

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-537983

(P2004-537983A)

(43) 公表日 平成16年12月24日(2004.12.24)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
<b>A O 1 K 67/027</b>	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 35/76</b>	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 5
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 P 25/14	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 199 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-583469 (P2002-583469)	(71) 出願人	598006222
(86) (22) 出願日	平成14年3月5日 (2002.3.5)		アベンティス・ファーマ・ソシエテ・アノニム
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月4日 (2003.9.4)		フランス国92160アントニー・アヴェニュー・レモン・アロン20
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/003320		
(87) 国際公開番号	W02002/085943	(71) 出願人	503323774
(87) 国際公開日	平成14年10月31日 (2002.10.31)		ザ・ガバメント・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ
(31) 優先権主張番号	60/272, 759		アメリカ合衆国ワシントン・ディー・シー20201. インディペンデンスアベニュー200. ユー・エス・デパートメント・オブ・ヘルス・アンド・ヒューマン・サービス
(32) 優先日	平成13年3月5日 (2001.3.5)	(74) 代理人	100091731
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 高木 千嘉
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトA B C C 1 2 遺伝子の核酸、このような核酸を含むベクター、およびこれらの使用

## (57) 【要約】

本発明は、新規なヒトA B C C 1 2 遺伝子、ならびに新規な短鎖および長鎖のA B C C 1 2 タンパク質アイソフォームをコードするc D N Aに関する。本発明は、このような核酸を含むベクターおよび組換え宿主細胞、ヌクレオチド・プローブおよびプライマーにも関し、A B C C 1 2 遺伝子中またはA B C C 1 2 遺伝子の対立遺伝子によって産生される対応するタンパク質アイソフォーム中の多型および突然変異を検出するための手段にも関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 1 ~ 3 2 のいずれか 1 つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

## 【請求項 2】

配列番号 1 ~ 3 2 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも 8 個の連続したヌクレオチドを含む単離された核酸。

## 【請求項 3】

配列番号 1 ~ 3 2 のいずれか 1 つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、少なくとも 80 % のヌクレオチドが同一である単離された核酸。

10

## 【請求項 4】

核酸が、配列番号 1 ~ 3 2 のいずれか 1 つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、85 %、90 %、95 %、または 98 % のヌクレオチドが同一である、請求項 3 に記載の単離された核酸。

## 【請求項 5】

配列番号 1 ~ 3 2 のいずれか 1 つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、厳密性の高い条件下でハイブリッドを形成する単離された核酸。

## 【請求項 6】

配列番号 1 ~ 3 2 のいずれか 1 つにおいて示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

20

## 【請求項 7】

配列番号 1 ~ 3 2 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含む、A B C C 1 2 遺伝子に特異的なヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマー。

## 【請求項 8】

配列番号 3 5 ~ 4 6 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む、A B C C 1 2 遺伝子に特異的なヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマー。

## 【請求項 9】

a) 増幅反応に必要な試薬の存在下で、第 1 のヌクレオチド・プライマーが核酸領域の 5' の位置でハイブリッドを形成し、第 2 のヌクレオチド・プライマーが核酸領域の 3' の位置でハイブリッドを形成する 2 つのヌクレオチド・プライマーと核酸を接触させること、および

30

b) 増幅した核酸領域を検出すること

を含む請求項 1 に記載の核酸の領域を増幅する方法。

## 【請求項 10】

2 つのヌクレオチド・プライマーが、

a) 配列番号 1 ~ 3 2 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列または相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含むヌクレオチド・プライマー、

b) 請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載のヌクレオチド・プライマー、

40

c) 配列番号 3 5 ~ 4 6 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的な配列を有する核酸を含むヌクレオチド・プライマー

からなる群から選択される請求項 1 に記載の核酸の領域を増幅する方法。

## 【請求項 11】

a) そのハイブリダイゼーション位置が核酸領域のそれぞれ 5' および 3' に位置する 2 つのヌクレオチド・プライマーと、場合によって、

b) 増幅反応に必要な試薬

とを含む請求項 1 に記載の核酸を増幅するためのキット。

## 【請求項 12】

2 つのヌクレオチド・プライマーが、

50

a) 配列番号 1 ~ 3 2 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列または相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含むヌクレオチド・プライマー、  
b) 請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載のヌクレオチド・プライマー、  
c) 配列番号 3 5 ~ 4 6 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的な配列を有する核酸を含むヌクレオチド・プライマー  
からなる群から選択される請求項 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 3】

マーカ化合物を含む、請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載のヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマー。

【請求項 1 4】

a) 1) 配列番号 1 ~ 3 2 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含むヌクレオチド・プローブ、  
2) 請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載のヌクレオチド・プライマー、  
3) 配列番号 3 5 ~ 4 6 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含むヌクレオチド・プローブ  
からなる群から選択されるヌクレオチド・プローブと核酸を接触させること、および  
b) 核酸とプローブで形成される複合体を検出すること  
を含む請求項 1 に記載の核酸を検出する方法。

【請求項 1 5】

プローブが担体上に固定されている、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

a) 1) 配列番号 1 ~ 3 2 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含むヌクレオチド・プローブ、2) 請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載のヌクレオチド・プライマー、3) 配列番号 3 5 ~ 4 6 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含むヌクレオチド・プローブからなる群から選択されるヌクレオチド・プローブと、場合によって、  
b) ハイブリダイゼーション反応に必要な試薬  
とを含む請求項 1 に記載の核酸を検出するためのキット。

【請求項 1 7】

プローブが担体上に固定されている、請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 1 8】

請求項 1 に記載の核酸を含む組換えベクター。

【請求項 1 9】

ベクターがアデノウイルスである、請求項 1 8 に記載のベクター。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 に記載の組換えベクターを含む組換え宿主細胞。

【請求項 2 1】

請求項 1 に記載の核酸を含む組換え宿主細胞。

【請求項 2 2】

配列番号 3 3 または 3 4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離された核酸。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の核酸を含む組換えベクター。

【請求項 2 4】

請求項 2 2 に記載の核酸を含む組換え宿主細胞。

【請求項 2 5】

請求項 2 3 に記載の組換えベクターを含む組換え宿主細胞。

【請求項 2 6】

10

20

30

40

50

- a) 配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、
- b) 配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含むポリペプチド断片またはポリペプチド変異体、および
- c) 配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに相同的なポリペプチドからなる群から選択される単離されたポリペプチド。

【請求項 27】

請求項 26 に記載の単離されたポリペプチドに対する抗体。

【請求項 28】

抗体が検出可能な化合物を含む、請求項 27 に記載の抗体。

【請求項 29】

10

- a) ポリペプチドを請求項 27 に記載の抗体と接触させること、および
- b) ポリペプチドと抗体で形成された抗原 / 抗体複合体を検出することを含むポリペプチドを検出する方法。

【請求項 30】

- a) 請求項 27 に記載の抗体と、
- b) ポリペプチドと抗体で形成された抗原 / 抗体複合体の検出を可能にする試薬とを含むポリペプチドを検出するための診断キット。

【請求項 31】

請求項 1 に記載の核酸と、生理的に適合する賦形剤とを含む薬剤組成物。

【請求項 32】

20

請求項 18 に記載の組換えベクターと、生理的に適合する賦形剤とを含む薬剤組成物。

【請求項 33】

発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った患者の予防用および / または治療用薬剤を製造するための請求項 1 に記載の核酸の使用。

【請求項 34】

発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った患者の予防用および / または治療用薬剤を製造するための請求項 21 に記載の組換えベクターの使用。

【請求項 35】

発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った患者の予防用 / または治療用薬剤を製造するための、配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含む単離された A B C C 1 2 ポリペプチドの使用。

30

【請求項 36】

配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、生理的に適合する賦形剤とを含む薬剤組成物。

【請求項 37】

発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼの予防用または治療用の活性成分をスクリーニングするための、配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含む単離された A B C C 1 2 ポリペプチドの使用。

【請求項 38】

発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼの予防用または治療用の活性成分をスクリーニングするための、配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含む A B C C 1 2 ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の使用。

40

【請求項 39】

- a) 少なくとも 1 つの A B C C 1 2 ポリペプチドと検出可能なマーカーを含む基質とを含む膜小胞を調製すること、
- b) ステップ a) で得た小胞を作用薬または拮抗薬の候補化合物とインキュベートすること、
- c) 検出可能なマーカーを含む基質の放出量を定性的かつ / または定量的に測定すること、および
- d) 作用薬または拮抗薬の候補化合物とともにまだインキュベートしていない膜小胞によ

50

る標識基質放出の測定値と、ステップb)で測定した基質の放出量とを比較することを含むA B C C 1 2ポリペプチドの作用薬または拮抗薬をスクリーニングする方法。

【請求項40】

a)検出可能なマーカーで標識した陰イオンを含むA B C C 1 2ポリペプチドを発現する細胞をインキュベートすること、

b)ステップa)の細胞を洗浄して細胞中に侵入していない過剰の標識陰イオンを除去すること、

c)ステップb)で得た細胞をA B C C 1 2ポリペプチドの作用薬または拮抗薬の候補化合物とともにインキュベートすること、

d)細胞からの標識陰イオンの流出量を測定すること、および

e)作用薬または拮抗薬の候補化合物とともにまだインキュベートしていない細胞で測定した標識陰イオンの流出量と、ステップd)で測定した標識陰イオンの流出量とを比較すること

を含むA B C C 1 2ポリペプチドの作用薬または拮抗薬をスクリーニングする方法。

【請求項41】

請求項24または25に記載の組換え宿主細胞を含む移植片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、A B C C 1 2と称する新規な遺伝子、および新規なA B C C 1 2タンパク質をコードするcDNAに関する。本発明は、ベクターおよび組換え宿主細胞、ヌクレオチド・プローブおよびプライマーにも関し、A B C C 1 2遺伝子における、またはA B C C 1 2遺伝子の対立遺伝子形(allelic form)によって産生される対応するタンパク質における一般には多型を、とりわけ突然変異を検出するための手段にも関する。

【背景技術】

【0002】

A T P結合領域(A B C)輸送体スーパーファミリーは、最大の遺伝子ファミリーの1つであり、膜を通る多種多様な物質のエネルギー依存性輸送に関わる機能的に多様な膜タンパク質グループをコードしている(Dean等、Curr Opin Genet Dev, 1995, 5, 779~85)。活性な輸送体タンパク質は、細菌からヒトへの進化の過程で極めて良好に保存されているタンパク質ファミリーを構成している(AmesおよびLecar、FASEB J., 1992, 6, 2660~2666)。A B Cタンパク質は、様々な物質、例えば、イオン、アミノ酸、ペプチド、糖、ビタミン、またはステロイド・ホルモンの細胞外および細胞内の膜輸送に関与している。特徴が明らかな40個のヒトのメンバーのうち11個のメンバーは、ヒトの疾患に付随すると記述されており、なかでもA B C A 1、A B C A 4(A B C R)、A B C C 7(C F T R)はそれぞれタンジール病(Bodzioch M等、Nat. Genet., 1999, 22(4); 347~351; Brooks-Wilson等、Nat Genet, 1999, 22(4), 336~345; Rust S等、Nat. Genet., 1999, 22, 352~355; Remaley A T等、)、スタガルト病(Lewis R A等、Am. J. Hum. Genet., 1999, 64, 422~434)、および嚢胞性線維症(Riordan JM等、Science, 1989, 245, 1066~1073)に関与していると考えられている。これらの意味するところは、A B C遺伝子ファミリーが機能的に重要な役割を果たしているということであり、新しい遺伝子ファミリー・メンバーの発見は、ヒト疾患の生理病理学に新たな洞察を与えるはずである。

【0003】

プロトタイプのA B Cタンパク質はA T Pと結合し、A T Pの加水分解エネルギーを使用して様々な分子の細胞膜を通る輸送を駆動している。真核生物に由来するほとんどのA B C機能性タンパク質は、完全輸送体(full-transporter)をコードしており、それぞれが2つのA T P結合領域(ヌクレオチド結合性フィールド、N B F)および2つの膜貫通(T M)領域からなっている。完全な輸送体のほとんどは、T M - N B F - T M - N B Fの形で配列している(Dean等、Curr Opin Genet, 1995, 5, 79~785)。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 4 】

A T P 結合領域のアミノ酸配列を解析することによって、A B C 遺伝子をサブファミリーに分類できるようになった (Allikmets等、Hum Mol Genet、1996、5、1649～1655)。現在、最近のHUGOの分類によれば、ヒトゲノムではA B C AからA B C Gと命名された7つのA B C 遺伝子サブファミリー、すなわち、A B C A (A B C 1サブファミリー)、A B C B (MDR / TAPサブファミリー)、A B C C (CFTR / MRPサブファミリー)、A B C D (ALDサブファミリー)、A B C E (OABPサブファミリー)、A B C F (GCN20サブファミリー)、およびA B C G (白色 (white) サブファミリー) が記載されている。これらのサブファミリーの大多数は、膜貫通領域の配列中にながり保存されていることも示す、類似の遺伝子構成 (gene organization) を有する遺伝子を含む。しかし、A B C タンパク質は極めて多様な物質を輸送し、いくつかの異なるサブファミリーのメンバー同士が、同じサブファミリー内のタンパク質同士よりも基質の認識において高い類似性を互いに有することが示された。このサブファミリーのうち5つは、酵母のゲノム中にもあることから、これらのグループが真核生物の進化の初期に存在し、維持されてきたことがわかる (Decottignies等、Nat Genet、1997、137～45; Michaelis等、1995、Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

10

## 【 0 0 0 5 】

ヒトにおいて同定された数個のA B C 輸送タンパク質は、様々な疾患に関連している。腫瘍細胞における多剤耐性の表現型のいくつかは、やはりA B C 輸送体構造を有するMDR (多剤耐性) タンパク質をコードする遺伝子に関連している。別のA B C 輸送体は、ニューロンおよび腫瘍の病態に関連し (米国特許第5,858,719号)、あるいは金属のホメオスタシス異常によって引き起こされる疾患に関与している可能性がある (Biochim Biophys Acta、1999 Dec 6; 1461(2): 18～404)。

20

## 【 0 0 0 6 】

ヒトA B C C サブファミリーは、現在、同定された10種のメンバー (A B C C 1～10) を有し、このうち7種は多剤耐性様 (multidrug resistance-like) (MRP) サブグループに由来し、2種はスルホニル尿素受容体 (SUR) サブグループに由来し、1種はCFTR遺伝子である。MRP様タンパク質は、有機陰イオン輸送体である。すなわち、MRP様タンパク質は、例えばメトトレキセート (MTX) などの陰イオン性薬物、ならびにグルタチオン (GSH)、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドと結合する中性薬物を輸送し、ヌクレオシド・アナログに対する耐性にある役割を果たしている (Cui等、Mol Pharmacol、1999、55、929～37; Kool等、Proc Natl Acad Sci、1999、96、6914～9; Schuetz等、Nat Med、1999、5、1048～51; Wijnholds等、Proc Natl Acad Sci、2000、97、7476～81)。より具体的には、A B C C 1、A B C C 2、およびA B C C 3は、GSH、グルクロナート、サルフェート、およびMTXなど他の有機陰イオンに結合する薬物を輸送し、一方、A B C C 4およびA B C C 5タンパク質は、PMEAを含めたヌクレオチド・アナログおよびプリン塩基アナログに対する耐性を付与する。いくつかのA B C C サブファミリー・メンバーにおけるいくつかの遺伝的変異は、ヒトの様々な遺伝病に関連することが確認された。例えば、嚢胞性線維症は、A B C C 7 遺伝子、すなわちCFTR (嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子) 遺伝子の突然変異によって引き起こされる (Riordan等、Science、1989、245、1066～73)。A B C C サブファミリーの別のメンバーであるA B C C 2 遺伝子は、デュピン・ジョンソン症候群に関連がある (Wada等、Hum Mol Genet、1998、7、203～7)。また、最近、A B C C サブファミリーに属する別の遺伝子であるA B C C 6 遺伝子のコード配列における突然変異が、結合組織の遺伝的障害である弾力線維性仮性黄色腫の表現型の原因であることが確認された (Bergen等、Nat. Genet.、2000、25、228～31; Le Saux等、Nat Genet、2000、25、223～7)。同様に、スルホニル尿素受容体であるA B C C 8 すなわちSUR1は、乳児期の家族性持続性高インシュリン性低血糖症 (familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia) に関与していると考えられる (Thomas等、Science、1995、268、426～9)。

30

40

50

したがって、A B C C サブファミリーに由来する新しい遺伝子の特徴を決定することによ

って、トランスロカーゼ活性を有し、ヒトの病理に主要な役割を果たし得る生物学的に重要な輸送体が得られる可能性がある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本出願人は、A B C C タンパク質サブファミリーに属し、A B C C 1 2 と命名された新規な遺伝子を発見しその特徴を明らかにした。A B C C 1 2 遺伝子には2つの異なるスプライシング形 (splicing forms) があるので、異なる転写体アイソフォームが同定された。したがって、ヒトでは、2つの異なる m R N A A B C C 1 2 が発現することが判明した。2通りのスプライシングの結果生じる2種類のメッセンジャーは、長さの異なる3つのアミノ酸を含む2種類の A B C C 1 2 タンパク質をコードし、1つは長鎖 A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームと称し、もう1つは短鎖 A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームと称する。また、この新たに発見した遺伝子は、アミノ酸配列、特に膜貫通領域 (T M) および A T P 結合領域 (N B D) 内のアミノ酸配列がかなり保存されており、類似の遺伝子構成を有する。特に、この遺伝子は、A B C C 5、A B C C 2、および A B C C 3 など他の A B C C サブファミリー・メンバーに、具体的には A T P 結合ドメインにおいて、より具体的には C 末端 A T P 結合ドメインにおいて密接に関係していると思われる。A B C C 1 2 タンパク質は、A B C C 4 および A B C C 5 と同様、他のよく知られたサブグループのメンバーである A B C C 1 (M R P 1) よりも小さく、余分の N 末端ドメインを欠いていると考えられるが (Borst等、J Natl Cancer Inst、2000、92、1295~302)、これは輸送機能には不要である (Bakos等、J. Biol. Chem、1998、273、32167~75)。構造的に類似した A B C タンパク質は、膜を通して類似した物質を輸送することが多いので、A B C C 1 2 タンパク質が A B C C 4 遺伝子および/または A B C C 5 遺伝子と機能的類似性、すなわち、P M E A などのヌクレオチド・アナログおよびプリン塩基アナログに対する耐性を有すると考えることは理に適っている (Schuetz等、Nat Med、1999 5、1048~51; Wijnholds等、Proc Natl Acad Sci、2000、97、7476~81)。

10

20

【0008】

また、本出願人は、新規な遺伝子 A B C C 1 2 を、ヒト16番染色体の16q12遺伝子座にある領域に位置づけた。この領域は、発作性運動誘発性ジスキネジー (paroxysmal kinesigenic ジスキネジー) 舞蹈アテトーゼ (Tomita等、Am J Hum Genet、1999、65、1688~97; Bennett等、2000) と称される遺伝的病理と統計上関連している領域である。この結果は、A B C C 1 2 がこの障害の候補位置にあり、したがって A B C C 1 2 遺伝子が発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼの臨床的な表現型の一原因遺伝子であり得るという仮説を支持するものである。

30

【0009】

発作性ジスキネジーの中で最も多いタイプである発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼ (P K C) は、突然の随意運動、ストレス、または興奮によって誘発される、舞蹈病および筋緊張異常を含めた反復的で頻繁な不随意運動および不随意姿勢の発作によって特徴づけられる障害である (Swoboda等、Neurology、2000、55、224~30)。その発症は小児期または青年期初期であり、その頻度と重症度は年齢とともに減弱し、抗けいれん薬を用いた治療が効く。P K C は、家族性で散発的に起こり、女性よりも男性で多く発症する。これは、大部分の家族において、不完全浸透度の常染色体優性形質として遺伝する。この遺伝子座は、ヒト染色体16q11~12に位置づけられている (Tomita等 (1999) Am. J. Hum. Genet. 65、1588~1697; Bennett等 (2000) Neurology 54、125~130)。

40

【0010】

重複する遺伝子座は、発作性舞蹈アテトーゼを伴う乳児けいれん (I C C A) の遺伝子を含むと予想されている (Lee等 (1998) Hum. Genet. 103、608~612)。さらに、本出願人は、A B C C 1 2 遺伝子の発現パターンを P C R および E S T データベース・マイニングによって決定した。それによれば、A B C C 1 2 遺伝子は、P K C の病因に関わっている可能性がある C N S などの組織中で発現することが示唆される。

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0011】

本発明は、システイニル・ロイコトリエンなどの有機陰イオン輸送体、メトトレキセートなどの陰イオン性薬物、ならびにグルタチオン（GSH）、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合する中性薬物の輸送に、あるいはその染色体候補領域が16番染色体、より正確には16q腕、さらに正確には発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに対する16q12遺伝子座に位置する病理に関与している可能性が高いヒトABCC12遺伝子、cDNA、タンパク質アイソフォームの核酸に関する。

したがって、本発明の第1の主題は、配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸である。

10

## 【0012】

本発明は、配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも8個の連続したヌクレオチドを含む核酸にも関する。

本発明は、配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、少なくとも80%のヌクレオチドが同一である核酸にも関する。

本発明は、配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは98%のヌクレオチドが同一である核酸にも関する。

本発明は、配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列と、厳密性の高い条件下でハイブリッド形成する核酸にも関する。

20

本発明は、短鎖および長鎖ヒトABCC12タンパク質アイソフォームをコードする核酸、特にcDNA分子にも関する。したがって、本発明は、配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸に関する。

本発明は、配列番号1～32のいずれか1つで示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸にも関する。

## 【0013】

本発明によれば、配列番号33のアミノ酸配列を含む1356アミノ酸の短鎖ABC C12ポリペプチドアイソフォームをコードする配列番号1のヌクレオチド配列を含む核酸。

本発明によれば、配列番号34のアミノ酸配列を含む1359アミノ酸の長鎖ABC C12ポリペプチド・アイソフォームをコードする配列番号2のヌクレオチド配列を含む核酸。

30

したがって、本発明は、配列番号33のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸にも関する。

したがって、本発明は、配列番号34のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸にも関する。

したがって、本発明は、配列番号33のアミノ酸配列を含むポリペプチドにも関する。

したがって、本発明は、配列番号34のアミノ酸配列を含むポリペプチドにも関する。

したがって、本発明は、配列番号33で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドにも関する。

40

したがって、本発明は、配列番号34で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドにも関する。

## 【0014】

本発明は、ABCC12遺伝子中の、またはこれらの遺伝子の対立遺伝子形によって産生される対応するタンパク質中の一般には多型、とりわけ突然変異を検出するための手段にも関する。

本発明は、別の一態様によれば、例えば1個または複数のヌクレオチドの置換、付加、欠失など少なくとも1つの二多型性（biallelic polymorphism）を含むABCC12遺伝子のヌクレオチド配列にも関する。

ABCC12核酸領域に位置する核酸配列、特に突然変異または多型のいずれか1つを含

50



む核酸配列とハイブリッドを形成するヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマー（ゲノムDNA、メッセンジャーRNA、cDNA）。

本発明によるヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマーは、配列番号1～32のいずれか1つを含む核酸またはその相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも8個の連続したヌクレオチドを含む。

【0015】

本発明によるヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマーは、本発明による核酸、特に配列番号1～32のいずれか1つを含む核酸またはその相補的なヌクレオチド配列の10、12、15、18または20～25、35、40、50、70、80、100、200、500、1000、1500の連続したヌクレオチド長を有することが好ましい。 10

【0016】

あるいは、本発明によるヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマーは、本発明による核酸、特に配列番号1～32のいずれか1つを含む核酸またはその相補的なヌクレオチド配列の12、15、18、20、25、35、40、50、100、200、500、1000、1500の連続したヌクレオチド長を含む断片からなりかつ／またはこれらを含む。

したがって、本発明によるヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマーの定義は、先に定義した厳密性の高いハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1～32のいずれか1つを含む核酸またはその相補的なヌクレオチド配列とハイブリッドを形成するオリゴヌクレオチドを包含するものである。 20

【0017】

本発明による好ましいプローブおよびプライマーは、配列番号35～46のいずれか1つを含むヌクレオチド配列の全部もしくは一部またはその相補的なヌクレオチド配列を含む。

本発明によるヌクレオチド・プライマーは、本発明による核酸、より具体的には配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列を含む核酸またはその相補的なヌクレオチド配列を増幅するために使用することができる。

本発明によれば、ABCC12遺伝子に特異的ないくつかのヌクレオチド・プライマーは、配列番号1または2のいずれか1つを含む核酸を増幅するために使用することができ、配列番号35～46のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む。 30

【0018】

本発明の別の主題は、試料に含まれる本発明による核酸、より具体的には配列番号1～32のいずれか1つを含む核酸、その相補的なヌクレオチド配列、配列番号1～32のいずれか1つで示される核酸またはその相補的なヌクレオチド配列を増幅するための方法に関する。この方法は、以下のステップ、すなわち、

a) 標的核酸が存在すると推定される試料を、増幅反応に必要な試薬の存在下で、増幅しようとする標的核酸領域のそれぞれ5'側および3'側にそのハイブリダイゼーション位置がある一对のヌクレオチド・プライマーと接触させること、および 40  
b) 増幅した核酸を検出することを含む。

【0019】

本発明は、配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸、配列番号1～32のいずれか1つまたはその相補的なヌクレオチド配列の核酸断片または変異体が、試料中に存在するかどうかを検出する方法にも関する。この方法は、以下のステップ、すなわち

1) 本発明による1個または複数のヌクレオチド・プローブを、試験しようとする試料と接触させること、

2) プローブと試料中に存在する核酸とで形成される複合体を検出することを含む。

【0020】

本発明による検出方法の特定の一実施形態によれば、オリゴヌクレオチド・プローブは担体上に固定されている。

別の一態様によれば、オリゴヌクレオチド・プローブは検出可能なマーカを含む。

【0021】

本発明の別の一主題は、a) 配列番号1～32のいずれか1つまたはその相補的なヌクレオチド配列、あるいはb) 配列番号1～32のいずれか1つで示される配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸の全部または一部を増幅するためのボックスまたはキットである。このボックスまたはキットは、

- 1) 増幅しようとする標的核酸のそれぞれ5'側および3'側にそのハイブリダイゼーション位置がある本発明による一对のヌクレオチド・プライマーと、場合によっては、
- 2) 増幅反応に必要な試薬とを含む。

10

このような増幅ボックスまたは増幅キットは、好ましくは、上述の少なくとも一对のヌクレオチド・プライマーを含む。

【0022】

本発明は、試料中の本発明による核酸の有無を検出するためのボックスまたはキットにも関し、このボックスまたはキットは、a) 本発明による1個または複数のヌクレオチド・プローブとb) ハイブリダイゼーション反応に必要な適切な試薬を含む。

第1の態様によれば、この検出ボックスまたはキットは、ヌクレオチド・プローブおよびプライマーが担体上に固定されていることを特徴とする。

第2の態様によれば、この検出ボックスまたはキットは、ヌクレオチド・プローブおよびプライマーが検出可能なマーカを含むことを特徴とする。

20

【0023】

上述の検出キットの特定の一実施形態によれば、このようなキットは、対象とする標的核酸を検出するために、あるいは本発明による核酸のコード領域または非コード領域における突然変異を検出するために使用できる、本発明による複数のオリゴヌクレオチド・プローブおよび/またはプライマーを含む。本発明の好ましい一実施形態によれば、標的核酸は、配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列または相補的な核酸配列を含む。あるいは、標的核酸は、配列番号1～32のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸の核酸断片または変異体である。

別の好ましい一実施形態によれば、本発明によるプライマーは、一般に、配列番号1～32のいずれか1つまたはその相補的な配列の全部または一部を含む。

30

【0024】

本発明は、本発明による核酸を含む組換えベクターにも関する。このような組換えベクターは、

- a) 配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸、
- b) 配列番号1～32のいずれか1つで示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸、
- c) 配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸のうち、少なくとも8個の連続したヌクレオチドを有する核酸、
- d) 配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、少なくとも80%のヌクレオチドが同一である核酸、
- e) 配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、85%、90%、95%、または98%のヌクレオチドが同一である核酸、
- f) 厳密性の高いハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列または相補的なヌクレオチド配列を含む核酸とハイブリッド形成する核酸、および
- g) 配列番号33および34のいずれか1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸からなる群から選択される核酸を含むことが好ましい。

40

50

## 【 0 0 2 5 】

第 1 の実施形態によれば、所望とする宿主細胞の形質転換または形質移入後に、本発明による組換えベクターを使用してそのベクター中に挿入した核酸を増幅する。

第 2 の実施形態によれば、本発明による組換えベクターは、本発明による核酸に加え、調節シグナル、すなわち核酸およびそのコードされた mRNA の転写および / または翻訳を誘導または制御するヌクレオチド配列を含む発現ベクターに相当する。

## 【 0 0 2 6 】

好ましい一実施形態によれば、本発明による組換えベクターは、特に以下の諸成分、すなわち

( 1 ) 挿入しようとする核酸の発現を調節するためのプロモーターおよび / またはエンハンサー配列などのエレメントまたはシグナル、 10

( 2 ) このようなベクターに挿入しようとする本発明による核酸内に含まれ、( 1 ) に記載した調節エレメントまたはシグナルと整合する位置にあるヌクレオチド・コード領域、および

( 3 ) ( 2 ) に記載した核酸のヌクレオチド・コード領域の転写の開始および停止に適切な核酸を含む。

## 【 0 0 2 7 】

本発明は、様々な物質の輸送に関与し、また、16 番染色体、より正確には 16 q 腕、さらに正確には発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに対する 16 q 12 遺伝子座にその染色体候補領域が位置する病理に関わる ABC C 1 2 ポリペプチドの短鎖または長鎖アイソフォームのいずれか 1 つをコードする cDNA 核酸を含む組換え欠損ウイルスにも関する。 20

本発明の別の好ましい一実施形態では、この組換え欠損ウイルスは発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに関わる ABC C 1 2 ポリペプチドアイソフォームのいずれか 1 つをコードする gDNA 核酸を含む。ABC C 1 2 ポリペプチド短鎖および長鎖アイソフォームはそれぞれ配列番号 33 および 34 のアミノ酸配列を含むことが好ましい。

## 【 0 0 2 8 】

本発明は、別の好ましい一実施形態では、RSV - LTR または CMV 初期プロモーターから選択されるプロモーターの制御下にある短鎖または長鎖 ABC C 1 2 ポリペプチドアイソフォームをコードする核酸を含む組換え欠損ウイルスに関する。

特定の一実施形態によれば、本発明による核酸を宿主細胞、特に哺乳動物から得られる宿主細胞にインピボで導入する方法は、適切な調節配列の制御下に置かれた本発明の薬剤として適合するベクターおよび「裸の」核酸を含む製剤を、選択した組織、例えば平滑筋組織に局所注射して導入するステップを含み、この「裸の」核酸はこの組織の細胞によって吸収される。 30

## 【 0 0 2 9 】

本発明の特定の一実施形態によれば、ABC C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか 1 つをインピボで産生するための組成物が提供される。この組成物は、生理的に許容されるビヒクルおよび / または賦形剤中にある溶液状態の、適切な調節配列の制御下に置かれて ABC C 1 2 ポリペプチドアイソフォームをコードする核酸を含む。

## 【 0 0 3 0 】

したがって、本発明は、適切な調節エレメントの制御下に置かれて配列番号 33 または 34 から選択されたアミノ酸配列を含む ABC C 1 2 ポリペプチドの短鎖または長鎖アイソフォームをコードする核酸を含む組成物にも関する。 40

したがって、本発明は、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った患者または対象の予防用または治療用の、短鎖または長鎖 ABC C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか 1 つをコードする核酸を含む薬剤組成物と 1 個または複数の生理的に適合する賦形剤との組合せにも関する。

このような組成物は、適切な調節エレメントまたはシグナルの制御下に置かれて配列番号 1 ~ 32 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含む核酸を含むことが好ましい。

また、本発明は、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼなどの染色体 16 q 12 上に位置する 50

病理の影響を受けている患者または対象の予防用または治療用の、本発明による組換えベクターを含む薬剤組成物と1個または複数の生理的に適合する賦形剤との組合せを対象とする。

【0031】

本発明は、染色体遺伝子座16q12上に位置する病理の予防用の、あるいはより具体的には発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った対象の治療用の薬剤を製造するための、短鎖または長鎖ABCC12タンパク質アイソフォームをコードする本発明による核酸の使用にも関する。

本発明は、染色体遺伝子座16q12上に位置する病理の予防用の、あるいはより具体的には発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った対象の治療用の薬剤を製造するための、ABCC12タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする核酸を含む本発明による組換えベクターの使用にも関する。

