の特性に基づく。一つが既知のタンパク質のポリペプチド配列に融合した酵母 G a 1 4 D N A - 結合ドメインからなり、他方が第二のタンパク質のポ  
50

リペプチド配列に融合したGal4活性化ドメインからなる二つのハイブリッドタンパク質をコードするポリヌクレオチドを作成し、酵母宿主細胞中に導入する。二つの融合タンパク質間の分子間結合が、Gal4活性化ドメインを持つGal4 DNA-結合ドメインを再構成し、これがGal4結合部位に作用可能に結合したレポーター遺伝子（例えば、lacZ、HIS3）の転写活性化に至る。典型的には、ツーハイブリッド法は、既知のタンパク質と相互作用をする新規なポリペプチド配列を同定するために使用される（Silver SC及びHunt SW (1993) Mol. Biol. Rep. 17:155; Durfee等 (1993) Genes Devel. 7; 555; Yang等 (1992) Science 257:680; Luban等 (1993) Cell 73: 1067; Hardy等 (1992) Genes Devel. 6; 801; Bartel等 (1993) Biotechniques 14:920; 及びVojtek等(1993) Cell 74:205)。しかし、ツーハイブリッド法の変形法は第二の既知のタンパク質への結合に影響を及ぼす既知のタンパク質の突然変異を同定するために使用されている（Li B及びFields S(1993) FASEB J. 7:957; Lalo等 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90: 5524; Jackson等 (1993) Mol. Cell. Biol. 13; 2899; 及びMadura等(1993) J. Biol. Chem. 268: 12046)。ツーハイブリッド法はまた二つの既知のタンパク質の相互作用している構造ドメイン（Bardwell等 (1993) med. Microbiol. 8: 1177; Chakraborty等 (1992) J. Biol. Chem. 267: 17498; Staudinger等 (1993) J. Biol. Chem. 268: 4608; 及びMilne GT及びWeaver DT (1993) Genes Devel. 7; 1755)又は単一のタンパク質のオリゴマー形成の役割を担うドメイン（Iwabuchi等 (1993) Oncogene 8; 1693; Bogerd等 (1993) J. Virol. 67: 5030)を同定するために使用されている。ツーハイブリッド系の変形系はタンパク質分解酵素のインビボ活性を研究するために使用されている（Dasmahapatra等(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89: 4159)。あるいは、大腸菌/BCCP相互作用的スクリーニング系（Germino等 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A) 90: 933; Guarente L (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A) 90: 1639)を用いて相互作用するタンパク質配列（すなわち、ヘテロ二量体化するか又はより高次のヘテロ多量体を形成するタンパク質配列）を同定することができる。

#### 【0082】

これらのツーハイブリッド法の各々は二つのGal4融合タンパク質間のポジティブな会合に依存し、もって機能性Gal4転写活性化因子を再構成し、これがついでGal4結合部位に作用可能に結合したレポーター遺伝子の転写を誘発する。レポーター遺伝子の転写は、(1)熱量酵素アッセイにより同定できる酵素活性（例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ）としてか、(2)決まった媒質上の向上した細胞成長（例えば、HIS3）として典型的には現れるポジティブな読み出しをつくる。ポジティブな読み出し条件は一般には次の検出可能な条件の一又は複数として特定される：(1)予め決められたレポーター遺伝子の転写速度の増加、(2)典型的には、インビボで容易にアッセイできる酵素のような、予め決められたレポーター遺伝子によりコードされるポリペプチド産物の濃度の増加又は豊富さ、及び/又は(3)逆ツーハイブリッド系を有する生物（例えば酵母）における選択可能な又は他の同定可能なフェノタイプの変化。一般には、ポジティブな読み出し条件を特徴づける選択可能な又は他の同定可能なフェノタイプの変化が生物体に、決まった媒質への選択性成長効果、接合フェノタイプ、特徴ある形態又は発達段階、薬物耐性、又は検出可能な酵素活性（例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ等々）を付与する。転写活性化因子は特異的遺伝子の発現をポジティブに調節するタンパク質である。それらは、特異的DNA配列に結合して特異性を付与する一つの領域と、基本遺伝子発現機構のタンパク質成分に結合する活性化ドメインと称される他の領域の二つの構造ドメインに機能的に分割できる（Ma及びPtashne (1988) Cell 55:443)。これらの二つのドメインは転写活性化因子として機能するためには物理的に連結される必要がある。ツーハイブリッド系は、単離されたDNA結合ドメインを一タンパク質（タンパク質X）につなぎながら、単離された活性化ドメインを他のタンパク質（タンパク質Y）につなぎることにより、この知見を利用する。XとYが有意な程度に相互作用するとき、DNA結合及び活性化ドメインが今度は連結され転写活性化因子の機能が再構成される（Fields及びSong (1989) Nature 340: 245)。酵母宿主株は、再構成された転写活性化

10

20

30

40

50

因子がHIS3又はlacZのような特定のレポーター遺伝子を発現させるように操作され、これがタンパク質間の相互作用の読み出しをもたらす(上掲のField及びSong(1989);上掲のChien等

(1991))。タンパク質間相互作用を監視するためのツーハイブリッド系の一つの利点は物理的に弱いが生理的に重要なタンパク質間相互作用の検出の感度である。しかして、これは、タンパク質間相互作用を検出するための他の方法に対して顕著な利点を提供する。

#### 【0083】

本発明は、典型的には第一のハイブリッドタンパク質、第二のハイブリッドタンパク質、及びレポーター遺伝子をコードするポリヌクレオチドの形態のhSu(fu)関連タンパク質ツーハイブリッド系を有する宿主生物体(典型的には単細胞生物)をまた提供し、ここで、上記ポリヌクレオチドは一過性発現のために導入されるか安定に複製される。ある実施態様では、宿主生物は酵母細胞(例えば、サッカロミセス・セレビシエ)であり、ここでは、レポーター遺伝子転写調節配列がGal4応答性プロモーターを含む。(1)hSu(fu)ポリペプチドに結合可能なGli及び/又はSlimbの結合断片に融合したGAL4 DNA結合ドメイン(又はGAL4活性化ドメイン)をコードする発現カセット、(2)Gli及び/又はSlimbポリペプチドに結合可能なhSu(fu)の結合断片に融合したGAL4 DNA活性化ドメイン(又はそれぞれGAL4結合ドメイン)をコードする発現カセット、及び(3)シス結合GAL4転写応答要素を含むレポーター遺伝子(-ガラクトシダーゼ)を含む酵母を薬剤スクリーニングに使用することができる。このような酵母は試験薬剤と共にインキュベートされ、レポーター遺伝子(例えば、-ガラクトシダーゼ)の発現が決定される;対照培養物と比較してレポーター遺伝子の発現を阻害する薬剤の能力は、候補Gli調節薬剤又はhSu(fu)調節薬剤として薬剤を同定する。酵母ツーハイブリッド系を用いて哺乳動物(典型的にはヒト)cDNA発現ライブラリをスクリーニングすることができ、ここでは、cDNAがGAL4 DNA結合ドメイン又は活性化ドメインに融合し、hSu(fu)又はGli及び/又はSlimbポリペプチド配列の何れかはGAL4活性化ドメイン又はDNA結合ドメインにそれぞれ融合される。このような酵母ツーハイブリッド系はhSu(fu)又はGli及び/又はSlimb配列に結合するタンパク質をコードするcDNAをスクリーニングすることができる。例えば、DNAライブラリを、ヒト成熟B細胞(Namalwa)系統(Ambrus等,(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A))又は他の適切な細胞型からのmRNAからつくり出すことができる。酵母ツーハイブリッド発現系(Chien等,(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)88:9578)においてクローニングされたこのようなcDNAライブラリを、hSu(fu)又はGli及び/又はSlimbと相互作用するタンパク質をコードし、それによってGAL4-依存性レポーター遺伝子の発現を生じるcDNAsを同定するために使用することができる。hSu(fu)又はGli及び/又はSlimbと相互作用するポリペプチドは、また、抗体と共にhSu(fu)又はGli及び/又はSlimbの免疫沈降と共沈種の同定によって同定することができる。更に、hSu(fu)又はGli及び/又はSlimbと結合するポリペプチドを、hSu(fu)又はGli及び/又はSlimbポリペプチドでペプチドライブラリ(例えば、バクテリオファージペプチドディスプレイライブラリ、空間的に定まったVLSIPSペプチドアレイ等々)をスクリーニングすることによって同定することができる。

#### 【0084】

本発明は(1)第一のhSu(fu)関連ポリペプチドと転写活性化因子活性化ドメインを含む第一のハイブリッドタンパク質、(2)第二のhSu(fu)関連ポリペプチドと転写活性化因子DNA-結合ドメインを含む第二のハイブリッドタンパク質を有するツーハイブリッド系、宿主細胞、及び指示マニュアルを含んでなるキットをまた提供する。このようなキットは第一及び第二ハイブリッドタンパク質間の分子間結合を変える能力を試験する薬剤パネルを任意に含んでもよい。

これらの細胞培養アッセイ及び動物実験で得られたデータは、ヒトで使用するための用量範囲の処方用いられる。本発明の化合物の用量は、毒性を殆ど又は全く持たない循環濃

10

20

30

40

50

度の範囲内になければならない。用量は、用いる投与形態と投与経路に依存してこの範囲内で変わりうる。

【 0 0 8 5 】

3. アンチセンスヌクレオチド

アンタゴニストの他の好ましい部類は遺伝子治療技術の使用を含み、アンチセンスヌクレオチドの投与を含む。適用可能な遺伝子治療技術は、治療的に有効なDNA又はmRNAの一回又は複数回投与を含む。アンチセンスRNA及びDNAは、インビボでの或る種の遺伝子の発現を阻止するための治療薬として使用できる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に移入でき、それらは、細胞膜による制限された取り込みによって引き起こされる低い細胞内濃度にも関わらず、阻害剤として作用する、Zamecnik等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4143-4146 (1986)。オリゴヌクレオチドは、例えば負に荷電したホスホジエステル基を不荷電基で置換することにより、それらの取り込みを促進させるように修飾することができる。

生存細胞に核酸を導入するために知られた種々の技術がある。該技術は、核酸がインビトロ、エキソビボ、又はインビトロで培養された細胞に、又はインビボで対象とする宿主の細胞に移されるかに応じて変わる。インビトロで哺乳動物細胞に核酸を移行するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などの使用を含む。現在好ましいインビボ遺伝子移行技術は、ウイルス（典型的にはレトロウイルス）ベクターでの形質移入及びウイルスコートタンパク質-リポソーム媒介形質移入を含む、Dzau等, Trends Biotech. 11: 205-210 (1993)。幾つかの状況では、核酸供給源に標的細胞をターゲティングする試薬を提供するのが好ましく、例えば、エンドサイトーシスを伴う細胞表面膜タンパク質に特異的な抗体をターゲティング及び/又は取り込みの促進のために用いてもよく、例えば、特定の細胞型向性のカプシドタンパク質又はその断片、サイクリングで内部移行を受けるタンパク質の抗体、及び細胞内局在化をターゲティングし細胞内半減期を向上させるタンパク質である。レセプター媒介エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wu等, J. Biol. Chem. 262:

4429-4432 (1987); Wagner等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3410-3414 (1990)に記載されている。既知の遺伝子標識及び遺伝子治療プロトコールのレビューについては、Anderson等, Science 256: 808-813 (1992)を参照のこと。

一実施態様では、hSu(fu)アンタゴニスト及び/又はアゴニスト分子は細胞の内因性リガンドに結合するのに用いることができ、それにより、特に細胞内のhSu(fu)のレベルが正常な生理的レベルを越える場合、細胞をhSu(fu)野生型に非応答性とする。また、内因性hSu(fu)基質、又は望ましくない細胞反応（腫瘍細胞の増殖など）を活性化する複合体形成剤に結合するのが有利であろう。

本発明の更なる実施態様では、hSu(fu)発現は、hSu(fu)タンパク質の発現を低下させるのに有効な量のhSu(fu)アンチセンスRNA又はDNAをhSu(fu)発現細胞に提供することにより低下させうる。