10

したがって、本発明の別の主題は、ABCC12タンパク質のいずれか1つ、すなわち発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに関わるポリペプチドアイソフォームをコードする本発明による核酸を含む組換えベクターである。

【0032】

本発明は、ABCC12遺伝子の欠損に伴う、または染色体遺伝子座16q12上に位置する病理に伴う疾患や病状の治療用および/または予防用の薬剤組成物を調製するためのこのような組換えベクターの使用にも関する。

本発明は、任意の生物活性ABCC12ポリペプチドアイソフォームを長期にわたり効果的にインビボで発現させるための、本発明によるこのような組換えベクターを用いてエキスピボで遺伝子改変し体内に移植する細胞の使用、または体内に移植する組換えベクター産生細胞の使用にも関する。

20

本発明は、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った対象の予防用および/または治療用の薬剤を製造するための、ABCC12タンパク質アイソフォームをコードする本発明による核酸の使用にも関する。

【0033】

本発明は、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った対象の予防用および/または治療用の薬剤を製造するための、本発明によるABCC12ポリペプチドアイソフォームをコードする核酸を含む本発明による組換えベクターの使用にも関する。

30

本発明は、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った対象の予防用および/または治療用の薬剤を製造するための、本発明によるABCC12ポリペプチドアイソフォームをコードする核酸を含む本発明による組換え宿主細胞の使用にも関する。

本発明は、メトトレキセート(MTX)などの陰イオン性薬物、GSH複合薬物(conjugated drugs)、グルクロナート複合薬物、サルフェート複合薬物など酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送障害に関連する病理の治療用および/または予防用の薬剤組成物を調製するための、本発明による組換えベクター、好ましくは組換え欠損ウイルスの使用にも関する。

【0034】

本発明は、PKCなど染色体遺伝子座16q12上に位置する病理の治療用および/または予防用の薬剤組成物を調製するための、このような組換えベクターまたは組換え欠損ウイルスの使用に関する。したがって、本発明は、本発明による1種または複数の組換えベクターまたは組換え欠損ウイルスを含む薬剤組成物にも関する。

40

本発明は、いずれか1つの生物活性ABCC12タンパク質を長期にわたり効果的にインビボで発現させるための、本発明によるウイルスを用いてエキスピボで遺伝子改変し体内に移植する細胞の使用、または体内に移植するこのようなウイルスの産生細胞の使用にも関する。

【0035】

本発明は、本発明によるABCC12ポリペプチドアイソフォームをコードする核酸をウイルス・ベクター中に取り込むことができ、これらのベクターが生物活性な成熟ポリペ

50

チドの効果的な発現を可能にすることを示す。より具体的には、本発明は、A B C C 1 2 タンパク質のアイソフォームのインピボでの発現を、アデノウイルスの直接投与、あるいは産生細胞またはこのような核酸を取り込むアデノウイルスまたはレトロウイルスで遺伝子改変した細胞の移植によって得ることができることを示す。

この点で、本発明の別の主題は、1種または複数の本発明による組換え欠損ウイルスに感染した哺乳動物細胞に関する。より具体的には、本発明は、これらのウイルスに感染したヒト細胞の集団に関する。これらの細胞は、特に血液由来の細胞（全能性幹細胞または前駆体）、線維芽細胞、筋芽細胞、肝細胞、ケラチノサイト、平滑筋細胞、内皮細胞、グリア細胞などでもよい。

#### 【0036】

10

本発明の別の主題は、1種または複数の本発明による組換え欠損ウイルスに感染した哺乳動物細胞または組換えウイルス産生細胞、および細胞外マトリックスを含む移植片に関する。本発明による移植片は、 $10^5 \sim 10^{10}$ 細胞を含むことが好ましい。これらの移植片は $10^6 \sim 10^8$ 細胞を含むことがより好ましい。

より具体的には、本発明の移植片中の細胞外マトリックスは、ゲル化化合物と、場合によっては、細胞を定着させる担体を含む。

#### 【0037】

本発明は、本発明の核酸、より具体的には、配列番号1～32のいずれか1つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換え宿主細胞にも関する。

20

本発明は、本発明の核酸、より具体的には、配列番号1～32のいずれか1つで示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換え宿主細胞にも関する。

別の態様によれば、本発明は、本発明による組換えベクターを含む組換え宿主細胞にも関する。したがって、本発明は、本発明のあらゆる核酸、より具体的には、配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換えベクターを含む組換え宿主細胞にも関する。

本発明は、具体的には、配列番号1～32のいずれか1つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換えベクターを含む組換え宿主細胞に関する。

本発明は、配列番号1～32のいずれか1つで示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換えベクターを含む組換え宿主細胞にも関する

30

。本発明は、配列番号33または34のアミノ酸配列のいずれか1つを含むポリペプチドをコードする核酸を含む組換えベクターを含む組換え宿主細胞にも関する。

#### 【0038】

本発明は、配列番号33または34のアミノ酸配列のいずれか1つを含むポリペプチド、そのペプチド断片、またはその変異体を産生するための方法にも関する。この方法は、以下のステップ、すなわち

40

- a) 前記ポリペプチドをコードする核酸を適切なベクターに挿入すること
- b) 予め形質転換した宿主細胞を適切な培養培地中で培養すること、またはステップa)の組換えベクターを宿主細胞に形質移入すること、
- c) この馴化した培養培地を回収すること、または例えば超音波処理や浸透圧衝撃によってこの宿主細胞を溶解すること、
- d) ステップc)で得られた培養培地または細胞溶解物から前記ポリペプチドを分離して精製すること、および
- e) 適切であれば、産生された組換えポリペプチドの特徴を明らかにすることを含む。

#### 【0039】

配列番号33または34から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドと「相同」であると称されるポリペプチドも本発明の一部を成す。このような相同なポリペプチドは、等価なアミノ酸で置換された1個または複数のアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む。

#### 【0040】

50

本発明による A B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォーム、特に 1 ) 配列番号 3 3 または 3 4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチド、2 ) 配列番号 3 3 または 3 4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または 3 ) 配列番号 3 3 または 3 4 から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドに「相同」なポリペプチド。

特定の一実施形態では、本発明による抗体は、1 ) 配列番号 3 3 または 3 4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチド、2 ) 配列番号 3 3 または 3 4 から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または 3 ) 配列番号 3 3 または 3 4 から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドに「相同」なポリペプチドに対する抗体である。このような抗体は、Kozbor 等 ( Immunology Today ( 1983 ) 4 : 7 2 ) によって記述されたトリオーマ法またはハイブリドーマ法を用いて産生される。

10

#### 【 0 0 4 1 】

したがって、本発明の主題は、さらに、試料中の本発明によるポリペプチドの有無を検出する方法であり、この方法は以下のステップ、すなわち、

a ) 1 ) 配列番号 3 3 または 3 4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチド、2 ) 配列番号 3 3 または 3 4 から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または 3 ) 配列番号 3 3 または 3 4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドに「相同」なポリペプチドに対する抗体と試験試料とを接触させること、および

b ) 形成された抗原 / 抗体複合体を検出することを含む。

20

#### 【 0 0 4 2 】

本発明は、試料中の本発明によるポリペプチドの有無を診断または検出するためのボックスまたはキットにも関する。このボックスは、

a ) 1 ) 配列番号 3 3 または 3 4 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、2 ) 配列番号 3 3 または 3 4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または 3 ) 配列番号 3 3 または 3 4 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに「相同」なポリペプチドに対する抗体と、

b ) 形成された抗原 / 抗体複合体の検出を可能にする試薬とを含む。

#### 【 0 0 4 3 】

本発明は、本発明による核酸を含む薬剤組成物にも関する。

30

本発明は、発作性運動誘発性舞踏アテトーゼなど染色体遺伝子座 1 6 q 1 2 上に位置する病理の治療のための、本発明による A B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォームのいずれか 1 つをコードする核酸を含む薬剤組成物および本発明による A B C C 1 2 ポリペプチドを含む薬剤組成物も提供する。

本発明は、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームをコードする本発明による核酸を移入しインビボで発現させることを含む、発作性運動誘発性舞踏アテトーゼなど染色体遺伝子座 1 6 q 1 2 に位置する病理の治療のための新しい治療手法にも関する。

したがって、本発明は、患者や対象における発作性運動誘発性舞踏アテトーゼなど染色体遺伝子座 1 6 q 1 2 に位置する病理の治療および / または予防のための新しい手法を提供する。本発明は、具体的には、このような病理を引き起こす遺伝子の欠損を修復または促進する方法を提供する。

40

したがって、本発明は、発作性運動誘発性舞踏アテトーゼなど染色体遺伝子座 1 6 q 1 2 に位置する遺伝子の機能障害に罹った対象の予防用および / または治療用に、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームをコードする核酸と 1 種または複数の生理的に適合するビヒクルおよび / または賦形剤とを組み合わせる薬剤組成物にも関する。

#### 【 0 0 4 4 】

本発明の特定の一実施形態によれば、A B C C 1 2 タンパク質のいずれか 1 つのインビボでの産生のための組成物が提供される。この組成物は、生理的に適合するビヒクルおよび / または賦形剤中にあり溶液状態で適切な調節配列の制御下に置かれて A B C C 1 2 ポリペプチドのいずれか 1 つをコードする核酸を含む。

50

したがって、本発明は、適切な調節エレメントの制御下に置かれて配列番号 33 または 34 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸を含む組成物にも関する。

このような組成物は、適切な調節エレメントの制御下に置かれて配列番号 1 ~ 32 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含む核酸を含むことが好ましい。

#### 【0045】

本発明は、メトトレキセート (MTX) などの陰イオン性薬物、GSH 複合薬物、グルクロナート複合薬物、サルフェート複合薬物など酸性リガンドに結合した中性薬物を輸送する機能の障害に罹った対象の予防用または治療用に、本発明による組換えベクターと 1 種または複数の生理的に適合するビヒクルおよび / または賦形剤とを組み合わせる薬剤組成物にも関する。

10

別の態様によれば、本発明の別の主題は、メトトレキセート (MTX) などの陰イオン性薬物、GSH、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送の機能障害によって引き起こされる疾患を治療する予防上または治療上の療法である。この療法は、本発明による 1 つの ABC C 12 ポリペプチドアイソフォームをコードする核酸と、1 種または複数の生理的に適切なビヒクルおよび / または賦形剤とを組み合わせる患者に投与することを含む。

#### 【0046】

本発明は、メトトレキセート (MTX) などの陰イオン性薬物、GSH、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送の機能障害に罹った患者や対象の予防用および / または治療用の、配列番号 33 または 34 から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドと 1 種または複数の生理的に適切なビヒクルおよび / または賦形剤とを治療上有効な量含む薬剤組成物に関する。

20

本発明は、配列番号 33 または 34 から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドと 1 種または複数の生理的に適切なビヒクルおよび / または賦形剤とを治療上有効な量含む、PKC の予防用および / または治療用の薬剤組成物にも関する。

本発明は、PKC の予防および / または治療するための薬剤組成物にも関しており、そのような方法は、本発明による ABC C 12 ポリペプチドアイソフォームのいずれか 1 つをコードする核酸と 1 種または複数の生理的に適切なビヒクルおよび / または賦形剤とを組み合わせる患者に投与することを含む。

30

#### 【0047】

特定の一実施形態によれば、少なくとも本発明による核酸を宿主細胞、特に哺乳動物から得られる宿主細胞にインピボで導入する方法は、薬剤として適合するベクターおよび適切な調節配列の制御下に置かれた本発明による「裸の」核酸を含む製剤を、選択した組織、例えば平滑筋組織に局所注射して導入するステップを含み、この「裸の」核酸はこの組織の細胞によって吸収される。

さらに別の態様によれば、本発明の別の主題は、メトトレキセート (MTX) などの陰イオン性薬物、GSH、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送の機能障害によって引き起こされる疾患を治療する予防上または治療上の療法である。この療法は、本発明による ABC C 12 ポリペプチドアイソフォームのいずれか 1 つと 1 種または複数の生理的に適切なビヒクルおよび / または賦形剤とを組み合わせる治療上有効な量を患者に投与することを含む。

40

#### 【0048】

本発明は、ABC C 12 タンパク質アイソフォームのいずれか 1 つに作用する小分子および化合物をスクリーニングして、メトトレキセート (MTX) などの陰イオン性薬物、GSH、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送を修復または改善できるポリペプチドの作用薬および拮抗薬を同定し、その輸送機能障害を効果的に治療および / または予防するための方法も提供する。これらの方法は、メトトレキセート (MTX) などの陰イオン性薬物、GSH 複合薬物、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送の欠陥による疾患の治療に使用する小分子およ

50

び化合物を同定するために有用である。

したがって、本発明は、メトトレキセート（MTX）などの陰イオン性薬物、GSH複合薬物、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送の機能障害に起因する疾患の予防用および/または治療用活性成分をスクリーニングするための、本発明によるABCC12ポリペプチドアイソフォームのいずれか1つまたはABCC12ポリペプチドを発現する細胞の使用にも関する。

#### 【0049】

本発明は、化合物または小分子、ABCC12ポリペプチドのいずれか1つの作用薬または拮抗薬をスクリーニングする方法にも関する。この方法は、以下のステップ、すなわち  
a) ABCC12ポリペプチドと検出可能なマーカーを含む脂質基質のいずれか1つとを含む膜小胞を調製すること、

10

b) ステップa) で得た小胞を作用薬または拮抗薬の候補化合物とインキュベートすること、

c) 検出可能なマーカーを含む脂質基質の放出量を定性的かつ/または定量的に測定すること、および

d) ステップb) で得た放出測定値を、作用薬または拮抗薬の候補化合物とともにまだインキュベートしていない小胞による標識脂質基質の放出測定値と比較することを含む。

第1の特定の実施形態では、短鎖および長鎖ABCC12ポリペプチドアイソフォームはそれぞれ配列番号33または34を含む。

#### 【0050】

20

本発明は、化合物または小分子、ABCC12ポリペプチドのいずれか1つの作用薬または拮抗薬をスクリーニングする方法にも関する。この方法は、以下のステップ、すなわち  
a) 対応するABCC12ポリペプチドを自然に発現する細胞、またはABCC12のいずれか1つをコードする核酸を細胞に形質移入した後に対応するABCC12ポリペプチドを発現する細胞、例えば細胞系を得ること、

b) 検出可能なマーカーで標識した陰イオンの存在下で、ステップa) の細胞をインキュベートすること、

c) これらの細胞に侵入していない過剰の標識陰イオンを除去するためにステップb) の細胞を洗浄すること、

d) ステップc) で得た細胞をABCC12ポリペプチドのいずれか1つの作用薬または拮抗薬の候補化合物とともにインキュベートすること、

30

e) 標識陰イオンの流出量（efflux）を測定すること、および

f) ステップe) で測定した標識陰イオンの流出量値を、ABCC12ポリペプチドの作用薬または拮抗薬の候補化合物の存在下でインキュベートしていない細胞で測定した標識陰イオンの流出量値と比較することを含む。

特定の一実施形態では、ABCC12ポリペプチドは配列番号33または34を含む。

#### 【0051】

##### 〔発明の詳述〕

##### 一般的な定義

本発明は、完全長を含む本発明のABCC12ポリペプチド、自然に発生する形のABCC12、およびこれらの抗原性断片をコードするヒト遺伝子を、あらゆる動物、具体的には哺乳動物またはトリ、より具体的にはヒト源から単離しようとするものである。

40

#### 【0052】

本発明によれば、当業者に周知の従来の分子生物学、微生物学、および組換えDNA技術が使用される。このような技術は、文献に詳しく説明されている（Sambrook等、1989、Molecular cloning a laboratory manual, 2ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York; Glover、1985、DNA Cloning: A practical approach、I巻およびII巻 oligonucleotide synthesis、MRL Press, LTD., Oxford、U. K. ; HamesおよびHiggins、1985、Transcription and translation; HamesおよびHiggins、1984、Animal Cell Culture; Freshney、1986、Immobilized Cells And Enzymes

50



、 IRL Press ; および Perbal、1984、A practical guide to molecular cloning)。

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用する「遺伝子」という用語は、ポリペプチドをコードするヌクレオチドの集合を指し、cDNA およびゲノムDNA 核酸を含む。

「単離された」という用語は、本発明では、その本来の環境（生体物質が天然に存在する環境）から取り出された生体物質（核酸またはタンパク質）を表す。

例えば、植物や動物に自然な状態で存在するポリヌクレオチドは単離されていない。その同じヌクレオチドが、自然に挿入されている植物や動物のゲノム中の隣接する核酸から分離されると、「単離された」状態にあるとみなせる。

このようなポリヌクレオチドはベクターに入れることができ、かつ／またはこのようなポリヌクレオチドは組成物に含めることができるが、それでもこのベクターまたは組成物はポリヌクレオチドの自然な環境を構成していないので、依然として単離された状態にある。

【 0 0 5 4 】

「精製された」という用語は、他の化合物が存在せず完全に純粋な形で物質が存在するということではない。そうではなくこれは相対的な定義である。

ポリヌクレオチドは、出発材料または天然の材料を少なくとも1桁、好ましくは2桁または3桁、好ましくは4桁または5桁純度を高めた後に「精製された」状態になる。

本明細書では、「ヌクレオチド配列」という表現を用いて、ポリヌクレオチドまたは核酸を表すことができる。「ヌクレオチド配列」という表現は、遺伝物質自体を包含し、したがってその配列に関する情報のみに限定されない。

「核酸」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、または「ヌクレオチド配列」という用語は、一本鎖または二重、すなわち二本鎖の形をしたRNA 配列、DNA 配列、またはcDNA 配列、あるいは2個以上のヌクレオチドのRNA / DNA ハイブリッド配列を包含する。

「核酸」は、ヌクレオチドと呼ばれる共有結合したサブユニットからなる高分子化合物である。核酸には、ポリリボ核酸（RNA）およびポリデオキシリボ核酸（DNA）があり、両者は一本鎖でも二本鎖でもよい。DNA には、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、および半合成（semi-synthetic）DNA などがある。タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、センス配列またはコード配列と呼ばれる。

「ヌクレオチド」という用語は、天然のヌクレオチド（A、T、G、C）、ならびに（1）プリンのアナログ、（2）ピリミジンのアナログ、または（3）糖アナログなどの少なくとも1つの修飾体を含む修飾ヌクレオチドの両方を表し、このような修飾ヌクレオチドの例は、例えば、国際公開第95 / 04 064号に記載されている。

【 0 0 5 5 】

本発明では、第1のヌクレオチドの各塩基が、これとは向きが反対である第2のポリヌクレオチドの相補的な塩基と対をなす場合、第1のポリヌクレオチドは第2のポリヌクレオチドと「相補的」とであるとみなす。相補的な塩基は、AとT（またはAとU）、またはCとGである。

「異種」DNA は、天然には細胞内にない、または細胞の染色体部位にはないDNA を指す。異種DNA は、好ましくは細胞にとって異質な遺伝子を含む。

本明細書で使用する「相同」という用語は、そのすべての文法的な形およびスペル変化において、スーパーファミリー（例えば、免疫グロブリン・スーパーファミリー）由来のタンパク質および異なる種（例えば、ミオシンI鎖など）由来の相同タンパク質を含めて「共通の進化の起源」を有するタンパク質間の関係を指す（Reeck等、1987、Cell 50 : 667）。このようなタンパク質（およびこれらをコードする遺伝子）は配列相同性を有し、これらの高度な配列類似性として表れている。

したがって、「配列類似性」という用語は、そのすべての文法的な形において、核酸間やタンパク質のアミノ酸配列間の同一性または一致の程度を指し、これらは共通の進化の起

10

20

30

40

50

源を共有していてもしていなくてもよい (Reeck等、同上参照)。しかし、一般的な使用方法でも本願でも、「相同」という用語は、「高度に」などの副詞で修飾されるときには、配列類似性を指し共通の進化の起源を指さないことがある。

#### 【0056】

特定の一実施形態では、少なくとも約50% (好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約90%または約95%) のヌクレオチドが規定の長さのDNA配列にわたって一致する場合、2つのDNA配列は「実質的に相同」または「実質的に類似」である。実質的に相同な配列は、配列データ・バンクにおいて、または例えばその特定の系に対して規定される厳密な条件下でのサザン・ハイブリダイゼーション実験において、利用可能な標準のソフトウェアを用い、これらの配列を比較することによって確認することができる。適切なハイブリダイゼーション条件を規定することは当業者には周知である。例えば、Maniatis等、同上; Glover等 (1985. DNA Cloning: A practical approach、I巻およびII巻 oligonucleotide synthesis、MRL Press, Ltd、Oxford、U. K. ) ; HammesおよびHiggins (1985. Transcription and Translation) を参照されたい。

10

#### 【0057】

同様に、特定の一実施形態では、30%を超えるアミノ酸が同一であり、または約60%を超えるアミノ酸が類似 (機能的に同一) である場合、2つのアミノ酸配列は「実質的に相同」または「実質的に類似」である。類似配列または相同配列は、例えば、GCG (Genetics Computer Group、Program Manual for the GCG Package、Version 7、Madison、Wisconsin) 重層プログラム (pileup program) を用いた整列 (alignment) によ

20

って確認することが好ましい。2つのヌクレオチド配列間またはアミノ酸配列間の「同一性百分率」は、本発明では、最適に並べられた2つの配列を、比較用ウィンドウを通して比較して決定する。

したがって、比較用ウィンドウ内のヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の部分は、2つの配列の最適な整列が得られるように、(付加または欠失を含まない) 基準配列に対して付加または欠失 (例えば「ギャップ」) を含むことがある。

この百分率は、比較する2つの (核酸またはペプチド) 配列に対して同一の核塩基または同一のアミノ酸残基が観察される位置の数を測定し、次いで2つの塩基間またはアミノ酸残基間で同一な位置の数を比較用ウィンドウ内の総位置数で割り、次いでその結果を100倍して配列同一性百分率を求めることによって計算される。

30

#### 【0058】

比較用の最適配列整列は、WISCONSIN GENETICS SOFTWARE PACKAGE 社、GENETICS COMPUTER GROUP (GCG)、575 Science Doctor、Madison、WISCONSINのパッケージに含まれている既知のアルゴリズムを利用したコンピュータを用いて達成することができる。

#### 【0059】

説明のために示すと、BLASTソフトウェア (1996年3月のBLAST 1.4.9バージョン、1998年2月のBLAST 2.0.4バージョン、および1998年9月のBLAST 2.0.6バージョン) を利用し、デフォルトのパラメータだけを使用して配列同一性百分率を算出することができる (Altschul等、1990、Mol. Biol., 215: 403~410; Altschul等、1997、Nucleic Acids Res., 25: 3389~3402)。Blastは、Altschul等のアルゴリズムを利用して、基準「問い合わせ」配列に類似/相同な配列を探索する。この問い合わせ配列および使用するデータベースはペプチド・タイプでも核タイプでもよく、任意の組合せが可能である。

40

#### 【0060】

本明細書では、「対応する」という用語は、類似性または同一性の測定対象となる分子と正確な位置が同一でも異なっても、類似または相同な配列を指すために使用する。核酸またはアミノ酸配列の整列はスペースを含んでいてもよい。したがって、「対応する」という用語は、配列類似性を指し、アミノ酸残基またはヌクレオチド塩基の番号付けを指

50

すのではない。

【0061】

本発明によるA B C C 1 2ポリペプチドアイソフォームをコードする遺伝子は、ゲノムDNAでもcDNAでも、任意のソース、具体的にはヒトcDNAまたはゲノムのライブラリーから単離することができる。遺伝子を得る方法は、上述の通り当技術分野では周知である（例えば、Sambrook等、1989、Molecular cloning: a laboratory manual, 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New Yorkを参照）。

【0062】

したがって、A B C C 1 2遺伝子の分子クローニング用核酸源としてあらゆる動物細胞を使用することができる。前記DNAは、クローン化されたDNA（例えば、DNA「ライブラリー」）から当分野で既知の標準操作によって得ることができ、好ましくは、タンパク質および/または転写物を高度に発現する組織から調製したcDNAライブラリーから、化学合成により、cDNAクローニングにより、あるいは所望の細胞から精製したゲノムDNAまたはそれらの断片のクローニングにより得られる（例えば、Sambrook等、1989、Molecular cloning: a laboratory manual, 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York; Glover, 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, I巻およびII巻 Oligonucleotide Synthesis, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K.参照）。

【0063】

ゲノムDNA由来のクローンは、コード領域に加え調節およびイントロンDNA領域を含むことがあり、cDNA由来のクローンはイントロン配列を含まない。そのソースにかかわらず、適切なベクターに遺伝子を分子クローン化してその遺伝子を増殖すべきである。ゲノムDNA由来の遺伝子の分子クローニングでは、DNA断片が生成し、そのいくつかは所望の遺伝子をコードしている。DNAは、様々な制限酵素を用いて特定の部位で切断することができる。あるいは、マンガンの存在下でDNAアーゼを使用してDNAを断片化することができる。また、DNAは例えば超音波処理によって物理的に切断することができる。次いで、この線状DNA断片を、アガロースやポリアクリルアミドのゲル電気泳動、およびカラム・クロマトグラフィーを含め、ただしこれらだけに限定されない標準技術によりサイズによって分離することができる。

【0064】

DNA断片が生成した後、所望のA B C C 1 2遺伝子を含む特定のDNA断片をいくつかの方法によって同定することができる。例えば、A B C C 1 2遺伝子の一部、その特定のRNA、またはそれらの断片が多量に入手でき、精製でき、標識できる場合、標識プローブとの核酸ハイブリダイゼーションによってその生成したDNA断片をスクリーニングすることができる（BentonおよびDavis, Science (1977), 196: 180; Grunstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1975) 72: 3961）。例えば、以下の具体例でなされたように、A B C C 1 2タンパク質に対して得られる部分的なコード配列情報に対応するオリゴヌクレオチド・セットを調製し、A B C C 1 2をコードするDNA用プローブとして、または（例えば、RT-PCR用ポリTプライマーと併用して）cDNAまたはmRNA用プライマーとして使用することができる。本発明によるA B C C 1 2核酸またはポリペプチドに極めて特異的な断片を選択することが好ましい。このプローブに実質的に相同なDNA断片がハイブリッドを形成する。上述したように、相同性の程度が大きいほど、より厳密なハイブリダイゼーション条件を使用することができる。特定の一実施形態では、様々な厳密性のハイブリダイゼーション条件を使用して相同A B C C 1 2遺伝子を同定する。

【0065】

例えば、遺伝子が、本明細書に示すA B C C 1 2タンパク質の等電点電気泳動アミノ酸組成または部分的アミノ酸配列を有するタンパク質産物をコードする場合、その遺伝子の諸特性に基づいてさらに選択を行うことができる。したがって、発現産物の物理的、化学的、または免疫的諸特性に基づいたアッセイによって、その遺伝子の有無を検出することが

できる。例えば、A B C C 1 2 について知られているのと類似または同一の電気泳動、等電点電気泳動すなわち非平衡 p H ゲル電気泳動挙動、タンパク質分解消化地図、または抗原性の諸性質を示すタンパク質を産生する c D N A クローン、すなわち適切な m R N A をハイブリダイゼーションにより選択する D N A クローンを選択することができる。

#### 【 0 0 6 6 】

本発明による A B C C 1 2 遺伝子は、m R N A 選択によって、すなわち、核酸ハイブリダイゼーションとその後のインビトロでの翻訳によっても同定することができる。この操作に従えば、ヌクレオチド断片を使用してハイブリダイゼーションにより相補的な m R N A が単離される。このような D N A 断片は、利用可能な精製された A B C C 1 2 D N A でもよいし、部分的なコード配列情報から設計された合成オリゴヌクレオチドでもよい。単離した m R N A 生成物のインビトロ翻訳産物を免疫沈降分析または機能性アッセイ（例えば、チロシンホスファターゼ活性）にかけて、m R N A、したがって所望の配列を含む相補的な D N A 断片を同定する。さらに、細胞から単離したポリソームが、本発明による A B C C 1 2 ポリペプチドのいずれか 1 つに対する特異的な固定された抗体に吸着することによって特定の m R N A を選択することができる。

10

#### 【 0 0 6 7 】

放射性同位体で標識された A B C C 1 2 c D N A を、（吸着したポリソームから）選択した m R N A を鋳型として用いて合成することができる。次いで、放射性同位体標識 m R N A または c D N A をプローブとして用いて、相同 A B C C 1 2 D N A 断片を他のゲノム D N A 断片の中から同定する。

20

本発明による核酸の「変異体」は、基準のポリヌクレオチドとは 1 個または複数の塩基が異なる核酸を意味すると理解される。核酸変異体は、天然に存在する対立遺伝子変異体（allelic variant）など天然起源のものでもよいし、例えば、突然変異生成技術によって得られる非天然変異体でもよい。

#### 【 0 0 6 8 】

一般に、基準（通常、野生型）核酸と核酸変異体の相違は小さく、基準核酸と核酸変異体のヌクレオチド配列は極めて類似しており、多くの領域では同一である。核酸変異体中に存在するヌクレオチド修飾はサイレントなことがあり、すなわち、核酸変異体によってコードされるアミノ酸配列を変えないことがある。

しかし、核酸変異体のヌクレオチドの変化は、基準核酸によってコードされるポリペプチドと比べたときに、核酸変異体によってコードされるポリペプチドに置換、付加、または欠失をもたらすことがある。また、コード領域のヌクレオチド修飾は、ポリペプチドのアミノ酸配列に保存的または非保存的な置換をもたらすことがある。

30

#### 【 0 0 6 9 】

本発明による核酸変異体は、基準核酸のポリペプチドと同じ機能または生物活性、あるいは最初の基準核酸によってコードされるポリペプチドに対する抗体によって認識される能力を実質的に保存しているポリペプチドをコードしていることが好ましい。

したがって、いくつかの核酸変異体は、問題のタンパク質の構造と活性の関係をその系統的な研究により推定することを可能にするポリペプチド変異体をコードすることになる。対象とする疾患に関連したこれらの変異体に関する知識は欠くことができない。というのは、これにより病理原因を分子レベルで理解することが可能になるからである。

40

#### 【 0 0 7 0 】

「断片」は、基準核酸に比べて長さが短く、基準核酸と同一のヌクレオチド配列を共通部分にわたり含むヌクレオチド配列を意味すると理解される。本発明によるこのような核酸「断片」は、それが適切であれば、その断片が一構成体であるより大きなポリヌクレオチドに含まれていてもよい。このような断片は、本発明による核酸の 8、10、12、15、18、20～25、30、40、50、70、80、100、200、500、1000、または 1500 個の連続したヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、あるいはこれらからなっている。

#### 【 0 0 7 1 】

50

「核酸分子」は、一本鎖の形でも二本鎖ヘリックスでも、リン酸エステル・ポリマーの形のリボヌクレオシド（アデノシン、グアノシン、ウリジン、またはシチジン；「RNA分子」）、またはデオキシリボヌクレオシド（デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、またはデオキシシチジン；「DNA分子」）、あるいはこれらのホスホリチオネート、チオエステルなどあらゆるリン酸エステル類似体を指す。二本鎖DNA-DNA、DNA-RNA、およびRNA-RNAヘリックスが可能である。核酸分子という用語は、特にDNA分子またはRNA分子においては、その分子の1次構造および2次構造のみを指し、どんな特定の3次構造にも限定されない。したがって、この用語は、なかでも線状または環状のDNA分子（例えば、制限断片）、プラスミド、および染色体中に見られる二本鎖DNAを含む。特定の二本鎖DNA分子の構造を議論する際には、本明細書では、非転写DNA鎖（すなわち、mRNAと相同な配列を有する鎖）に沿って5'から3'方向への配列のみを示す常法に従って配列を記載することがある。「組換えDNA分子」は、分子生物学的操作を行ったDNA分子である。

10

#### 【0072】

核酸分子は、温度および溶液イオン強度の適切な条件下で核酸分子の一本鎖を他の核酸分子にアニールできる場合、cDNA、ゲノムDNA、RNAなど別の核酸分子と「ハイブリッド可能」である（Sambrook等、同上を参照）。温度およびイオン強度の条件によって、ハイブリダイゼーションの「厳密性」が決まる。相同な核酸を予備スクリーニングする場合、55°の $T_m$ に対応する厳密性の低いハイブリダイゼーション条件、例えば、5×SSC、0.1%SDS、0.25%乳、ホルムアミドなし；または、30%ホルムアミド、5×SSC、0.5%SDSを使用することができる。中程度の厳密性のハイブリダイゼーション条件は、これよりも高い $T_m$ 、例えば、40%ホルムアミド、5×または6×SSCに対応する。厳密性の高いハイブリダイゼーション条件は、最も高い $T_m$ 、例えば、50%ホルムアミド、5×または6×SSCに対応する。ハイブリダイゼーションには、2つの核酸が相補的な配列を含む必要があり、ハイブリダイゼーションの厳密性によっては塩基間のミスマッチが起こり得る。核酸をハイブリッドするのに適切な厳密性は、核酸の長さおよび相補性の程度、当分野で周知の変数によって決まる。2つのヌクレオチド配列間の類似性または相同性の程度が大きいほど、これらの配列を有する核酸ハイブリッドの $T_m$ 値は高くなる。核酸ハイブリダイゼーションの（ $T_m$ の高さに対応する）相対安定性は、以下の順、すなわち、RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNAの順に減少する。100ヌクレオチドよりも長いハイブリッド用に $T_m$ の計算式が誘導されている（Sambrook等、同上を参照）。これよりも短い核酸、すなわちオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの場合、ミスマッチの位置がより重要になり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する（Sambrook等、同上を参照）。好ましくは、ハイブリッド可能な核酸の長さの下限は少なくとも約10ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約15ヌクレオチドであり、より好ましくはその長さは少なくとも約20ヌクレオチドである。

20

30

#### 【0073】

特定の一実施形態では、「標準ハイブリダイゼーション条件」という用語は55°の $T_m$ を指し、上述の条件が利用される。好ましい一実施形態では $T_m$ は60°であり、より好ましい一実施形態では $T_m$ は65°である。

40

#### 【0074】

本発明の「厳密性の高いハイブリダイゼーション条件」とは、以下の条件を意味すると理解される：

##### 1. 膜競合およびプレハイブリダイゼーション：

- 混合物：40  $\mu$ lサケ精子DNA（10 mg/ml）

+ 40  $\mu$ lヒト胎盤DNA（10 mg/ml）

- 96°で5分間変性し、次いでこの混合物を氷中に浸漬する。

- 2×SSCを除去し、ホルムアミド混合物4 mlをこの膜を含むハイブリダイゼーション・チューブ中に注入する。

- 2つの変性DNAの混合物を添加する。

50

- 回転させながら 42 で 5 ~ 6 時間インキュベートする。

## 2. 標識プローブ競合:

- 反復の量に応じ、標識し精製したプローブに Cot DNA 10 ~ 50  $\mu$ l を加える。

- 95 で 7 ~ 10 分間変性する。

- 65 で 2 ~ 5 時間インキュベートする。

## 3. ハイブリダイゼーション:

- プレハイブリダイゼーション混合物を除去する

- サケ精子 DNA 40  $\mu$ l とヒト胎盤 DNA 40  $\mu$ l とを混合し、96 で 5 分間変性し、その後水中に浸漬する。

- ハイブリダイゼーション・チューブに 4 ml のホルムアミド混合物、2 つの DNA 混合物、および変性標識プローブ / Cot DNA を添加する。

- 回転させながら 42 で 15 ~ 20 時間インキュベートする。

## 4. 洗浄および暴露:

- 2 x SSC 中室温で 1 回洗浄し、リンスする。

- 室温 2 x SSC で、および 65 0.1 % SDS で 5 分間 2 回洗浄

- 65 で 15 分間、0.1 x SSC および 0.1 % SDS で 2 回洗浄

- 膜を透明プラスチック・ラップに包み、暴露する。

### 【0075】

上述のハイブリダイゼーション条件を、厳密性の高い条件下、20ヌクレオチド長から 700ヌクレオチド長の核酸分子のハイブリダイゼーションに適用する。当業者に既知の技術に従って、上述のハイブリダイゼーション条件を、ハイブリダイゼーションしようとする核酸の長さまたは選択した標識のタイプに応じて調整できることは言うまでもない。適切なハイブリダイゼーション条件を、例えば、HamesおよびHiggins (1985、同上) のマニュアルに含まれる教示に従って調整することができる。

### 【0076】

本明細書で使用する「オリゴヌクレオチド」という用語は、本発明による核酸にハイブリッド可能な通常少なくとも 15ヌクレオチドの核酸を指す。オリゴヌクレオチドは、例えば <sup>32</sup>P - ヌクレオチドまたはビオチンなどの標識を共有結合したヌクレオチドで標識することができる。一実施形態では、標識オリゴヌクレオチドをプローブとして使用して、本発明による ABC C 12 ポリペプチドのいずれか 1 つをコードする核酸の存在を検出することができる。別の一実施形態では、オリゴヌクレオチド (その一方または両方を標識することができる) を、ABC C 12 核酸の完全長または断片をクローニングするために、あるいは ABC C 12 タンパク質をコードする核酸の存在を検出するために、PCR プライマーとして使用することができる。別の一実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、ABC C 12 DNA 分子と三重らせんを形成することができる。一般に、オリゴヌクレオチドは合成により調製され、好ましくは核酸合成装置で合成される。したがって、オリゴヌクレオチドは、チオエステル結合などの自然には生成しないリン酸エステル類似結合で調製することができる。

### 【0077】

「相同組換え」とは、ベクターの外来 DNA 配列を染色体に挿入することを指す。ベクターは、相同組換えのための特異的な染色体部位を標的とすることが好ましい。特異的な相同組換えの場合、ベクターは、染色体へのこのベクターの相補的な結合および取り込みを可能にするのに十分な長さの、染色体配列と相同な領域を含む。相同領域が長いほど、また、配列類似性の程度が大きいほど、相同組換えの効率が増加し得る。

### 【0078】

DNA 「コード配列」は、適切な調節配列の制御下に置かれたとき、インビトロまたはインビボの細胞内でポリペプチドに転写され翻訳される二本鎖 DNA 配列である。コード配列の境界は、5' (アミノ) 末端側の開始コドンおよび 3' (カルボキシル) 末端側の翻訳停止コドンで決まる。コード配列は、原核生物の配列、真核生物の mRNA 由来の c D

10

20

30

40

50

N A、真核生物の（例えば、哺乳動物の）D N A由来のゲノムD N A配列、さらには合成D N A配列などであるが、これらだけに限定されない。コード配列が真核細胞における発現を意図したものである場合、通常、ポリアデニレーション・シグナルおよび転写終結配列がコード配列の3'側に置かれる。

#### 【0079】

転写および翻訳制御配列は、宿主細胞でコード配列の発現をもたらす、プロモーター、エンハンサー、ターミネーターなどのD N A調節配列である。真核細胞では、ポリアデニレーション・シグナルが制御配列である。

#### 【0080】

「調節領域」は、核酸の発現を調節する核酸配列を意味する。調節領域は、特定の核酸（相同領域）の自然な発現をもたらす配列を含むことができ、また、（異なるタンパク質、さらには合成タンパク質の発現をもたらす）異なる起源の配列を含むことができる。特に、この配列は、真核生物またはウイルスの遺伝子配列、あるいは特異的または非特異的、誘発的または非誘発的に遺伝子の転写を刺激または抑制する誘導配列（derived sequences）とすることができる。調節領域は、複製開始点、R N Aスプライス部位、エンハンサー、転写終結配列、ポリペプチドを標的細胞の分泌経路に誘導するシグナル配列、およびプロモーターを含む。

10

#### 【0081】

「異種ソース」由来の調節領域は、発現される核酸と天然では無関係な調節領域である。異種調節領域には、異なる種由来の調節領域、異なる遺伝子由来の調節領域、ハイブリッド調節配列、および自然には発生しないが当業者によって設計される調節配列が含まれる。

20

「カセット」とは、ベクターの特異的制限部位に挿入可能なD N Aセグメントを指す。このD N Aセグメントは、対象とするポリペプチドをコードし、カセットおよび制限部位は、転写および翻訳のための適切な読み枠に確実にカセットを挿入できるように設計される。

「プロモーター配列」は、細胞のR N Aポリメラーゼを結合させ、下流（3'方向）のコード配列の転写を開始できるD N A調節領域である。本発明では、プロモーター配列は、その3'末端で転写開始部位に結合し、上流側（5'方向）に伸びて、バックグラウンド以上の検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最低数の塩基またはエレメントを含む。プロモーター配列内には、（例えば、ヌクレアーゼS1を用いたマッピングで都合よく規定される）転写開始部位、ならびにR N Aポリメラーゼの結合をもたらすタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）がある。

30

#### 【0082】

コード配列は、R N Aポリメラーゼがコード配列をm R N Aに転写するときには、細胞内の転写および翻訳制御配列の「制御下」にあり、次いでm R N Aはt r a n s - R N Aでスプライスされ、このコード配列によってコードされるタンパク質に翻訳される。

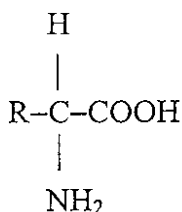
「シグナル配列」は、細胞表面に発現されるタンパク質のコード配列の始めに含まれる。この配列は、成熟ポリペプチドのN末端にあるシグナル・ペプチドをコードする。シグナル・ペプチドは、宿主細胞を誘導してポリペプチドを動かす。「トランスロケーション・シグナル配列」という用語は、本明細書では、この種のシグナル配列を指すために使用する。トランスロケーション・シグナル配列は、真核生物および原核生物に固有の様々なタンパク質に関連していることが見出され、両方のタイプの生物で機能することが多い。

40

「ポリペプチド」は、共有結合したアミノ酸残基からなる高分子化合物である。アミノ酸は、次の一般構造を有する。

#### 【0083】

#### 【化1】



## 【 0 0 8 4 】

アミノ酸は、側鎖 R に基づき 7 つのグループに分類される：( 1 ) 脂肪族側鎖、( 2 ) 水酸 ( OH ) 基を含む側鎖、( 3 ) イオウ原子を含む側鎖、( 4 ) 酸性基またはアミド基を含む側鎖、( 5 ) 塩基性基を含む側鎖、( 6 ) 芳香族環を含む側鎖、および ( 7 ) 側鎖がアミノ基と融合したイミノ酸であるプロリン。

10

「タンパク質」は、生細胞において構造的役割や機能的役割を果たすポリペプチドである。

本発明のポリペプチドおよびタンパク質は、グリコシル化されていてもいなくてもよい。

「相同性」は、共通の進化起源を反映した配列の類似性を意味する。ポリペプチドまたはタンパク質は、それらのアミノ酸の多くが ( 1 ) 同一であり、または ( 2 ) 化学的に類似した R 側鎖を有する場合、相同性または類似性を有すると言われる。核酸は、それらのヌクレオチドの多くが同一であれば相同性を有すると言われる。

## 【 0 0 8 5 】

20

「単離されたポリペプチド」または「単離されたタンパク質」は、その天然状態では通常それに付随している化合物 ( 例えば、他のタンパク質またはポリペプチド、核酸、炭水化物、脂質 ) が、実質的にないポリペプチドまたはタンパク質である。「単離された」という意味は、他の化合物との人工または合成混合物、あるいは生物活性を妨害せず、例えば、不完全な精製、安定剤の添加、または薬剤として許容される製剤への配合のために存在し得る不純物の存在を除外しない。

## 【 0 0 8 6 】

本発明によるポリペプチドの「断片」は、そのアミノ酸配列が基準ポリペプチドのアミノ酸配列よりも短く、これらの基準ポリペプチドの全体にわたって同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味すると理解される。このような断片は、それが適切であれば、これらの断片をその一部とするより大きなポリペプチドに含まれていてもよい。本発明によるポリペプチドのこのような断片は、5、10、15、20、30 ~ 40、50、100、200、または300アミノ酸長とすることができる。

30

## 【 0 0 8 7 】

本発明によるポリペプチドの「変異体」は、基準ポリペプチドのアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列が少なくとも1つのアミノ酸残基の1つまたは複数の置換、付加、または欠失を含むポリペプチドを主に意味すると理解され、このアミノ酸置換は保存的でも非保存的でもよいと理解される。

## 【 0 0 8 8 】

ポリペプチドまたはタンパク質の「変異体」は、ポリペプチドまたはタンパク質から誘導され、ポリペプチドまたはタンパク質の少なくとも1つの生物学的特性を維持するあらゆる類似体、断片、誘導体、または突然変異体である。異なるポリペプチドまたはタンパク質の変異体は天然に存在することもある。これらの変異体は、タンパク質をコードする構造遺伝子のヌクレオチド配列の違いを特徴とする対立遺伝子変異体であってもよく、スプライシングが異なり、翻訳後修飾を含むことがある。変異体は、実質的に同じ生物活性を有するが異なる種から得られる関連タンパク質も含む。

40

## 【 0 0 8 9 】

当業者であれば、単一または複数のアミノ酸の置換、欠失、付加、または交換 ( replacements ) を含む変異体を産生することができる。これらの変異体は、とりわけ、( a ) 1つまたは複数のアミノ酸残基が保存的または非保存的アミノ酸で置換された変異体、( b )

50



1つまたは複数のアミノ酸がポリペプチドまたはタンパク質に付加した変異体、(c) 1つまたは複数のアミノ酸が置換基を含む変異体、および(d) ポリペプチドまたはタンパク質が血清アルブミンなど別のポリペプチドと融合した変異体を含むことができる。これらの変異体を得るための技術は、遺伝子工学(サプレッション、欠失、変異など)、化学的技術、および酵素技術を含めて、当業者の知るところである。

#### 【0090】

もしこのような対立遺伝子変異体、類似体、断片、誘導体、突然変異体、ならびに選択的mRNAスプライシング体および選択的翻訳後修飾体を含めた修飾体が、結果的にポリペプチドの生物学的諸特性のいずれかを保持するポリペプチドの誘導体である場合、これらは本発明の範囲に含まれるものである。

10

#### 【0091】

「ベクター」は、別のDNAセグメントがそれに結合して、その結合セグメントが複製され得るプラスミド、ウイルス、ファージ、コスミドなどのレプリコンである。「レプリコン」は、インピボでのDNA複製の自律的単位として機能する、すなわち、それ自体の制御の下で複製が可能な遺伝因子(例えば、プラスミド、染色体、ウイルス)である。

#### 【0092】

本発明は、本発明のABCC12ポリペプチドのいずれか1つの類似体および誘導体をコードする遺伝子を含むクローニング・ベクターにも関する。ABCC12タンパク質のいずれか1つに関係する誘導体および類似体の産生および使用は本発明の範囲に含まれる。特定の一実施形態では、この誘導体または類似体は機能的に活性であり、すなわち、本発明の野生型ABCC12ポリペプチドに伴う1つまたは複数の機能的活性を示すことができる。

20

#### 【0093】

機能的に等価な分子を生成する置換、付加、または欠失によって核酸のコード配列を変えてABCC12誘導体を生成することができる。元のABCC12よりも機能的活性が亢進または増大した誘導体を生成することが好ましい。あるいは、このような誘導体は、本発明のABCC12ポリペプチドの天然リガンドに対し同等またはそれ以上の親和性を有するABCC12細胞外ドメインの可溶性断片をコードすることもできる。このような可溶性誘導体は、ABCC12に結合するリガンドの阻害剤候補でありうる。

#### 【0094】

ヌクレオチド・コード配列の縮重のため、ABCC12遺伝子のアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列をコードする他のDNA配列を本発明を実施するのに使用することができる。このDNA配列は、他の種由来の対立遺伝子、相同遺伝子、この配列内の同じアミノ酸残基をコードする異なるコドンで置換して改変し、サイレントな変化を生じさせたABCC12遺伝子の全体または一部を含むヌクレオチド配列を含むが、これらだけに限定されない。同様に、本発明のABCC12誘導体は、ABCC12タンパク質のいずれか1つのアミノ酸配列内の残基を機能的に等価なアミノ酸残基で置換して保存的なアミノ酸置換をもたらす改変された配列を含むABCC12タンパク質のアミノ酸配列の全体または一部を含有する配列を、主要なアミノ酸配列として含むABCC12誘導体であるが、これらだけに限定されない。例えば、機能的に等価なものとして働きサイレントな改変をもたらす極性の類似した別のアミノ酸で、この配列内の1つまたは複数のアミノ酸残基を置換することができる。この配列内のアミノ酸を置換するアミノ酸は、配列内のアミノ酸が属するクラスの別のメンバーから選択することができる。例えば、非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが挙げられる。芳香族環構造を含むアミノ酸は、フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンである。極性中性アミノ酸としては、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンなどがある。正に帯電した(塩基)アミノ酸としては、アルギニン、ロイシン、ヒスチジンなどがある。負に帯電した(酸性)アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸などがある。このような改変は、ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動または等

30

40

50

電点によって測定される見掛け分子量には影響しないと考えられる。

【0095】

特に好ましい置換は、

- 正の電荷を保持するような、A r gのL y sによる置換、およびその逆の置換、
- 負の電荷を保持するような、A s pのG l uによる置換、およびその逆の置換、
- 遊離のO Hを保持できる、T h rのS e rによる置換、および、
- 遊離のC O N H<sub>2</sub>を保持できる、A s nのG l nによる置換である。

【0096】

特に好ましい特性を有するアミノ酸を置換するためにアミノ酸置換を行うこともできる。例えば、別のC y sとのジスルフィド架橋が可能な部位としてC y sを導入することができる。特に「触媒的な」部位としてH i sを導入することができる（すなわち、H i sは酸または塩基として作用し、生化学触媒の中では最も一般的なアミノ酸である）。P r oは、特にその平面構造のために導入することができ、タンパク質構造中にbターンを生じる。 10

【0097】

本発明のA B C C 1 2誘導体および類似体をコードする遺伝子を、当分野で既知の様々な方法により生成することができる。この遺伝子を生成する操作は、遺伝子またはタンパク質レベルで行われる。例えば、クローン化したA B C C 1 2配列を、当分野で知られている多数の方法のいずれかによって修飾することができる（Sambrook等、1989、同上）。この配列を、適切な部位で制限エンドヌクレアーゼを用いて切断し、必要であればさらに酵素で修飾し、単離し、インビトロで連結することができる。A B C C 1 2の誘導体または類似体をコードする遺伝子の生成では、修飾された遺伝子が、所望の活性がコードされている領域において、翻訳停止シグナルで中断されずに、確実にA B C C 1 2遺伝子と同じ翻訳読み枠内に留まるようにすべきである。 20

【0098】

また、A B C C 1 2をコードする核酸は、インビトロまたはインビボで突然変異を起こして、翻訳、開始、および/または停止配列を生成および/または破壊し、あるいはコード領域内に変異を生じ、かつ/または新しい制限エンドヌクレアーゼ部位を形成しまたは既存の制限エンドヌクレアーゼ部位を破壊して、インビトロでの修飾をさらに促進することができる。このような変異は、突然変異したA B C C 1 2遺伝子産物の機能的活性を亢進するものであることが好ましい。なかでもインビトロでの部位特異的な突然変異生成およびT A B（登録商標）リンカー（Pharmacia）の使用を含めた当分野で既知のあらゆる突然変異生成技術を使用することができる（Hutchinson等、（1978）*Biol. Chem.* 253: 655 1; ZollerおよびSmith、（1984）*DNA*, 3: 479~488; Oliphant等、（1986）*Gene* 44: 17 7; Hutchinson等、（1986）*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 710; Huygen等、（1996）*Nature Medicine*, 2(8): 893~898）。P C R技術は、部位特異的な突然変異生成に好ましい（Higuchi、1989、*PCR Technology*中の「Using PCR to Engineer DNA」、: Principles and Applications for DNA Amplification、H. Erlich編、Stockton Press、6章、pp. 61~70）。 30

【0099】

次いで、同定し単離したA B C C 1 2遺伝子を適切なクローニング・ベクターに挿入することができる。当分野で既知の多数のベクター-宿主系を使用することができる。使用可能なベクターとしては、プラスミド、改変されたウイルスなどがあるが、これらだけに限定されない。ただし、ベクター系は使用する宿主細胞に適合したものでなければならない。ベクターの例は、大腸菌（*Escherichia coli*）、ラムダ誘導体などのバクテリオファージ、p B R 3 2 2誘導体またはp U Cプラスミド誘導体などのプラスミド、例えば、p G E Xベクター、p m a l - c、p F L A Gなどであるが、これらだけに限定されない。クローニング・ベクターへの挿入は、例えば、相補的な付着末端を有するクローニング・ベクターにD N A断片を連結することによって行うことができる。しかし、このD N Aを断片化するために使用する相補的な制限部位がクローニング・ベクター内に存在しない場 40 50

合、このDNA分子の末端を酵素で修飾することができる。あるいは、ヌクレオチド配列（リンカー）をDNA末端上に連結することによって任意の所望の部位を作製することができる。なお、これらの連結されたリンカーは、制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする特異的に化学合成されたオリゴヌクレオチドを含むことができる。組換え分子は、形質転換、形質移入、感染、エレクトロポレーションなどによって宿主細胞に導入することができ、その結果多数の遺伝子配列コピーが生成する。クローン化された遺伝子は、シャトル・ベクター・プラスミド上に含めることが好ましい。シャトル・ベクター・プラスミドは、クローニング細胞、例えば大腸菌での増殖をもたらし、望むならば、その後適切な発現細胞系内に挿入するための精製を容易にする。例えば、シャトル・ベクターは、2種以上のタイプの生物内で複製できるベクターであり、大腸菌由来の配列と酵母2mプラスミド由来の配列とを連結することによって、大腸菌でも酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）でも複製されるシャトル・ベクターを調製することができる。

10

#### 【0100】

別法では、所望の遺伝子を適切なクローニング・ベクターに「ショット・ガン」法で挿入した後に、同定し単離することができる。所望の遺伝子を、クローニング・ベクターに挿入する前に、例えばサイズ分画により濃縮することができる。

#### 【0101】

ABCC12ポリペプチドまたは抗原性断片をコードするヌクレオチド配列、その誘導体または類似体、または機能的に活性な誘導体は、そのキメラ・タンパク質を含めて、適切な発現ベクター、すなわち、挿入するタンパク質コード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含むベクターに挿入することができる。このようなエレメントを、本明細書では「プロモーター」と称する。したがって、本発明のABCC12ポリペプチドをコードする核酸は、本発明の発現ベクター中のプロモーターと作用的に関連している。cDNAおよびゲノム配列共にこのような調節配列の制御の下でクローン化し発現することができる。発現ベクターは、好ましくは複製開始点も含む。

20

#### 【0102】

必要な転写および翻訳シグナルを、組換え発現ベクター上に設けることができ、あるいはABCC12をコードする元の遺伝子および/またはそのフランキング領域により供給することができる。

#### 【0103】

利用可能な宿主・ベクター系としては、ウイルス（例えば、ワクシニア・ウイルス、アデノウイルスなど）に感染した哺乳動物細胞系；ウイルス（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；酵母ベクターを含有する酵母などの微生物；またはバクテリオファージで形質転換された細菌、DNA、プラスミドDNA、コスミドDNAなどがあるが、これらだけに限定されない。ベクターの発現エレメントは、強度および特異性が様々である。利用する宿主・ベクター系に応じて、いくつかの適切な転写および翻訳エレメントのうちのいずれか1つを使用することができる。

30

#### 【0104】

本発明の組換えABCC12タンパク質、またはその機能性の断片、誘導体、キメラ構築物、または類似体は、組換えによってコード配列が組み込まれた後、染色体上で発現することがある。この点で、いくつかの増幅系のうちいずれかをを用いて安定な遺伝子発現を高レベルで達成することができる（Sambrook等、1989、同上を参照）。

40

#### 【0105】

その中の組換えベクターが本発明によるABCC12ポリペプチドのいずれか1つをコードする核酸を含んだ細胞は、ABCC12ポリペプチドのいずれか1つの発現がこの細胞によってもたらされる条件の下で適切な細胞培養培地中で培養する。

#### 【0106】

クローニング・ベクターにDNA断片を挿入する既述の方法のいずれかを使用して、適切な転写/翻訳制御シグナルおよびタンパク質コード配列からなる遺伝子を含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、インビトロでの組換えDNA技術および

50

合成技術およびインビボでの組換え（遺伝的組換え）が含まれる。

【0107】

A B C C 1 2 ポリペプチドの発現は、当分野で既知の任意のプロモーター／エンハンサー・エレメントによって制御され得るが、これらの調節エレメントは、発現用に選択した宿主中で機能しなければならない。A B C C 1 2 遺伝子発現を制御するために使用できるプロモーターとしては、S V 4 0 初期プロモーター領域（BenoistおよびChambon、1981 Nature 290: 304~310）、ラウス肉腫ウイルスの3'末端反復配列に含まれるプロモーター（Yamamoto等、1980 Cell 22: 787~797）、ヘルペス・チミジンキナーゼ・プロモーター（Wagner等、1981 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441~1445）、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinster等、1982 Nature 296: 39~42）； - ラクタマーゼ・プロモーターなど原核生物の発現ベクター（Villa-Kamaroff等、1978 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3727~3731）、またはt a c プロモーター（DeBoer等、1983 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 21~25）；Scientific American、1980、242: 74~94の「Useful proteins from recombinant bacteria」も参照；G a l 4 プロモーターなど酵母または他の菌類由来のプロモーター・エレメント、A D C（アルコール・デヒドロゲナーゼ）プロモーター、P G K（ホスホグリセロール・キナーゼ）プロモーター、アルカリ・ホスファターゼ・プロモーター；および組織特異性を示し、トランスジェニック動物に利用されている動物転写制御領域：すい臓腺房細胞で活性なエラスターゼI 10 遺伝子制御領域（Swift等、1984 Cell 38: 639~646；Ornitz等、1986 Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399~409；MacDonald、1987）；すい臓ベータ細胞で 20 活性なインシュリン遺伝子制御領域（Hanahan、1985 Nature: 315: 115~122）、リンパ球細胞で活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedl等、1984 Cell 38: 647~658；Adames等、1985 Nature 318: 533~538；Alexander等、1987 Mol. Cell. Biol. 7: 1436~1444）、精巣、乳房、リンパ球、および肥満細胞で活性なマウス乳癌ウイルス制御領域（Leder等、1986 Cell 45: 485~495）、肝臓で活性なアルブミン遺伝子制御領域（Pinkert等、1987 Genes and Devel. 1: 268~276）、肝臓で活性なアルファ - フェトタンパク質遺伝子制御領域（Krumlauf等、1985 Mol. Cell. Biol. 5: 1639~1648；Hammer等、1987 Science 235: 53~58）、肝臓で活性なアルファ1 - アンチトリプシン 30 遺伝子制御領域（Kelsey等、1987 Genes and Devel. 1: 161~171）骨髄細胞で活性なベータ - グロブリン遺伝子制御領域（Mogran等、1985 Nature 315: 338~340；Kollias等、1986 Cell 46: 89~94）、脳の希突起細胞で活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域（Readhead等、1987 Cell 48: 703~712）、骨格筋で活性なミオシン L 鎖 - 2 遺伝子制御領域（Sani、1985 Nature 314: 283~286）、および視床下部で 40 活性な性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域（Mason等、1986 Science 234: 1372~1378）などがあるが、これらだけに限定されない。

【0108】

本発明のA B C C 1 2 ポリペプチドのいずれか1つをコードする核酸を含む発現ベクターは、一般的な5通りの手法で同定することができる：（a）所望のプラスミドDNAまたは特異的mRNAのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、（b）核酸ハイブリダイゼーション、（c）選択マーカー遺伝子機能の有無、（d）適切な制限エンドヌクレアーゼを用いた分析、および（e）挿入された配列の発現。第1の手法では、核酸をPCRで増幅して増幅産物を検出する。第2の手法では、挿入したマーカー遺伝子と相同な配列を含むプローブを用いた核酸ハイブリダイゼーションによって、発現ベクターに挿入した外来遺伝子の存在を検出することができる。第3の手法では、ベクター中の外来遺伝子の挿入により引き起こされる特定の「選択マーカー」遺伝子機能（例えば、 - ガラクトシダーゼ 40 活性、チミジン・キナーゼ活性、抗生物質に対する耐性、形質転換表現型、バキュロウイルス中の閉塞体（occlusion body）の形成など）の有無に基づいて組換えベクター／宿主系を同定および選択することができる。別の例では、A B C C 1 2 ポリペプチドのいずれか1つをコードする核酸がベクターの「選択マーカー」遺伝子配列内に挿入された場合、A B C C 1 2 遺伝子機能が働かないことによってA B C C 1 2 核酸を含む組換え体を同 50

定することができる。第4の手法では、適切な制限酵素を用いた消化により組換え発現ベクターを同定する。第5の手法では、発現されるタンパク質が機能的に活性なコンホメーションをとる場合、組換えによって発現される遺伝子産物の活性、生化学的諸特性、または免疫学的諸特性を評価することによって、組換え発現ベクターを同定することができる。

#### 【0109】

多種多様な宿主/発現ベクターの組合せを、本発明の核酸を発現させるのに使用することができる。有用な発現ベクターは、例えば、染色体のセグメント、非染色体性DNA配列、および合成DNA配列で構成することができる。適切なベクターには、SV40の誘導体および既知の細菌プラスミド、例えば、大腸菌プラスミドcol E1、pCR1、pBR322、pMal-C2、pET、pGEX (Smith等、1988、Gene 67: 31~40)、pMB9およびそれらの誘導体、RP4などのプラスミド；ファージDNA、例えばファージ1の多数の誘導体、例えばNM989、ならびに他のファージDNA、例えばM13および繊維状一本鎖ファージDNA；2mプラスミドまたはその誘導体などの酵母プラスミド；昆虫または哺乳動物細胞に有用なベクターなどの真核細胞に有用なベクター；ファージDNAまたは他の発現制御配列を使用するように改変したプラスミドなどプラスミドとファージDNAの組合せから誘導されるベクターなどがある。

#### 【0110】

例えば、バキュロウイルス発現系では、pVL941 (BamH1クローニング部位；Summers)、pVL1393 (BamH1、SmaI、XbaI、EcoRI、NotI、XmaIII、BglII、およびPstIクローニング部位；Invitrogen)、pVL1392 (BglII、PstI、NotI、XmaIII、EcoRI、XbaI、SmaI、およびBamH1クローニング部位；SummersおよびInvitrogen)、およびpBlueBacIII (BamH1、BglII、PstI、NcoI、およびHindIIIクローニング部位、blue/white組換えスクリーニングが可能；Invitrogen) など、ただしこれらだけに限定されない非融合(non-fusion)トランスファー・ベクター、pAc700 (BamH1およびKpnIクローニング部位、ここでBamH1認識部位は開始コドンで始まる；Summers)、pAc701およびpAc702 (pAc700と同様 読み枠が異なる)、pAc360 (多角体タンパク質開始コドン(polyhedrin initiation codon)の36塩基対下流BamH1クローニング部位；Invitrogen (195))、およびpBlueBacHisA、B、C (3種の異なる読み枠、BamH1、BglII、PstI、NcoI、およびHindIIIクローニング部位を有する、ProBond精製用N末端ペプチド、およびブルーのblue/white組換えスクリーニング；Invitrogen (220)) など、ただしこれらだけに限定されない融合(fusion)トランスファー・ベクターの両方を使用することができる。

#### 【0111】

本発明での使用が考えられる哺乳動物発現ベクターには、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)プロモーターなどの誘導性プロモーターを有するベクター、例えば、DHFR発現ベクターを含む任意の発現ベクター、またはpED (PstI、SalI、SbaI、SmaI、およびEcoRIクローニング部位、クローン化された遺伝子とDHFRの両方を発現するベクターを含む；Kaufman、Current Protocols in Molecular Biology、16.12 (1991) 参照) などのDHFR/メトトレキセート共増幅(co-amplification)ベクターなどがある。あるいは、pEE14 (ベクターがグルタミン合成酵素および遺伝子クローンを発現するHindIII、XbaI、SmaI、SbaI、EcoRI、およびBclIクローニング部位、；Celltech) などのグルタミン合成酵素/メチオニンスルホキシミン共増幅ベクター。別の一実施形態では、pREP4 (BamH1、SfiI、XhoI、NotI、NheI、HindIII、NheI、PvuII、およびKpnIクローニング部位、構成的RSV-LTRプロモーター、ハイグロマイシンで選択可能なマーカー；Invitrogen)、pCEP4 (BamH1、SfiI、XhoI、NotI、NheI、HindIII、NheI、PvuII、およびKpnIクローニング部