【 0 0 8 6 】

腫瘍形成hSu(fu)遺伝子、例えば本発明の遺伝子配列を使用して容易に同定され分離される腫瘍抑制活性に欠陥のある変異体遺伝子に特異的なアンチセンス分子を用いて、hSu(fu)関連腫瘍が疑われるか有していることが示された細胞における発現をダウンレギュレートする。アンチセンス分子の投与は腫瘍形成hSu(fu)活性を減少させる効果を有している。アンチセンス配列は標的とされる欠陥性hSu(fu)遺伝子のmRNAに相補的であり、標的遺伝子産物の発現を阻害する。

アンチセンス分子は合成オリゴヌクレオチドでありうる。そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは一般に少なくとも約7、通常は少なくとも約12、より通常は少なくとも約20のヌクレオチド長で、約500以下、通常は約50以下、より通常は約35ヌクレオチド長以下であり、ここで長さは交差反応性の不存在を含む特異性、阻害効果等々により支配される。7から8の塩基長の短いオリゴヌクレオチドは遺伝子発現の強い選択的な

10

20

30

40

50

阻害剤となりうるが見いだされた (Wagner等, Nature Biotechnology 14:840-844(1996)を参照)。内在性有意鎖 mRNA 配列の特異的領域又は領域群は、好ましくは h S u ( f u ) 突然変異を包含するアンチセンス配列により補完されるように選択される。インビトロ動物モデルでの標的遺伝子の発現の阻害について候補配列をアッセイする。配列の組み合わせもまた使用でき、ここでは mRNA 配列の幾つかの領域がアンチセンス相補性に対して選択される。アンチセンス分子及び/又は他の阻害薬剤が、進入を可能にする条件下で腫瘍細胞と接触させることによって投与される。該分子は、例えばリポソーム懸濁液のような、溶液又は投与のための任意の他の薬理的に好適な形態で提供されうる。細胞による核酸の取り込みを向上させるための当該分野で既知の多くの送達方法が存在する。有用な送達系は、センダイウィルス-リポソーム送達系 (Rapaport及びShai J. Biol. Chem. 269:15124-15131(1994)を参照)、カチオン性リポソーム、ポリマー送達ゲル又はマトリックス、多孔性気球カテーテル (Shi等, Circulation 90:955-951(1994); 及びShi等, Gene Therapy 1:408-414(1994))、レトロウィルス発現ベクター等々を含む。送達ビヒクルとしてのリポソームの使用は興味ある方法の一つである。リポソームは標的部位の細胞と融合し、細胞内腔の内容物を細胞内に送達する。リポソームは、接触を維持する種々の手段、例えば隔離、結合剤等々を使用して、融合に十分な時間の間、細胞との接触が維持される。リポソームは、センダイウィルス又はインフルエンザウィルス等々のような膜の融合を媒介する精製タンパク質又はペプチドで調製されうる。脂質は、例えばホスファチジルコリンのようなカチオン性脂質を含む既知のリポソーム形成脂質の任意の有用な組み合わせでありうる。残りの脂質は通常は中性脂質、例えばコレステロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール等々である。

10

20

## 【 0 0 8 7 】

## I . 診断的用途

ここに記載した本発明の化合物 (例えば、ヒト及び脊椎動物 h S u ( f u )、脊椎動物 h S u ( f u ) 変異体及び抗脊椎動物 h S u ( f u ) 抗体) の他の用途は、h S u ( f u ) 又はヘッジホッグシグナル伝達により疾患が幾分導かれたかどうかの診断を助けることである。例えば、基底細胞癌細胞は活性なヘッジホッグシグナル伝達に関連している。ヘッジホッグシグナル伝達によって特定の疾患が導かれるかどうかを決定する診断アッセイは以下の工程を用いて実施される: (1) 細胞又は組織の培養; (2) h S u ( f u ) 変調ヘッジホッグシグナル伝達を阻害可能な化合物の投与; 及び (3) ヘッジホッグシグナル伝達が対照に対して変調されている度合いの測定。これらの工程は、本開示に基づいて標準的な技術を用いて実施することができる。例えば、細胞又は組織の単離と培養又はインビボに標準的な技術を使用できる。

30

## 【 0 0 8 8 】

以下の実施例は例示するためにのみ提供されるものであって、決して本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

本明細書で引用した全ての特許及び文献の全体を、出典明示によりここに取り込む。

## ( 実施例 )

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従って使用した。ATCC受託番号を用いて以下の実施例と明細書全体を通して特定されている細胞の供給源はバージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションである。

40

## 【 0 0 8 9 】

## 実施例 1 . ヒト h S u ( f u ) をコードする c D N A クロンの単離

公的な配列データベース (Genbank) を検索して、ショウジョウバエのメラノガスターの f u s e d タンパク質のサブレッサーと相同性を示すマウス E S T を同定した (A A 2 2 3 6 3 7)。マウス E S T の想定される推定アミノ酸配列は d S u ( f u ) タンパク質の 8 4 のアミノ酸の 6 4 に一致した。ついで、この E S T 配列を公的な E S T データベース (例えば、GenBank) と企業の E S T データベース (例えば、LIFESEQ (登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA) を含む様々な E S T データベースと比較して、相同

50

性 E S T 配列を同定した。比較は、コンピュータプログラム B L A S T 又は B L A S T 2 [Altschul 等, Methods in Enzymology, 266: 460-480 (1996)] を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、B L A S T スコア 7 0 (又はある場合には 9 0) 又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington) でクラスター形成してコンセンサス D N A 配列に構築した。このコンセンサス配列は F i g 7 (配列番号: 3) に示され、ここで D N A 3 3 4 5 4 と命名される。

F i g 7 (配列番号: 3) に示された D N A 3 3 4 5 4 コンセンサス配列に基づいて、1) P C R により対象とする配列を含む c D N A ライブラリを同定するために、及び 2) h S u ( f u ) の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして用いるために、オリゴヌクレオチドを合成した。正方向及び逆方向 P C R プライマーは一般に 2 0 から 3 0 のヌクレオチドの範囲であり、しばしば約 1 0 0 - 1 0 0 0 b p 長の P C R 産物をもたらすように設計される。プローブ配列は、典型的には 4 0 - 5 5 b p 長である。ある場合には、コンセンサス配列が約 1 - 1 . 5 k b p より大きいときに更なるオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからの D N A を、Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology に従って、P C R プライマー対での P C R 増幅によりスクリーニングした。ついで、ポジティブライブラリをプローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて対象とする遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

P C R プライマー (正及び逆) を合成した:

正方向 P C R プライマー 5' -CAGCCGAACCCGCTCCAGGTTAC- 3' (配列番号: 6) 逆方向 P

C R プライマー 5' -CATGGACTCTGTTGTCACCATAGAG- 3' (配列番号: 7)

さらに、ヒト胎児肺 p R K 5 哺乳動物発現ライブラリを、次のヌクレオチド配列を持つコンセンサス D N A 3 3 4 5 4 配列から作成された合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブでスクリーニングした: ハイブリダイゼーションプローブ

5' -GAGCACTGGCACTACATCAGCTTTGGCCTGAGTGATCTCT- 3' (配列番号: 8)

【 0 0 9 0 】

c D N A ライブラリの作成のための R N A はヒト胎児肺組織から単離した。c D N A クローンの単離に用いた c D N A ライブラリは、カリフォルニア州サンジエゴの Invitrogen からのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。c D N A は、N o t I 部位を含むオリゴ d T でプライムし、平滑末端で S a l I ヘミキナーゼ化アダプターに結合させ、N o t I で切断し、ゲル電気泳動法で適当にサイズ分類し、適切なクローニングベクター ( p R K B 又は p R K D 等; p R K 5 B は S f i I 部位を含まない p R K 5 D の前駆体である; Holmes 等, Science, 253: 1278-1280 (1991) 参照) に、独特の X h o I 及び N o t I 部位において、所定の方向でクローニングした。

上述のようにして単離されたクローンの D N A 配列決定により、h S u ( f u ) の全長 D N A 配列 (ここで D N A 3 3 4 5 5 - 1 5 4 8 と命名 [ F i g 6 A - 6 B, 配列番号: 1 ] ) ( U N Q 6 5 0 と命名) と、h S u ( f u ) の誘導タンパク質配列 (配列番号: 2; F i g 1) が得られた。クローン U N Q 6 5 0 (ここで D N A 3 3 4 5 5 - 1 5 4 8 と命名) は 1 9 9 9 年 3 月 5 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 P T A - 1 2 7 が付与された。

U N Q 6 5 0 ( D N A 3 3 4 5 5 - 1 5 4 8 ) の全ヌクレオチド配列は F i g 6 A - 6 B (配列番号: 1) に示す。クローン U N Q 6 5 0 ( D N A 3 3 4 5 5 - 1 5 4 8 ) はヌクレオチド位置 7 4 - 7 6 に見かけの転写開始部位を持ちヌクレオチド位置 1 3 7 3 - 1 3 7 5 の停止コドンで終端する単一のオープンリーディングフレームを含む ( F i g 6 A - 6 B ) 。予想されたポリペプチド前駆体は 4 3 3 アミノ酸長である ( F i g 1 ) 。 F i g 1 に示される全長 h S u ( f u ) タンパク質は約 4 7 9 3 2 ダルトンの推定分子量と約 5 . 6 6 の P I を有する。 F i g 1 (配列番号: 2) に示された全長 h S u ( f u ) 配列の分析により次のものの存在が明らかになった: 約アミノ酸 2 6 5 から約アミノ酸 2 6 8 の潜在的な N - グリコシル化部位。h S u ( f u ) を d S u ( f u ) とアラインメントさせ

10

20

30

40

50

ることにより、アミノ酸レベルで37.7%の同一性が明らかになり(Fig 1)、保存的アミノ酸置換を考慮に入れると63%まで増加した。Prositesデータベースに対してhSu(fu)を検索した結果、15の潜在的なリン酸化部位が明らかになり、その幾つかが種間で保存されていた(Fig 1に示す)。Prositesの検索により3つの候補PKAリン酸化部位がhSu(fu)に同定され、dSu(fu)では何も同定されなかった。しかし、検索方策に幾つかの活性が少ない潜在的なPKAリン酸化部位モチーフを含めることにより、hSu(fu)に二つ(2)の異なる部位が同定され、dSu(fu)に5つのそのような部位が同定された(Fig 1)。PESTアルゴリズム(40)により、辺縁PEST配列が同定され、これはアミノ酸344-358にスパンしていた。hSu(fu)遺伝子をFISH解析により染色体10、領域q24-q25にマッピングした(Fig 2)。

10

Fig 1(配列番号:2)に示された全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント分析を使用した、Dayhoffデータベース(version 35.45 SwissProt 35)の解析により、hSu(fu)アミノ酸配列と以下のDayhoff配列:S55695, A45983, PAC4\_RAT, P\_R93246, S49624, CA39\_CHICK, S30127, MTC128\_32, MTV043\_60及びLEG3\_CRIL0との間の有意な相同性が証明された。

#### 【0091】

実施例2. ハイブリダイゼーションプローブとしてのhSu(fu)の使用

以下の方法は、hSu(fu)をコードするヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションプローブとしての使用を記載する。

20

全長又は成熟hSu(fu)(Fig 6A-6B、配列番号:1に示す)のコード配列を含むDNAは、ヒト組織cDNAライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリにおける相同DNA類(hSu(fu)の天然に生じる変異体をコードするものなど)のスクリーニングのためのプローブとして用いられる。

何れかのライブラリDNAを含むフィルターのハイブリダイゼーションと洗浄は、以下の高緊縮性条件下で実施した。放射性標識hSu(fu)誘導プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションは、50%ホルムアルデヒド、5xSSC、0.1%SDS、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、2xデンハード液、及び10%デキストラン硫酸の溶液中で42°Cにおいて20時間行った。フィルターの洗浄は、0.1xSSC及び0.1%SDSの水溶液中、42°Cで行った。