位、構成的 h C M V 前初期遺伝子、ハイグロマイシンで選択可能なマーカー ; Invitrogen )、p M E P 4 ( K p n I、P v u I、N h e I、H i n d I I I、N o t I、X h o I、S f i I、B a m H I クローニング部位、誘導性メタロチオネイン II a 遺伝子プロモーター、ハイグロマイシンで選択可能なマーカー ; Invitrogen )、p R E P 8 ( B a m H I、X h o I、N o t I、H i n d I I I、N h e I、および K p n I クローニング部位、R S V - L T R プロモーター、ヒスチジノールで選択可能なマーカー ; Invitrogen )、p R E P 9 ( K p n I、N h e I、H i n d I I I、N o t I、X h o I、S f i I、および B a m H I クローニング部位、R S V - L T R プロモーター、G 4 1 8 で選択可能なマーカー ; Invitrogen )、および p E B V H i s ( R S V - L T R プロモーター、ハイグロマイシンで選択可能なマーカー、P r o B o n d 樹脂で精製できエンテロキナーゼで切断される N 末端ペプチド ; Invitrogen ) など、エプスタイン・バー・ウイルス ( E B V ) の制御下でエピソームの発現を誘導するベクターを使用することができる。本発明で使用する選択可能な哺乳動物発現ベクターは、p R c / C M V ( H i n d I I I、B s t X I、N o t I、S b a I、および A p a I クローニング部位、G 4 1 8 選択 ; Invitrogen )、p R c / R S V ( H i n d I I I、S p e I、B s t X I、N o t I、X b a I クローニング部位、G 4 1 8 選択 ; Invitrogen ) などである。本発明により使用されるワクシニア・ウイルス哺乳動物発現ベクター ( Kaufman、1991、同上を参照 ) は、p S C 1 1 ( S m a I クローニング部位、T K - および - g a l 選択 )、p M J 6 0 1 ( S a l I、S m a I、A f l I、N a r I、B s p M I I、B a m H I、A p a I、N h e I、S a c I I、K p n I、および H i n d I I I クローニング部位 ; T K - および - g a l 選択 )、および p T K g p t F 1 S ( E c o R I、P s t I、S a l I、A c c I、H i n d I I、S b a I、B a m H I、および H p a クローニング部位、T K または X P R T 選択 ) などであるが、これらだけに限定されない。

#### 【 0 1 1 2 】

酵母発現系も、本発明に従って、A B C C 1 2 ポリペプチドのいずれか 1 つを発現するために使用することができる。例えば、非融合 p Y E S 2 ベクター ( X b a I、S p h I、S h o I、N o t I、G s t X I、E c o R I、B s t X I、B a m H I、S a c I、K p n I、および H i n d I I I クローニング部位 ; Invitrogen ) または融合 p Y E S H i s A、B、C ( X b a I、S p h I、S h o I、N o t I、B s t X I、E c o R I、B a m H I、S a c I、K p n I、および H i n d I I I クローニング部位、ProBond樹脂で精製されエンテロキナーゼで切断される N 末端ペプチド ; Invitrogen ) の 2 つを挙げるだけではあるが、本発明に従って使用することができる。

#### 【 0 1 1 3 】

特定の組換え D N A 分子を同定し単離した後、当分野で既知のいくつかの方法を用いてこれを増殖させることができる。適切な宿主系および増殖条件を確立した後、組換え発現ベクターを増殖させ、多量に調製することができる。先に説明したように、使用できる発現ベクターは、以下のベクターまたはその誘導体などであるが、これらだけに限定されない : ワクシニア・ウイルスまたはアデノウイルスなどのヒトまたは動物ウイルス ; バキュロウイルスなどの昆虫ウイルス ; 酵母ベクター ; バクテリオファージ・ベクター ( 例えば、ラムダ )、ならびにプラスミドおよびコスミド D N A ベクターなどが 2、3 挙げられる。

#### 【 0 1 1 4 】

また、挿入配列の発現を調節し、遺伝子産物を所望の特定の形式で修飾および加工する宿主細胞株を選択することができる。異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳および翻訳後プロセッシング、および修飾 ( 例えばシグナル配列の、例えばグリコシル化、切断 ) について特徴的で特異的な機序を有する。適切な細胞系または宿主系を選択して、発現した外来タンパク質の所望の修飾およびプロセッシングを確実にすることができる。例えば、細菌系での発現を用いて、非グリコシル化コア・タンパク質産物を産生することができる。しかし、細菌で発現される膜貫通 A B C C 1 2 タンパク質は、正しく折り畳まれないことがある。酵母での発現は、グリコシル化産物を産生することができる。真核細胞での発現では、異種タンパク質「本来の ( native )」グリコシル化および折り畳みが起こる可能性を高く

することができる。また、哺乳動物細胞での発現は、A B C C 1 2 活性を再構成または構成できるツールを提供するものである。さらに、ベクター/宿主発現系が異なると、タンパク質分解などのプロセッシング反応への影響度が異なることがある。

#### 【0115】

ベクターは、所望の宿主細胞に当分野で既知の方法、例えば、形質移入、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合法、D E A E デキストラン法、リン酸カルシウム沈殿法、リポフェクション（リソソーム融合）、遺伝子銃の使用、D N A ベクター輸送体（例えば、Wu等、1992、J. Biol. Chem. 267: 963~967; WuおよびWu、1988、J. Biol. Chem. 263: 14621~14624; Hartmut等、カナダ国特許出願第2,012,311号、1990年3月15日出願を参照）によって導入される。

10

#### 【0116】

このようなD N Aを細胞内に導入する場合、外来または異種D N Aを細胞に「形質移入」する。形質移入されたD N Aが表現型の変化を起こす場合、細胞は外来または異種D N Aで「形質転換」されている。好ましくは、形質転換D N Aは、（共有結合で）染色体D N Aに組み込まれてその細胞のゲノムを構成すべきである。

#### 【0117】

内在性膜タンパク質として発現する組換えマーカー・タンパク質を、標準法により単離し精製することができる。一般に、内在性膜タンパク質は、ドデシル硫酸ナトリウム（S D S）、T r i t o n X - 1 0 0 ポリオキシエチレン・エステル、I p a g e 1 / n o n i d e t P - 4 0 （N P - 4 0 ）（オクチルフェノキシ）- ポリエトキシエタノール、ジゴキシン、デオキシコール酸ナトリウムなど、それらの混合物を含めて、ただしこれらだけに限定されない界面活性剤で膜を溶解して得ることができる。懸濁液を超音波処理して溶解性を上げることができる。溶解した形のタンパク質は、培養液を回収することによって、または封入体を溶解することによって、例えば、上述のように、界面活性剤で処置することによって、また、必要であれば超音波処理または他の機械的な加工によって得ることができる。可溶性または溶解性タンパク質は、ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動（P A G E）、等電点電気泳動、2次元ゲル電気泳動、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー、免疫親和性、およびサイズ分離用カラム・クロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、免疫沈降、または他の標準のタンパク質精製技術など様々な技術を用いて単離することができる。

20

30

#### 【0118】

あるいは、本発明による核酸またはベクターを、リポフェクションによってインビボで導入することができる。過去10年間、リポソームを利用してインビトロで核酸を封入および形質移入することが増加している。リポソームで媒介された形質移入で直面する困難や危険を制限するように設計された合成陽イオン性脂質を使用して、マーカーをコードする遺伝子をインビボで形質移入するためのリポソームを調製することができる（Felgner等（1987、PNAS 84/7413）; Mackey等（1988、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85: 8027~8031）; Ulmer等（1993、Science、259: 1745~1748））。陽イオン性脂質の使用により、負に帯電した核酸の封入を促進し、負に帯電した細胞膜との融合を促進することもできる（FelgnerおよびRingold（1989、Science、337: 387~388））。核酸の移送に特に有用な脂質化合物および組成物は、国際公開第95/18863号および同96/17823号、および米国特許第5,459,127号に記載されている。外来遺伝子を特定の器官にインビボで導入するためにリポフェクションを使用することには、実用上の利点がある。特定の細胞に対するリポソームの分子ターゲティングは、有益な一分野である。特定のタイプの細胞を対象に形質移入することは、すい臓、肝臓、腎臓、脳など、異質の細胞を含む組織において特に好ましいことは明らかである。ターゲティングのために、脂質を他の分子に化学的に結合させることができる〔Mackey等、同上を参照〕。標的とするペプチド、例えば、ホルモンまたは神経伝達物質、および抗体などのタンパク質、または非ペプチド分子をリポソームと化学的に結合させることができる。

40

#### 【0119】

50

陽イオン性オリゴペプチド（例えば、国際公開第95/21931号）、DNA結合タンパク質由来のペプチド（例えば、国際公開第96/25508号）、陽イオン性ポリマー（例えば、国際公開第95/21931号）などの他の分子も、インビボでの核酸の形質移入を容易にするために有用である。

#### 【0120】

裸のDNAプラスミドとしてベクターをインビボで導入することも可能である（米国特許第5,693,622号、同第5,589,466号、および同5,580,859号参照）。遺伝子治療用の裸のDNAベクターを、当分野で既知の方法、例えば、形質移入、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合法、DEAEデキストラン法、リン酸カルシウム沈殿法、遺伝子銃の使用、またはDNAベクター輸送体の使用（例えば、Wu等、1992、同上；WuおよびWu、1988、同上；Hartmut他、カナダ国特許出願第2,012,311号、1990年3月15日出願；Williams等、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726~2730を参照）によって所望の宿主細胞に導入することができる。受容体を媒介とするDNA送達手法も使用することができる（Curiel等、1992、Hum. Gene Ther. 3:147~154；WuおよびWu、1987、J. Biol. Chem. 262:4429~4432）。

10

#### 【0121】

「薬剤として許容されるビヒクルまたは賦形剤」としては、投薬方法として薬剤的に許容され、無菌であり、適切な分散剤、湿潤剤、および懸濁剤を用いて配合される水性懸濁液でも油性懸濁液でもよい、稀釈剤およびフィラーが挙げられる。個々の薬剤として許容される担体および活性化合物と担体の比は、組成物の溶解性および化学的諸性質、個々の投与形態、および標準の製剤上の実務で決まる。

20

#### 【0122】

本発明の核酸、ポリペプチド、ベクター、または宿主細胞は、好ましくは、薬剤として許容されるビヒクルまたは賦形剤中、インビボで導入される。「薬剤として許容される」という句は、生理的に許容され、ヒトに投与した時に胃ぜん動の異常亢進、めまいなどアレルギーや類似の有害反応を通常は起こさない分子体（molecular entities）および組成物にあてはまる。好ましくは、本明細書で使用する「薬剤として許容される」という用語は、連邦政府または州政府の規制当局、あるいは米国薬局方、または動物、より具体的にはヒトへの使用が一般に認められた他の薬局方に列記されている規制当局によって認可されたことを意味する。「賦形剤」という用語は、前記化合物とともに投与される稀釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。このような薬剤担体は、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油など石油、動物、植物、または合成起源の液体を含めて、水や油などの無菌液体とすることができる。好ましくは、水、水溶液、食塩水、水性ブドウ糖、およびグリセロール溶液が、賦形剤、特に注射液として使用される。適切な薬剤の賦形剤は、E. W. Martin著「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。

30

#### 【0123】

したがって、本発明は、治療に有効な量の遺伝子治療用ABCC12ポリペプチドを発現するベクターを送達しようとするものである。「治療に有効な量」という句は、本明細書では、宿主の活性、機能、および応答における臨床的に有意な障害を少なくとも約15パーセント、好ましくは少なくとも50パーセント、より好ましくは少なくとも90パーセント減少させ、さらに好ましくは防止するのに十分な量を意味するのに使用する。あるいは、治療に有効な量は、宿主の臨床的に有意な状態を改善するのに十分な量である。

40

#### 【0124】

ABCC12遺伝子の核酸

本出願人らは、ABCC12と称する新規なヒトABCC様遺伝子を同定した。本出願人らは、この新規な遺伝子が染色体16q12領域（図2）上に位置することも明らかにした。

さらに、本出願人らは、短鎖および長鎖のABCC12タンパク質アイソフォームのコード配列（CDS）に対応する各転写物配列を決定した。本発明によれば、ABCC12遺伝子は、29個のエクソンと28個のイントロンを含む。エクソンにはすべてGTおよび

50



A G ジヌクレオチドが隣接し、真核生物遺伝子のスプライス部位に対するコンセンサ配列と一致した（表 1）。本出願人らは、表 1 に示すように長さおよびエクソン 15 の配列が異なる 2 つの A B C C 1 2 転写物も同定した。短鎖転写物のエクソン 15 は、配列番号 17 で示される 76 ヌクレオチドを含み、長鎖転写物のエクソン 15 は、配列番号 32 で示される追加の 9 ヌクレオチドを 3' 末端に有する。

したがって、ヒトの新規な A B C C 1 2 遺伝子の短鎖転写物は、配列番号 1 で示される 4273 ヌクレオチドからなり、一方、長鎖転写物は配列番号 2 で示される。

【0125】

【表 1】

表 1：ABCC12 のスプライス部位配列およびエクソン・サイズ

エクソン	サイズ (bp)	スプライスアクセプター	スプライスドナー
1	119	Not determined	CCTGTGCAAGgtaagtcaga
2	156	ttgtctgcagGTTAGCACCC	ATGCCAAAAGgtaccaggat
3	152	ttcatcacagATTTTCGAGTC	GGGCCGGTGAgtagcggcagc
4	230	ttacagacagTTCTCATTC	TGTTGGCGAGgtaagctggc
5	174	ttctttccagGTGCTCAATA	ACCCGTCCAGgtaacggcat
6	148	ttgatttcagATGTTTATGG	ACTATCCAAGgtaggacaag
7	149	tattttgcagATATAAGAAG	CGCACCCGTGgtaagagctg
8	108	tgttcttcagGCATTTAGTG	GAGAATGAAGgtataactaa
9	279	ttaatcttagAAAATCTCTCA	GGTGAGAAAGgtgggtgtgt
10	72	tctctggcagGGGAAGATCT	CCTAGGACAGgtaagctgtg
11	125	gttgttccagATGCAGCTGC	ATCACCAAAGgtaatatataa
12	73	gcaccaacagGTATCAGCAC	CCTGACTGAGgtgagcgggg
13	204	ctgtccacagATTGGGGAGC	CCAGCTACAGgtgatggggac
14	135	acttctgcagTTCTTAGAGT	GCAGTTCAAGgtaactcaca
15	76 または 85	ttgtctccagGATCCTGAAC	GAAGATGCTGgtataatcgg または GGTATAATCGgttagaatcc
16	72	ctcaccctagTTTTGGCTCC	GACACAAAAGgtattttacca
17	90	gtctccacagTTCTGAGCA	GCTTCTGGAGgttcagata
18	104	cctcttgcagGGTACCTCCT	GGGCTCACGGgtgagtttce
19	198	ttctccaaagATGACCTGTG	GTTTGATAAGgttagggccac
20	227	ttctccacagATCTTAAAGA	TTCTGTTACGgttaggcccac
21	138	tttcttccagCATTTTCCAC	GCATCACCTAgtagtccca
22	157	aaaactccagTCACCTCCTC	CATCATCCAGgtaatgcctg
23	90	ttttcaacagCTGAGCGGAC	ATACATTTCCGgttaggaaat
24	190	tcctttacagACCTGTGTTC	ACAGGTTCCGgttaggacaa
25	160	tggtttcccagGAAAGTCATC	GTACAGTAAGgttagctgttt
26	79	ttcattgcagGTACAACCTG	GAGAGACACAgtaggtctct
27	114	tgtttttagATAATGAAAC	TAATTCAAAGgtaagaaaac
28	165	tcctccacagATCATTTCTCC	AAATGGGAAGgtataggaag
29	87+3'UTR	tgactttcagGTGATTGAGT	Not determined

【0126】

本出願人らは、対応する A B C C 1 2 遺伝子または試料中のヌクレオチド発現産物を検出する様々な手段を作り出すのに本発明による特に有用な、新規なヒト A B C C 1 2 遺伝子のエクソン配列の特徴を明らかにした。

【0127】

A B C C 1 2 遺伝子のいくつかのエクソンをそのヌクレオチド配列で特徴づけて表 2 および表 3 に示した。表 2 と表 3 ではエクソン 15 のみが異なる。ヒト A B C C 1 2 遺伝子は、サイズが 72 ~ 279 bp の 29 個のエクソンからなる。異なるスプライシングによって、配列番号 17 で示される 76 ヌクレオチドのエクソンを含む第 1 の短鎖アイソフォー

10

20

30

40

50

ム、および配列番号 32 で示される 85ヌクレオチドのエクソン 15を含む第2の長鎖アイソフォームが生成する。ABCC12遺伝子の28個のイントロンのうち、16個はクラス0（スプライスはコドンとコドンの間で起こる）、6個はクラス1（コドンは第1と第2のヌクレオチド間で中断される）、6個はクラス2（スプライスはコドンの第2と第3のヌクレオチド間で起こる）である。

【0128】

【表2】

表2：ヒトABCC12のエクソンDNAおよびイントロンDNA（短鎖アイソフォーム）

配列番号	エクソンまたはイントロン番号	mRNA中のエクソンの開始	mRNA中のエクソンの終了	ゲノム断片中のエクソンの開始	ゲノム断片中のエクソンの終了	エクソン長	断片中のイントロンの開始	断片中のイントロンの終了	イントロン長
3	1	1	119	111347	111469	119	111466	113705	2240
4	2	120	275	113706	113865	156	113862	116417	2556
5	3	276	423	116418	116569	152	116566	116850	285
6	4	424	657	116851	117080	230	117085	118434	1350
7	5	658	831	118435	118608	174	118609	119395	787
8	6	832	979	119396	119543	148	119544	123935	4392
9	7	980	1128	123936	124084	149	124085	126875	2791
10	8	1129	1236	126876	126983	108	126984	129033	2050
11	9	1237	1515	129034	129312	279	129313	133486	4174
12	10	1516	1587	133487	133558	72	133559	135930	2372
13	11	1588	1712	135931	136055	125	136056	-	-
14	12	1713	1785	3997	4069	73	4070	5711	1642
15	13	1786	1989	5712	5915	204	5916	9419	3504
16	14	1990	2124	9420	9554	135	9555	9667	113
17	15	2125	2200	9668	9743	76	9744	9822	79
18	16	2201	2272	9823	9894	72	9895	12800	2906
19	17	2273	2362	12801	12890	90	12891	13904	1014
20	18	2363	2466	13905	14008	104	14009	15993	1985
21	19	2467	2664	15994	16191	198	16192	16961	770
22	20	2665	2891	16962	17188	227	17189	20320	3132
23	21	2892	3029	20321	20458	138	20459	24427	3969
24	22	3030	3186	24428	24584	157	24585	30120	5536
25	23	3187	3276	30121	30210	90	30211	32595	2385
26	24	3277	3466	32596	32785	190	32786	33244	459
27	25	3467	3626	33245	33404	160	33405	34510	1106
28	26	3627	3705	34511	34589	79	34590	35623	1034
29	27	3706	3819	35624	35737	114	35738	37256	1519
30	28	3820	3984	37257	37421	165	37422	37528	107
31	29	3985	4273	37529	37817	289	37818	-	-

【0129】

【表3】

表3：ヒトABCC12のエクソンDNAおよびイントロンDNA（長鎖アイソフォーム）

配列番号	エクソンまたはイントロン番号	mRNA中のエクソンの開始	mRNA中のエクソンの終了	ゲノム断片中のエクソンの開始	ゲノム断片中のエクソンの終了	エクソン長	断片中のイントロンの開始	断片中のイントロンの終了	イントロン長
3	1	1	119	111347	111465	119	111466	113705	2240
4	2	120	275	113706	113861	156	113862	116417	2556
5	3	276	423	116418	116569	152	116566	116850	285
6	4	424	657	116851	117080	230	117085	118434	1350
7	5	658	831	118435	118608	174	118609	119395	787
8	6	832	979	119396	119543	148	119544	123935	4392
9	7	980	1128	123936	124084	149	124085	126875	2791
10	8	1129	1236	126876	126983	108	126984	129033	2050
11	9	1237	1515	129034	129312	279	129313	133486	4174
12	10	1516	1587	133487	133558	72	133559	135930	2372
13	11	1588	1712	135931	136055	125	136056	-	-
14	12	1713	1785	3997	4069	73	4070	5711	1642
15	13	1786	1989	5712	5915	204	5916	9419	3504
16	14	1990	2124	9420	9554	135	9555	9667	113
32	15	2125	2209	9668	9752	85	9753	9822	70
18	16	2210	2281	9823	9894	72	9895	12800	2906
19	17	2282	2371	12801	12890	90	12891	13904	1014
20	18	2372	2475	13905	14008	104	14009	15993	1985
21	19	2476	2673	15994	16191	198	16192	16961	770
22	20	2674	2900	16962	17188	227	17189	20320	3132
23	21	2901	3038	20321	20458	138	20459	24427	3969
24	22	3039	3195	24428	24584	157	24585	30120	5536
25	23	3196	3285	30121	30210	90	30211	32595	2385
26	24	3286	3475	32596	32785	190	32786	33244	459
27	25	3476	3635	33245	33404	160	33405	34510	1106
28	26	3636	3714	34511	34589	79	34590	35623	1034
29	27	3715	3828	35624	35737	114	35738	37256	1519
30	28	3829	3993	37257	37421	165	37422	37528	107
31	29	3994	4282	37529	37817	289	37818	-	-

10

20

30

40

50

## 【0130】

したがって、本発明は、配列番号1～32のいずれか1つまたはその相補的な配列を含む核酸にも関する。

本発明は、配列番号1～32のいずれか1つで示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸にも関する。

本発明は、配列番号1～32のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも8個の連続したヌクレオチドを含む核酸にも関する。

また、本発明の主題は、配列番号1～32のいずれか1つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、少なくとも80%のヌクレオチドが同一である核酸である。

本発明は、配列番号1～32のいずれか1つを含む核酸と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは98%のヌクレオチドが同一である核酸にも関する。

本発明は、配列番号1～32のいずれか1つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、厳密性の高い条件下でハイブリッド形成する核酸にも関する。

## 【0131】

A B C C 1 2 タンパク質の短鎖および長鎖アイソフォームをコードする c D N A 分子さらに、本出願人は、ヒト A B C C 1 2 遺伝子に対応する c D N A 配列およびコード配列 ( C D S ) を決定し、短鎖および長鎖ヒト対応タンパク質アイソフォームをコードした ( 実施例 2 ) 。

新規なヒト A B C C 1 2 遺伝子の c D N A 分子は、配列番号 1 で示される 4 2 7 3 ヌクレオチドからなり、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼの障害に罹っていない対象中で産生される 1 3 5 6 アミノ酸 ( a a ) の A B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォーム ( 配列番号 3 3 ) に対応する 4 0 7 1 ヌクレオチドのコード配列を含む。配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列を含む新規なヒト A B C C 1 2 遺伝子の c D N A 分子は、配列番号 1 の位置 1 のヌクレオチド ( A T G 翻訳開始コドンの塩基 A ) から位置 4 0 7 1 のヌクレオチド ( T A A 停止コドンの塩基 A ) までのオープン・リーディング・フレームを含み、配列番号 3 3 の 1 3 5 6 アミノ酸の完全長 A B C C 1 2 ポリペプチドをコードする。

10

## 【0132】

新規なヒト A B C C 1 2 遺伝子の長鎖 c D N A 分子は、配列番号 2 で示される 4 2 8 2 ヌクレオチドからなり、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼの障害に罹っていない対象において産生される 1 3 5 9 アミノ酸 ( a a ) の A B C C 1 2 ポリペプチド・アイソフォーム ( 配列番号 3 4 ) に対応する 4 0 8 0 ヌクレオチド・コード配列を含む。配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列を含む A B C C 1 2 タンパク質の長鎖アイソフォームをコードする c D N A は、配列番号 2 の位置 1 のヌクレオチド 1 ( A T G 翻訳開始コドンの塩基 A ) から位置 4 0 8 0 のヌクレオチド ( T A A 停止コドンの塩基 A ) までのオープン・リーディング・フレームを含み、配列番号 3 4 の 1 3 5 9 アミノ酸の A B C C 1 2 ポリペプチドの長鎖アイソフォームをコードする。

20

したがって、本発明は、配列番号 1 および 2 またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を対象とする。

## 【0133】

本発明は、配列番号 1 および 2 で示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸にも関する。

本発明は、配列番号 1 および 2 またはその相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも 8 個の連続したヌクレオチドを含む核酸にも関する。

30

また、本発明の主題は、配列番号 1 ~ 2 のヌクレオチドを含む核酸またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、少なくとも 8 0 % のヌクレオチドが同一である核酸である。

本発明は、配列番号 1 ~ 2 のヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、少なくとも 8 5 % 、好ましくは 9 0 % 、より好ましくは 9 5 % 、さらに好ましくは 9 8 % のヌクレオチドが同一である核酸にも関する。

## 【0134】

本発明の別の主題は、配列番号 1 ~ 2 のヌクレオチド配列を含む核酸またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、厳密性の高い条件下でハイブリッド形成する核酸である。

40

本発明は、配列番号 3 3 または 3 4 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸にも関する。

本発明は、配列番号 3 3 または 3 4 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸にも関する。

本発明は、配列番号 3 3 または 3 4 のアミノ酸配列を含むポリペプチドにも関する。

本発明は、配列番号 3 3 または 3 4 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドにも関する。

本発明は、配列番号 3 3 または 3 4 のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのペプチド断片と、少なくとも 8 0 % のアミノ酸が同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドにも関する。

50

本発明は、配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含むポリペプチドと少なくとも 85 %、好ましくは 90 %、より好ましくは 95 %、さらに好ましくは 98 % のアミノ酸が同一であるポリペプチドにも関する。

本発明によるポリペプチドは、配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含む本発明によるポリペプチドの 4、5 ~ 10、15、18 または 20 ~ 25、35、40、50、70、80、100 または 200 の連続したアミノ酸長を有することが好ましい。

#### 【0135】

ヒドロパシー・プロファイルに基づくトポロジー予測および他の既知の ABC 輸送体との比較から、コードされた ABCC12 タンパク質アイソフォームは、(Walker A および B ドメイン、およびシグネチャー・モチーフ (signature motifs) を含めた) 2 つの ATP 結合ドメインおよび 2 つの膜貫通ドメインを含む完全 ABC 輸送体であることが示唆された (図 1)。ABCC12 のアミノ酸配列は、47 % がヒト ABCC5 タンパク質と同一であり、37 % がヒト ABCC4 と同一である。ABCC12 タンパク質は、ABCC4 および ABCC5 タンパク質同様、サブグループの他の周知のメンバーである ABCC1 (MRP1) よりも小さく、余分な N 末端ドメインを欠いていると思われるが (Borst 等、J Natl Cancer Inst、2000、92、1295 ~ 302)、この N 末端ドメインは輸送機能には不要であることが判明している (Bakos 等、J. Biol. Chem、1998、273、32167 ~ 75)。

#### 【0136】

##### 【表 4】

表 4：配列全体にわたる ABCC11、ABCC5、ABCC4、ABCC1、および ABCA1 のアミノ酸配列間の相同性/同一性百分率

	ABCC5	ABCC1	ABCC4	ABC-A1	ABCC12
ABCC5	100/100				
ABCC1	49/38	100/100			
ABCC4	49/38	52/41	100/100		
ABC-A1	-	-	-	100/100	
ABCC12	57/47	48/36	49/37	-	100/100

#### 【0137】

ABCC12、ABCC4、および ABCC5 遺伝子のアミノ酸配列の整列から、配列全体にわたり 49 ~ 41 % の同一性が示されている (表 4 および 図 1)。

#### 【0138】

ABCC サブファミリー・タンパク質の系統学的解析によって、ABCC12 遺伝子と ABCC5 遺伝子の進化上の密接な関係が明らかとなっている (図 5)。また、系統樹の解析によって、ABCC8 と ABCC9 遺伝子が最近 2 組に分岐したこと、一方、ABCC10 が共通祖先から最初に分離した遺伝子の 1 つであることが示唆されている。ABCC1、ABCC2、ABCC3、および ABCC6 の各遺伝子は明確に規定されたサブ・クラスターを構成し、一方、ABCC4 と CFTR (ABCC7) 遺伝子は明らかに初期に分岐したにもかかわらず別の確実なサブセットを形成している。

#### 【0139】

ヌクレオチド・プローブおよびプライマー

本発明による核酸 (ゲノム DNA、メッセンジャー RNA、cDNA) とハイブリッドを形成するヌクレオチド・プローブおよびプライマーも、本発明の一部を成す。

本発明によれば、配列番号 1 ~ 32 のいずれか 1 つまたは相補的なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドから誘導される核酸断片は、試料中の ABCC12 遺伝子またはその断片またはその (突然変異体または多型を含む) 変異体のヌクレオチド配列の少なくとも 1 コピーの存在を検出するのに有用である。

本発明によるヌクレオチド・プローブまたはプライマーは、配列番号 1 ~ 32 のいずれか

1つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を含む。

本発明によるヌクレオチド・プローブまたはプライマーは、配列番号1～32のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸のうち、少なくとも8個の連続したヌクレオチドを含む。

本発明によるヌクレオチド・プローブまたはプライマーは、本発明による核酸、特に配列番号1～32のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸の10、12、15、18または20～25、35、40、50、70、80、100、200、500、1000、1500の連続したヌクレオチド長を有することが好ましい。

あるいは、本発明によるヌクレオチド・プローブまたはプライマーは、本発明による核酸、より具体的には配列番号1～32のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸の12、15、18、20、25、35、40、50、100、200、500、1000、1500の連続したヌクレオチド長を有する断片からなりかつ/またはそれらを含む。

したがって、本発明によるヌクレオチド・プローブまたはプライマーの定義は、上で定義した厳密性の高いハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1～32のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸とハイブリッドを形成するオリゴヌクレオチドを包含する。

#### 【0140】

好ましい一実施形態によれば、本発明によるヌクレオチド・プライマーは、配列番号35～46のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的な核酸配列を含む。

ABCC12遺伝子の様々な領域の増幅を可能にするプライマーおよびプライマー対の例を下記の表5に示す。配列番号35～46の各プライマーが配列番号1および2の中で占める位置、およびそのハイブリッド形成領域を表5に示す。「Comp」という略語は相補的な核酸配列を指す。

#### 【0141】

#### 【表5】

表5：ABCC12遺伝子の核酸断片 (nucleic fragments) の増幅用プライマー

配列番号	名称	プライマー	位置 (短鎖フォーム)	位置 (長鎖フォーム)
35	028397_A	TCCTTCGCCACATTTTCC	157-174	157-174
36	028397_B	ATTGAGCACCTCGCCAAC	comp 666-649	comp 666-649
37	028397_C	TTCTCATTACCAAATCCTCC	428-448	428-448
38	028397_D	ACATTAAACATGGCAATCACAC	comp 1157-1136	comp 1157-1136
39	028397_E	GTGTGATTGCCATGTTTAATGT	1136-1157	1136-1157
40	028397_G	GGAGTGCATTAAGAAGACGC	1929-1948	1929-1948
41	028397_H	CAGAGAGGAGGATGCCAT	comp 2643-2626	comp 2652-2635
42	028397_K	CACTGCAAGCATGGTGTTC	2556-2574	2565-2583
43	028397_L	CTCATCGGTGTGACTCTCA	comp 3663-3645	comp 3672-3654
44	028397_O	TTTGAGAGTCACACCGATGAGAT	3643-3665	3652-3674
45	028397_P	CCCAGAACCAACCCCAAG	comp 4273-4256	comp 4282-4265
46	028397_R	GGCTCTGTGAGATGAATAGG	4104-4123	4113-4132

#### 【0142】

好ましい一実施形態によれば、本発明によるヌクレオチド・プライマーは、配列番号35～46のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的な核酸配列を含む。

#### 【0143】

本発明によるヌクレオチド・プライマーまたはプローブは、クローニングおよび制限酵素作用、あるいはNarang等 (1979、Methods Enzymol、68：90～98) またはBrown等 (1979、Methods Enzymol、68：109～151) によるリン酸ジエステル法、Beaucage等 (1981、Tetrahedron Lett、22：1859～1862) によるジエチルホスホロアミダイト法、または欧州

特許第 0,707,592 号に記載の固体担体に関する技術などの技術に従って行う直接的な化学合成を含めて、当業者に周知の任意の適切な方法によって調製することができる。

【0144】

本発明による核酸はそれぞれ、上記オリゴヌクレオチド・プローブおよびプライマーを含めて、所望であれば、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、または化学的手段によって検出できるマーカーを組み入れることによって標識することができる。例えば、このようなマーカーは、放射性同位体 ( $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{35}\text{S}$ )、蛍光分子 (5 - プロモデオキシウリジン、フルオレセイン、アセチルアミノフルオレン、ジゴキシゲニン)、またはビオチンなどのリガンドからなるものでもよい。プローブの標識化は、好ましくは、プライマー伸長により、あるいは 5' 末端または 3' 末端に付加することにより、標識分子をポリヌクレオチドに組み入れて実施する。核酸断片の非放射性標識の例は、特にフランス国特許第 78 109 75 号、または Urdea 等 (1988、Nucleic Acids Research、11: 4937~4957)、または Sanchez - Pescador 等 (1988、J. Clin. Microbiol.、26 (10): 1934~1938) の論文に記載されている。

10

【0145】

好ましくは、本発明によるヌクレオチド・プローブおよびプライマーは、Urdea 等 (1991、Nucleic Acids Symp Ser.、24: 197~200)、あるいは欧州特許第 0,225,807 号 (CHIRON) に記載のプローブなどシグナルの増幅を可能にするタイプの構造的特徴を持つことができる。

【0146】

本発明によるオリゴヌクレオチド・プローブは、特に、ゲノム DNA を用いたサザン・ブロット法で、あるいは試料中の対応する転写体を発現させようとするときには対応するメッセンジャー RNA を用いたノーザン・ブロット法で使用することができる。

20

本発明によるプローブおよびプライマーを、PCR 増幅産物の検出あるいはミスマッチの検出に使用することもできる。

本発明によるヌクレオチド・プローブまたはプライマーを、固体担体上に固定することができる。このような固体担体は当業者には周知であり、マイクロタイター・プレートのウェル、ポリスチレン・ビーズ、磁気ビーズ、ニトロセルロース・バンド、またはラテックス粒子などの微粒子の表面を含む。

【0147】

したがって、本発明は、試料中の配列番号 1~32 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列または相補的なヌクレオチド配列を含む核酸、または配列番号 1~32 のいずれか 1 つの核酸断片または変異体または相補的なヌクレオチド配列の存在を検出する方法にも関する。この方法は、以下のステップ、すなわち

30

1) 本発明による 1 個または複数のヌクレオチド・プローブまたはプライマーを試験試料と接触させること、

2) プローブと試料中に存在する核酸とで形成される複合物を検出することを含む。

本発明による検出方法の特定の一実施形態によれば、オリゴヌクレオチド・プローブおよびプライマーは担体上に固定されている。

別の一態様によれば、オリゴヌクレオチド・プローブおよびプライマーは検出可能なマーカーを含む。

40

【0148】

また、本発明は、試料中の本発明による核酸の存在を検出するためのボックスまたはキットに関する。このボックスまたはキットは、

a) 1 個または複数の上記ヌクレオチド・プローブまたはプライマー、

b) 適切であれば、ハイブリダイゼーション反応に必要な試薬を含む。

【0149】

第 1 の態様によれば、検出ボックスまたはキットは、プローブまたはプライマーが担体上に固定されていることを特徴とする。

第 2 の態様によれば、検出ボックスまたはキットは、オリゴヌクレオチド・プローブが検

50

出可能なマーカを含むことを特徴とする。

【0150】

上記検出キットの特定の一実施形態によれば、このようなキットは、対象とする標的核酸を検出するために、あるいは本発明による核酸、より具体的には配列番号1～30のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸のコード領域または非コード領域における突然変異を検出するために使用できる本発明による複数のオリゴヌクレオチド・プローブおよび/またはプライマーを含む。

したがって、本発明によるプローブは、担体上に固定され、「DNAチップ」などのマトリックス中に配列することができる。このような配列マトリックスは、特に米国特許第5,143,854号、国際公開第90/15070号、同第92/10092号に記載されている。

10

【0151】

オリゴヌクレオチド・プローブが高密度で固定された担体マトリックスは、例えば、米国特許第5,412,087号および国際公開第95/11995号に記載されている。

本発明によるヌクレオチド・プライマーを使用して、本発明による核酸のいずれか1つ、より具体的には配列番号1～32のいずれか1つのヌクレオチド配列または相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を増幅することができる。あるいは、本発明によるヌクレオチド・プライマーを使用して配列番号1～32のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列の核酸断片または変異体を増幅することができる。

特定の一実施形態では、本発明によるヌクレオチド・プライマーを使用して、配列番号1～32のいずれか1つ、配列番号1～32のいずれか1つで示される、または相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を増幅することができる。

20

【0152】

本発明の別の一主題は、本発明による核酸、より具体的には試料に含まれるa)配列番号1～32のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列、b)配列番号1～32のいずれか1つで示されるまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を増幅する方法に関する。この方法は、以下のステップ、すなわち、

a)標的核酸が存在すると推定される試料を、増幅反応に必要な試薬の存在下で、増幅しようとする標的核酸領域のそれぞれ5'側および3'側にそのハイブリダイゼーション位置がある一対のヌクレオチド・プライマーと接触させること、および

30

b)増幅した核酸を検出することを含む。

好ましくは、上記ヌクレオチド・プライマーのいずれかを上記増幅方法を実施するのに使用する。

【0153】

また、本発明の主題は、本発明による核酸、より具体的には配列番号1～32のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列、または配列番号1～32のいずれか1つで示されるまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を増幅するためのボックスまたはキットである。このボックスまたはキットは、

a)増幅しようとする標的核酸のそれぞれ5'側および3'側にそのハイブリダイゼーション位置がある一対の本発明によるヌクレオチド・プライマーと、場合によっては、

40

b)増幅反応に必要な試薬とを含む。

このような増幅ボックスまたはキットは、好ましくは、少なくとも一対の上記ヌクレオチド・プライマーを含む。

【0154】

また、本発明の主題は、配列番号1～32のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸の全部または一部を増幅するためのボックスまたはキットである。このボックスまたはキットは、

1)増幅しようとする標的核酸のそれぞれ5'側および3'側にそのハイブリダイゼーション位置がある一対の本発明によるヌクレオチド・プライマーと、場合によっては、

2)増幅反応に必要な試薬とを含む。

50



このような増幅ボックスまたはキットは、好ましくは、少なくとも一対の上記ヌクレオチド・プライマーを含む。

【0155】

本発明は、試料中の本発明による核酸の存在を検出するためのボックスまたはキットにも関する。このボックスまたはキットは、

- a) 本発明による1個または複数のヌクレオチド・プローブ、
- b) 適切であれば、ハイブリダイゼーション反応に必要な試薬を含む。

【0156】

第1の態様によれば、検出ボックスまたはキットは、ヌクレオチド・プローブおよびプライマーが担体上に固定されていることを特徴とする。

10

第2の態様によれば、検出ボックスまたはキットは、ヌクレオチド・プローブおよびプライマーが検出可能なマーカを含むことを特徴とする。

【0157】

上記検出キットの特定の一実施形態によれば、このようなキットは、対象とする標的核酸を検出する、あるいは本発明による核酸のコード領域または非コード領域における突然変異を検出するために使用することができる本発明による複数のオリゴヌクレオチド・プローブおよび/またはプライマーを含む。本発明の好ましい一実施形態によれば、標的核酸は、配列番号1~32のいずれか1つのヌクレオチド配列、または相補的な核酸配列を含む。あるいは、標的核酸は、配列番号1~32のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸の核酸断片または変異体である。

20

本発明によれば、本発明によるプライマーは、一般に、配列番号35~46のいずれか1つの全部もしくは一部またはその相補的な配列を含む。

【0158】

本発明によるヌクレオチド・プライマーは、対象の遺伝子型を決定する方法、および/または集団の遺伝子型を決定する方法に特に有用であり、特に、対象中の特定の対立遺伝子形または特定の形の対立遺伝子群(ハプロタイプ)と、これら対象中の特定の表現型(形質)、例えば16番染色体上、より正確には16q腕上、さらに正確には16q12遺伝子座にその病理の染色体候補領域が位置する発作性運動誘発性舞踏アテトーゼなどの疾患をこれらの対象にもたらす素因の存在との関連性の研究に特に有用である。

【0159】

組換えベクター

30

本発明は、本発明による核酸を含む組換えベクターにも関する。本発明では「ベクター」は、一本鎖または二本鎖の形の環状または線状のDNAまたはRNA分子を意味すると理解される。

【0160】

好ましくは、このような組換えベクターは、以下の核酸、すなわち、

- a) 配列番号1~32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸、
- b) 配列番号1~32のいずれか1つで示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸
- c) 配列番号1~32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸のうち、少なくとも8個の連続したヌクレオチドを含む核酸、
- d) 配列番号1~32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、少なくとも80%のヌクレオチドが同一である核酸、
- e) 配列番号1~32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、85%、90%、95%、または98%のヌクレオチドが同一である核酸、
- f) 厳密性の高いハイブリダイゼーション条件下で、1) 配列番号1~32のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸とハイブリッドを形成する核酸、

40

50

g) 配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸、および

h) アミノ酸配列配列番号 33 または 34 を含むポリペプチドをコードする核酸から選択される核酸を含む。

#### 【0161】

第1の実施形態によれば、所望の宿主細胞の形質転換または形質移入後に、本発明による組換えベクターを用いて、ベクターに挿入された核酸を増幅する。

第2の実施形態によれば、本発明による組換えベクターは、本発明による核酸に加え、調節シグナルすなわち核酸およびそのコードされた mRNA の転写および/または翻訳を誘導または制御するヌクレオチド配列を含む発現ベクターに相当する。

10

#### 【0162】

好ましい一実施形態によれば、本発明による組換えベクターは、特に、以下の成分、すなわち

(1) プロモーターおよび/またはエンハンサー配列など、挿入する核酸の発現を調整するエレメントまたはシグナル、

(2) このようなベクターに挿入する本発明による核酸の中に含まれ、(1)に記載の調節エレメントまたはシグナルと合致する位置にあるヌクレオチド・コード領域、および

(3) (2)に記載した核酸のヌクレオチド・コード領域の転写を開始および停止するための適切な核酸を含む。

#### 【0163】

20

また、本発明による組換えベクターは、それらを増幅または発現しようとする宿主細胞の1個または複数の複製開始点、マーカーまたは選択可能なマーカーを含むことができる。例として示すと、細菌プロモーターを、*lacI* または *lacZ* プロモーター、T3 または T7 バクテリオファージ RNA ポリメラーゼ・プロモーター、ラムダ・ファージ PR または PL プロモーターとすることができる。

真核細胞のプロモーターは、単純ヘルペス・ウイルス (HSV) のウイルス・チミジン・キナーゼ・プロモーター、またはマウス・メタロチオネイン-L プロモーターを含む。

#### 【0164】

一般に、適切なプロモーターを選択する場合、当業者は、好ましくは、先に引用した Sambrook 等の本 (1989、Molecular cloning: a laboratory manual, 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York) または Fuller 等 (1996、Current Protocols In Molecular Biology, Ausubel 等 (編) 中の Immunology) によって記述されている技術を参照することができる。

30

#### 【0165】

ABC C12 遺伝子のいずれか1つのゲノム配列を発現させようとするときには、好ましくは、大きな挿入配列を含むことができるベクターを使用する。特定の一実施形態では、好ましくは、Sternberg (1992、Trends Genet., 8: 1~16; 1994、Mamm. Genome, 5: 397~404) によって記述されたベクター p158 またはベクター p158/neo8 などの P1 バクテリオファージ・ベクターなどのバクテリオファージ・ベクターを使用する。

#### 【0166】

40

本発明による好ましい細菌ベクターは、例えば、ベクター pBR322 (ATCC 37017)、あるいは pAA223-3 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)、pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, UNITED STATES) などのベクターである。

ベクター pQE70、pQE60、pQE9 (Qiagen)、pSiX174、pBlue script SA、pNH8A、pNH16A、pNH18A、pNH46A、pWLN EO、pSV2CAT、pOG44、pXTI、pSG (Stratagene) などの市販のベクターでもよい。

これらは、*Spodoptera frugiperda* 由来の Sf9 系統 (受託番号 CRL 1711) の細胞を形質移入するために使用されるベクター pVL1392/1393 (Pharminogen) などのバキュロウイルス型のベクターでもよい。

50

これらは、タイプ 2 または 5 のヒト・アデノウイルスなどのアデノウイルス・ベクターでもよい。

本発明による組換えベクターは、レトロウイルス・ベクターまたはアデノ随伴ベクター (AAV) でもよい。このようなアデノ随伴ベクターは、例えば、Flotte等 (1992、Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 7: 349~356)、Samulski等 (1989、J. Virol., 63: 3822~3828)、またはMcLaughlin BA等 (1996、Am. J. Hum. Genet., 59: 561~569) によって記述されている。

#### 【0167】

本発明によるポリヌクレオチドの発現を可能にするには、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入しなければならない。本発明によるポリヌクレオチドの宿主細胞への導入は、プライマー培養 (primer culture) または細胞系の形で細胞を形質転換または形質移入するための当業者に周知の技術によって、インビトロで実施することができる。ABC12欠損に関連する疾患を予防し治療するために、本発明によるポリヌクレオチドをインビボまたはエクスピボで導入することもできる。

10

#### 【0168】

本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを宿主細胞に導入するために、当業者は、好ましくは、リン酸カルシウム沈殿法 (Graham等、1973、Virology、52: 456~457; Chen等、1987、Mol. Cell. Biol., 7: 2745~2752)、DEAEデキストラン (Gopal、1985、Mol. Cell. Biol., 5: 1188~1190)、エレクトロポレーション (Tur-Kaspa、1896、Mol. Cell. Biol., 6: 716~718; Potter等、1984、Proc Natl Acad Sci USA., 81(22): 7161~5)、ダイレクト・マイクロインジェクション (direct microinjection) (Harland等、1985、J. Cell. Biol., 101: 1094~1095)、DNAを入れたリポソーム (Nicolau等、1982、Methods Enzymol., 149: 157~76; Fraley等、1979、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、76: 3348~3352) など様々な技術を参照することができる。

20

#### 【0169】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入した後、その細胞のゲノムにそれを安定に組み込むことができる。相同組換えによってゲノムの正確な部位でこの組込みを行うことができ、あるいは無作為に組込みを行うこともできる。いくつかの実施形態では、細胞周期に無関係にまたは同期してポリヌクレオチドを保持し複製することを可能にする配列を含むエピソード断片の形で、ポリヌクレオチドを宿主細胞中で安定に維持することができる。

30

#### 【0170】

特定の一実施形態によれば、本発明によるポリヌクレオチドを宿主細胞、特に哺乳動物から得られる宿主細胞にインビボで導入する方法は、適切な調節配列の制御下に置かれた本発明による薬剤として適合するベクターおよび「裸の」ポリヌクレオチドを含む製剤を、選択した組織、例えば心筋組織のレベルで局所注射することによって導入するステップを含み、この「裸の」ポリヌクレオチドはこの組織の筋細胞によって吸収される。

#### 【0171】

インビトロおよびインビボで使用する「裸の」ポリヌクレオチドを含む組成物は、例えば国際公開第95/11307号 (Institut Pasteur、Inserm、University of Ottawa)、Tacson等の論文 (1996、Nature Medicine、2(8): 888~892)、およびHuygen等の論文 (1996、Nature Medicine、2(8): 893~898) に記載されている。

40

#### 【0172】

本発明の特定の一実施形態によれば、ABC12タンパク質をインビボで産生する組成物が提供される。この組成物は、適切な調節配列の制御下に置かれたABC12ポリペプチドをコードする、生理的に許容されるベクター中の溶液状態のポリヌクレオチドを含む。

#### 【0173】

選択した宿主生物に注射するベクターの量は、注射部位に応じて変わる。一指針として、動物、好ましくはABC12欠損に関連する疾患を発症しそうな患者の体内に、ABC12タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードするポリヌクレオチド約0.1

50

～約100 μgを注射することができる。

したがって、本発明は、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする核酸と、1つまたは複数の生理的に適合する賦形剤との組合せを含む、A B C C 1 2 欠損に罹った患者や対象の予防または治療のための薬剤組成物にも関する。

このような組成物は、適切な調節エレメントまたはシグナルの制御下に置かれた配列番号1または2のヌクレオチド配列を含む核酸を含むことが好ましい。

#### 【0174】

本発明の別の主題は、本発明による組換えベクターと、1つまたは複数の生理的に適合する賦形剤との組合せを含む、A B C C 1 2 欠損に罹った患者や対象の予防または治療のための薬剤組成物である。

本発明は、発作性運動誘発性舞踏アテトーゼに罹った対象の予防用または治療用薬剤を製造するための、A B C C 1 2 タンパク質をコードする本発明による核酸の使用に関する。

本発明は、発作性運動誘発性舞踏アテトーゼの予防用薬剤を製造するための、A B C C 1 2 タンパク質のいずれか1つをコードする核酸を含む本発明による組換えベクターの使用にも関する。

さらに、本発明は、メトトレキセート(MTX)などの陰イオン性薬物、GSH、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送機能障害に関連する病理の治療用または/および予防用の薬剤を製造するための、A B C C 1 2 タンパク質のいずれか1つをコードする核酸を含んだ本発明による組換えベクターの使用にも関する。

#### 【0175】

本発明は、メトトレキセート(MTX)などの陰イオン性薬物、GSH、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送障害に関連する病理の治療用および予防用の薬剤を製造するための、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする核酸を含む本発明による組換えベクターの使用にも関する。

したがって、本発明の別の主題は、A B C C 1 2 タンパク質またはポリペプチドアイソフォームのいずれか1つをコードする本発明による核酸を含む組換えベクターである。

#### 【0176】

本発明は、欠損または発作性運動誘発性舞踏アテトーゼと関連する疾患または病態の治療用および/または予防用薬剤組成物を製造するためのこのような組換えベクターの使用にも関する。

本発明は、少なくとも1つの生物活性A B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォームを長期にわたり効果的にインビボで発現させるための、本発明によるこのような組換えベクターを用いてエクスピボで遺伝子改変し体内に移植する細胞の使用、または体内に移植する組換えベクター産生細胞の使用にも関する。

体細胞遺伝子治療法に有用なベクターおよびこのようなベクターを含む組成物。

#### 【0177】

本発明は、A B C C 1 2 欠損に関連した病理の治療のための新しい治療手法にも関する。

本発明は、遺伝子治療、発作性運動誘発性舞踏アテトーゼに関わるA B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする遺伝子の移送およびインビボでの発現によりA B C C 1 2 欠損に関連した病理を治療できる可能性を実証することによって、従来技術の欠点に対する有利な解決策を提供するものである。したがって、本発明は、発作性運動誘発性舞踏アテトーゼなど16q12遺伝子座に位置する病理の特異的かつ効果的な治療を可能にする簡単な手段を提供する。

#### 【0178】

遺伝子治療は、病気に冒された細胞または器官に遺伝情報を導入することによって、欠損または異常(突然変異、異常発現など)を修正し、治療の対象となるタンパク質の発現を誘発するものである。この遺伝情報を、器官から取り出した細胞中にエクスピボで導入し、次いで修正した細胞を体内に戻すこともできるし、あるいはインビボで適切な組織に直接導入することもできる。後者の場合、様々な技術、なかでもDNAとDEAE-デキストランの複合物(Pagano等、J. Virol、1(1967)891)、DNAと核タンパク質との複合

10

20

30

40

50

物 (Kaneda等、1989、Science 243:375)、DNAと脂質との複合物 (Felgner等、1987、PNAS 84:7413)、リボソームの使用 (Fraley等、1980、J. Biol. Chem., 255:10431) などを含めた様々な形質移入技術がある。さらに最近では、遺伝子の移送用ベクターとしてウイルスを使用することが、これら物理的形質移入技術の有望な代案として行われている。これに関連して、様々なウイルスが、特定の細胞集団に感染するそれらの能力について評価されてきた。特に、レトロウイルス (RSV、HMS、MMSなど)、HSVウイルス、アデノ随伴ウイルス、およびアデノウイルス。

#### 【0179】

したがって、本発明は、ABCC12をコードする遺伝子を移送しインビボで発現させる、ABCC12欠損に関連する病理を治療するための新しい治療手法にも関する。特に好ましい様式で、本出願人は、今回、ABCC12タンパク質のいずれか1つをコードする核酸を含む組換えベクターを構築し、これらの組換えベクターをインビボで投与することが可能であり、また、この投与によって、細胞病理作用 (cytopathological effect) を起こすことなく、少なくとも1つの生物活性ABCC12タンパク質をインビボで安定かつ効果的に発現させることが可能になることを発見した。

10

#### 【0180】

アデノウイルスは、ABCC12遺伝子のいずれか1つを移送し発現させる特に効率的なベクターの1つである。組換えアデノウイルスをベクターとして使用すると、所望の治療効果をもたらすのに十分なレベルでこの遺伝子を発現させることが可能になる。この遺伝子の安定な発現を可能にすることができるレトロウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV) などの他のウイルス・ベクターも、本特許請求の範囲に記載されている。

20

したがって、本発明は、ABCC12欠損を治療し予防するための新しい手法を提供しようとするものである。

したがって、本発明の別の主題は、ABCC12タンパク質またはポリペプチドをコードする本発明による核酸を含む組換え欠損ウイルスである。

#### 【0181】

本発明は、ABCC12欠損の治療および/または予防に有用であり得る薬剤組成物を調製するためのこのような組換え欠損ウイルスの使用にも関する。

本発明は、生物活性ABCC12ポリペプチドを長期にわたり効果的にインビボで発現させるための、本発明によるこのような組換え欠損ウイルスを用いてエクスピボで遺伝子改変し体内に移植する細胞の使用、または体内に移植する組換え欠損ウイルス産生細胞の使用にも関する。

30

#### 【0182】

本発明は、制御された発現を誘導でき、かつ通常ABCC12の発現に関与しない器官においてこのタンパク質の有害な効果を及ぼすことがないので特に有益である。特に、本発明のベクターを産生する細胞、または本発明のベクターにエクスピボで感染した細胞の移植によって、かなりの量のABCC12タンパク質が放出される。

#### 【0183】

本発明で産生されるABCCタンパク質輸送体の活性は、ヒトABCC12型のもでも動物ABCC12型のもでもよい。本発明で使用する核酸配列 (nucleic sequence) は、cDNA、ゲノムDNA (gDNA)、RNA (レトロウイルスの場合)、または例えば、1つまたは複数のイントロン (gDNA) を挿入したcDNAからなるハイブリッド構築体でもよい。これは、合成または半合成配列を含むこともできる。特に有利には、cDNAまたはgDNAを利用する。特に、gDNAを使用するとヒト細胞での発現性が良くなる。これらを本発明によるウイルス・ベクターに取り込ませるには、好ましくは、例えば部位特異的な突然変異生成、特に適切な制限部位を挿入する突然変異生成によってこれらの配列を修飾する。従来技術に記載されている配列は、本発明による使用向けにはまったく構成されておらず、実質的な発現を得るためには、前もって手直しが必要になることがある。本発明では、ヒトABCC12タンパク質をコードする核配列を使用することが好ましい。また、ABCC12タンパク質の誘導体をコードする構築体を使用するこ

40

50

ともできる。A B C C 1 2 タンパク質のいずれか 1 つの誘導体は、例えば、本来の配列に対する変異、欠失、および / または付加によって得られる任意の配列、および親油性物質を輸送する活性を有する産物をコードする任意の配列を含む。これらの改変を、当業者に既知の技術を用いて行うことができる（以下の一般的な分子生物学技術を参照されたい）。次いで、このようにして得られた誘導体の生物活性を、特に実施例に示すように、細胞からの物質の流出量を測定して容易に決定することができる。本発明ではこれらの誘導体を、プローブとしてそれらの本来の配列または断片を用いたハイブリダイゼーションによって、核酸ライブラリーから得ることもできる。

#### 【0184】

これらの誘導体は、特に、それらの結合部位に対して高い親和性を有する分子、プロテアーゼに対してより大きな耐性を示す分子、より高い治療効果またはより少ない副作用または、場合によっては、新しい生物学的諸特性を有する分子である。これらの誘導体は、インビボでの発現性を向上させた改変 D N A 配列も含む。

10

#### 【0185】

第 1 の実施形態では、本発明は、A B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォームをコードする c D N A を含む組換え欠損ウイルスに関する。本発明の別の好ましい実施形態では、組換え欠損ウイルスは、A B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォームをコードするゲノム D N A ( g D N A ) を含む。この A B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォームはそれぞれ配列番号 3 3 または 3 4 のアミノ酸配列を含むことが好ましい。

#### 【0186】

本発明のベクターを、様々なタイプのウイルスから調製することができる。アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス ( A A V )、ヘルペス・ウイルス ( H S V )、またはレトロウイルス由来のベクターを使用することが好ましい。移植しようとする細胞の直接投与、またはエクスピボでの改変にはアデノウイルス、また、産生細胞の移植にはレトロウイルスを使用することが好ましい。

20

#### 【0187】

本発明によるウイルスには欠損があり、すなわち標的細胞中で自己複製できない。したがって、一般に、本発明で使用する欠損ウイルスのゲノムは、感染細胞中でウイルスが複製するのに必要な最低限の配列を欠いている。これらの領域を、（完全にまたは部分的に）除去するか、機能しないようにするか、他の配列、特に A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか 1 つをコードする核配列で置換することができる。それでも、欠損ウイルスは、ウイルス粒子のキャプシド形成に必要なゲノム配列を保持していることが好ましい。

30

#### 【0188】

より具体的にアデノウイルスに関しては、構造および諸特性が幾分異なる様々な血清型の特徴が明らかとなっている。これらの血清型の中でも、タイプ 2 または 5 のヒト・アデノウイルス ( A d 2 または A d 5 )、あるいは動物起源のアデノウイルス ( 国際公開第 9 4 / 2 6 9 1 4 号参照 ) が、本発明では好ましく使用される。本発明で使用する動物起源のアデノウイルスには、イヌ、ウシ、ネズミ ( 例 : Mav1、Beard 等、Virology 75 ( 1990 ) 81 )、ヒツジ、ブタ、トリ、またはサル ( 例 : S A V ) 起源のアデノウイルスなどがある。この動物起源のアデノウイルスは、好ましくはイヌ・アデノウイルス、より好ましくは C A V 2 アデノウイルス ( 例えば、Manhattan または A 2 6 / 6 1 株 ( A T C C V R - 8 0 0 ) ) である。好ましくは、ヒトまたはイヌまたは混合起源のアデノウイルスを本発明では使用する。本発明の欠陥アデノウイルスは、I T R、キャプシド形成を可能にする配列、および A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームをコードする配列を含むことが好ましい。本発明のアデノウイルスのゲノムでは、少なくとも E 1 領域を機能しなくすることが好ましい。本発明のアデノウイルスのゲノムにおいて、E 1 遺伝子と、E 2、E 4、L 1 ~ L 5 遺伝子の少なくとも 1 つを機能しなくすることがさらに好ましい。当業者に既知の任意の技術によって、特に、対象とする遺伝子における完全な抑圧、置換、部分的欠失、あるいは 1 つまたは複数の塩基の付加によって、対象とするウイルス遺伝子を機

40

50

能しなくすることができる。このような改変は、インビトロ（単離されたDNA上で）またはイン・サイチュで、例えば、遺伝子工学技術、変異誘発物質を用いた処置によって行うことができる。他の領域、特にE3（国際公開第95/02697号）、E2（同第94/28938号）、E4（同第94/28152号、同第94/12649号、同第95/02697号）、およびL5（同第95/02697号）領域も改変することができる。好ましい一実施形態によれば、本発明によるアデノウイルスは、E1およびE4領域に欠失があり、不活性化されたE1領域に、ABCC12をコードする配列が挿入されている。別の好ましい一実施形態によれば、E1領域に欠失があり、そこにE4領域およびABCC12タンパク質アイソフォームをコードする配列（フランス国特許出願第9413355号）が挿入されている。

10

#### 【0189】

本発明による組換え欠損アデノウイルスは、当業者に既知の任意の技術（Levrero等、1991 Gene 101；欧州特許第185 573号；およびGraham、1984、EMBO J., 3:2917）によって調製することができる。特に、これらの組換え欠損アデノウイルスは、アデノウイルスととりわけABCC12タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする核酸を有するプラスミドとの相同組換えによって調製することができる。この相同組換えを、このアデノウイルスとプラスミドを適切な細胞系に同時形質移入した後に行う。これに使用する細胞系は、好ましくは（i）これらのエレメントによって形質転換可能でなければならず、（ii）欠損アデノウイルス・ゲノム部分を、好ましくは組換えの危険性を避けるために組み込まれた形で補完できる配列を含まなければならない。系の例としては、特にそのゲノム中に組み込まれたAd5アデノウイルスのゲノムの左部分（12%）を含むヒト胚性腎系293（Graham等、1977、J. Gen. Virol., 36:59）、または特に国際公開第94/26914号および同第95/02697号に記載されているE1およびE4機能を補完できる系などがある。

20

#### 【0190】

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、比較的小さいDNAウイルスであり、感染した細胞のゲノム中に安定かつ部位特異的に組み込まれる。このウイルスは、細胞の増殖、形態、または分化にいかなる影響も及ぼすことなく、多様な細胞に感染することができる。また、このウイルスはヒトの病理に関与しないと考えられる。AAVのゲノムは、クローン化され、その配列が決定され、その特徴が明らかにされている。このゲノムは約4700塩基を含み、その両端にこのウイルスの複製開始点として働く約145塩基の逆方向反復領域（ITR）を含む。このゲノムの残りの部分は、キャプシド形成機能を有する2つの基本領域に分割される。このゲノムの左部分はrep遺伝子を含み、ウイルス複製およびウイルス遺伝子の発現に関与している。このゲノムの右部分は、ウイルス・キャプシド・タンパク質をコードするcap遺伝子を含む。

30

#### 【0191】

遺伝子をインビトロおよびインビボで移送するのにAAV由来のベクターを使用することは、文献（特に国際公開第91/18088号；国際公開第93/09239号；米国特許第4,797,368号、同第5,139,941号、欧州特許第488 528号を参照されたい）に記載されている。これらの出願特許は、rep遺伝子および/またはcap遺伝子が欠失し対象とする遺伝子で置換されたAAV由来の様々な構築体、およびインビトロ（培養細胞上で）またはインビボ（直接生体内に）で対象とする前記遺伝子を移送するためのこの構築体の使用について記載している。しかし、これらの文献のうち、ABCC12タンパク質の1つのインビボまたはエキスピボでの移送および発現に組換えAAVを使用すること、あるいはこのような移送の利点について記載または示唆しているものはない。本発明による組換え欠損AAVは、ヒト・ヘルパー・ウイルス（例えば、アデノウイルス）に感染した細胞系に、2つのAAV逆方向反復領域（ITR）が両端についたABCC12タンパク質をコードする配列を含むプラスミドとAAVキャプシド形成遺伝子（rep遺伝子およびcap遺伝子）を有するプラスミドとを同時形質移入して調製することができる。次いで、生成した組換えAAVを常法により精製する。

40

50

## 【0192】

ヘルペス・ウイルスおよびレトロウイルスについては、組換えベクターの構築が広く文献に記載されている。特に、Breakfield等(1991、New Biologist、3:203)；欧州特許第453242号、同第178220号、Bernstein他(1985)；McCormick、(1985、BioTechnology、3:689)などを参照されたい。

## 【0193】

特に、レトロウイルスは、分裂中の細胞に感染する組込みウイルス(integrating viruses)である。レトロウイルスのゲノムは、基本的に、2つの長末端反復(LTR)、キャプシド形成配列、および3つのコード領域(gag、polおよびenv)を含む。レトロウイルス由来の組換えベクターでは、gag、polおよびenv各遺伝子は、一般に、完全にまたは部分的に欠失しており、対象とする異種核酸配列で置換されている。これらのベクターは、特にMoMuLV(「ネズミ・モロニー白血病ウイルス」；MoMLVとも呼ばれる)、MSV(「ネズミ・モロニー肉腫ウイルス」)、HaSV(「ハーベイ肉腫ウイルス」)；SNV(「ひ臓壊死ウイルス」)；RSV(「ラウス肉腫ウイルス」)、またはフレンド・ウイルスなどの様々なタイプのレトロウイルスから生成させることができる。

10

## 【0194】

本発明によるABCC12タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする配列を含む組換えレトロウイルスを構築するには、特にLTR、キャプシド形成配列、および前記コード配列を含むプラスミドを一般に構築し、次いでそれを使用して、プラスミドに欠けているレトロウイルス機能を途中で付与できるいわゆるキャプシド形成細胞系(encapsulation cell line)を形質移入する。したがって、このキャプシド形成系は、一般にgag、pol、およびenv各遺伝子を発現することができる。このようなキャプシド形成系、特にPA317系(米国特許第4,861,719号)、PsiCRIP系(国際公開第90/02806号)、およびGP+envAm-12系(国際公開第89/07150号)は従来技術に記載されている。また、組換えレトロウイルスは、転写活性を抑制するためにLTRに改変を含み、gag遺伝子の一部を含む拡張キャプシド形成配列を含むことができる(Bender等、1987、J. Virol., 61:1639)。次いで、生成した組換えレトロウイルスを常法により精製する。

20

## 【0195】

本発明を実施するには、組換え欠損アデノウイルスを使用することが好ましい。アデノウイルスの特に有益な諸特性は、親油性物質輸送活性を有するタンパク質をインビボで発現するのに好ましい。本発明によるアデノウイルス・ベクターは、精製した懸濁液をインビボで直接投与するのに、あるいは細胞、特に移植の点で自己細胞をエクスピボで形質転換するのに特に好ましい。また、本発明によるアデノウイルス・ベクターは、これに加えて、特に感染効率が極めて高く、少量のウイルス懸濁液を用いて感染させることができるなど多くの利点を持つ。