30

ついで、全長天然配列hSu(fu)をコードするDNAと所望の配列同一性を有するDNAは、当該分野で知られている標準的な方法を用いて同定できる。

#### 【0092】

実施例3. インサイツハイブリダイゼーションのためのハイブリダイゼーションプローブとしてのhSu(fu)の使用

齧歯類Su(fu)mRNAへのインサイツハイブリダイゼーションを実施した。胎齢8.5日(E8.5)のマウス胚に対するホルマウントインサイツハイブリダイゼーションを(37)に記載されているようにして実施した。プローブは、ヒト配列のヌクレオチド116-390(ヌクレオチド1=イニシエータATGのA)に対応する、マウスSu(fu)cDNA PCR鋳型とT7RNAポリメラーゼで合成したジゴキシゲンin標識RNAであった。組織切片へのインサイツハイブリダイゼーションに対しては、ラットE11.5及びE15.5全胚と、出生後1日(P1)のラット脳を、4%パラホルムアルデヒド中4°Cで終夜浸漬固定し、15%スクロース中で終夜凍結保護し、O.T.C.(VWR Scientific)に包埋し、液体窒素で凍結させた。成体マウス脳を粉末ドライアイスで新鮮凍結させた。成体ラット脊髄及びマウス精巣をO.T.C.に包埋し、液体窒素で凍結させた。切片を16µmで切断し、過去に記載されているようにして(38)インサイツハイブリダイゼーションのために加工した。記載されたようにして(39)、<sup>33</sup>P-UTPで標識したRNAプローブを産生した。センス及びアンチセンスプローブを、ヒト配列のヌクレオチド97-424を包含するhSu(fu)cDNA PCR断片からT7RNAポリメラーゼで合成した。

40

50

ホルマウントインサイツハイブリダイゼーションにより、調べた最も早い発育時点において、*Su(fu)*mRNAがE8.5マウスに広く発現されていることが明らかになった(Fig 3A-3B)。標識は発育中の神経板の全体にわたって一様に強く見えた。心臓の原基のみがこの段階で特に標識されていなかった(Fig 3B)。E11.5のラットでは、*Su(fu)*メッセージが中枢神経系、脊髄及び体節の全体にわたって広範に残っていた(Fig 3C)。E11.5及びE15.5ラットの脊髄の横断面には、活性な細胞増殖の領域である室領域の発育中の神経上皮内に顕著なシグナルが明らかになった(Fig 3E及び3F)。脳、脊髄、腸、肺、および精巣を含むE15.5胚全体の組織が*Su(fu)*に対して標識された；肝臓はほんの僅かなシグナルを示していた(Fig 3D)。P1ラットの脳においては、*Su(fu)*mRNAが広く発現され、神経上皮、副脳室領域、及び海馬神経細胞フィールドにわたる顕著なシグナルを示した(Fig 3G)。メッセージは成体脳においては大いにダウンレギュレートされていたが、全体にわたってなお弱く検出できた；比較的高い発現が海馬、小脳顆粒及びプルキンエ細胞層、及び嗅球に観察された(Fig 3H-3J)。

Dhhは精巣に特異的に発現され精子形成のために重要であるので(41)、成体マウス精巣についてまた*Su(fu)*mRNAを調べた。精巣の断面には、*Su(fu)*mRNAが精細管の部分集合に強く発現しており、その転写が胚芽細胞の分化段階によって調節されることを示唆している(Fig 4A)。*Su(fu)*メッセージが発達中の精母細胞の領域にわたって銀色顆粒の輪として観察された(Fig 4C及び4D)。尿管内の多くの部位では、最も高い発現が中央に集中しており、そこでは胚芽細胞分化の最後の段階が生じている(Fig 4E)。有意鎖対照プローブの隣接組織切片へのハイブリダイゼーションではバックグラウンドを越えるシグナルは見られなかった(Fig 4B)。

#### 【0093】

実施例4. *hSu(fu)* 遺伝子の染色体位置をマッピングするためのハイブリダイゼーションプローブとしての*hSu(fu)*の使用

*hSu(fu)* 遺伝子の染色体の局在化を決定した。ヒト血液から単離したリンパ球を、37で68-72時間の間、10%のウシ胎仔血清とフィトヘマグルチニンを補填したアルファMEM中で培養した。培養物をBrdU(0.18mg/ml; Sigma)で処理して細胞集団を同調させ、ついで無血清培地で3x洗浄し、チミジン(2.5mg/ml; Sigma)を含むアルファMEMにて37で6時間の間、再培養した。細胞を収集し、標準的な手順によってスライドを調製し、低張処理、固定及び空気乾燥を施した。全長*hSu(fu)*cDNAをBioNick標識キット(Gibco BRL)を使用して15で2h、dATPの存在下にてピオチン標識した。蛍光インサイツハイブリダイゼーション(FISH)を記載されたようにして実施した(35, 36)。簡単には、スライドを55で1hの間、焼き、RNA分解酵素で処理し、2xSSC中の70%のホルムアミドで2分間(70)変性させ、エタノール中で脱水した。プローブを、50%のホルムアミドと10%のデキストラン硫酸からなるハイブリダイゼーション混合物中で5分間75にて変性させた。変性させた染色体調製物をプローブと終夜ハイブリダイズさせ、洗浄し、蛍光抗ピオチン抗体とDAPI染色で標識した。各染色体拡散体のDAPIバンド形成パターンとFISHシグナルを別個に記録し、ついで重ね合わせて*hSu(fu)*マッピング位置をあてがった。

上記のFISH分析により、*hSu(fu)* 遺伝子は染色体10q24-25にマッピングされた。興味深いことに、多形性膠芽腫、前立腺癌、悪性メラノーマ及び子宮内膜癌を含む多くの腫瘍における異型接合性の喪失(LOH)分析に基づいて、区間10q.23-pter内に腫瘍抑制遺伝子に対する二つの遺伝子座が提案された(44-47)。この点において、多くの癌において突然変異していることが見いだされ、この領域にまたマッピングする二つの候補腫瘍抑制遺伝子：10q23.3でのMMAC1/PTEN(48, 49)と10q25.3-26.1でのDMBT1(悪性脳腫瘍において欠失)(50)が、最近記載されている。*hSu(fu)*の染色体局在化は、*hSu(fu)*が活性な細胞増殖の領域に高度に発現され(Fig 3F-Jを参照)、HHシグナル伝達のイン

10

20

30

40

50

ヒビターであるという知見と組み合わせられて、h S u ( f u ) が Patched のように腫瘍サプレッサーである可能性が極めて高いことを示している。

【 0 0 9 4 】

実施例 5 : 大腸菌における h S u ( f u ) の発現

この実施例は大腸菌中における組換え発現による h S u ( f u ) の未グリコシル化型の調製を例証する。

h S u ( f u ) をコードする DNA 配列 ( 配列番号 : 1 ) を、選択した PCR プライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位を含まなければならない。種々の発現ベクターを用いることができる。好適なベクターの例は、p B R 3 2 2 ( 大腸菌由来のもの ; Bolivar 等, Gene, 2:95 (1977) を参照 ) であり、これはアンピシリン及びテトラサイクリン耐性のための遺伝子を含む。ベクターは、制限酵素で消化され脱リン酸される。PCR 増幅配列を、ついでベクターに結合させる。ベクターは、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、t r p プロモーター、p o l y h i s リーダー ( 最初の 6 つの S T I I コドン、p o l y h i s 配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む )、h S u ( f u ) コード化領域、ラムダ転写終結区、及び a r g U 遺伝子を含む。

ライゲーション混合物は、ついで、上掲の Sambrook 等に記載された方法を用いて選択した大腸菌を形質転換するのに使用される。形質転換体は、それらの LB プレートで成長する能力により同定され、ついで抗生物質耐性クローンが選択される。プラスミド DNA が単離され、制限分析及び DNA 配列決定で確認される。

選択されたクローンは、抗生物質を添加した LB プロスのような液体培地で終夜成長させることができる。終夜培養物は、続いて大規模培養の播種に用いられる。次に細胞を所望の至適密度まで成長させ、その間に発現プロモーターが作動される。

更に数時間の培養の後、細胞を遠心分離により収集することができる。遠心分離で得られた細胞ペレットは、当該分野で知られた種々の試薬を用いて可溶化され得、ついで可溶化された h S u ( f u ) タンパク質を金属キレート化カラムを用いてタンパク質を緊密に結合させる条件下で精製する。

【 0 0 9 5 】

実施例 6 : 哺乳動物細胞における h S u ( f u ) の発現

この実施例は哺乳動物細胞中での組換え発現による h S u ( f u ) の潜在的にグリコシル化された型の調製を例証する。

発現ベクターとしてベクター p R K 5 ( 1989年3月15日公開の EP307,247 を参照 ) を用いた。場合によっては、上掲の Sambrook 等に記載されたようなライゲーション方法を用いて、h S u ( f u ) DNA を選択した制限酵素で p R K 5 に結合させて、h S u ( f u ) DNA の挿入を行う。得られたベクターは、p R K 5 - h S u ( f u ) と呼ばれる。

一実施態様では、選択された宿主細胞は 2 9 3 細胞とすることができる。ヒト 2 9 3 細胞 ( A T C C C C L 1 5 7 3 ) は、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び / 又は抗生物質を添加した D M E M などの培地中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化した。約 1 0 μ g の p R K 5 - h S u ( f u ) DNA を約 1 μ g の V A RNA 遺伝子をコードする DNA [ Thimmappaya 等, Cell, 31:543 (1982) ] と混合し、5 0 0 μ l の 1 m M トリス - H C l 、 0 . 1 m M の E D T A 、 0 . 2 2 7 M の C a C l <sub>2</sub> に溶解させた。この混合物に、滴下して、5 0 0 μ l の 5 0 m M の H E P E S ( p H 7 . 3 5 ) 、 2 8 0 m M の N a C l 、 1 . 5 m M の N a P O <sub>4</sub> を添加し、2 5 ° C で 1 0 分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、2 9 3 細胞に加えて 3 7 ° C で約 4 時間静置した。培地を吸引し、2 m l の P B S 中 2 0 % グリセロールを 3 0 秒間添加した。2 9 3 細胞をついで無血清培地で洗浄し、新鮮培地を添加し、細胞を約 5 日間インキュベートした。

形質移入後約 2 4 時間で、培地を除去し、培地 ( 単独 ) 又は 2 0 0 μ C i / m l の <sup>3 5</sup> S - システイン及び 2 0 0 μ C i / m l の <sup>3 5</sup> S - メチオニンを含む培地で置換した。1 2 時間のインキュベーション後、条件培地を収集し、スピンフィルターで濃縮し、1 5 % S D S ゲルに充填した。処理したゲルを乾燥させ、h S u ( f u ) ポリペプチドの存在を現す

10

20

30

40

50

選択された時間の間フィルムに露出した。形質転換した細胞を含む培養物に、更なるインキュベーションを施し（無血清培地中で）、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

これに換わる技術では、h S u ( f u ) は、Sompariyac等、Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて293細胞に一過性に導入される。293細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700  $\mu$ gのp R K 5 - h S u ( f u ) DNAを添加する。細胞は、先ずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄した。DNA - デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートした。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、5  $\mu$ g / ml ウシインスリン及び0.1  $\mu$ g / ml ウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコ中に再導入した。約4日後に、条件培地を遠心分離し、濾過して細胞及び細胞片を除去した。ついで発現されたh S u ( f u ) を含む試料を濃縮し、透析及び/又はカラムクロマトグラフィー等の任意の選択された方法によって精製した。

#### 【0096】

他の実施態様では、h S u ( f u ) をCHO細胞中で発現させることができる。p R K 5 - h S u ( f u ) は、C a P O <sub>4</sub> 又はD E A E - デキストランなどの既知の試薬を用いてCHO細胞中に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地（単独）又は<sup>35</sup>S - メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。h S u ( f u ) ポリペプチドの存在を決定した後、培地を無血清培地に置換することができる。好ましくは、培地を約6日間インキュベートし、ついで条件培地を収集する。ついで、発現されたh S u ( f u ) を含む培地を濃縮して、任意の選択される方法によって精製することができる。