30

## 【0196】

本発明の別の特に好ましい実施形態によれば、ABCC12タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする配列を含むレトロウイルス・ベクターを生成する系を、インビボでの移植に使用する。この目的に使用できる系は、本発明によるABCC12タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする核配列を含むレトロウイルスを生成できるように改変された特にPA317細胞(米国特許第4,861,719号)、PsiCRIP細胞(国際公開第90/02806号)およびGP+envAm-12細胞(米国特許第5,278,056号)である。例えば、血液細胞系の前駆体である全能性幹細胞を対象から収集し単離することができる。次いで、これらの細胞を、培養時、ウイルス・プロモーター、非ウイルス・プロモーター、またはマクロファージに特異的な非ウイルス・プロモーターの制御下またはそれ自身のプロモーターの制御下にあるABCC12タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする配列を含むレトロウイルス・ベクターで形質移入することができる。次いで、これらの細胞を対象中に戻す。これらの細胞の分化によ

40

50



り、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームの 1 つを発現する血球が生成する。

【0197】

本発明のベクターにおいては、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか 1 つをコードする配列を、感染細胞中でその発現を可能にするシグナルの制御下に置くことが好ましい。このシグナルは相同の発現シグナルでも異種の発現シグナル、すなわち A B C C 1 2 タンパク質の発現を自然にもたらすシグナルとは異なるシグナルでもよい。このシグナルは、特に他のタンパク質の発現をもたらす配列、または合成配列でもよい。特に、このシグナルは、特異的な形式などで、あるいは誘導的な形式などで遺伝子の転写を刺激しまたは抑制する、真核生物遺伝子配列またはウイルス遺伝子配列または誘導配列 (derived sequences) でもよい。例として、このシグナルは、感染しようとする細胞のゲノム由来のプロモーター配列、ウイルスのゲノム由来のプロモーター配列、および特にアデノウイルスの E 1 A 遺伝子または主要後期プロモーター (major late promoter) (MLP) 遺伝子のプロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、RSV-LTR などでもよい。真核生物のプロモーターは、ユビキタス・プロモーター (HPRT、ピメンチン、 $\alpha$ -アクチン、チューブリンなど)、中間径フィラメント (デスミン、ニューロフィラメント、ケラチン、GFAP など) のプロモーター、(MDR、CFTR、または第 VIII 因子型などの) 治療用遺伝子のプロモーター、組織特異的プロモーター (ピルビン酸キナーゼ、ピリン、腸の脂肪酸結合タンパク質のプロモーター、平滑筋細胞の  $\alpha$ -アクチンのプロモーター、肝臓に特異的なプロモーター; Apo AI、Apo AII、ヒト・アルブミンなど)、または (ステロイド・ホルモン受容体、レチノイン酸受容体など) 刺激に対応するプロモーターなどでもよい。また、これらの発現配列は、エンハンサーまたは調節配列などを付加して改変することができる。また、挿入遺伝子が発現配列を含まないときには、この挿入遺伝子を欠損ウイルスのゲノムのこのような配列の下流に挿入することができる。

10

20

【0198】

特定の一実施形態では、本発明は、RSV-LTR または CMV 初期プロモーターから選択されるプロモーターの制御下にある A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか 1 つをコードする核酸を含む組換え欠損ウイルスに関する。

上述したように、本発明は、親油性物質の輸送に関連した病理の治療および / または予防用薬剤組成物を調製するための上記ウイルスの使用にも関する。

30

【0199】

本発明は、上記 1 つまたは複数の組換え欠損ウイルスを含む薬剤組成物にも関する。これらの薬剤組成物を、局所、経口、非経口、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下、眼内、または経皮経路などによる投与用に処方することができる。本発明の薬剤組成物は、注射剤、特に例えば患者の門脈中などへの静脈内注射用の、薬剤として許容されるビヒクルまたは生理的に適合する賦形剤を含むことが好ましい。これらのビヒクルまたは賦形剤は、特に滅菌等張液または乾燥した、特に凍結乾燥した組成物に類するものであり、滅菌水か生理食塩水かによるが、これらを添加すると注射溶液の調製が可能になる。患者の門脈中に直接注射することが好ましい。というのは、これにより肝臓での感染を標的とし、したがってこの器官に治療効果を集中することができるからである。

40

【0200】

注射に使用する組換え欠損ウイルスの用量は、様々なパラメータ、特にウイルス・ベクター、使用する投与方法、関連する病理、または所望の治療期間に応じて調節することができる。一般には、本発明による組換えアデノウイルスを、 $10^4 \sim 10^{14}$  pfu/ml、好ましくは  $10^6 \sim 10^{10}$  pfu/ml の用量で処方し投与する。「pfu」(プラーク形成単位) という用語は、ウイルス溶液の感染力に対応するものであり、適切な培養細胞を感染させ、感染細胞の溶解から生じるプラークの数を通常 48 時間後に測定して決定する。ウイルス溶液の pfu 滴定量を測定する技術は、文献に詳細に記載されている。

レトロウイルスに関して、本発明による組成物は、移植の目的で産生細胞をじかに含む。

【0201】

50

この点で、本発明の別の主題は、本発明による１つまたは複数の組換え欠損ウイルスに感染した任意の哺乳動物細胞に関する。より具体的には、本発明は、このようなウイルスに感染した任意のヒト細胞集団に関する。これらは、特に血液に由来する細胞（全能性幹細胞または前駆体）、線維芽細胞、筋芽細胞、肝細胞、ケラチノサイト、平滑筋および内皮細胞、グリア細胞などとすることができる。

#### 【0202】

本発明による細胞は、初代培養に由来するものでもよい。これらの細胞は、当業者に既知の任意の技術で収集し、次いで、これらの増殖を可能とする条件下で培養することができる。より具体的に線維芽細胞の場合は、生検、例えばHam（1980）により記述された技術によってこれらの細胞を容易に得ることができる。これらの細胞は、そのまま使用してウイルスに感染させることができ、あるいは後で使用するために例えば凍結させて貯蔵して自己のライブラリーを樹立することもできる。本発明による細胞は、例えばすでに樹立されているライブラリーから得て、二次培養することができる（例えば、欧州特許第228458号、同第289034号、同第400047号、同第456640号を参照されたい）。

10

#### 【0203】

次いで、生物活性ABC12タンパク質を産生する能力を培養中の細胞に付与するために、これらの細胞を本発明による組換えウイルスで感染させる。感染は、当業者に既知の技術に従ってインピトロで行われる。特に、使用する細胞のタイプおよび細胞当たりの所望のウイルス・コピー数に応じて、当業者は、感染多重度および、場合によっては、生成する感染サイクル数を調節することができる。これらの細胞をインピボで投与しようとするときには、これらのステップを適切な無菌条件下で実施しなければならないことは容易に理解されよう。これらの細胞を感染するのに使用する組換えウイルスの用量は、当業者が所望の目的に従って調節することができる。上述のインピボでの投与条件は、インピトロでの感染にも適用することができる。レトロウイルスでの感染の場合、本発明による組換えレトロウイルス産生細胞に感染する細胞を同時培養することもできる。これにより、レトロウイルスの精製が不要になる。

20

#### 【0204】

本発明の別の主題は、本発明による１つまたは複数の組換え欠損ウイルスまたは組換えウイルスを産生する細胞に感染した哺乳動物細胞および細胞外マトリックスを含む移植片に関する。本発明による移植片は、 $10^5 \sim 10^{10}$ 細胞を含むことが好ましい。本発明による移植片は、 $10^6 \sim 10^8$ 細胞を含むことがより好ましい。より具体的には、本発明の移植片中の細胞外マトリックスは、ゲル化化合物および、場合によっては、細胞の固定を可能とする担体を含む。

30

#### 【0205】

本発明による移植片の調製には、様々なタイプのゲル化剤を使用することができる。ゲル化剤は、ゲル構造を有するマトリックス中に細胞を封入し、適切であれば担体上にこの細胞を容易に固定できるようにするのに使用される。したがって、特にコラーゲン、ゼラチン、グリコサミノグリカン、フィブロネクチン、レクチンなど様々な細胞接着剤をゲル化剤として使用することができる。本発明ではコラーゲンを使用することが好ましい。これは、ヒト、ウシ、またはネズミ由来のコラーゲンとすることができる。タイプIコラーゲンを使用することがより好ましい。

40

#### 【0206】

上述のように、本発明による組成物は、好ましくは、細胞の固定を可能とする担体を含む。固定という用語は、細胞を担体に接着および／または付着させる任意の形態の生物学的および／または化学的および／または物理的相互作用を指す。また、細胞は使用する担体を覆っても、この担体内部に侵入しても、あるいはその両方でもよい。本発明では、固体で無毒および／または生体適合性の担体を使用することが好ましい。特に、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）繊維または生物起源の担体を使用することができる。

したがって、本発明は、親油性物質の輸送に関連した病理を治療または予防するための極

50

めて有効な手段を提供するものである。

また、この治療法は、ヒトおよびヒツジ、ウシ、家畜（イヌ、ネコなど）、ウマ、魚などあらゆる動物に適用することができる。

【0207】

組換え宿主細胞

本発明は、本発明の核酸、より具体的には、配列番号1～32から選択されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換え宿主細胞に関する。本発明は、本発明の核酸、およびより具体的には、配列番号1～32で示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換え宿主細胞にも関する。

10

別の一態様によれば、本発明は、本発明による組換えベクターを含む組換え宿主細胞にも関する。したがって、本発明は、本発明の核酸のいずれか、より具体的には、配列番号1～32から選択されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換えベクターを含む組換え宿主細胞にも関する。

本発明は、配列番号1～32のいずれか1つで示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換えベクターを含む組換え宿主細胞にも関する。

【0208】

本発明による好ましい宿主細胞は、例えば以下の

a) 原核生物の宿主細胞：大腸菌 (*Escherichia coli*) 株 (DH5- 株)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 株、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 株、あるいはシュードモナス属 (*Pseudomonas*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*)、ブドウ球菌属 (*Staphylococcus*) などの菌株；

20

b) 真核生物の宿主細胞：HeLa細胞 (ATCC番号CCL2)、Cv1細胞 (ATCC番号CCL70)、COS細胞 (ATCC番号CRL1650)、Sf-9細胞 (ATCC番号CRL1711)、CHO細胞 (ATCC番号CCL-61)、3T3細胞 (ATCC番号CRL-6361)、またはヒト赤白血病K562 (ATCC No. CCL-243) である。

【0209】

ABCC12ポリペプチドアイソフォームを産生するための方法

30

本発明は、配列番号33または34のアミノ酸配列を含むポリペプチドを産生するための方法にも関し、この方法は以下のステップ、すなわち、

- a) 前記ポリペプチドをコードする核酸を適切なベクターに挿入すること、
- b) 予め形質転換した宿主細胞を適切な培養培地中で培養すること、またはステップa)の組換えベクターを宿主細胞に形質移入すること、
- c) この馴化した培養培地を回収すること、または例えば超音波処理や浸透圧衝撃によってこの宿主細胞を溶解すること、
- d) ステップc)で得られた前記培養培地または細胞溶解物から前記ポリペプチドを分離し生成すること、および
- e) 適切であれば、産生された組換えポリペプチドの特徴を明らかにすることを含む。

40

【0210】

本発明によるポリペプチドは、このポリペプチドに対する、あるいはその断片またはその変異体に対する抗体をその上に予め固定した免疫親和性クロマトグラフィー・カラムに対する結合によって特定することができる。

別の一態様によれば、本発明による組換えポリペプチドを、当業者に既知の方法および、例えば、F. Ausubel等 (1989、Current Protocols in Molecular Biology、Green Publishing Associates and Wiley Interscience、N.Y.) に記載されている方法によって、適切な一連のクロマトグラフィー・カラムを通して精製することができる。

【0211】

本発明によるポリペプチドは、従来の化学合成技術により、均一溶液中または固相中で調

50

製することもできる。説明のために示すと、本発明によるポリペプチドは、Houben Weyl (1974、*Methoden der Organischen Chemie*、E. Wünsch編、15 - I : 15 - II) によって記述された均一溶液中での技術、またはMerrifield (1965、*Nature*、207 (996) : 522 ~ 523 ; 1965、*Science*、150 (693) : 178 ~ 185) によって記述された固相合成技術によって調製することができる。

#### 【0212】

配列番号33または34から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドに「相同」なポリペプチドも本発明の一部を成す。このような相同ポリペプチドは、配列番号33または34の等価なアミノ酸で置換された1個または複数のアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む。

10

#### 【0213】

本発明による「等価なアミノ酸」は、例えばD型残基によるL型残基の置換、または当業者に周知の技術によるピログルタミン酸でのグルタミン酸(E)の置換を意味すると理解される。説明のために示すと、少なくとも1つのD型残基を含むペプチドの合成がKoch (1977) によって記述されている。別の態様によれば、同一クラスに属する2つのアミノ酸、すなわち非荷電極性と非極性、塩基性と酸性アミノ酸の2つも等価なアミノ酸とみなせる。

#### 【0214】

レトロ-インバース結合(NHCO)、カルバ(carba)結合(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)、またはケトメチレン結合(CO-CH<sub>2</sub>)など少なくとも1つの非ペプチド結合を含むポリペ

20

#### 【0215】

少なくとも1個のアミノ酸の1つまたは複数の付加、欠失、置換を含む本発明によるポリペプチドは、その非改変ポリペプチドに対する抗体によって認識される能力を保持していることが好ましい。

#### 【0216】

抗体

本発明によるABCC12ポリペプチドアイソフォーム、特に1)配列番号33または34のいずれか1つのアミノ酸配列を含むポリペプチド、2)配列番号33または34のいずれか1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または3)配列番号33または34から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに「相同」なポリペプチドを、抗体、特に患者の正常型または改変型ABCC12ポリペプチドの産生を検出するための抗体の調製に使用することができる。

30

配列番号33または34から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと「相同」なポリペプチドに対する抗体も本発明の一部を成す。このような抗体は、配列番号33または34の等価なアミノ酸で置換された1個または複数のアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む相同ポリペプチドを対象とする。

#### 【0217】

本発明での「抗体」は、特にポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体または断片(例えば、F(ab)'<sub>2</sub>断片およびFab断片)または本発明の標的ポリペプチドまたは標

40

的ポリペプチド断片を認識する一次抗体のドメインを含むあらゆるポリペプチドを意味すると理解される。

モノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein (1975、*Nature*、256 : 495 ~ 497) によって記述された技術に従ってハイブリドーマから調製することができる。

#### 【0218】

本発明によれば、組換え産生または化学合成によって産生したポリペプチド、その断片またはその他の誘導体またはその類似体は、融合タンパク質を含めて、免疫原として使用して本発明によるポリペプチドを認識する抗体を産生することができる。このような抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、一本鎖、Fab断片、およびFab発現ライブラリーなどがあるが、これらだけに限定されない。本発明の抗ABCC5抗体、

50

抗 A B C C 4 抗体、または抗 A B C C 1 抗体は交差反応性であってもよく、例えば、異なる種由来の対応する A B C C 1 2 ポリペプチドを認識することもできる。ポリクローナル抗体は交差反応性である可能性がより高い。あるいは、本発明の抗体は、A B C C 1 2 の単一の型に対して特異的であってもよい。このような抗体は、ヒト A B C C 1 2 に特異的であることが好ましい。

#### 【0219】

当分野で既知の様々な手順を、A B C C 1 2 ポリペプチドまたはその誘導体またはその類似体に対するポリクローナル抗体の産生に使用することができる。抗体を産生する場合、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどを含めて、ただしこれらだけに限定されない様々な宿主動物を、A B C C 1 2 ポリペプチド、またはその誘導体（例えば、断片または融合タンパク質）を注射して免疫することができる。一実施形態では、A B C C 1 2 ポリペプチドまたはその断片を、免疫原性の担体、例えば、ウシ血清アルブミン（B S A）またはキーホール・リンペット・ヘモシニアン（K L H）と複合することができる。フロインド・アジュバント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムなどの無機質ゲル、リゾレシチン、p l u r o n i c ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キーホール・リンペット・ヘモシニアン、ジニトロフェノールなどの界面活性物質、および B C G（カルメット・ゲラン菌（*bacille Calmette - Guerin*））、コリネバクテリウム・パルヴム（*Corynebacterium parvum*）などの潜在的に有用なヒト・アジュバントを含めて、ただしこれらだけに限らない様々なアジュバントを宿主種に応じて使用して免疫応答を増大させることができる。

10

20

#### 【0220】

A B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォームに対するモノクローナル抗体、あるいはその断片、その類似体、またはその誘導体を調製する場合、培養中の連続細胞系を用いて抗体分子を産生するあらゆる技術を使用することができる。これらの技術には、最初に Kohler および Milstein（1975、*Nature*、256：495～497）によって開発されたハイブリドーマ技術、ならびにトリオーマ技術、ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor 等、1983、*Immunology Today*、4：72；Cote 等、1983、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*、80：2026～2030）、およびヒト・モノクローナル抗体を産生する E B V - ハイブリドーマ技術（*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*、Alan R. Liss, Inc., pp. 77～96 中の Cole 等、1985）などがあるが、これらだけに限定されない。本発明の別の一実施形態では、モノクローナル抗体を無菌動物中で産生することができる（国際公開第 89/12690 号）。実際、本発明によれば、A B C C 1 2 ポリペプチドに特異的なマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物活性を有するヒト抗体分子由来の遺伝子とともにスプライシングすることによって、「キメラ抗体」を産生するために開発された技術（Morrison 等、1984、*J. Bacteriol.* 159：870；Neuberger 等、1984、*Nature*、312：604～608；Takeda 等、1985、*Nature* 314：452～454）を使用することができる。このような抗体は本発明の範囲に含まれる。ヒト抗体またはヒト化抗体はそれ自体、免疫応答、特にアレルギー応答を異種抗体よりも極めて誘発し難いので、このようなヒト抗体またはヒト化キメラ抗体を、（下記の）ヒトの疾患または障害の治療に使用することが好ましい。

30

#### 【0221】

本発明によれば、一本鎖抗体の産生用に記述された技術（Huston に与えられた米国特許第 5,476,786 号および同第 5,132,405 号；同第 4,946,778 号）を、A B C C 1 2 ポリペプチドに特異的な一本鎖抗体を産生するために手直しすることができる。本発明の別の一実施形態により、F a b 発現ライブラリーの構築のために記述された技術（Huse 等、1989、*Science* 246：1275～1281）を利用して、A B C C 1 2 ポリペプチド、またはその誘導体または類似体に対する所望の特異性を有するモノクローナル F a b 断片を迅速かつ容易に同定することが可能になる。

40

#### 【0222】

抗体分子のイディオタイプを含む抗体断片を既知の技術により生成することができる。例えば、このような断片は、抗体分子をペプシン消化して産生することができる F ( a b ' )

50

$F(a b')$ 断片のジスルフィド架橋を還元して生成することができる  $F a b'$ 断片、およびこの抗体分子をパパインおよび還元剤で処置して生成することができる  $F a b$ 断片などであるが、これらだけに限定されない。

#### 【0223】

抗体の産生においては、所望の抗体のスクリーニングを、当分野で既知の技術、例えば、放射性免疫測定法、E L I S A (酵素結合免疫吸着測定法)、「サンドイッチ」免疫測定法、免疫放射線測定法、ゲル内沈降反応、免疫拡散測定法、(例えば、コロイド状金、酵素、または放射性同位体標識を使用した)イン・サイチュ免疫測定法、ウェスタン・ブロット法、沈殿反応、凝集測定法(例えば、ゲル凝集測定法、血球凝集測定法)、補体結合測定法、免疫蛍光測定法、プロテインA測定法、および免疫電気泳動測定法などによって実施することができる。一実施形態では、一次抗体上の標識を検出することによって抗体の結合を検出する。別の一実施形態では、二次抗体の結合または一次抗体に対する試薬を検出することによって一次抗体を検出する。別の一実施形態では、二次抗体を標識する。免疫測定法で結合を検出するための多数の手段が当分野では知られており、本発明の範囲に含まれる。例えば、A B C C 1 2ポリペプチドの特異的なエピトープを認識する抗体を選択するには、そのようなエピトープを含有するA B C C 1 2ポリペプチド断片に結合する産物に対して生成されるハイブリドーマを分析することができる。特定の動物種由来のA B C C 1 2ポリペプチドに特異的な抗体を選択する場合、その動物種の細胞から発現された、または単離されたA B C C 1 2ポリペプチドと積極的に結合するかどうかで選択することができる。

10

20

#### 【0224】

前記抗体を、上記任意の検出技術または当分野で既知の技術を用いて、A B C C 1 2ポリペプチドアイソフォームの局在化および活性に関係する当分野で既知の方法に使用することができ、例えば、ウェスタン・ブロット法の場合、適切な生理的試料などにおけるイン・サイチュでのA B C C 1 2ポリペプチドの測定レベルに使用することができる。

#### 【0225】

特定の一実施形態では、A B C C 1 2ポリペプチド活性に作用し(agonize)または拮抗する抗体を生成することができる。このような抗体を、リガンドを同定する下記アッセイを用いて試験することができる。

#### 【0226】

本発明は、1)配列番号33または34のアミノ酸配列を含むポリペプチド、2)配列番号33または34のアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または3)配列番号33または34から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに「相同」なポリペプチドに対する抗体に関する。これは、本発明の一部を成し、Kozbor等(1983、Hybridoma、2(1):7~16)によって記述されたトリオーマ技術またはハイブリドーマ技術で産生される。

30

#### 【0227】

本発明は、米国特許第4,946,778号またはMartineau等(1998、J. Mol Biol、280(1):117~127)に記載された一本鎖Fv抗体断片(S c F v)にも関する。

本発明による抗体は、Ridder等(1995、Biotechnology(NY)、13(3):255~260)によって記述されたファージ・ライブラリーまたはReinmann等(1997、AIDS Res Hum Retr oviruses、13(11):933~943)およびLeger等(1997、Hum Antibodies、8(1):3~16)によって記述されたヒト化抗体を利用して得られる抗体断片も含む。

40

本発明による抗体製剤は、試料中の抗原の有無および/または量を確認するための免疫学的検出試験に有用である。

また、本発明による抗体は、当業者に周知の技術に従い、同位体または非同位体の、例えば蛍光性の検出可能なマーカー、あるいはビオチンなどの分子と結合できる検出可能なマーカーを含むことができる。

#### 【0228】

したがって、本発明の別の主題は、試料中の本発明によるポリペプチドの有無を検出する

50

方法である。この方法は、以下のステップ、すなわち、

- a) 1) 配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、2) 配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または 3) 配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含むポリペプチドと「相同」なポリペプチドに対する抗体と試験試料とを接触させること、および
- b) 形成された抗原 / 抗体複合体を検出することを含む。

【0229】

本発明は、試料中の本発明によるポリペプチドの有無を診断または検出するためのボックスまたはキットにも関する。このボックスは、

- a) 1) 配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、2) 配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または 3) 配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含むポリペプチドと「相同」なポリペプチドに対する抗体と、
- b) 形成された抗原 / 抗体複合体の検出を可能にする試薬とを含む。

【0230】

薬剤組成物および治療方法

本発明は、A B C C 1 2 機能性ポリペプチド、特に配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含むポリペプチドの有効量を産生することができる治療上有効な量のポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、コレステロールまたは炎症性脂質の輸送欠陥を予防および / または治療するための薬剤組成物にも関する。

本発明は、本発明による A B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォームのいずれか 1 つをコードする核酸を含む薬剤組成物、および染色体遺伝子座 16 q 12 上に位置する疾患を予防および / または治療するための本発明による A B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォームを含む薬剤組成物も提供する。

本発明は、本発明による A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームをコードする核酸をインビボで移送し発現することを含む、親油性物質の輸送に関連した病理を治療するための新しい治療手法にも関する。

【0231】

したがって、本発明は、発作性運動誘発性舞踏アテトーゼなどの病理を治療および / または予防する新しい手法を提供する。

したがって、本発明は、メトトレキセート (MTX) などの陰イオン性薬物、G S H 複合薬物、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物を輸送する機能の障害に罹った対象を予防または治療するための、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームをコードする核酸と 1 つまたは複数の生理的に適合するビヒクルおよび / または賦形剤との組合せを含む薬剤組成物にも関する。

【0232】

本発明の特定の一実施形態によれば、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか 1 つをインビボで産生する組成物が提供される。この組成物は、適切な調節配列の制御下に置かれ A B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォームのいずれか 1 つをコードする核酸を、生理的に許容されるビヒクルおよび / または賦形剤中に溶液状態で含む。

したがって、本発明は、配列番号 33 または 34 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、適切な調節エレメントの制御下に置かれた核酸を含む組成物にも関する。

このような組成物は、配列番号 1 または 2 のヌクレオチド配列を含む、適切な調節エレメントの制御下に置かれた核酸を含むことが好ましい。

【0233】

別の一態様によれば、本発明の別の主題は、親油性物質の輸送欠陥によって引き起こされる疾患を治療する予防的および / または治療的治療法である。このような方法は、本発明による A B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォームのいずれか 1 つをコードする核酸を患者に投与するステップを含み、適切であれば、この核酸は 1 つまたは複数の生理的に適合するビヒクルおよび / または賦形剤と組み合わされている。

本発明は、A B C C 1 2 遺伝子欠損に罹った対象を予防または治療するための、1つまたは複数の生理的に適合する賦形剤と組み合わせた本発明による組換えベクターを含む薬剤組成物にも関する。

【0234】

特定の一実施形態によれば、本発明による核酸を宿主細胞、特に哺乳動物から得られる宿主細胞にインピボで導入する方法は、適切な調節配列の制御下に置かれた本発明による薬剤として適合するベクターおよび「裸の」核酸を含む製剤を、選択した組織、例えば平滑筋組織に局所注射して導入するステップを含み、この「裸の」核酸はこの組織の細胞によって吸収される。

【0235】

本発明は、予防用および/または治療用の様々な形態の薬剤、より具体的には発作性運動誘発性舞踏アテトーゼに罹った対象の治療用薬剤を製造するための、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする本発明による核酸の使用にも関する。本発明は、発作性運動誘発性舞踏アテトーゼに罹った対象の予防用および/または治療用薬剤を製造するための、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする核酸を含む本発明による組換えベクターの使用にも関する。

【0236】

本発明は、予防用および/または治療用の様々な形態の薬剤、より具体的にはメトトレキセート(MTX)などの陰イオン性薬物、GSH複合薬物、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送障害に罹った対象の治療用薬剤を製造するための、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする本発明による核酸の使用にも関する。

【0237】

本発明は、メトトレキセート(MTX)などの陰イオン性薬物、GSH複合薬物、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送欠陥の予防用および/または治療用薬剤を製造するための、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする核酸を含む本発明による組換えベクターの使用にも関する。本発明は、上記の通り、発作性運動誘発性舞踏アテトーゼに関連した病理の治療および/または予防用薬剤組成物を調製するための、本発明による組換え欠損ウイルスの使用にも関する。

【0238】

本発明は、メトトレキセート(MTX)などの陰イオン性薬物、GSH複合薬物、グルクロナート複合薬物、サルフェート複合薬物など酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送に関連する欠陥の治療用および/または予防用の薬剤組成物を調製するための組換え欠損ウイルスの使用に関する。したがって、本発明は、本発明による1つまたは複数の組換え欠損ウイルスを含む薬剤組成物にも関する。本発明は、体内に移植され、生物活性A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームの1つを長期にわたり効果的にインピボで発現することができる、本発明によるウイルスによりエクスピボで遺伝子改変された細胞、またはウイルスなどの産生細胞の使用にも関する。

【0239】

本発明は、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする核酸をウイルス・ベクター中に取り込むことができ、これらのベクターが生物活性な成熟ポリペプチドの効果的な発現を可能にすることを示す。より具体的には、本発明は、A B C C 1 2 遺伝子のインピボでの発現が、アデノウイルスの直接投与、あるいは産生細胞またはこのようなDNAを取り込むアデノウイルスまたはレトロウイルスで遺伝子改変された細胞の移植によって得られることを示す。

【0240】

本発明の薬剤組成物は、注射製剤、特に例えば患者の門脈中などへの静脈内注射用の、薬剤として許容されるビヒクルまたは生理的に適合する賦形剤を含むことが好ましい。これらのビヒクルまたは賦形剤は、特に滅菌等張液または乾燥した、特に凍結乾燥した組成物

10

20

30

40

50



に類するものであり、滅菌水か生理食塩水かによるが、これらを添加すると注射溶液の調製が可能になる。患者の門脈中に直接注射することが好ましい。というのは、これにより肝臓での感染を標的とし、したがってこの器官に治療効果を集中することができるからである。

#### 【0241】

「薬剤として許容されるビヒクルまたは賦形剤」としては、投薬方法として薬剤的に許容され、無菌であり、また、適切な分散剤、湿潤剤、および懸濁剤を用いて配合される水性懸濁液または油性懸濁液でもよい希釈剤およびフィラーが挙げられる。個々の薬剤として許容される担体および活性化合物と担体の比は、組成物の溶解性および化学的諸性質、個々の投与形態、および標準の製剤上の実務で決まる。

10

#### 【0242】

本発明の核酸、ポリペプチド、ベクター、または宿主細胞は、好ましくは、薬剤として許容されるビヒクルまたは賦形剤中、インピボで導入される。「薬剤として許容される」という句は、生理的に許容され、ヒトに投与した時に胃ぜん動の異常亢進、めまいなどアレルギーや類似の有害反応を通常は起こさない分子および組成物を指す。好ましくは、本明細書で使用する「薬剤として許容される」という用語は、連邦政府または州政府の規制当局、あるいは米国薬局方、または動物、より具体的にはヒトへの使用が一般に認められた他の薬局方に列記されている規制当局によって認可されたことを意味する。「賦形剤」という用語は、前記化合物とともに投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。このような薬剤担体は、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油など石油、動物、植物、または合成起源の液体を含めて、水や油などの無菌液体とすることができる。好ましくは、水、水溶液、食塩水、水性ブドウ糖、およびグリセロール溶液が、賦形剤、特に注射液として使用される。適切な薬剤の賦形剤は、E. W. Martin著「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。

20

#### 【0243】

本発明による薬剤組成物は、経口、直腸、非経口、静脈内、皮下、または皮内経路により同じように問題なく投与することができる。

#### 【0244】

別の態様によれば、本発明の別の主題は、コレステロールまたは炎症性脂質の輸送欠陥によって引き起こされる疾患を治療する予防的および/または治療的治療法であり、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする核酸を患者または対象に投与することを含む。この核酸は1つまたは複数の生理的に適合するビヒクルおよび/または賦形剤と組み合わせられている。

30

#### 【0245】

別の実施形態では、本発明による核酸、組換えベクター、および組成物は、小胞、特にリボソーム (Langer, 1990, Science, 249: 1527~1533; Treat等, 1989, Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez - BeresteinおよびFidler (編), Liss: New York, pp. 353~365; およびLiposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez - BeresteinおよびFidler (編), Liss: New York, pp. 317~327中のLopez - Berestein, 1989を参照されたい) に入れて送達することができる。

40

#### 【0246】

別の態様では、本発明による核酸で形質転換され、本発明によるA B C C 1 2 ポリペプチドを高いレベルで発現する組換え細胞を、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つを必要とする対象に移植することができる。本発明による核酸をコードするA B C C 1 2 で形質転換された自己細胞を移植して拒絶反応を防止することが好ましい。あるいは、免疫認識および免疫拒否を防止するポリマー・マトリックス内の可溶性因子を産生する非自己細胞を遮蔽する技術を利用できる。

#### 【0247】

本発明による核酸、ポリペプチド、組換えベクター、組換え宿主細胞、および組成物の投

50

与対象は、好ましくはヒトであるが、あらゆる動物とすることもできる。したがって、当業者に容易に理解されるように、本発明の方法および薬剤組成物は、あらゆる動物、特に、ネコまたはイヌなどの家で飼う動物、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、およびブタなどの家畜、（自然状態または動物園内の）野生動物、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコなどの研究動物、ニワトリ、シチメンチョウ、鳴きん類などのトリを含めて、ただしこれらだけには限定されない哺乳動物に投与するのに、すなわち、獣医用に特に適している。

先に定義した核酸、組換えベクター、または組換え宿主細胞を含む薬剤組成物を患者や対象に投与することが好ましい。

#### 【0248】

A B C C 1 2 ポリペプチドの作用薬化合物または拮抗薬化合物をスクリーニングする方法別の一態様によれば、本発明は、コレステロールまたは炎症性脂質の輸送欠陥による疾患を治療するのに有用な治療用化合物または小分子をスクリーニングする様々な方法にも関する。

したがって、本発明は、A B C C 1 2 遺伝子の障害から生ずる疾患の予防用および／または治療用活性成分をスクリーニングするための、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つまたはA B C C 1 2 ポリペプチドを発現する細胞の使用にも関する。産物ライブラリーをあらゆる既存技術でスクリーニングするために、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つの触媒部位およびオリゴペプチド断片または免疫原性断片を使用することができる。このタイプのスクリーニングに使用されるポリペプチド断片は、溶液中で遊離していても、固体担体、細胞表面、または細胞中に結合していてもよい。次いで、A B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォーム断片と試験薬剤との結合複合体の形成を測定することができる。

#### 【0249】

対象とするタンパク質に対して親和性を有する産物が入手可能な大量スクリーニング（high-flux screening）に使用できる別の産物スクリーニング技術が、国際公開第84/03564号に記載されている。この方法をA B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つに適用すると、様々な産物が固体表面上で合成される。これらの産物是对応するA B C C 1 2 タンパク質アイソフォームまたはその断片と反応し、その複合物が洗い流される。次いで、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つと結合している産物を当業者に既知の方法によって検出する。ペプチドを捕捉し、それを担体上に固定するために非中和抗体も使用することができる。

#### 【0250】

A B C C 1 2 中和性競合抗体（neutralizing competition antibodies）、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つ、およびA B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つと結合可能な産物を用いた産物スクリーニング方法を実施することも可能である。このように、これらの抗体を使用して、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つを含む共通抗原単位を有するペプチドの存在を検出することができる。

A B C C 1 2 活性を増加させる能力を評価すべき産物としては、特にこの分子の活性化に関与するキナーゼ特異的A T P 相同体、ならびに前記キナーゼに起因する脱リン酸化を回避できるホスファターゼを挙げることができる。特にホスホジエステラーゼ（P D E）阻害剤のテオフィリンおよび3-イソブチル-1-メチルキサンチン型またはアデニルシクラーゼ活性化薬フォルスコリンでもよい。

したがって、本発明は、ヒトA B C C 1 2 をコードする核酸を構成的に発現するか、または導入した哺乳動物、昆虫、細菌、または酵母の膜または小胞、すなわちすべて合成型または細胞型の膜または小胞の間で、コレステロールまたは親油性物質をトランスロケーションする方法に基づいて、産物、すなわち、化合物、小分子などをスクリーニングする任意の方法の使用に関する。このために、標識親油性物質類似体を使用することができる。

また、多数の輸送体が破損することが記載されている（van den Hazel等、1999、J. Bi

10

20

30

40

50

ol Chem, 274: 1934~41) ことから、特徴的な表現型を有する細胞の突然変異体を使用することを考え、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームでその機能を補完し、これら全部をスクリーニングの目的で使用する事が可能である。

#### 【0251】

本発明は、基質を輸送する活性を有する化合物または小分子、すなわちA B C C 1 2 ポリペプチドのいずれか1つの作用薬または拮抗薬をスクリーニングする方法にも関する。この方法は、以下のステップ、すなわち、

a) A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つと検出可能なマーカーを含む基質とを含む膜小胞を調製すること、

b) ステップa) で得た小胞を作用薬または拮抗薬の候補化合物とインキュベートすること、

c) 検出可能なマーカーを含む基質の放出量を定性的かつ/または定量的に測定すること、および

d) ステップb) で得た放出測定値を、作用薬または拮抗薬の候補化合物とともにまだインキュベートしていない小胞による標識基質の放出測定値と比較することを含む。

#### 【0252】

A B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォームは配列番号33および34のアミノ酸配列を含む。

上記スクリーニング方法の第1の態様によれば、この膜小胞は、当業者に周知の技術に従って調製することができる合成脂質小胞である。この特定の態様によれば、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームを組換えタンパク質とすることができる。

第2の態様によれば、この膜小胞は、少なくとも1つのA B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォームを発現する細胞由来の原形質膜の小胞である。この細胞は、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つを自然に発現する細胞、または少なくとも1つのA B C C 1 2 ポリペプチドをコードする核酸またはA B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォームをコードする核酸を含む組換えベクターを形質移入した細胞とすることができる。

上記スクリーニング方法の第3の態様によれば、この基質は、メトトレキセート(MTX)などの陰イオン性薬物である。

上記スクリーニング方法の第4の態様によれば、この基質は、GSH複合薬物、グルクロナート複合薬物、またはサルフェート複合薬物など酸性リガンドに結合する中性薬物である。

第5の態様によれば、この基質は、例えば<sup>3</sup>Hまたは<sup>125</sup>Iから選択される同位体で放射性標識されている。

第6の態様によれば、この基質は、NBDまたはピレンなどの蛍光化合物で標識されている。

第7の態様によれば、標識基質およびA B C C 1 2 ポリペプチドを含む膜小胞を、ステップb)の前に固体担体表面に固定する。

第8の態様によれば、小胞によって放出される蛍光または放射能の測定は、A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つによる基質輸送の活性を直接反映するものである。

#### 【0253】

本発明は、陰イオンを輸送する活性を有する化合物または小分子、すなわちA B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つの作用薬または拮抗薬をスクリーニングする方法にも関する。この方法は、以下のステップ、すなわち、

a) A B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つを自然に発現する細胞、またはA B C C 1 2 をコードする核酸を細胞に形質移入した後にA B C C 1 2 ポリペプチドを発現する細胞、例えば細胞系を得ること、

b) 検出可能なマーカーで標識した陰イオンの存在下で、ステップa)の細胞をインキュベートすること、

c) これらの細胞に侵入していない過剰の標識陰イオンを除去するためにステップb)の

細胞を洗浄すること、

d) ステップc) で得た細胞を A B C C 1 2 ポリペプチドの作用薬または拮抗薬の候補化合物とともにインキュベートすること、

e) 標識陰イオンの流出量を測定すること、および

f) ステップe) で測定した標識陰イオンの流出量の値を、A B C C 1 2 ポリペプチドの作用薬または拮抗薬の候補化合物の存在下でまだインキュベートしていない細胞で測定した標識陰イオンの流出量の値と比較することを含む。

#### 【0254】

第1の特定の実施形態では、A B C C 1 2 ポリペプチドアイソフォームは配列番号33および34のアミノ酸配列を含む。

第2の態様によれば、上記スクリーニング方法に使用する細胞は、A B C C 1 2 ポリペプチドを自然には発現しない細胞、または低レベルのA B C C 1 2 ポリペプチドしか発現しない細胞でもよく、これらの細胞にはA B C C 1 2 タンパク質アイソフォームのいずれか1つをコードする核酸の発現を誘導できる本発明による組換えベクターが形質移入されている。

第3の態様によれば、この細胞は、陰イオン輸送に自然の欠陥を有する細胞、あるいはVerapamil (商標)、テトラエチルアンモニウムなどの1つまたは複数の陰イオン・チャネル阻害剤で前処理した細胞とすることができる。

このスクリーニング方法の第4の態様によれば、この陰イオンは $K^{125}I$ 塩または $Na^{125}I$ 塩などの放射性標識ヨウ化物である。

第5の態様によれば、標識陰イオンの流出量を実験中定期的に測定し、それによってこの流出量の動力学的な測定を確立することが可能になる。

第6の態様によれば、培養細胞の上清中に存在する標識陰イオン量を所定の時間に測定することによって標識陰イオンの流出量の値を決定する。

第7の態様によれば、細胞溶解物で観測される放射能と培養細胞の上清で観測される放射能との合計に相当する全放射能に対する培養細胞の上清で観測される放射能の比率として標識陰イオンの流出量の値を決定する。

#### 【0255】

インターロイキンおよび作用薬または拮抗薬の候補化合物の産生を刺激する化合物の存在下で；

以下の実施例は、さらに本発明を説明するものであって、本発明を限定するものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0256】

ゲノム・データベース中のヒトA B C C 1 2 遺伝子の検索

Gene Bank HTGS データベースの検索を、T B L A S T N および T B L A S T P の各プログラムを用いて既知のA B C 輸送体ヌクレオチド配列およびタンパク質配列を問い合わせとして実施した。Genetics Computer Group (GCG) Packageに含まれているP I L E U P プログラムを用いてアミノ酸整列を作成した。ゲノム分析パイプラインI上のG R A I L およびG e n e s c a n の各プログラムを用いて、新しい遺伝子のゲノム構造を予測した。

ヒトA B C C 1 2 輸送体遺伝子配列を、G e n B a n k HTGS データベースの細菌人工染色体 (B A C) クローン # A C 0 0 7 6 0 0 上に検出した。c D N A 配列決定、ゲノム構造予測プログラム、およびコンピュータ検索により、A B C C サブファミリーに属する新しい遺伝子の配列およびゲノム構造を決定した。

発現された配列タグ (E S T) クローン配列および遺伝子の5'領域および3'領域から予想されたc D N A 配列からプライマーを設計した。A B C C 1 2 c D N A 配列を、精巢または肝臓のc D N A (Clontech) のP C R 増幅によって確認した。A B I 3 7 7 シークエンサーを用いて製造者 (Perkin Elmer) の手順に従い配列を決定した。ゲノム配列 (B A C A C 0 0 7 6 0 0) とc D N A 配列を比較して、イントロンの位置を決定し

10

20

30

40

50

た。

# 【実施例 2】

## 【0257】

放射線ハイブリッド・マッピング (Radiation hybrid Mapping) (図 2)

Gene Bridge 4 放射線ハイブリッド・パネル (radiation hybrid panel) (Research Genetics) を用い製造者の手順に従いマッピングして、染色体上のヒト ABC C 1 2 遺伝子の位置を決定した。

放射線ハイブリッド・マッピングによれば、ABC C 1 2 はヒト染色体 16 の動原体領域に位置し、マーカー D 1 6 S 3 0 9 3 および D 1 6 S 4 0 9 が隣接していた (図 2)。この領域は 5.4 cM または 132.5 cR を含んでおり、この領域には組換えマーカーおよび / またはマップされた多型マーカーが存在しないことからさらに範囲を限定することはできなかった。ABC C 1 2 遺伝子は、16 p マーカー D 1 6 S 3 0 9 3 (119.40 cR) よりも 16 q マーカー D 1 6 S 4 0 9 (132.4 cR) の近くに位置づけられるので (図 2)、染色体 16 q 1 2.1 上に位置している可能性が最も高い。ABC C 1 2 は、同じ遺伝子座に位置し、ABC C 1 1 からは約 200 kb 離れている。ABC C 1 1 と ABC C 1 2 は直列に並び、それらの 5' 末端は動原体に面している。2 つの別の ABC C サブファミリー遺伝子 ABC C 1 および ABC C 6 は、同じ染色体の短腕 16 p 1 3.1 (Cole 等 (1992) Science 258, 1650 ~ 1654; Allikmets 等 (1996) Human Mol. Genet. (1996) 5, 1649 ~ 1655) に位置づけられた。ABC C 1 および ABC C 6 の各 3' 末端は、互いにわずか約 9 kb しか離れておらず、そのためこれらの遺伝子は反対方向を向いている (Cai 等、J Mol Med, 2000, 78, 36 ~ 46)。

## 【0258】

発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼ (PKC) の遺伝子座は、マーカー D 1 6 S 3 0 9 3 とマーカー D 1 6 S 4 1 6 との間の 16 p 1 1.2 ~ q 1 2.1 に割り当てられた (Tomita 等、Am J Hum Genet, 1999, 65, 1688 ~ 97; Bennett 等、2000; 図 2)。重複する遺伝子座は、発作性舞蹈アテトーゼを伴う乳児けいれん (ICCA; Lee 等、Hum Genet, 1998, 103, 608 ~ 12) の遺伝子を含むと予想されている。染色体 16 上の新規なイオン・チャネル遺伝子中の突然変異は、PKC および / または ICCA をもたらす恐れがあることが示唆された (Bennett 等、Neurology, 2000, 54, 125 ~ 30)。ABC C サブファミリーの別のメンバーである囊胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (CFTR) は、サイクリック AMP によって制御されるチャネルとして、また、他のイオン・チャネルおよび輸送体の制御因子として機能するので (Kleizen 等、J Cell Biol, 2000, 79, 544 ~ 56)、この遺伝子がイオン・チャネル (または制御因子) として機能し得ること、およびこれらの突然変異が疾患の表現型をもたらす恐れがあることはもっともなことである。ABC C 1 2 の発現の分析から、この遺伝子が筋や脳組織で発現し、骨格筋や脳に関係する PKC の病因の作業仮説を支持するものであることが示されている。要約すると、染色体上の位置、考えられる機能、および発現プロファイルから、この遺伝子は PKC / ICCA に対する有望な候補である。

# 【実施例 3】

## 【0259】

系統学的解析 (図 5)

ABC C サブファミリー・タンパク質の系統学的解析によって、ABC C 1 1 遺伝子と ABC C 1 2 遺伝子が比較的最近 2 組に分岐したことが明白である (図 5)。この得られた隣接合流樹 (neighbor-joining tree) によって、ABC C 1 1 / ABC C 1 2 のクラスターと ABC C 5 遺伝子の進化上の密接な関係が最大の信頼度 (100 レベルのブートストラップ (bootstrap) 支持) で示されている (図 5)。また、この近隣結合樹の解析によって、ABC C 8 遺伝子と ABC C 9 遺伝子が最近 2 組に分岐し、一方、ABC C 1 0 が共通祖先から分離した最初の遺伝子の 1 つであると考えられることが示唆された。ABC C 1 1、ABC C 1 2、ABC C 3、および ABC C 6 の各遺伝子は明確に規定されたサブ・クラスターを構成し、一方、ABC C 4 と CFTR (ABC C 7) の各遺伝子は

10

20

30

40

50

明らかに初期に分岐したにもかかわらず別の確実なサブセットを形成している。

#### 【実施例 4】

#### 【0260】

##### 細胞系

ヒト赤白血病 K 5 6 2 細胞を、アメリカ組織培養コレクション (American Tissue Culture Collection) (Rockville MD) から得て、10%ウシ胎児血清、2 - グルタミン 2 mM を補充した RPMI - 1640 培地中で培養した。9 - (2 - ホスホニルメトキシエチル) アデニン (PMEA) に耐性のある細胞 K 5 6 2 / PMEA を、(Hatse 等、Mol Pharmacol、1996、50、1231~42) によって記述されたようにして誘導した。T - リンパ芽球細胞系 CEM および (-) 2', 3' - ジデオキシ - 3' - チアシチジン (3TC) に耐性のある CEM - 3TC 細胞を選択した [参考文献]。細胞系 CEM ss および CEM - r1 は、(Robbins 等、Mol Pharmacol、1995、47、391~7) によって記述された。CEM - r1 は、ABCC4 を過剰発現するので、PMEA に対して高い耐性がある (Schuetz 等、Nat Med、1999、5、1048~51)。これら 6 個の細胞系 (野生型と耐性細胞系の 3 組) 由来の RNA すべてを、TRIZOL (GIBCO BRL) を用いて単離し、図 3 の簡単な説明に示したサイクル数とオリゴヌクレオチド・プライマーを変えて RT - PCR を実施した。産物をサブクローニングし、配列を直接決定して確認した。

10

#### 【0261】

##### 逆転写

全容積 11.5  $\mu$ l 中で、オリゴ dT 500 ng と混合した mRNA poly (A) + (Clontech) 500 ng を 70 で 10 分間変性し、次いで氷上で冷却した。RNA sin 10 単位、DTT 10 mM、dNTP 0.5 mM、Superscript 第 1 鎖 (first strand) 緩衝液、および Superscript II (Life Technologies) 200 単位を添加後、反応物を 42 で 45 分間インキュベートした。

20

#### 【0262】

##### PCR

各ポリメラーゼ連鎖反応は、各 dNTP 400  $\mu$ M、Thermus aquaticus (Taq) DNA ポリメラーゼ (Ampli Taq Gold; Perkin Elmer) 2 単位、各プライマー 0.5  $\mu$ M、MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM、PCR 緩衝液、および DNA 50 ng、または cDNA 約 25 ng、または初期 PCR 混合物 1/50 e を含んでいた。Perkin Elmer 9700 サーマル・サイクラー中、96 ウェル・マイクロタイター・プレート中で反応を 30 サイクル実施した。94 10 分間の最初の変性後、各サイクルは、30 秒 (94) の変性ステップ、30 秒 (64 2 サイクル、61 2 サイクル、58 2 サイクル、および 55 28 サイクル) のハイブリダイゼーション・ステップ、および 1 分 / kb (72) の伸長ステップからなった。最後に 72 7 分間伸長させて PCR を終了した。RT - PCR の場合、逆転写酵素のない対照反応および cDNA の代わりに水を含んだ反応をサンプルごとに実施した。

30

#### 【0263】

##### DNA 配列決定

PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分析・定量し、P100 カラムを用いて精製した。ABI Prism BigDye ターミネーター・サイクル配列決定キット (terminator cycle sequencing kit) (Perkin Elmer Applied Biosystems) を用いて、精製した PCR 産物の配列を決定した。この配列決定反応混合物を、Microcon - 100 微量濃縮器 (Amicon, Inc., Beverly) を用いて精製した。ABI 377 DNA シークエンサー (Perkin Elmer Applied Biosystems) で製造者 (Applied Biosystems、Perkin Elmer) の手順に従い、配列決定反応物の配列を決定した。

40

#### 【0264】

##### プライマー

GCG パッケージの Prime ソフトウェア、またはオリゴ 4 (National Biosciences, Inc.) ソフトウェアを用いて、オリゴヌクレオチドを選択した。プライマーを Life T

50

technologies, Ltdから取り寄せ、精製せずに使用した。

#### 【実施例 5】

##### 【0265】

ヒト組織およびヌクレオチド耐性細胞系における ABC C 1 2 の発現

ABC C 1 2 遺伝子の発現パターンを、PCRにより多重組織発現アレイ (multiple tissue expression arrays) (Clontech) 上で遺伝子特異的プライマーを用いて検討し、約 500bp の PCR 断片を得た (図 3)。約 5000bp の mRNA 種がノーザン・ブロットによって観測された (データは示さない)。発現実験に使用したプライマーは、エクソン 6 からエクソン 9 までの ABC C 1 2 cDNA を増幅し、588bp の PCR 断片が得られた (図 3)。

ABC C 1 2 EST の組織源 (tissue source) を dbEST 公開データベースおよび Incyte LifeSeq Gold 商用 (proprietary) データベースで系統的に解析して、その大部分が CNS (11) 由来である 18 個の EST を得た。これ以外の EST は、精巢 (3 クローン)、および免疫系 (4) 由来であった。筋ライブラリー由来の EST はなかった。

#### 【実施例 6】

##### 【0266】

ABC C 1 2 の完全な cDNA を含む発現ベクターの哺乳動物細胞における構築

ABC C 1 2 遺伝子は、哺乳動物細胞中で発現することがある。一般的な真核生物の発現ベクターは、mRNA の転写開始を可能にするプロモーター、タンパク質をコードする配列、転写終結に必要なシグナル、および転写物のポリアダニレーションに必要なシグナルを含む。発現ベクターは、エンハンサー、コザック配列、mRNA のスプライシングに必要な配列などのさらに別のシグナルも含む。SV40 ウイルス・プロモーターの初期要素 (early element) および後期要素 (late element)、レトロウイルスLTR、または CMV ウイルス初期プロモーターを用いて有効な転写が得られる。一方、アクチン・プロモーターなどの細胞要素も使用することができる。本発明を実施するために多数の発現ベクターを使用することができる。このようなベクターの一例は pcDNA3 (Invitrogen) である。

#### 【実施例 7】

##### 【0267】

正常な ABC C 1 2 ポリペプチドアイソフォームおよび突然変異 ABC C 1 2 ポリペプチドアイソフォームの産生

実施例 2 にその単離について記載した対応する完全な cDNA によってコードされる正常な ABC C 1 2 ポリペプチド、または実施例 2 に記載した技術に従ってその完全な cDNA を得ることもできる突然変異 ABC C 1 2 ポリペプチドは、細菌または昆虫細胞の各発現系においてバキュロウイルス・ベクターを用いて、あるいはワクシニア・ウイルス・ベクターを含む哺乳動物細胞やそれを含まない哺乳動物細胞において容易に産生することができる。これらの方法はすべて、現在広範に記載されており、当業者には既知である。その詳細な記述の 1 つが、例えば F. Ausubel 等 (1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.) にある。

#### 【実施例 8】

##### 【0268】

突然変異 ABC C 1 2 ポリペプチドに対する抗体の産生

本発明における抗体を、様々な方法によって調製することができる (Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J. G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl - Massachusetts General Hospital Harvard Medical School 編, Current Protocols In Molecular Biology 1 巻, 11 章, 1989)。例えば、本発明のポリペプチドを発現する細胞を動物に注射して抗体を含む血清の産生を誘導する。記載された方法の 1 つでは、タンパク質を調製し、汚染を避けるために精製する。次いで、このような製剤を、より高い活性を有するポリクローナル抗血清を産生する目的で動物

10

20

30

40

50

に導入する。

【0269】

この好ましい方法では、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。このようなモノクローナル抗体をハイブリドーマ技術を用いて調製することができる (Koehler等、1975、Nature、256:495; Koehler等、1976、Eur. J. Immunol. 6:292; Koehler等、1976、Eur. J. Immunol. 6:511; Hammeling等、1981、Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas、Elsevier、N.Y.、pp. 563~681)。一般に、このような方法ではポリペプチドを用いて、さらに好ましくはこのポリペプチドを発現する細胞を用いて動物 (好ましくはマウス) を免疫する必要がある。これらの細胞を適切な組織培養培地中で培養することができる。しかし、(56 で不活化した) 10% ウシ胎児血清を補充し、非必須アミノ酸約10g/1、ペニシリン1000U/ml、およびストレプトマイシン約100μg/mlを補充したイーグル培地 (修正Earle) 中でこれらの細胞を培養することが好ましい。

10

【0270】

これらのマウスの細胞を抽出して、適切な骨髓腫細胞系と融合させる。ただし、ATCCから入手できる親の骨髓腫細胞系 (SP20) を使用することが好ましい。融合後、得られたハイブリドーマ細胞をHAT培地で選択的に維持し、次いでWands等 (1981、Gastroenterology、80:225~232) によって記述された限界希釈法によりクローン化する。このような選択後に得られたハイブリドーマ細胞を検査して、前記ポリペプチドに結合可能な抗体を分泌するクローンを同定する。

【0271】

さらに、前記ポリペプチドに結合可能な別の抗体を、抗イディオタイプ抗体を用いた2段階操作によって産生することができる。このような方法は、その抗体自体が抗原であり、したがって別の抗体を認識する抗体を得ることが可能であるという事実に基づいている。この方法によれば、前記タンパク質に特異的な抗体を用いて動物、好ましくはマウスを免疫することができる。次いでこの動物の細胞を用いてハイブリドーマ細胞を産生し、この特異的な抗体タンパク質複合体に結合するその能力が前記ポリペプチドでブロックされ得る抗体を産生するクローンを同定するために、このハイブリドーマ細胞をスクリーニングする。これらの抗体を用いて動物を免疫して、このタンパク質に特異的な抗体を大量に生成させることができる。

20

【0272】

本明細書に記載する方法に従い、本発明の抗体のFab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、および他の断片を使用することが好ましい。このような断片は、一般には、(Fab断片を産生するために) パパイン、(F(ab')<sub>2</sub>断片を産生するために) ペプシンなどの酵素を利用したタンパク質分解性の切断によって産生される。あるいは、組換えDNA技術または合成化学技術を適用して、このタンパク質を認識する分泌断片を産生することができる。

30

【0273】

抗体をヒトにインビボで使用する場合、「ヒト化」キメラ・モノクローナル抗体を使用することが好ましい。このような抗体を、上記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞由来の遺伝子構築体 (genetic constructs) を用いて産生することができる。キメラ抗体を産生する方法は、当業者には既知である (総説としてMorrison (1985、Science 229:1202); Oi等 (1986、Biotechnology、4:214); Cabilly他、米国特許第4,816,567号; Taniguchi他、欧州特許第1,714,96号; Morrison他、欧州特許第1,734,94号; Neuberger等、国際公開第8,601,533号; Robinson等、国際公開第8,702,671号; Boulianne等; (1984、Nature、312:643); およびNeuberger等 (1985、Nature、314:268) を参照されたい)。

40

【実施例9】

【0274】

突然変異または転写の相違に起因する発作性運動誘発性舞踏アテトーゼなど染色体遺伝子座に関連する疾患の原因遺伝子の同定

実施例4に記載の方法に従い、罹患または非罹患個体に特異的なRNAを用いたノーザン

50



10

## 20

## 30

5' - C G G C C G C G G C G C G C C C G G A C C G C C T A G G A T T T A A A T C  
G C G G C C C G C G - 3' である。

## 【0278】

改変発現ベクター pCMV の EcoRI 部位と SmaI 部位の間の DNA 断片を単離し、シャトル・ベクター pXCI (McKinnon等、1982、Gene、19:33; McGrory等、1988、Virology、163:614) の改変 XbaI 部位にクローン化することができる。

## 【0279】

シャトル・ベクター pXCI の改変:

5' 末端から 3' 末端までに

5' CTCTAGAAATTCGGCCCTCCGTGGCCGTTTAAACGCTAGCGCCCGGGCTTAATTAAGTCGACTCTAGAGC - 3' の配列を有する XbaI、EcoRI、SfiI、PmeI、NheI、SrfI、PacI、SalI、および XbaI の各制限部位を含むマルチ・クローニング部位を、ベクター pXCI (McKinnon等、1982、Gene 19:33; McGrory等、1988、Virology、163:614) の XbaI 部位 (3329 位置のヌクレオチド) に挿入することができる。

10

## 【0280】

次いで、CMV プロモーター/エンハンサー、FV40 のドナー・スプライシング部位 (donor splicing sites) およびアクセプター・スプライシング部位 (acceptor splicing sites)、および FV40 のポリアデニレーション・シグナルを含む改変ベクター pCMV - から単離した EcoRI - SalI DNA 断片を、改変シャトル・ベクター pXCI の EcoRI - SalI 部位中にクローン化することができ、このベクターを pCMV - 11 と呼ぶ。

20

## 【0281】

シャトル・ベクター pAD12 - ABCA の調製:

ヒト ABCC12 cDNA を上述のように RT - PCR 反応により得て、ベクター pCMV - 12 中の NotI 部位にクローン化し、ベクター pCMV - ABCC12 を得る。

## 【0282】

ABC1 組換えアデノウイルスの構築:

ヒト ABCC12 cDNA を含む組換えアデノウイルスを、McGrory等 (1988、Virology、163:614) によって記述された技術に従って構築することができる。

手短に言えば、ベクター pAD12 - ABCA に、Chen および Okayama (1987、Mol Cell Biol.、7:2745~2752) の技術に従ってベクター tGM17 を同時形質移入する。同様に、ベクター pAD12 - ルシフェラーゼを構築し、ベクター pJM17 を同時形質移入した。

30

組換えアデノウイルスを PCR 増幅によって確認し、ヒト胎生腎細胞系 HEK 293 (American Type Culture Collection、Rockville、MD、USA) 中で大規模に増幅する前に、2つの精製サイクルにかける。

アデノウイルス・ベクターで感染後 48 ~ 72 時間に感染細胞を収集し、5回の凍結融解溶解サイクルにかける。

この粗製溶解物を Freon (Halocarbene 113、Matheson Product、Scaucus、N. J. USA) を利用して抽出し、0.2% ネズミ・アルブミン (Sigma Chemical Co.、St Louis、MO、USA) を補充した塩化セシウム中で2回沈降させ、NaCl 150 mM、Hepes (pH 7.4) 10 mM、KCl 5 mM、MgCl<sub>2</sub> 1 mM、および CaCl<sub>2</sub> 1 mM からなる緩衝液で徹底した透析を行う。

40

この組換えアデノウイルスを - 70 で貯蔵し、それを動物に投与する前に、あるいは培養中の細胞とともにインキュベーションする前に滴定する。

欠失領域の構造部分 (structural portion) に位置するオリゴヌクレオチド・プライマーを用いた PCR 増幅を利用してスクリーニングすることにより、野生型が混入したアデノウイルスがないことを確認する。

## 【0283】

ヒト ABCC12 cDNA の発現の確認:

配列番号 33 または 34 で示されるアミノ酸配列の全部または一部を含む ABCC12 タ

50

ンパク質由来の合成ポリペプチド断片を注射することによって、ウサギおよびニワトリ中で上述のようにしてヒトA B C C 1 2ポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体を調製することができる。これらのポリクローナル抗体を使用して、細胞モデルおよび動物モデルにおけるヒトA B C C 1 2遺伝子の発現を免疫プロット法および/または免疫検出法によって検出および/または定量する。

#### 【0284】

細胞中のヒトA B C C 1 2 c D N Aのインビトロでの発現：

H E K 2 9 3系およびC O S - 7系の各細胞 (American Tissue Culture Collection、Bethesda、MD、USA)、ならびにタンジール病患者または低リポタンパク血症に罹った患者由来の初代培養物中の線維芽細胞に、リポフェクトアミン (BRL、Gaithersburg、M D、USA) を用いて、あるいは塩化カルシウムを利用した共沈殿 (Chen等、1987、Mol Cell Biol., 7: 2745~2752) によって発現ベクター p C M V - A B C C 1 2 (5 ~ 25 μg) を形質移入する。

これらの細胞をベクター p A B C C 1 2 - A d V (感染の指数 (Index of infection)、M O I = 10) で感染させることもできる。

ヒトA B C C 1 2の発現は、形質移入された細胞および/または感染細胞を用いて、免疫プロット法ならびにa p o A - 1により誘導されるコレステロールの流出量の定量によってモニターすることができる。

#### 【0285】

様々な動物モデルにおけるA B C C 1 2遺伝子のインビボでの発現：

実験0日目に、 $10^8 \sim 10^9$ 溶解プラーク形成単位 (p f u) を含む精製組換えアデノウイルス (p A B C A - A d Vまたはp L u c i f - A d V) を含有する適切な量 (100 ~ 300 μl) の培地を、マウス (C 5 7 B L / 6、対照マウスおよびトランスジェニック・マウス・モデルまたはノックアウト・マウス・モデル) の伏在静脈中に注入する。コレステロールまたは炎症性脂質の輸送におけるA B C C 1 2タンパク質の生理上の役割を、アデノウイルスの投与前 (0日) と投与後 (2、4、7、10、14日) のコレステロールまたは適切な炎症性脂質の総量を測定することによって評価する。

#### 【0286】

コレステロールおよび炎症性脂質の輸送に対するA B C C 1 2遺伝子発現の効果を評価するために、放射性標識された産物を利用した動力学的研究を、ベクター r L u c i f - A d Vおよびr A B C A - A d Vの投与から5日後に実施する。

また、Vaisman (1995) およびHoeg (1996) の教示に従い、A B C C 1 2、C M V、またはa p o Eなど内在性プロモーターの制御下にあるヒトA B C C 1 2 c D N Aを含む構築体を用いて、A B C C 1 2遺伝子を過剰発現するトランスジェニック・マウスおよびトランスジェニック・ウサギを生産することができる。

#### 【0287】

本発明は、本明細書に記載する特定の実施形態によってその範囲を限定されるものではない。実際、本明細書に記載する実施形態に加えて様々な本発明の変形が、前述の説明および添付した図面から当業者には明白になるはずである。このような変形は添付した特許請求の範囲の範囲内に含まれるものである。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0288】

【図1】A B C C 1 1、A B C C 1 2長鎖アイソフォーム、およびA B C C 5タンパク質の配列を示す図である。同一アミノ酸を影付きで、ギャップをピリオドで示す。Walker AおよびBモチーフ、およびA B C輸送体ファミリー・シグネチャ配列 (signature sequence) Cは、下線を引きそれぞれの文字で標識してある。Genetics Computer Group Package中のP I L E U Pプログラムを用いてアミノ酸配列を並べた。膜貫通セグメント候補を太字で示す。

【図2】16番染色体の物理地図、ならびにヒトA B C C 1 2遺伝子およびA B C C 1 1遺伝子の局在化を示す図である。マーカーD 1 6 S 3 0 9 3とD 1 6 S 4 0 9が隣接した

10

20

30

40

50

ヒト A B C C 1 2 遺伝子と A B C C 1 1 遺伝子は約 2 0 0 k b 離れており、頭 - 尾形式で構成され、これらの 5' 末端は動原体に面している。I C C A 遺伝子座、P K C 遺伝子座、およびそれらの重複する遺伝子座を角括弧で示す。A B C C 1 1 遺伝子および A B C C 1 2 遺伝子をそれぞれ灰色および黒の矢印で示す。

【図 3】ヒト A B C C 1 2 遺伝子のヒト M u l t i p l e T i s s u e c D N A ( M T C ( 商 標 )、Clontech) 上での P C R による発現プロファイルを示す図である。各レーンは、16 個のヒト組織 / 細胞からの正規化された第一鎖 (first-strand) c D N A を含む。すなわち、レーン 1 ~ 66 は、それぞれ心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、筋、腎臓、すい臓、ひ臓、胸腺、精巣、卵巣、腸、結腸、白血球、および前立腺の c D N A である。N は負の対照であり、M はマーカー (1 k b P l u s D N A L a d d e r) のレーンである。以下のプライマー対は特定の遺伝子産物を増幅した：A B C C 1 2 : 順方向 5' - G G T G A C A G A C A A G C G A G T T C A G A C A A T G - 3'、逆方向 5' - C T T T G C T C C T C T G G G C C A G T G - 3'。

10

【図 4】A B C C 1 2 遺伝子および A B C C 1 1 遺伝子のスプライシング・パターンを示す図である。空白の枠はエクソンを示し、縦の線はスプライス部位を示す。各遺伝子のエクソン数を図の上下に示す。塗りつぶした枠は、A B C ドメインをコードするエクソンである。

【図 5】A B C C サブファミリーの遺伝子の系統的关系を示す図である。C L U S T A L W プログラムを用いて、A B C C サブファミリー・メンバーすべての完全なタンパク質配列を並べた。相違の程度 (distance measure) をアミノ酸当たりの置換数で示す。

20

## 【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
31 October 2002 (31.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/085943 A2**(51) International Patent Classification: C07K 14/705,  
C12N 15/85, 15/861, 15/10, 15/12, C07K 16/28, C12Q  
1/68, A61K 48/00, 38/16, G01N 33/50, A61L 27/38**Michael** [US/US]; 1362 Hitchinpost Lane, Frederick, MD  
(US). **ALLIKMETTS, Rando** [US/US]; 8-J Lamplight  
Village Road, Nonroc, NY 10950 (US).