また、エピトープタグh S u ( f u ) は、宿主CHO細胞において発現させることができる。h S u ( f u ) はp R K 5 ベクターからサブクロニングした。サブクローン挿入物にPCRを施して、バキュロウイルス発現ベクター中のpoly-hisタグ等の選択されたエピトープタグと枠内で融合させる。poly-hisタグh S u ( f u ) 挿入物を、ついで、安定なクローンの選択のためのDHFR等の選択マーカを含むSV40誘導ベクターにサブクロニングできる。最後に、CHO細胞をSV40誘導ベクターで（上記のように）形質移入することができる。発現を実証するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたpoly-hisタグh S u ( f u ) を含む培地を、ついで濃縮し、Ni<sup>2+</sup> - キレートアフィニティクロマトグラフィー等の任意の選択される方法により精製できる。

タンパク質間相互作用を研究すべく、様々なサブクローンとcDNA作成物をh S u ( f u ) と多のタンパク質の生産のためにつくり出した。h S u ( f u ) cDNAをCMV - 系発現ベクター（p R K）中にサブクロニングし、そのカルボキシ末端をflagペプチドでエピトープタグ化し、Fig 10に提示されたh S u ( f u ) - flag - エピトープタンパク質をコードする挿入物を含むp R K . h S u ( f u ) を作った（配列番号：10）。（Ken Kinzler博士により提供された）ヒトG l i c DNAを同じ発現ベクターにクローニングし、9 E 1 0 c - m y c エピトープをアミノ末端（最初のATGの直ぐ後）に導入してp R K . h G l i を作った。（Mike Ruppert博士により提供された）ヒトG l i 3をp R Kにまたクローニングした。挿入物の3'末端からの配列決定により、公開された配列（32）と比較して位置4700に「T」ヌクレオチドが失われていて、タンパク質の早発の切断が生じていることが明らかにされた。部位特異的突然変異誘発（Muta-Genファージミドインビトロ突然変異誘発システム、Bio-Rad）を用いてこの位置に「T」を加えてp R K . h G l i 3を作った。マウスG l i 2のコード領域を、鋳型としてMarathon ReadyマウスE 1 1 cDNA（Clontech）を用いてT a k a r a L Aポリメラーゼ（宝酒造株式会社）でのPCRにより得て、p R Kにクローニングしてp R K . h G l i 2を得た。ヒトS l i m b配列（33）と比較して最初の22のアミノ酸を失っているマウスcDNA S l i m bをGenome Systemsから取得し（クローン# 1068742）5'RACEによって伸長させた。幾つかの異なった5'RACE産物を回収したところ、遺伝

10

20

30

40

50

子がその5'末端に選択的スプライシングを受けていることが示唆された((33)と(34)も参照)。公開されたヒトS1imbのアミノ末端に最も密接に一致する配列を単離し、pRK中にクローニングしてpRK.mS1imbを作った。mS1imb cDNAによって予測されるタンパク質はそのヒト対応物(33)からの572のアミノ酸の9だけで異なっていた。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)-hSu(fu)発現作成物(pGEX.hSu(fu))を、ファーマシアpGEXベクター系を使用して作製した。(GST)-hSu(fu)(配列番号:11)の発現されたアミノ酸配列はFig 11に示している。

#### 【0097】

実施例7：酵母菌でのhSu(fu)の発現

10

以下の方法は、酵母菌中でのhSu(fu)の組換え発現を記載する。

最初に、ADH2/GAPDHプロモーターからのhSu(fu)の細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。プロモーター及びhSu(fu)をコードするDNAを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してhSu(fu)の細胞内発現を方向付ける。分泌のために、hSu(fu)をコードするDNAを選択したプラスミドに、ADH2/GAPDHプロモーターをコードするDNA、天然hSu(fu)シグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、あるいは例えば酵母菌アルファ因子もしくはインベルターゼ分泌シグナル/リーダー配列、及び(必要ならば)hSu(fu)の発現のためのリンカー配列と共にクローニングすることができる。

酵母菌株AB110等の酵母菌は、ついで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、10%トリクロロ酢酸での沈降及びSDS-PAGEによる分離で分析し、ついでクマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。

20

続いて組換えhSu(fu)は、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、ついで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。hSu(fu)を含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いて更に精製することができる。

#### 【0098】

実施例8：バキュロウイルス感染昆虫細胞でのhSu(fu)の発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中におけるhSu(fu)の組換え発現を記載する。

30

hSu(fu)をコードする配列は、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。このようなエピトープタグは、poly-hisタグと免疫グロブリンタグ(IgGのFc領域など)を含む。pVL1393(Novagen)などの市販プラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単には、hSu(fu)又はhSu(fu)のコード配列の所望部分、例えば成熟タンパク質をコードする配列が、5'及び3'領域に相補的なプライマーでのPCRにより増幅される。5'プライマーは、隣接する(選択された)制限酵素部位を包含することができる。生成物は、ついで、その選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

40

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold<sup>TM</sup>ウイルスDNA(PharMingen)を、スポドプテラ・フルギペルダ(Spodoptera frugiperda)(「Sf9」)細胞(ATCC CRL 1711)中にリポフェクチン(GIBCO-BRLから市販)を用いて同時形質移入することにより産生される。28℃で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを収集し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilley等, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施した。

#### 【0099】

ついで、発現されたpoly-hisタグhSu(fu)は、例えば、Ni<sup>2+</sup>-キレートアフィニティークロマトグラフィーにより以下のように精製できる。抽出物は、Rupert等,

50

Nature, 362:175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染した組換えSf9細胞から調製した。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー(25 mLのHepes、pH 7.9; 12.5 mMのMgCl<sub>2</sub>; 0.1 mMのEDTA; 10%のグリセロール; 0.1%のNP-40; 0.4 MのKCl)中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を添加液(50 mMのリン酸塩、300 mMのNaCl、10%のグリセロール、pH 7.8)で50倍希釈し、0.45 μmフィルターで濾過した。Ni<sup>2+</sup>-NTAアガロースカラム(Qiagenから市販)を5 mLの総容積で調製し、25 mLの水で洗浄し、25 mLの添加液で平衡化させた。濾過した細胞抽出物は、毎分0.5 mLでカラムに充填した。カラムを、分画回収が始まる点であるA<sub>280</sub>のベースラインまで添加液で洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー(50 mMのリン酸塩; 300 mMのNaCl、10%のグリセロール、pH 6.0)で洗浄した。A<sub>280</sub>のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で0から500 mMのイミダゾール勾配で展開した。1 mLの分画を回収し、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ(Qiagen)に複合したNi<sup>2+</sup>-NTAでのウェスタンブロットで分析した。溶離したHis<sub>10</sub>-タグhSu(fu)を含む分画をプールし、添加液で透析した。あるいは、IgGタグ(又はFcタグ)hSu(fu)の精製は、例えば、プロテインA又はプロテインGカラムクロマトグラフィーを含む既知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

10

## 【0100】

20

実施例9: hSu(fu)に結合する抗体の調製

この実施例はhSu(fu)に特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

モノクローナル抗体を生産する技術は当該分野で知られており、例えば、上掲のGodingに記載されている。用いられ得る免疫原は、精製hSu(fu)、hSu(fu)を含む融合タンパク質、及び細胞表面に組換えhSu(fu)を発現する細胞を含む。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなく、なすことができる。

Balb/c等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に1-100マイクログラムで注入したhSu(fu)免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をMPL-TDMアジュバント(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)に乳

30

## 【0101】

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「陽性」な動物に、hSu(fu)の静脈内注射の最後の注入をすることができる。3から4日後、マウスを屠殺し、脾臓を取り出した。ついで脾臓細胞を(35%ポリエチレングリコールを用いて)、ACTTから番号CRL 1597で入手可能なP3X63AgU.1等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合

40

させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、ついで、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン)培地を含む96ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。ハイブリドーマ細胞は、hSu(fu)に対する反応性についてのELISAでスクリーニングされる。hSu(fu)に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「陽性」ハイブリドーマ細胞の決定は、当業者の技量の範囲内である。

陽性ハイブリドーマ細胞を同系のBalb/cマウスに腹腔内注入し、抗hSu(fu)モノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィー - を

50

用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテイン A 又はプロテイン G への結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーを用いることができる。

### 【0102】

実施例 10 . h S u ( f u ) に結合する抗体の使用

抗 h S u ( f u ) 抗体での免疫細胞化学。h S u ( f u ) ポリクローナル抗体を、精製した G S T - h S u ( f u ) 融合タンパク質でのウサギの免疫化により産生した。得られた抗体をプロテイン A カラムでのアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。

ProNectin F (Stratagene) 被覆ガラスチャンバースライド中のサブコンフルエントな C O S - 7 細胞に、D E A E - デキストランに続いて D M S O ショックを使用して、p R K . h S u ( f u ) 、 p R K . h G l i 、 又は双方のプラスミドの何れかを一過性に形質移入した。24 時間後に、細胞を 4 % のパラホルムアルデヒド中で 10 分間固定し、0 . 1 % のトリトン - X 100 中で 5 分間透過処理し、ブロックバッファー ( P B S 中 5 % のヤギ血清 ) 中でブロックし、抗 h S u ( f u ) ポリクローナル ( 以下を参照 ) 及び / 又は抗 c - m y c モノクローナル抗体 ( ジェネンテク ; ブロックバッファー中 3  $\mu$  g / m l で 1 時間 ) からなる一次抗体と反応させた。細胞を洗浄し、それぞれ、ブロックバッファー中で 1 時間、c y 3 - 抗ウサギ I g G ( 1 : 350 ) 及び / 又は c y 2 - 抗マウス I g G ( 1 : 100 ; Jackson ImmunoResearch ) の何れかで標識した。スライドを洗浄し、Fluoromount-G ( Southern Biotechnology Assoc. , Inc. ) においてカバーガラスをした。

10

### 【0103】

実施例 11 . h S u ( f u ) を含むタンパク質間相互作用

インビトロ共沈アッセイを実施してタンパク質間相互作用を研究した。N I H - 3 T 3 細胞を、10 % ウシ胎仔血清と 100 単位 / m l のペンストレップ ( 成長培地 ) を含む D M E M 中で、10 c m 組織培養皿中で 30 % の集密度まで成長させた。全体で 10  $\mu$  g の D N A / 皿、36  $\mu$  l のリポフェクタミン及び 5 m l の opti M E M ( Gibco BRL ) を用いて製造者のプロトコル ( Gibco BRL ) に従って、リポフェクタミンを細胞に一過性に形質移入した。二つのプラスミドを同時に形質移入するとき、各々の 5  $\mu$  g を使用した。42 時間後、細胞を P B S ( 4 ) 中で 2 x 洗浄し、( 20 m M の H e p e s 、 p H 8 . 0 、 150 m M の N a C l 、 1 % の N P - 40 、 それぞれ 5  $\mu$  g / m l のロイペプチンとアプロチニン、1 m M の P M S F 、 及び 250  $\mu$  M のオルトバナデートを含む ) 1 m l の氷冷溶解バッファー中に直接溶解させた。可溶化液を 4 で 20 分間回転させ、ついで 14000 r p m にて 20 分間遠心分離し、上清を、2  $\mu$  l の抗 f l a g M 2 モノクローナル抗体 ( Kodak IBI ) 又は 2  $\mu$  l の抗 m y c モノクローナル抗体 ( 9 E 10 ; ジェネンテク ) の何れかでの終夜 ( 4 ) の免疫沈降を施した。プロテイン A セファロース ( Pharmacia ) を 4 にて 1 時間、添加した ( 溶解バッファー中 25  $\mu$  l の 50 : 50 スラリー ) 。ビーズを 3 x 溶解バッファーで、また 1 x 0 . 5 M の N a C l で洗浄し、2 x S D S 添加液を添加し、試料を煮沸させ ( 5 分 ) 、 8 % の変性 S D S ポリアクルルアミドゲル ( Novex ) 上で電気泳動させた。E C L 検出システム ( Amersham ) を使用して、タンパク質を、ニトロセルロースへのプロットティング、f l a g 又は m y c エピトープへの抗体での探索により検出した。

20

30

G S T - 融合タンパク質インビトロ結合アッセイを実施した。p G E X . h S u ( f u ) を D H 1 2 S 細菌細胞に形質転換し、500 m l の終夜培養物を、製造者のプロトコル ( Pharmacia ) に従って G S T - h S u ( f u ) 融合タンパク質の精製のために処理した。融合タンパク質を過剰の還元グルタチオンでビーズから溶出させ、溶出させたタンパク質を、変性 S D S - ポリアクルルアミドゲル上での O D <sub>280</sub> 測定と可視化によって定量化した ( データは示さず ) 。グルタチオンセファロースビーズに 4  $\mu$  g の融合タンパク質又は G S T ( Sigma ) を 4 にて 2 時間の間、負荷し、ついで結合バッファーで 3 x 洗浄した。25  $\mu$  l のビーズ ( 50 : 50 スラリー ) を、50  $\mu$  l 結合バッファー中に入った 2 - 8  $\mu$  l の <sup>35</sup>S - 標識インビトロ翻訳 h G l i 、 m G l i 2 、 h G l i 3 、 m S l i m b 、 又は h S u ( f u ) と共に 4 にて 2 時間の間インキュベートした。ビーズを 3 x 溶解バッファーで洗浄し、S D S - P A G E のために処理した。ゲルを続いて固定し、E N <sup>3</sup>

40

50

HANCE (Dupont NEN) において増幅し、乾燥させ、Kodak X-ARフィルムに曝した。結合バッファーは50 mMのトリスHCl、pH 8.0、150 mMのNaCl及びプロテアーゼインヒビターである(上述の通り)。50  $\mu$ lの反応容積中において20  $\mu$ Ci [<sup>35</sup>S]-メチオニン(Amersham)及びSP6 RNAポリメラーゼで、TNT結合網状赤血球溶解液系(Promega)を使用して、pRK.hGli、pRK.mGli2、pRK.hGli3、pRK.mSlimb、pRK.hSu(fu)及びSP6-ルシフェラーゼ対照プラスミドを転写し、インビトロで翻訳した。およそのタンパク質の定量のために、各反応物の1  $\mu$ lに変性SDS-PAGEを施した。各タンパク質の等価量を結合アッセイにおいて使用した。

#### 【0104】

Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Inc)を使用して、ルシフェラーゼレポーターアッセイを、記載されているようにして(24)、C3H10T1/2細胞において実施した。同時形質移入されたRenillaルシフェラーゼ内部標準の活性に対してホタルルシフェラーゼレポーターの活性を基準化することにより、形質移入効率の差を修正した。

hSu(fu)の生化学相互作用と生物活性を決定した。過去の研究はショウジョウバエGli相同体であるCiに対するdSu(fu)の結合を証明したので(29)、我々は類似の相互作用がそのヒトタンパク質対応物の間に存在するかどうかを試験した。我々は免疫細胞化学を用いて、形質移入したCOS-7細胞における一過性に過剰発現されたhSu(fu)及びhGliの細胞下局在化を可視化した。個々に発現されると、hSu(fu)とhGliは細胞質全体にわたって広く分散し、核内にしばしば検出された(Fig 5A、上部パネル)。また、それらは $\alpha$ -チューブリン(データを示さず)のものと同様の染色パターンを示しており、それらが微小管と共存していることを示唆している。細胞をhSu(fu)及びhGliで同時形質移入したとき、二重標識化がその染色パターンにおける広範なオーバーラップを明らかにした。更に、hGliは細胞質の全体にわたってもはや見いだされず、代わりに点状の密に染色された領域に集まっており、これはまたhSu(fu)に対しても強く標識された(Fig 5A、下方パネル)。これらの密に染色された領域は、hSu(fu)だけを過剰発現する細胞には見られず、常に両方のタンパク質に対して染色されていたが、hSu(fu)によるhGliの細胞質隔離を表しているかもしれない。

hSu(fu)によるhGliの細胞下隔離が二つのタンパク質間の生化学的相互作用によるものであるかどうかを調べるために、我々はhGliでhSu(fu)の共免疫沈降を調べた。NIH-3T3細胞にflagエピトープ-タグhSu(fu)(pRK.hSu(fu))及びc-mycエピトープ-タグhGli(pRK.hGli)のための発現プラスミドを一過性に形質移入し、細胞を42時間後に溶解し、溶解したタンパク質複合体を抗flag又は抗myc抗体の何れかで免疫沈降させ、ついで交互抗体を用いてウェスタンブロットにかけた。hSu(fu)又はhGliだけを発現する細胞からは共免疫沈降タンパク質は検出されなかった(Fig 5B)。これに対して、両方のタンパク質を同時発現する細胞から、hSu(fu)がhGliで直ぐに共免疫沈降させられ、hGliがhSu(fu)で直ぐに共免疫沈降させられた(Fig 5B)。hSu(fu)-hGliの相互作用はインビトロ結合アッセイを使用して確認された。この目的のために、細菌により生産されたGST-hSu(fu)タンパク質をグルタチオンセファロースビーズに負荷し、インビトロ翻訳<sup>35</sup>S-標識hGliを保持する能力を調べた。hGliはGST-hSu(fu)グルタチオンセファロースビーズ上に特異的に保持されたが、GSTだけが負荷されたビーズには保持されなかった(Fig 5C)。

#### 【0105】

更なる実験において、我々は、hSu(fu)と相互作用するGli相同体であるGli2及びGli3の能力を調べた。<sup>35</sup>S-標識mGli2及びhGli3はGST-hSu(fu)-結合ビーズによって特異的に保持されたが、ルシフェラーゼ、負の対照は保持されなかった(Fig 5C)。9E10c-mycエピトープがタンパク質の端のカルボ

10

20

30

40

50

キシ末端に融合している *hG1i3* の型はこのアッセイにおいて *hSu(fu)* には結合せず(データは示さず)、*G1i3* のカルボキシ末端領域が相互作用のためには重要であることを示している。

ここに提示された結合データは、脊椎動物 *G1i* の活性が *Su(fu)* との相互作用によって負に調節されることを示している。よって、機能性 *G1i* レポーターアッセイにおいて *hG1i* の活性を *hSu(fu)* が阻害できるかどうかを調べた。このために、*G1i* 結合部位(42)の9のコピーを単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ最小プロモーターに結合させたが、これがレポーターホタルルシフェラーゼ遺伝子の転写を方向付ける。この作成物からのルシフェラーゼ遺伝子の発現は *G1i* 及び *Shh* レセプターの成分(24)によって特異的に調節されることが分かった。過去に実証されているように(24) 10、無関係なタンパク質をコードする発現プラスミド(pRK.EGFP)とルシフェラーゼレポーター作成物とのC3H10T1/2の同時形質移入は、非常に低いレベルのルシフェラーゼ活性という結果になった(Fig 5D)。これに対して、*hG1i* 発現プラスミドとのレポーター遺伝子の同時形質移入は、ルシフェラーゼ活性のレベルがおよそ100倍増加する結果となった(Fig 5D)。重要なことに、*dSu(fu)* が *Ci* の負の制御因子であるという考えと一致して、*hG1i* 活性化レポーター発現が同時発現 *hSu(fu)* の存在下で有意に抑制されたが無関係なタンパク質ではそうではない(Fig 5D)。興味深いことには、バックグラウンドを越えるルシフェラーゼ活性の増加は、*hSu(fu)* が外因性 *hG1i* の不在下でレポーター遺伝子と同時発現されたときに検出された(Fig 5D)。併せて考えると、我々の知見は、*hSu(fu)* の *hG1i* との物理的な相互作用がその転写活性の不活性化に導くことを示している。 20

*hSu(fu)* 作用の可能な機構の調査を開始するために、我々は *hSu(fu)* と、*Slimb/TrCP* の脊椎動物相同体である、*Ci* と他のタンパク質のユビキチン-プロテアソーム分解経路へのターゲティングに関係しているF-ボックス含有タンパク質との間の相互作用を調べた(31, 34, 43)。我々は、インビトロ翻訳<sup>3 5</sup>S-標識 *mSlimb* は確かに *GST-hSu(fu)*-抱合グルタチオンセファロースビーズに特異的に結合するが、*GST*-抱合ビーズ単独には結合しないことを見いだした(Fig 5C)。如何なる特定の作用機構によっても限定されることを望むものではないが、*hSu(fu)* はおそらく部分的には *hG1i* と *Slimb* の双方とのその物理的相互作用を通して *Slimb/TrCP*-依存プロテアソーム分解経路まで *hG1i* をターゲティング 30  
することにより、*hG1i* を不活性化することが提案される。あるいは、*hSu(fu)* 自体が *Slimb*-媒介分解の標的であり得、その分解が *hG1i* を機能させるようにできる。何れの場合でも、*hSu(fu)* は *Zn* フィンガー転写因子 *G1i* を通してのヘッジホッグシグナル伝達の負の制御因子である。興味深いことに、<sup>3 5</sup>S-標識 *Su(fu)* はまた *GST-hSu(fu)* に結合し(Fig 5C)、*hSu(fu)* は2-ハイブリッドアッセイにおいてそれ自身に結合することが見いだされており(データは示さず)、*hSu(fu)* が二量体として機能する可能性が非常に高いことを示している。

【0106】

更なる引用文献

1. Ingham, P.W. (1995) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 492-8 40
2. Hammerschmidt, M., Brook, A. 及び McMahon, A.P. (1997) *Trends Genet.* 13, 14-21
3. Johnson, R.L. 及び Scott, M.P. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 450-456
4. Tabin, C. J. 及び McMahon, A. P. (1997) *Trends Cell. Biol.* 7, 442-446
5. Ingham, P.W. (1998) *EMBO J.* 17, 3505-11
6. Alexandre, C., Jacinto, A. 及び Ingham, W. P. (1996) *Genes Dev.* 10, 2003-2013
7. Dominguez, M., Brunner, M., Hafen, E. 及び Basler, K. (1996) *Science* 272, 1621-5
8. Orenic, T., Slusarski, D. C., Kroll, K. L. 及び Holmgren, R. A. (1990) *Genes Dev.* 4, 1053-1067
9. Lee, J., Platt, K.A., Censullo, P., Ruiz i Altaba, A. (1997) *Development* 124, 50

2537-2552

10. Hynes, M., Stone, D. M., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Goddard, A., Gurney, A. 及び Rosenthal, A. (1997) *Neuron* 19, 15-26
11. Jiang, J. 及び Struhl, G. (1995) *Cell* 80, 563-572
12. Li, W., Ohlmeyer, J. T., Lane, M. E. 及び Kalderon, D. (1995) *Cell* 80, 553-562
13. Fan, C. M., Porter, J. A., Chiang, C., Chang, D. T., Beachy, P. A. 及び Tessier-Lavigne, M. (1995) *Cell* 81, 457-65
14. Hynes, M., Porter, J. A., Chiang, C., Chang, D., Tessier-Lavigne, M., Beachy, P. A. 及び Rosenthal, A. (1995) *Neuron* 80, 95-101 10
15. Epstein, D. J., Marti, E., Scott, M. P. 及び McMahon, A. P. (1996) *Development* 122, 2885-94
16. Hammerschmidt, M., Bitgood, M.J. 及び McMahon, A.P. (1996) *Genes Dev.* 10, 647-58
17. Goodrich, L.V., Johnson, R.L., Milenkovic, L., McMahon, J.A. 及び Scott, M.P. (1996) *Genes Dev.* 10, 301-312
18. Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M. 及び Hooper, J.E. (1996) *Cell* 86, 221-232
19. Hooper, J.E. 及び Scott, M.P. (1989) *Cell* 59, 751-65
20. Stone, D.M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T.A., Gu, Q., Johnson, R.L., Scott, M.P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., Noll, M., Hooper, J.E., de Sauvage, F. 及び Rosenthal, A. (1996) *Nature* 384, 129-34 20
21. Hooper, J.E. (1994) *Nature* 372, 461-464
22. Marigo, V., Davey, R.A., Zuo, Y., Cunningham, J.M. 及び Tabin, C.J. (1996) *Nature* 384, 176-179
23. Chen, Y., Gallaher, N., Goodman, R.H. 及び Smolik, S.M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2349-54
24. Murone, M., Rosenthal, A. 及び de Sauvage, F.J. (1999) *Curr. Biol.* In press
25. Pham, A., Therond, P., Alves, G., Tournier, F.B., Busson, D., Lamour-Isnard, C., Bouchon, B.L., Preat, T., 及び Tricoire, H. (1995) *Genetics* 140, 587-98 30
26. Ohlmeyer, J.T. 及び Kalderon, D. (1998) *Nature* 396, 749-753
27. Preat, T. (1992) *Genetics* 132, 725-36
28. Mariol, M.-C., Preat, T. 及び Limbourg-Bouchon, B. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 3244-3251
29. Monnier, V., Dussillol, F., Alves, G., Lamour-Isnard, C. 及び Plessis, A. (1998) *Curr. Biol.* 8, 583-6
30. Aza-Blanc, P., Ramirez-Weber, F.A., Laget, M.P., Schwartz, C. 及び Kornberg, T. (1997) *Cell* 89, 1043-53
31. Jiang, J. 及び Struhl, G. (1998) *Nature* 391, 493-496
32. Ruppert, J.M., Vogelstein, B., Arheden, K., 及び Kinzler, K.W. (1990) *Mol. & Cell. Biol.* 10, 5408-5415 40
33. Theodosiou, N.A., Zhang, S., Want, W.-Y. 及び Xu, T. (1998) *Development* 125, 3411-3416
34. Margottin, F., Bour, S.P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K. 及び Benarous, R. (1998) *Mol. Cell.* 1, 565-574
35. Heng, H.H.Q., Squire, J. 及び Tsiu, L.-C. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9509-9513
36. Heng, H.H.Q. 及び Tsui, L.-C. (1993) *Chromosoma* 102, 325-332
37. Shimamura, K. 及び Rubenstein, J.L.R. (1997) *Development* 124, 2709-2718
38. Phillips, H.S., Hains, J.M., Laramie, G.R., Rosenthal, A. 及び Winslow, J.W. ( 50

- 1990) *Science* 250, 290-294
39. Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. 及び Green, M.R. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 7035-7052
40. Rechsteiner, M. 及び Rogers, S.W. (1996) *TIBS* 21, 267-271
41. Bitgood, M.J., Shen, L. 及び McMahon, A.P. (1996) *Curr. Biol.* 6, 298-304
42. Sasaki, H., Hui, C.-C., Nakafuku, M. 及び Kondoh, H. (1997) *Development* 124, 1313-1322
43. Yaron, A., Hatzubai, A., Davis, M., Lavon, I., Amit, S., Manning, A.M., Andersen, J.S., Mann, M., Mercurio, F. 及び Ben-Neriah, Y. (1998) *Nature* 396, 590-594
44. Gray, I.C., Phillips, S.M., Lee, S.J., Neoptolemos, J.P., Weissenbach, J. 及び Spurr, N.K. (1995) *Cancer Res.* 55, 4800-4803
45. Rasheed, B.K., McLendon, R.E., Friedman, H.S., Friedman, A.H., Fuchs, H.E., Bigner, D.D. 及び Bigner, S.H. (1995) *Oncogene* 10, 2243-2246
46. Albarosa, R., Colombo, B.M., Roz, L., Magnani, I., Pollo, B., Cirenei, N., Giani, C., Conti, A.M., DiDonato, S. 及び Finocchiaro, G. (1996) *Am. J. Hum. Genet.* 58, 1260-1267
47. Peiffer-Schneider, S., Noonan, F.C., Mutch, D.G., Simpkins, S.B., Herzog, T., Rader, J., Elbendary, A., Gersell, K.C. 及び Goodfellow, P.J. (1998) *Genomics* 52, 9-16
48. Li, J. 等 (1997) *Science* 275, 1943-1947
49. Steck, P.A. 等 (1997) *Nat. Genet.* 15, 356-362
50. Mollenhauser, J., Wiemann, S., Scheurlen, W., Korn, B., Hayashi, Y., Wilgenbus, K.K., von Deimling, A. 及び Poustka, A. (1998) *Nature Genet.* 17, 32-36
51. Litingtung, Y., Westphal, H. 及び Chiang, C. (1998) *Nature Genet.* 20, 58-61
52. Motoyama, J., Liu, J., Mo, R., Ding, Q., Post, M. 及び Hui, C.-c. (1998) *Nature Genet.* 20, 54-57
53. Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Serge, G.V., Kronenberg, H.M. 及び Tabin, C.J. (1996) *Science* 273, 613-622
54. Goodrich, L.V., Milenkovic, K.M., Higgins, L. 及び Scott, M.P. (1997) *Science* 277, 1109-1113
55. Carpenter, D., Brush, J., Frantz, G., Rosenthal, A., de Sauvage, F.J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13630-13643
56. Persengiev, S.P., Kondova, I.I., Millette, C.F. 及び Kilpatrick, D.L. (1997) *Oncogene* 14, 2259-2264
57. Robbins, D.J., Nybakken, K.E., Kobayashi, R., Sisson, J.C., Bishop, J.M. 及び Therond, P.P. (1997) *Cell* 90, 225-234
58. Sisson, J.C., Ho, K.S., Suyama, K. 及び Scott, M.P. (1997) *Cell* 90, 235-245
59. Hui, C.-C., Slusarski, D., Platt, K.A., Holmgren, R. 及び Joyner, A.L. (1994) *Dev. Biol.* 162, 402-413
60. Mo, R., Freer, A.M., Zinyk, D.L., Crackower, M.A., Michaud, J., Heng, H.h.-Q., Chik, D.W., Shi, X.-M., Tsui, L.-C., Cheng, S.H., Joyner, A. 及び Hui, C.-C. (1997) *Development* 124, 113-123
61. Motoyama, J., Takabatake, T., Takeshima, D., Hui, C.-C. (1998) *Nature Genet.* 18, 104-106
62. Matise, M., Epstein, D.J., Park, H.L., Platt, K.A. 及び Joyner, A.L. (1998) *Development* 125, 2759-2770
63. Ding, J., Yang, L., Yan, Y.-T., Chen, A., Desai, N., Wynshaw-Boris, A. 及び Shen, M.M. (1998) *Nature* 395, 702-707
64. Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R. 及び Smith, T.F. (1994) *Nature* 371, 297-300

65. Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W.及びElledge, S. J. (1996) Cell 86, 263-274
66. Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J.及びHarper, J.W. (1997) Cell 91, 209-219
67. Yoon, J.W., Liu, C.Z., Yang, J.T., Swart, R., Iannaccone, P.及びWalterhouse, D. (1998) J. Biol. Chem. 6, 3496-3501

## 【 0 1 0 7 】

## 材料の寄託

次の材料をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, 10801ユニバーシティ・ブルーバード、バージニア州20110-2209、米国(ATCC)に寄託した:

材料	ATCC寄託番号	寄託日
DNA33455-1548	PTA-127	1999年3月5日

この寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、どれが最初であろうとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号8860638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

## 【 0 1 0 8 】

本出願の譲受人は、寄託した培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと即座に取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの物質の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に改変することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

## 【 図面の簡単な説明 】

【 Fig 1 】 天然 h S u ( f u ) の誘導アミノ酸配列 ( 配列番号 : 2 ) を示す。ヒト S u ( f u ) とショウジョウバエ S u ( f u ) ( 配列番号 : 4 ) の推定タンパク質配列のアラインメントが提示されている。同一の残基はボックスで囲み、灰色に塗り潰した領域は保存された潜在的プロテインキナーゼCリン酸化部位を示し、星印は保存された潜在的なカゼインキナーゼIIリン酸化部位を示し、細い黒のバーは h S u ( f u ) ( 上のバーの配列 ) 又は d S u ( f u ) ( 下のバーの配列 ) における候補 P K A リン酸化部位を示し、黒地に白の文字の部分は P E S T ドメインを示している。ニードルマン-ウエンチ ( Needleman-Wench ) アルゴリズム ( Needleman 及び Wunsch ( 1970 ) J. Mol. Biol. 48:443 ) をアラインメントに用い、二つのタンパク質間の 37.7% の同一性と 63% のポジティブ度が明らかになった。433のアミノ酸配列ヒトタンパク質は 47932 の分子量と 5.66 の p I ( 非グリコシル化 ) を有していると予想される。潜在的な N - グリコシル化部位は 265 の位置にある、 N L S G 配列。図面と本出願全体を通して用いた省略符号は次のものを含む : a a 、 アミノ酸 ( 類 ) ; b p 、 塩基対 ( 類 ) ; c D N A 、 R N A に相補的な D

NA; BLAST、ベーシックローカルアラインメントサーチツール; ORF、オープンリーディングフレーム; UTR、非翻訳領域; HH、ヘッジホッグタンパク質ファミリー; Hh、ショウジョウバエヘッジホッグタンパク質; Shh、ソニックヘッジホッグタンパク質; Dhh、デザートヘッジホッグタンパク質; Ihh、インディアンヘッジホッグタンパク質; dsu(fu); fusedタンパク質のショウジョウバエサプレッサー; hsu(fu)、fusedタンパク質のヒトサプレッサー; Fu、ショウジョウバエFusedタンパク質; hGli、ヒトGliタンパク質; mGli2、マウスGli2タンパク質; hGli3、ヒトGli3タンパク質; Ci、ショウジョウバエ・キュビタス・インターラプタス (*Drosophila Cubitus interruptus*) タンパク質; S limb、ショウジョウバエS limbタンパク質; mS limb、マウスS limbタンパク質; PKA、cAMP-依存性プロテインキナーゼ; FISH、蛍光インサイツハイブリダイゼーション; PCR、ポリメラーゼ連鎖反応; EST、発現配列タグ; GST、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタンパク質; MEM、最少基本培地; E、胎齢; 及び、PAGE、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法。

【Fig 2 A - 2 B】 ヒトSu(fu)遺伝子の染色体局在化を示す。Fig 2 Aはピオチン化hsu(fu)プローブのFISH局在化を示す。染色体10の長腕への割当ては同じ有糸分裂像のDAPI-染色像を重ね合わせるにより達成した(Fig 2 B中)。Fig 2 BはFISHマッピングの結果を示す図である。各ドットは単一の染色体拡散上の二重のFISHシグナルを表している。分析した全体で100の細胞の内、72が特異的に標識された。

【Fig 3 A - 3 J】 胚性及び成体齧歯類組織におけるSu(fu)mRNAの組織分布を示す。Fig 3 Aは、ホールマウント8.5日の胎齢(E8.5)のマウスに対するマウスSu(fu)プローブを用いたインサイツハイブリダイゼーションの背部の図を示し、Fig 3 Bは側部の図を表す。Fig 3 C - 3 Jは、示した年齢での、ラット全胚(Fig 3 C及び3 D)、神経管(Fig 3 E及び3 F)、又は脳(Fig 3 G、3 H、3 I及び3 J)の矢状切片(Fig 3 C、Fig 3 D、Fig 3 I及びFig 3 J)又は冠状切片(Fig 3 E - 3 H)に対するSu(fu)のインサイツハイブリダイゼーションを示す。Fig 3 JはFig 3 Iの小脳の更に高倍率の図を示す。スケールバー=0.27mm(Fig 3 A及び3 B)、0.5mm(Fig 3 C); 1.67mm(Fig 3 D)、0.16mm(Fig 3 E); 0.59mm(Fig 3 F); 1.14mm(Fig 3 G); 5.33mm(Fig 3 H); 10mm(Fig 3 I); 及び1.03mm(Fig 3 J)。省略符号は次のものを含む: ps、原始線条; np、神経板; hb、後脳; mb、中脳; fb、前脳; mes、中胚葉; som、体節; all、尿膜; man、第一大動脈弓の下顎骨成分; sc、脊髄; ctx、皮質; di、間脳; cer、小脳; ton、舌; eso、食道; liv、肝臓; gt、性器結節; lu、肺; dis、椎間板; mg、中腸; nt、神経管; epen、上衣; nn、新皮質神経上皮; hip、海馬体; ssz、線条体副脳室領域; th、視床; cau、尾状核; hyp、視床下部; olf、嗅球; ic、下丘; suc、上丘。

【Fig 4 A - 4 E】 成体マウス精巣におけるSu(fu)の組織分布を示す。Fig 4 AはSu(fu)プローブにハイブリダイズした成体精巣の断面を示す。より高い倍率の図(Fig 4 C - 4 E)は、発達中の精母細胞(Fig 4 C及び4 D)への、又は幾つかの領域では、精細管の中心(Fig 4 E)へのSu(fu)mRNAの局在化を証明しており、そこでは、胚芽細胞分化の最後の段階が生じている。Fig 4 Bはセンス鎖対照プローブでの精巣のハイブリダイゼーションを示している。スケールバーは1.0mm(Fig 4 A及び4 B)と0.065mm(Fig 4 C - 4 E)を表している。省略符号は次のものを含む: st、精細管; ta、白膜; sg、精原細胞; sc、精母細胞; lc、ライディッヒ細胞; sm、成熟精子; lu、細胞内腔。

【Fig 5 A - 5 D】 hsu(fu)の免疫細胞化学、生化学相互作用、及び生物活性を示している。Fig 5 Aは形質移入COS-7細胞中でのhsu(fu)及びhGliの共存を示す。Fig 5 Aに示したように細胞を、pRK.hsu(fu)(Fig 5 A

10

20

30

40

50

1) か、pRK.hG1i (Fig 5 A 3) か、又は二つのプラスミドの双方 (Fig 5 A 2 及び 5 A 4) で、形質移入した；タンパク質を 24 時間後に免疫化学的に染色し、蛍光顕微鏡で可視化した。形質移入した細胞を固定し、膜透過化処理し、抗 hSu (fu) 及び抗 c - myc 一次抗体を使用し、続いて cy 3 抱合抗ウサギ Ig G 又は cy 2 抱合抗マウス Ig G それぞれを用いて、hSu (fu) (赤；Fig 5 A 1 及び 5 A 2) 及び / 又は hG1i (緑；Fig 5 A 3 及び 5 A 4) に対して標識した。底部パネル (Fig 5 A 2 及び 5 A 4) は同時形質移入され両方のタンパク質に対して二重標識された細胞を示している。倍率：400x。Fig 5 B は一過性に形質移入した NIH-3T3 細胞における hG1i と hSu (fu) の共免疫沈降を示す。細胞を、示されたプラスミド (全 10  $\mu$ g) で形質移入し、42 時間後に溶解し、溶解物を抗 flag M2 抗体 (flag タグ hSu (fu) に対して) 又は抗 c - myc 抗体 (myc - タグ hG1i に対して) で免疫沈降させた。タンパク質複合体に 8% ゲル上で変性 SDS-PAGE を施し、ニトロセルロースに移し、示されたように、抗 myc 又は抗 flag 抗体でプローブ化した。ECL 検出によって抗体を可視化した。Fig 5 C は GST-融合タンパク質結合アッセイを示している。タンパク質をインビトロ転写-翻訳によって 35S で標識し、GST-hSu (fu) 又は GST の何れかに結合したグルタチオンセファロースビーズと共に 4 2 時間の間、インキュベートした。洗浄後、結合したタンパク質を SDS-泳動用バッファ中での煮沸により溶出させ、試料に 10% 又は 8% (hSu (fu) のみ) の変性 SDS-PAGE を施した。ゲルを固定し、増幅し、乾燥させてフィルムに露出した。各反応に使用された標識タンパク質の量は入力 (「in」) レーンに示したものの 4 倍であった。「Lucifer」はルシフェラーゼを示している。Fig 5 D は G1i 活性化レポーターアッセイを示している。6 ウェルのプレート中の C3H10T1/2 細胞を、hSu (fu)、hG1i、hSu (fu) + hG1i のための発現作成物、又は空のベクター (pRK5) (それぞれ 0.5  $\mu$ g) と共に、ルシフェラーゼレポータープラスミド (1  $\mu$ g) で二通りに一過性に形質移入した；形質移入した DNA の全量を pRK.EGFP で 2  $\mu$ g にした。細胞溶解物中の相対的ルシフェラーゼ活性を形質移入後 48 時間で測定し、レニラルシフェラーゼ活性 (pRL-TK；0.0025  $\mu$ g / ウェル) に規準化した。データは 3 つの中の代表的な実験からの二通りの決定の平均 + / - SD を表している。

【Fig 6 A - 6 B】 天然配列 hSu (fu) をコードする cDNA のヌクレオチド配列を示す。ヌクレオチド配列 (配列番号：1) は天然 hSu (fu) をコードするヌクレオチド配列 (ヌクレオチド 74 から 1372) (配列番号：2) を含み、ここでヌクレオチド配列 (配列番号：1) はここで「UNQ650」及び / 又は「DNA33455 - 1548」と命名されたクローンである。開始コドンはヌクレオチド 74 から 76 にあり、「O」と表された停止コドンはヌクレオチド 1373 から 1375 にある。

【Fig 7】 コンセンサス配列として構築された、ここで DNA33454 (配列番号：3) と命名されたヌクレオチド配列を示す。下線の配列は融合体のマウスサプレッサーと相同なプライマー配列を示している。

【Fig 8】 ワシントン大学 HHMI マウス EST プロジェクトを經由して Marra 等により提供された、GenBank 受託番号 AA061391 の Fused 遺伝子のマウスサプレッサーの EST マウス精巢 cDNA の 275 bp のヌクレオチド配列 (配列番号：5) を示す。

【Fig 9】 Fused 遺伝子のサプレッサーと類似性を持つ NT2 ニューロン前駆体 937230 cDNA (GenBank 受託番号 AA223637) として同定された EST ヒト脳 cDNA の 346 bp のヌクレオチド配列 (配列番号：3) を示す。EST はワシントン大学 HHMI マウス EST プロジェクトを經由して Hillier 等により提供された。

【Fig 10】 hSu (fu) エピトープタグ flag タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号：9) を示す。

【Fig 11】 hSu (fu) - GST タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号：10) を示す。

10

20

30

40

【 1 】

```

nsu(fu) 1 MAELRPSGAPGPTAPPAGPTAPPFAFLPFPGLHAIYGEORRLLYDOPNPLQVTAIVKY
dsu(fu) 1 .....MAEANLCKPEVKP...PPGUKAIDHLGOVYFNOPNPLQVTLTKY

nsu(fu) 61 WLGQPPDLDVSWTRNVSFSANIFERWHYISFOLSDLTGGNRYREFTGDOGPSGFEEL
dsu(fu) 45 WLGQDDELDTISMYKFRQDYDRMVPPIHWHYISFOLSDLTGGNRYREFTGDOGPSGFEEL

nsu(fu) 121 LTKR.....IETGEBA...PIPTWPAELMQLARYVFSQENTFSGIGHVSMHSPLD
dsu(fu) 105 LAKTEIELKQIENPEKPKQRAITWPAELMQLARYVFSQENTFSGIGHVSMHSPLD

nsu(fu) 169 NSSEIRIHHMLLTDPPQHPYQVTFHGVNITFLDTGVGCTEELHSAQGWGCGIQLLRTYPI
dsu(fu) 165 STTSKLNLLVAQDPLGCDITPTGTYDFOGLVGVFDDELEQASRWXGRGVLNLELRDDMO

nsu(fu) 229 AIGRWLITDNRREGETIFEIIPHLOERYDKGHEITGSMISGYSAKCAWDDLSRPFEDDQEDS
dsu(fu) 225 TIGQWLIIMNQBOMSELELRETLNLLDQDLKQGSLLADYNADFSRELKPTNEVVEE

nsu(fu) 289 RSTIGTQPRRLSGKDTIEQIETLRGLLEINSKIFVLPPI:NPQRQNGIAHDPAPSRKDSLE
dsu(fu) 284 .....VDFALSEKCANENRGLTDTQMK*REPFSPQSMSSSLSL*HMSQPL...DFQ

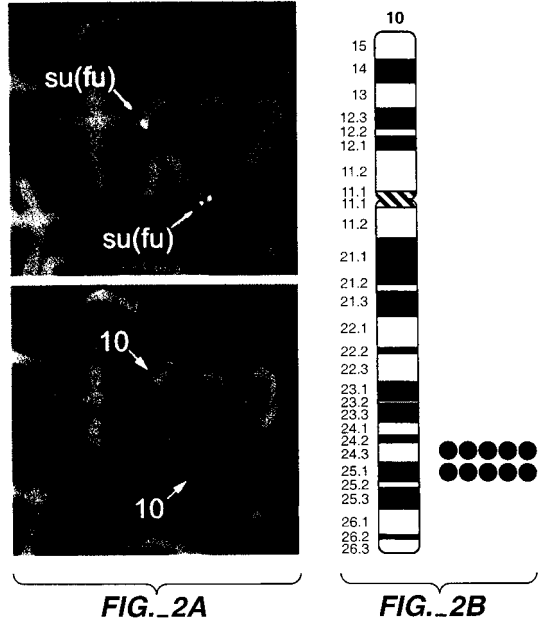
nsu(fu) 349 SDSSTAIIPHELIRTRQLESVHLKFNQESGALIPCLRGILLRGRHFGSITGCMATTF
dsu(fu) 335 AOAPNCJ.....SLDGIETLAPGVAKYLLAIKQDIRHGRHFGSITGCMATTF

nsu(fu) 409 VSTGVGAFATEEHPYAAAHGPMUQL
dsu(fu) 394 VAESVYGSANIVNVEPVGVLGTYMIGVLLIPDELYPALMEDFOSAGLDEKCEPKERLELEWPO

dsu(fu) 444 KNLKLIIDOPEPVLPMSLDAAPLKM

```

【 2 A - 2 B 】



【 3 A - 3 J 】

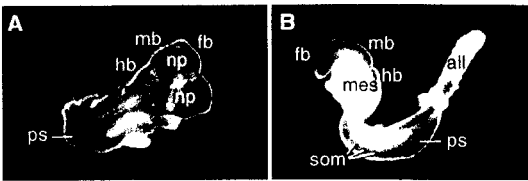


FIG. 3A

FIG. 3B

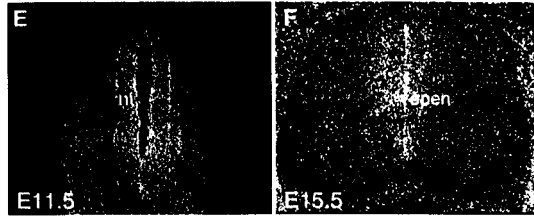


FIG. 3E

FIG. 3F

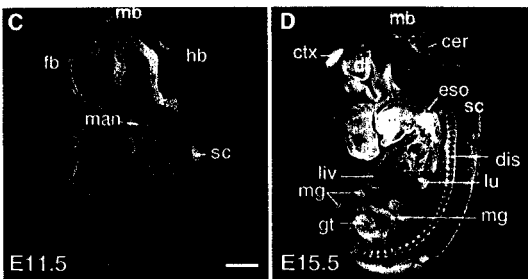


FIG. 3C

FIG. 3D

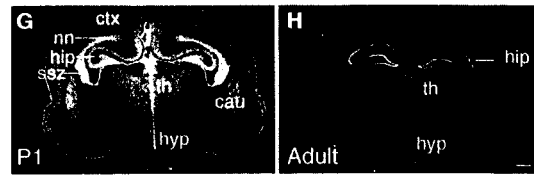


FIG. 3G

FIG. 3H

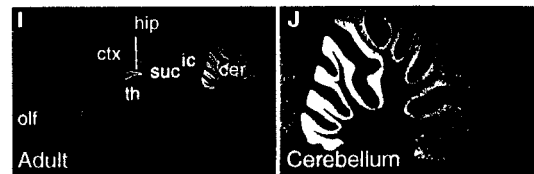


FIG. 3I

FIG. 3J

【 4 A - 4 E 】

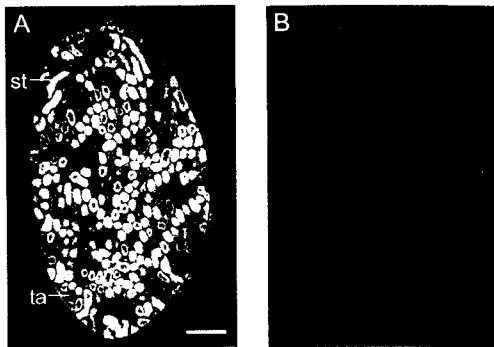


FIG.\_4A

FIG.\_4B

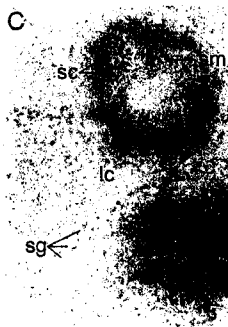


FIG.\_4C

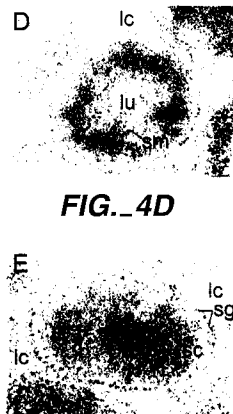


FIG.\_4E

【 6 A - 6 B 】

```

1  CCGCCCTGGCC CCGTACGTCCT CCGCCGCTGCTT CCGATTTGCC CAGTGTCCGCG CCGATCGACC CCGATGCGCG AGCTCGGCC TACCGGCC
2  GCGCCGCGGT GCGCCGCGCG GCGCCGCGCG GCGCCGCGCG GCGCCGCGCG GCGCCGCGCG GCGCCGCGCG GCGCCGCGCG GCGCCGCGCG
3  M A E L R P S G A
4  *orf
5  *MET
101 CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
102 GCGCCGCGGT GCGCCGCGCG GCGCCGCGCG GCGCCGCGCG GCGCCGCGCG GCGCCGCGCG GCGCCGCGCG GCGCCGCGCG GCGCCGCGCG
103 P G P T A P P A P G P T A P P A F A S L F P P G L H A I Y G E C R R
104 GCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
201 CCGCCGCGCG TCGCCGCGCG AACCGCGCG CCGCCGCGCG TCGCCGCGCG TCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
202 CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG TCGCCGCGCG TCGCCGCGCG TCGCCGCGCG TCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
44 L Y P D D Q P N P L Q V T A I V K Y W L G C P D P L D Y S V M Y R N
301 TCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
302 CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
77 V G S P S A N I P E H W H Y I S F G L S D L Y G D N R V H E F T G
401 TCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
110 T D G P S G F G F E L T F R L K R E T G E S A P P T W P A E L M Q G
501 CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
144 L A R Y V F Q S E N T F C S G D H V S W H S P L D N S E S R I Q H
601 CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
177 M L L T E D P Q M Q P V Q T P F G V T F L Q I V G V C T E E L H
701 CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
210 S A Q Q W N G Q G I L E L L R T V P I A G G P W L I T D M R R G E T

```

【 5 A - 5 D 】

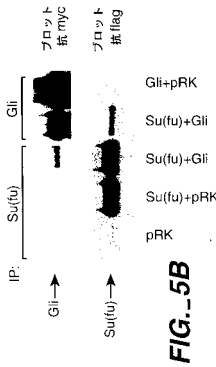


FIG.\_5B

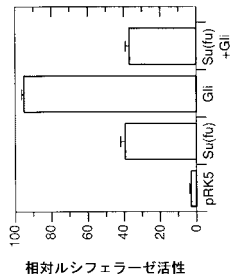


FIG.\_5D

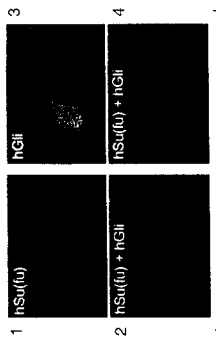


FIG.\_5A

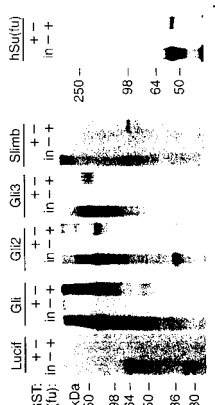


FIG.\_5C

FIG.\_6B

```

801 CCGATTTGGA GATCGATCGA CAGCTCGGAG AGAGAGTTGA CAAGGCGATC GAGACAGTGC GCTTCAACT GAGTGTGTC AGTGGCGAGT GTCCCTGGGA
802 GGTAAACT CTACTAGTGT GTGAGGTTTC TCTTCAACT GTTTCCTATC CTCTCTATC CAGGTTTGA CTAACAGAG CTAACAGAGT CAGCAGACT
244 I F E I D P H Q E R V D K G I E T T D G S N L S G V S A K C A W D
901 TCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
277 D L S R P E D E D S R S I C I G T Q P R R L S G K D T E Q I R
1001 GAGACGCG GAGAGGCT CGAGTACAG ACGAAGCTC TCGTCCGCG CAGCAGGCG CAGCAGGCG CAGCAGGCG CAGCAGGCG
310 E T L R G L E I N S A P V L P I N F P Q R Q N G L A H D R A P S R
1101 GAGAGGAG CCGGAGAT CAGCTCGA CCGCATAT TCCGATGAG CCGGAGGAG CCGGAGGAG CCGGAGGAG CCGGAGGAG
344 K D S L E S D S S T A I I P H E L I R T R Q L E S V H L K F N Q E
1201 CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
377 S G A L I P L C L R G R L L H G R H F T Y K S I T G D M A I T F V
1301 TCGCCGCGCG TCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
410 S T G V E G A F A T E H P Y A A H G P W L Q L O
1401 CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
1501 ATCGCCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
1601 CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG
1701 GCGCCGCGCG GAGCAGGCT CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG CCGCCGCGCG

```

【 7 】

```

1 GGACTGCTG CCGCCTCTAC CCTGACCAGC CGAACCCTGG CCAGGTTACC CTATCGTCA
61 AGTACTGGTT GGGTGGTCCG GACCCCTTGG ACTATGTTAG CATGTACAGG ACATGGGGA
121 GTCTCTCTCG CAACATCCCT GAGCACTGGC ACTACATCAG CTTTGGCCTG GTGATCTCT
181 ATGGTGACAA CAGAGTCCAT GAGTTTACAG GAACAGACGG ACCAAGTGGG TTGGCTTGG
241 AGTTGACGTT TCGTCTGAAG AGAGAAACTG GGGAG

101 GCCATCTACG GAGATGCG CCGCYTTTAX CTTTACAGC GGAACCCGCT CGAGTTTACC GGTATGCTA AGTACTGGT GGGTGGGCA GACCCCTTGG
CGGTGATGC CTTTCAAGC GCGCAANTY GAAATGTCG GCTTGGGCA GGTCCAAATG CAGTACAGT TCATACCAA CCGCACCCTG CTGGGAAAC
'msuf.f

201 ACTATGTTAG CATGTACAGG AATGCGGA GCCCTCTG TACATCCC GAGCACTGCG ACTGATCAG CTGCGCTG AGTATCTT ATGTCGAAA
TGATCAATC GTACATGTC TTACATCCCT CCGAAGAG ATTGTAGG CTGCTGACG TGTATGATC GAGCCGAG TCACATGGA TACAGTGT
'msuf.p

301 CAGATCCAT GAGTTTACA GGAACAGATG GACTGATGG TTTTGT
GTCTGAGTA CTTCAATGT CTTTCTTAC CTGATCACC AAAACA
'msuf.r

```

【 8 】

```

1 GAGAGTGTG CCGCCTCTAC CCTGACCAGC CGAACCCTGG CCAGGTTACC CTATCGTCA
61 AGTACTGGTT GGGTGGTCCG GACCCCTTGG ACTATGTTAG CATGTACAGG ACATGGGGA
121 GTCTCTCTCG CAACATCCCT GAGCACTGGC ACTACATCAG CTTTGGCCTG GTGATCTCT
181 ATGGTGACAA CAGAGTCCAT GAGTTTACAG GAACAGACGG ACCAAGTGGG TTGGCTTGG
241 AGTTGACGTT TCGTCTGAAG AGAGAAACTG GGGAG

```

【 9 】

```

1 GGACTGCTG CCGCCTCTAC CCTGACCAGC CGAACCCTGG CCAGGTTACC CTATCGTCA
61 CCGCCTCTCG CAACATCCCT GAGCACTGGC ACTACATCAG CTTTGGCCTG GTGATCTCT
121 CCGCCTCTCG CAACATCCCT GAGCACTGGC ACTACATCAG CTTTGGCCTG GTGATCTCT
181 GGGTGGGCA GACCCCTTGG ACTATGTTAG CATGTACAGG AATGTTGGGA GCGCTTCTGC
241 TACATCCCT GAGCACTGGC ACTACATCAG CTTTGGCCTG AGTATCTCT ATGTTGACAA
301 CAGAGTCCAT GAGTTTACA GGAACAGATG GACTGATGG TTTTGT

```

【 10 】

```

MAELRPSGAPGPTAPPAPGPTAPPAPAFASLFFPGLHAIYGEERLLYDQPNPLQVTAIVKY
WLGGPDPLDYVSMYRNVSANIPHEWHYISFGLSDLYGDNVHEFTGTDGSPSGFEL
TFLRKRETESAPPTWPAELMQLARVVFQSENTFCSDHVSWHSPLDNSESRIQHMLIT
EDPQMOPVQTPFGVVTFLQIVGCTEELHSAQQWNGQILELLRTVPIAGGWLITDMRR
GETIFEIDPHLQERVVDKGIETDGSNLSGVSAKCAWDDLSPPEDEDSRSICIGTQPRRL
SGKDTQIRETLRRLGLEINSKPVLPINPQRQGLAHDRAPSRKDSLESSTAIIPHEL
IRTRQLESVHLKFNQESGALIPCLRLRLLHGRHFTYKSIITGDMAITFVSTGVEGAFATE
EHPYAAHGFWLQLDYKDDDDK

```

【 11 】

```

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEHLVERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYID
GDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRAYSKDFETLKV
DFLSKLPKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMFLYDALDVLVYMDPCLDAPFKLVCFK
KRIEAIPQIDKYLKSKYIAWLQGWQATFGGDPKSDLVFRGSAELRPSGAPGPTAP
PAPGPTAPPAPAFASLFFPGLHAIYGEERLLYDQPNPLQVTAIVKYWLGGPDPLDYVSMYR
NVGSPSANIPHEWHYISFGLSDLYGDNVHEFTGTDGSPSGFELTFLRKRETESAPPT
WPAELMQLARVVFQSENTFCSDHVSWHSPLDNSESRIQHMLITEDPQMOPVQTPFGVV
TFLQIVGCTEELHSAQQWNGQILELLRTVPIAGGWLITDMRRGETIFEIDPHLQERV
DKGIETDGSNLSGVSAKCAWDDLSPPEDEDSRSICIGTQPRRLSGKDTQIRETLRRLG
LEINSKPVLPINPQRQGLAHDRAPSRKDSLESSTAIIPHELIRTRQLESVHLKFNQ
ESGALIPCLRLRLLHGRHFTYKSIITGDMAITFVSTGVEGAFATEEHPYAAHGFWLQ

```

【 配列表 】

000465921900001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 2
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02 C
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15 Z
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50 Z

- (72)発明者 ガーニー, オースティン, エル.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 2, ベルモント, デビー レーン 1
- (72)発明者 ムロン, マクシミリアン  
スイス国 エパリングス シーエイチ - 1 0 6 6, グランド ケミン 1 2 8
- (72)発明者 ローゼンタール, アーノン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, バーリンゲーム, チューリップ コート 4 0
- (72)発明者 ストーン, ドンナ, エム.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 5, プリスベーン, シエラ ポイント ロード 6 8  
4
- (72)発明者 ウッド, ウィリアム, アイ.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, ヒルズバラ, サウスダウン コート 3 5

審査官 渡邊 潤也

- (56)参考文献 Hillier L.et al., "Accession:AA223637[gi:1844170],Definition:zr07f05.r1 Stratagene NT2 neuronal precursor 937230 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:650817 5' similar to TR:E22318 1 E223181 SUPPRESSOR OF FUSED GENE, mRNA sequence."NCBI Entrez Nucleotide[online];12-MAR-1998 uploaded,NCBI,[retrieved on 09 February 2010]Retrieved from the Internet:<URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/1844170?report=genbank&log\\$=seqview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/1844170?report=genbank&log$=seqview)>  
EMBO J.,1998,17(13),p.3505-11  
Genetics,1995,140(2),p.587-98

## (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
UniProt/GeneSeq  
PubMed