(21) International Application Number: PCT/EP02/03320

(74) Agent: **LECCA, Patricia**; Aventis Pharma S.A., Direc-  
tion brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony  
Cedex (FR).

(22) International Filing Date: 5 March 2002 (05.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/272,759 5 March 2001 (05.03.2001) US

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GI, GH,  
GM, HN, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(71) Applicants (for all designated States except US): **AVEN-  
TIS PHARMA S.A.** [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron,  
F-92160 Antony (FR). **THE GOVERNMENT OF THE  
UNITED STATES OF AMERICA** [US/US]; U.S. De-  
partment of Health and Human Services, 200 Independence  
Avenue, Washington, DC 20201 (US).(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **ROSIER-MON-  
TUS, Marie-Francoise** [FR/FR]; 21, rue des Baconnets,  
F-92160 Antony (FR). **PRADES, Catherine** [FR/FR];  
30, avenue du Général De Gaulle, F-94320 Thiais (FR).  
**ARNOULD-REGUIGNE, Isabelle** [FR/FR]; 112,  
rue de Bry, F-94430 Chennevières Sur Marne (FR).  
**DENEFLÉ, Patrice** [FR/FR]; 45, avenue des Fusillés  
de Chateaubriand, F-94100 Saint-Maur (FR). **DEAN,**

Published:

— without international search report and to be republished  
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/085943 A2

(54) Title: NUCLEIC ACIDS OF THE HUMAN ABCC12 GENE, VECTORS CONTAINING SUCH NUCLEIC ACIDS AND  
USES THEREOF(57) Abstract: The present invention relates to a novel human ABCC12 gene as well as the cDNAs encoding the novel short and  
long of ABCC12 proteins isoforms. The invention also relates to vectors and recombinant host cells comprising such nucleic acids,  
nucleotide probes and primers, and means for the detection of polymorphisms and mutations in the ABCC12 gene or in the corre-  
sponding proteins isoforms produced by the allelic form of the ABCC12 gene.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

**NUCLEIC ACIDS OF THE HUMAN ABCC12 GENE, VECTORS CONTAINING  
SUCH NUCLEIC ACIDS AND USES THEREOF**

The present invention relates to a novel gene, designated ABCC12 and cDNAs encoding novel ABCC12 proteins. The invention also relates to vectors and recombinant host cells, nucleotide probes and primers, as well as means for the detection of polymorphisms in general, and mutations in particular in the ABCC12 gene or corresponding proteins produced by the allelic form of the ABCC12 gene.

The ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily is one of the largest gene families and encodes a functionally diverse group of membrane proteins involved in energy-dependent transport of a wide variety of substrates across membranes (Dean et al., *Curr Opin Genet Dev*, 1995, 5, 779-85). The active transporter proteins constitute a family of proteins that are extremely well conserved during evolution, from bacteria to humans (Ames and Lecar, *FASEB J.*, 1992, 6, 2660-2666). The ABC proteins are involved in extra- and intracellular membrane transport of various substrates, for example ions, amino acids, peptides, sugars, vitamins or steroid hormones. Among the 40 characterized humans members, 11 members have been described as associated with human disease, such as *inter alia* ABCA1, ABCA4 (ABCR) and ABCC7 (CFTR) which are thought to be involved in Tangier disease (Bodzioch M et al., *Nat. Genet.*, 1999, 22(4) ; 347-351; Brooks-Wilson et al., *Nat Genet*, 1999, 22(4), 336-345 ; Rust S et al., *Nat. Genet.*, 1999, 22, 352-355; Remaley A T et al., ), the Stargardt disease (Lewis R A et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1999, 64, 422-434), and the Cystic Fibrosis (Riordan JM et al., *Science*, 1989, 245, 1066-1073), respectively. These implications reveal the importance of the functional role of the ABC gene family and the discovery of new family gene members should provide new insights into the physiopathology of human diseases.

The prototype ABC protein binds ATP and uses the energy from ATP hydrolysis to drive the transport of various molecules across cell membranes. Most ABC functional proteins from eukaryotes encode full-transporter, each consisting of two ATP-binding domains (nucleotide binding fold, NBF) and two transmembrane (TM) domains. Most full-transporters are arranged in a TM-NBF-TM-NBF fashion (Dean et al., *Curr Opin Genet*, 1995, 5, 79-785).

Analysis of amino acids sequence alignments of the ATP-binding domains has allowed the ABC genes to be separated into sub-families (Allikmets et al., *Hum Mol Genet*,

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

2

1996, 5, 1649-1655). Currently, according to the recent HUGO classification, seven ABC gene sub-families named ABC A to G have been described in the human genome, i.e., ABCA (ABCA1 subfamily), ABCB (MDR/TAP subfamily), ABCC (CFTR/MRP subfamily), ABCD (ALD subfamily), ABCE (OABP subfamily), ABCF (GCN20 subfamily), and ABCG (white subfamily). For the most part these subfamilies contain genes that also display considerable conservation in the transmembrane domain sequences and have similar gene organization. However, ABC proteins transport very various substrates, and some members of different subfamilies have been shown to share more similarity in substrate recognition than do proteins within same subfamily. Five of the subfamilies are also represented in the yeast genome, indicating that these groups have been and retained early in the evolution of eukaryotes (Decotignies et al., *Nat Genet*, 1997, 137-45; Michaelis et al., 1995, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Several ABC transport proteins that have been identified in humans are associated with various diseases. Some multiple drug resistance phenotypes in tumor cells have been associated with the gene encoding the MDR (multi-drug resistance) protein, which also has an ABC transporter structure. Other ABC transporters have been associated with neuronal and tumor conditions (US Patent No. 5,858,719) or potentially involved in diseases caused by impairment of the homeostasis of metals (Biochim Biophys Acta. 1999 Dec 6;1461(2):18-404).

The human ABCC subfamily currently has ten identified members (ABCC1 to 10), seven of which are from the multidrug resistance-like (MRP) subgroup, two from the sulfonylurea receptor (SUR) subgroup, and the *CFTR* gene. MRP-like proteins are organic anion transporters; i.e., they transport anionic drugs, exemplified by methotrexate (MTX), as well as neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as glutathione (GSH), glucuronate, or sulfate, and play a role in resistance to nucleoside analogs (Cui et al., *Mol Pharmacol*, 1999, 55, 929-37; Kool et al., *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96, 6914-9; Schuetz et al., *Nat Med*, 1999, 5, 1048-51; Wijnholds et al., *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97, 7476-81). More specifically, ABCC1, ABCC2 and ABCC3 transport drugs conjugated to GSH, glucuronate, sulfate and other organic anions, such as MTX, whereas ABCC4 and ABCC5 proteins confer resistance to nucleotide analogs, including PMEA and purine base analogs. Several genetic variations in some ABCC subfamily members have been identified as associated with various human inherited diseases. For example, cystic fibrosis is caused by mutations in the *ABCC7* gene or *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

3

regulator) gene (Riordan et al., *Science*, 1989, 245, 1066-73). Another member of the ABCC subfamily, the ABCC2 gene, has been associated with the Dubin-Johnson syndrome (Wada et al., *Hum Mol Genet*, 1998, 7, 203-7). Also, mutations in the coding sequence of another gene belonging to the ABCC subfamily, the ABCC6 gene, have been recently

5 identified as responsible of the phenotype of pseudoxanthoma elasticum (Bergen et al., *Nat. Genet.*, 2000, 25, 228-31 ; Le Saux et al., *Nat Genet*, 2000, 25, 223-7), which is a genetic disorder of the connective tissue. Likewise, a receptor of sulfonylureas, ABCC8 or SUR1, appears to be involved in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy (Thomas et al., *Science*, 1995, 268, 426-9).

10 Therefore, characterization of a new gene from the ABCC subfamily is likely to yield a biologically important transporter that may have a translocase activity and may play a major role in human pathologies.

The applicants have discovered and characterized a novel gene belonging to the ABCC protein sub-family, which has been designated ABCC12. Different transcripts

15 isoforms have been identified since the ABCC12 gene has two different splicing forms. Consequently, two different mRNAs ABCC12 were found to be expressed in humans. The two messengers which result of alternative splicing encode two ABCC12 proteins having 3 amino acid difference in length, one is designated the long ABCC12 protein isoform, while the other is designated the short ABCC12 protein isoform. The newly discovered gene also

20 shows considerable conservation of the amino acid sequences, particularly within the transmembrane region (TM) and the ATP-binding regions (NBD), and have a similar gene organization. In particular, this gene appears to be closely related to other ABCC subfamily members such as ABCC5, ABCC2 and ABCC3, particularly in the ATP-binding domain, and more particularly in the C-terminal ATP binding domains. The ABCC12 proteins, as

25 well as ABCC4 and ABCC5, is smaller than another well-known member of the subgroup, ABCC1 (MRP1), appearing to lack the extra N-terminal domain (Borst et al., *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92, 1295-302), which is however not required for the transport function (Bakos et al., *J. Biol. Chem*, 1998, 273, 32167-75). Since structurally related ABC proteins often transport similar substrates across the membranes, it would be reasonable to suggest

30 that the ABCC12 proteins could share functional similarities with ABCC 4 and/or ABCC5 genes, *i.e.*, the resistance to nucleotide analogs, such as PMEA, and purine base analogs (Schuetz et al., *Nat Med*, 1999 5, 1048-51 ; Wijnholds et al., *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97, 7476-81).



WO 02/085943

PCT/EP02/03320

4

Furthermore, the applicants have mapped the novel gene ABCC12 in a region located in the 16q12 locus of the human chromosome 16, which is a region statistically linked with a genetic pathology designated paroxysmal kinesigenic choreoathetosis (Tomita et al., *Am J Hum Genet*, 1999, 65, 1688-97; Bennett et al., 2000). This result supports the hypothesis that ABCC12 represents a positional candidate for this disorder and thus that the ABCC12 gene may be one causing gene for the clinical phenotype of paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis (PKC), the most frequent type of paroxysmal dyskinesia, is a disorder characterized by recurrent, frequent attacks of involuntary movements and postures, including chorea and dystonia, induced by sudden voluntary movements, stress, or excitement (Swoboda et al., *Neurology*, 2000, 55, 224-30). The onset is in childhood or early adolescence, the frequency and severity diminish with age, and it responds to treatment with anticonvulsants. PKC occurs in familial and sporadic forms and affects more males than females. In most families, it is inherited as an autosomal dominant trait with incomplete penetrance. The gene locus has been mapped to human chromosome 16q11-12 (Tomita et al. (1999) *Am. J. Hum. Genet.* 65, 1588-1697; Bennett et al. (2000) *Neurology*, 54, 125-130).

An overlapping locus has been predicted to contain the gene for infantile convulsions with paroxysmal choreoathetosis (ICCA) (Lee et al., (1998) *Hum. Genet.* 103, 608-612). The Applicants have further determined expression pattern of the ABCC12 gene by PCR and by EST database mining that suggests that the ABCC12 gene is expressed in tissues such as CNS which is potentially involved in the etiology of PKC.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a nucleic acid of the human ABCC12 gene, cDNAs, and protein isoforms, which are likely to be involved in the transport of organic anion transporters, such as cysteinyl leukotriene, anionic drugs, such as methotrexate, as well as neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as glutathione (GSH), glucuronate, or sulfate, or in the pathology whose candidate chromosomal region is situated on chromosome 16, more precisely on the 16q arm and still more precisely in the 16q12 locus for paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

Thus, a first subject of the invention is a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

5

The invention also relates to a nucleic acid comprising at least 8 consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of a) any one of SEQ ID NOs: 1-32 or a complementary nucleotide sequence thereof.

5 The invention also relates to a nucleic acid having at least 80% nucleotide identity with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a nucleic acid having at least 85%, preferably 90%, more preferably 95% and still more preferably 98% nucleotide identity with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary  
10 nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a nucleic acid hybridizing, under high stringency conditions, with a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a nucleic acid, particularly cDNA molecules, which  
15 encode the short and long human ABCC12 proteins isoforms. Thus, the invention relates to nucleic acids comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NO: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted in any one of SEQ ID NO: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

20 According to the invention, a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, which encodes a short ABCC12 polypeptide isoform of 1356 amino acids comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 33.

According to the invention, a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 2, which encodes a long ABCC12 polypeptide isoform of 1359 amino acids  
25 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 34.

Thus, the invention also relates to a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 33.

Thus, the invention also relates to a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 34.

30 Thus, the invention also relates to a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 33.

Thus, the invention also relates to a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 34.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

6

The invention also relates to a polypeptide comprising an amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 33.

The invention also relates to a polypeptide comprising an amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 34.

5 The invention also relates to a means for detecting polymorphisms in general, and mutations in particular, in the ABCC12 gene or in the corresponding proteins produced by the allelic forms of these genes.

According to another aspect, the invention also relates to the nucleotide sequences of ABCC12 gene comprising at least one biallelic polymorphism such as for example a  
10 substitution, addition or deletion of one or more nucleotides.

Nucleotide probes and primers hybridizing with a nucleic acid sequence located in the region of the ABCC12 nucleic acid (genomic DNA, messenger RNA, cDNA), in particular, a nucleic acid sequence comprising any one of the mutations or polymorphisms.

The nucleotide probes or primers according to the invention comprise at least 8  
15 consecutive nucleotides of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

Preferably, nucleotide probes or primers according to the invention will have a length of 10, 12, 15, 18 or 20 to 25, 35, 40, 50, 70, 80, 100, 200, 500, 1000, 1500 consecutive nucleotides of a nucleic acid according to the invention, in particular of a nucleic acid  
20 comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

Alternatively, a nucleotide probe or primer according to the invention will consist of and/or comprise fragments having a length of 12, 15, 18, 20, 25, 35, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 consecutive nucleotides of a nucleic acid according to the invention, more particularly of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary  
25 nucleotide sequence thereof.

The definition of a nucleotide probe or primer according to the invention therefore covers oligonucleotides which hybridize, under the high stringency hybridization conditions defined above, with a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

30 The preferred probes and primers according to the invention comprise all or part of a nucleotide sequence comprising any one of SEQ ID NOs: 35-46, or a complementary nucleotide sequence thereof.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

7

The nucleotide primers according to the invention may be used to amplify a nucleic acid according to the invention, and more particularly a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

According to the invention, some nucleotide primers specific for an ABCC12 gene,  
5 may be used to amplify a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1 or 2, and comprise a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 35-46, or a complementary nucleotide sequence thereof.

Another subject of the invention relates to a method of amplifying a nucleic acid according to the invention, and more particularly a nucleic acid comprising any one of SEQ  
10 ID NOs: 1-32, a complementary nucleotide sequence thereof, a nucleic acid as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof, contained in a sample, said method comprising the steps of:

a) bringing the sample in which the presence of the target nucleic acid is suspected into contact with a pair of nucleotide primers whose hybridization position is located respectively  
15 on the 5' side and on the 3' side of the region of the target nucleic acid whose amplification is sought, in the presence of the reagents necessary for the amplification reaction; and

b) detecting the amplified nucleic acids.

The present invention also relates to a method of detecting the presence of a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary  
20 nucleotide sequence thereof, or a nucleic acid fragment or variant of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof in a sample, said method comprising the steps of:

1) bringing one or more nucleotide probes according to the invention into contact with the sample to be tested;

25 2) detecting the complex which may have formed between the probe(s) and the nucleic acid present in the sample.

According to a specific embodiment of the method of detection according to the invention, the oligonucleotide probes are immobilized on a support.

According to another aspect, the oligonucleotide probes comprise a detectable marker.

30 Another subject of the invention is a box or kit for amplifying all or part of a nucleic acid comprising a) any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof, or b) as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-32 or of a complementary nucleotide sequence thereof, said box or kit comprising:

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

8

1) a pair of nucleotide primers in accordance with the invention, whose hybridization position is located respectively on the 5' side and 3' side of the target nucleic acid whose amplification is sought; and optionally,

2) reagents necessary for an amplification reaction.

5 Such an amplification box or kit will preferably comprise at least one pair of nucleotide primers as described above.

The invention also relates to a box or kit for detecting the presence of a nucleic acid according to the invention in a sample, said box or kit comprising:

a) one or more nucleotide probes according to the invention;

10 b) appropriate reagents necessary for a hybridisation reaction.

According to a first aspect, the detection box or kit is characterized in that the nucleotide probe(s) and primer(s) are immobilized on a support.

According to a second aspect, the detection box or kit is characterized in that the nucleotide probe(s) and primer(s) comprise a detectable marker.

15 According to a specific embodiment of the detection kit described above, such a kit will comprise a plurality of oligonucleotide probes and/or primers in accordance with the invention which may be used to detect target nucleic acids of interest or alternatively to detect mutations in the coding regions or the non-coding regions of the nucleic acids according to the invention. According to preferred embodiment of the invention, the target nucleic acid  
20 comprises a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleic acid sequence. Alternatively, the target nucleic acid is a nucleic acid fragment or variant of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleotide sequence.

According to another preferred embodiment, a primer according to the invention  
25 comprises, generally, all or part of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary sequence thereof.

The invention also relates to a recombinant vector comprising a nucleic acid according to the invention. Preferably, such a recombinant vector will comprise a nucleic acid selected from the group consisting of

30 a) a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof,

b) a nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof,

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

9

c) a nucleic acid having at least eight consecutive nucleotides of a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof;

5 d) a nucleic acid having at least 80% nucleotide identity with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof;

e) a nucleic acid having 85%, 90%, 95%, or 98% nucleotide identity with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof;

10 f) a nucleic acid hybridizing, under high stringency hybridization conditions, with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence; and

g) a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of any one of SEQ ID NO: 33 and 34.

15 According to a first embodiment, a recombinant vector according to the invention is used to amplify a nucleic acid inserted therein, following transformation or transfection of a desired cellular host.

According to a second embodiment, a recombinant vector according to the invention corresponds to an expression vector comprising, in addition to a nucleic acid in accordance with the invention, a regulatory signal or nucleotide sequence that directs or controls transcription and/or translation of the nucleic acid and its encoded mRNA.

According to a preferred embodiment, a recombinant vector according to the invention will comprise in particular the following components:

25 (1) an element or signal for regulating the expression of the nucleic acid to be inserted, such as a promoter and/or enhancer sequence;

(2) a nucleotide coding region comprised within the nucleic acid in accordance with the invention to be inserted into such a vector, said coding region being placed in phase with the regulatory element or signal described in (1); and

30 (3) an appropriate nucleic acid for initiation and termination of transcription of the nucleotide coding region of the nucleic acid described in (2).

The present invention also relates to a defective recombinant virus comprising a cDNA nucleic acid encoding any one of short or long isoform of the ABCC12 polypeptide, involved in the transport of various substances, or in the pathology whose candidate chromosomal

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

10

region is situated on chromosome 16, more precisely on the 16q arm and still more precisely in the 16q12 locus for paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

In another preferred embodiment of the invention, the defective recombinant virus comprises a gDNA nucleic acid encoding any one of the ABCC12 polypeptides isoforms involved in paroxysmal kinesigenic choreoathetosis. Preferably, the ABCC12 polypeptides short and long isoforms comprise amino acid sequences of SEQ ID NO: 33 and 34, respectively.

In another preferred embodiment, the invention relates to a defective recombinant virus comprising a nucleic acid encoding the short or long ABCC12 polypeptide isoform under the control of a promoter chosen from RSV-LTR or the CMV early promoter.

According to a specific embodiment, a method of introducing a nucleic acid according to the invention into a host cell, in particular a host cell obtained from a mammal, *in vivo*, comprises a step during which a preparation comprising a pharmaceutically compatible vector and a "naked" nucleic acid according to the invention, placed under the control of appropriate regulatory sequences, is introduced by local injection at the level of the chosen tissue, for example a smooth muscle tissue, the "naked" nucleic acid being absorbed by the cells of this tissue.

According to a specific embodiment of the invention, a composition is provided for the *in vivo* production of any one of the ABCC12 proteins isoforms. This composition comprises a nucleic acid encoding the ABCC12 polypeptides isoforms placed under the control of appropriate regulatory sequences, in solution in a physiologically acceptable vehicle and/or excipient.

Therefore, the present invention also relates to a composition comprising a nucleic acid encoding the short or long isoform of the ABCC12 polypeptide comprising an amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 33 or 34, wherein the nucleic acid is placed under the control of appropriate regulatory elements.

Consequently, the invention also relates to a pharmaceutical composition intended for the prevention of or treatment of a patient or subject affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis comprising a nucleic acid encoding any one of the short or long ABCC12 protein isoform, in combination with one or more physiologically compatible excipients.

Preferably, such a composition will comprise a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs:1-32, wherein the nucleic acid is placed under the control of an appropriate regulatory element or signal.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

11

In addition, the present invention is directed to a pharmaceutical composition intended for the prevention or treatment of a patient or a subject affected by a pathology located on the chromosome 16q12, such as the paroxysmal kinesigenic choreoathetosis, comprising a recombinant vector according to the invention, in combination with one or more  
5 physiologically compatible excipients.

The invention also relates to the use of a nucleic acid according to the invention encoding the short or long ABCC12 protein isoform for the manufacture of a medicament intended for the prevention of a pathology located on the chromosome locus 16q12, or more particularly for the treatment of subjects affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis

10 The invention also relates to the use of a recombinant vector according to the invention comprising nucleic acids encoding any one of ABCC12 proteins isoforms for the manufacture of a medicament intended for the prevention of a pathology located on the chromosome locus 16q12 or more particularly for the treatment of subjects affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

15 The subject of the invention is therefore also a recombinant vector comprising nucleic acids according to the invention that encode any one of ABCC12 proteins or polypeptides isoforms involved in the paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

The invention also relates to the use of such a recombinant vector for the preparation of a pharmaceutical composition intended for the treatment and/or for the prevention of  
20 diseases or conditions associated with deficiency of the ABCC12 gene and with a pathology located on the chromosome locus 16q12.

The present invention also relates to the use of cells genetically modified *ex vivo* with such a recombinant vector according to the invention, or cells producing a recombinant vector, wherein the cells are implanted in the body, to allow a prolonged and effective  
25 expression *in vivo* of any biologically active ABCC12 polypeptides isoforms.

The invention also relates to the use of nucleic acids according to the invention encoding the ABCC12 proteins isoforms for the manufacture of a medicament intended for the prevention and/or the treatment of subjects affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

30 The invention also relates to the use of a recombinant vector according to the invention comprising nucleic acids encoding the ABCC12 polypeptides isoforms according to the invention for the manufacture of a medicament intended for the prevention and/or the treatment of subjects affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.



WO 02/085943

PCT/EP02/03320

12

The invention also relates to the use of a recombinant host cell according to the invention, comprising nucleic acids encoding the ABCC12 polypeptides isoforms according to the invention for the manufacture of a medicament intended for the prevention and/or the treatment of subjects affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

5 The present invention also relates to the use of a recombinant vector according to the invention, preferably a defective recombinant virus, for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment and/or prevention of pathologies linked to the dysfunction of the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH, glucuronate, or sulfate conjugated drugs.

10 The invention relates to the use of such a recombinant vector or defective recombinant virus for the preparation of a pharmaceutical composition intended for the treatment and/or for the prevention of a pathology located on the chromosome locus 16q12, such as PKC. Thus, the present invention also relates to a pharmaceutical composition comprising one or more recombinant vectors or defective recombinant viruses according to

15 the invention.

The present invention also relates to the use of cells genetically modified *ex vivo* with a virus according to the invention, or the use cells producing such viruses, implanted in the body, allowing a prolonged and effective expression *in vivo* of any one biologically active ABCC12 proteins.

20 The present invention shows that it is possible to incorporate a nucleic acid encoding ABCC12 polypeptides isoforms according to the invention into a viral vector, and that these vectors make it possible to effectively express a biologically active, mature polypeptide. More particularly, the invention shows that the *in vivo* expression of the isoforms of ABCC12 proteins may be obtained by direct administration of an adenovirus or by implantation of a

25 producing cell or of a cell genetically modified by an adenovirus or by a retrovirus incorporating such a nucleic acid.

In this regard, another subject of the invention relates to any mammalian cell infected with one or more defective recombinant viruses according to the invention. More particularly, the invention relates to any population of human cells infected with these viruses. These may

30 be in particular cells of blood origin (totipotent stem cells or precursors), fibroblasts, myoblasts, hepatocytes, keratinocytes, smooth muscle and endothelial cells, glial cells and the like.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

13

Another subject of the invention relates to an implant comprising mammalian cells infected with one or more defective recombinant viruses according to the invention or cells producing recombinant viruses, and an extracellular matrix. Preferably, the implants according to the invention comprise  $10^5$  to  $10^{10}$  cells. More preferably, they comprise  $10^6$  to  $10^8$  cells.

More particularly, in the implants of the invention, the extracellular matrix comprises a gelling compound and optionally, a support allowing the anchorage of the cells.

The invention also relates to a recombinant host cell comprising a nucleic acid of the invention, and more particularly, a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NO: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a recombinant host cell comprising a nucleic acid of the invention, and more particularly a nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted in any one SEQ ID NO: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

According to another aspect, the invention also relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector according to the invention. Therefore, the invention also relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector comprising any of the nucleic acids of the invention, and more particularly a nucleic acid comprising any one nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

Specifically, the invention relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector comprising a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector comprising a nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector comprising a nucleic acid encoding a polypeptide comprising any one amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34.

The invention also relates to a method for the production of a polypeptide comprising an amino acid sequence of any one of SEQ ID NOs: 33 or 34, or of a peptide fragment or a variant thereof, said method comprising the steps of:

a) inserting a nucleic acid encoding said polypeptide into an appropriate vector;

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

14

b) culturing, in an appropriate culture medium, a previously transformed host cell or transfecting a host cell with the recombinant vector of step a);

c) recovering the conditioned culture medium or lysing the host cell, for example by sonication or by osmotic shock;

5 d) separating and purifying said polypeptide from said culture medium or alternatively from the cell lysates obtained in step c); and

e) where appropriate, characterizing the recombinant polypeptide produced.

A polypeptide termed "homologous" to a polypeptide having an amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 33 or 34 also forms part of the invention. Such a homologous  
10 polypeptide comprises an amino acid sequence possessing one or more substitutions of an amino acid by an equivalent amino acid.

The ABCC12 polypeptide isoforms according to the invention, in particular 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of any one SEQ ID NO: 33 or 34, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of any  
15 one of SEQ ID NO: 33 or 34, or 3) a polypeptide termed "homologous" to a polypeptide comprising amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 33 or 34.

In a specific embodiment, an antibody according to the invention is directed against 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of any one SEQ ID NO: 33 or 34, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of  
20 selected from SEQ ID NO: 33 or 34, or 3) a polypeptide termed "homologous" to a polypeptide comprising amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 33 or 34. Such antibody is produced by using the trioma technique or the hybridoma technique described by Kozbor et al. (*Immunology Today* (1983) 4:72).

Thus, the subject of the invention is, in addition, a method of detecting the presence of  
25 any one of the polypeptides according to the invention in a sample, said method comprising the steps of:

a) bringing the sample to be tested into contact with an antibody directed against 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of any one of SEQ ID NO: 33 or 34, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence selected  
30 from SEQ ID NOs: 33 or 34, 3) a polypeptide termed "homologous" to a polypeptide comprising amino acid sequence of any one of SEQ ID NO: 33 or 34, and

b) detecting the antigen/antibody complex formed.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

15

The invention also relates to a box or kit for diagnosis or for detecting the presence of any one of polypeptide in accordance with the invention in a sample, said box comprising:

- a) an antibody directed against 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of any one of SEQ ID NOs: 33 or 34, or 3) a polypeptide "homologous" to a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34, and
- b) a reagent allowing the detection of the antigen/antibody complexes formed.

The invention also relates to a pharmaceutical composition comprising a nucleic acid according to the invention.

- 10 The invention also provides pharmaceutical compositions comprising a nucleic acid encoding any one of ABCC12 polypeptide isoforms according to the invention and pharmaceutical compositions comprising the ABCC12 polypeptides according to the invention intended for the treatment of a pathology located on the chromosome locus 16q12, such as the paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

- 15 The present invention also relates to a new therapeutic approach for the treatment of pathologies located on the chromosome locus 16q12, such as the paroxysmal kinesigenic choreoathetosis, comprising transferring and expressing *in vivo* a nucleic acid encoding the ABCC12 protein isoforms according to the invention.

- 20 Thus, the present invention offers a new approach for the treatment and/or prevention of pathologies located on the chromosome locus 16q12, such as the paroxysmal kinesigenic choreoathetosis in a patient or subject. Specifically, the present invention provides methods to restore or promote the deficiency of the gene causing such pathology.

- 25 Consequently, the invention also relates to a pharmaceutical composition intended for the prevention and/or treatment of subjects affected by, a dysfunction of the gene located on the chromosome locus 16q12, such as paroxysmal kinesigenic choreoathetosis, comprising a nucleic acid encoding the ABCC12 protein isoforms, in combination with one or more physiologically compatible vehicle and/or excipient.

- 30 According to a specific embodiment of the invention, a composition is provided for the *in vivo* production of any one of the ABCC12 proteins. This composition comprises a nucleic acid encoding any one of the ABCC12 polypeptides placed under the control of appropriate regulatory sequences, in solution in a physiologically compatible vehicle and/or excipient.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

16

Therefore, the present invention also relates to a composition comprising a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of any one of SEQ ID NO: 33 or 34, wherein the nucleic acid is placed under the control of appropriate regulatory elements.

5 Preferably, such a composition will comprise a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NO: 1-32, placed under the control of appropriate regulatory elements.

The invention also relates to a pharmaceutical composition intended for the prevention of or treatment of subjects affected by a dysfunction of the transport of anionic drugs, such as  
10 methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH, glucuronate, or sulfate conjugated drugs, comprising a recombinant vector according to the invention, in combination with one or more physiologically compatible vehicle and/or excipient.

According to another aspect, the subject of the invention is also a preventive or curative therapeutic method of treating diseases caused by a deficiency of the transport of  
15 anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH, glucuronate, or sulfate, such a method comprising administering to a patient a nucleic acid encoding one ABCC12 polypeptide isoform according to the invention, said nucleic acid being combined with one or more physiologically appropriate vehicles and/or excipients.

The invention relates to a pharmaceutical composition for the prevention and/or  
20 treatment of a patient or subject affected by a dysfunction of the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH, glucuronate, or sulfate comprising a therapeutically effective quantity of a polypeptide having an amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 33 or 34, combined with one or more physiologically appropriate vehicles and/or excipients.

25 The invention also relates to a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of PKC comprising a therapeutically effective quantity of a polypeptide having an amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 33 or 34, combined with one or more physiologically appropriate vehicles and/or excipients.

The invention also relates to a pharmaceutical composition for the prevention and/or  
30 treatment of PKC, such a method comprising administering to a patient a nucleic acid encoding any one of the ABCC12 polypeptide isoform according to the invention, said nucleic acid being combined with one or more physiologically appropriate vehicles and/or excipients.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

17

According to a specific embodiment, a method of introducing at least a nucleic acid according to the invention into a host cell, in particular a host cell obtained from a mammal, *in vivo*, comprises a step during which a preparation comprising a pharmaceutically compatible vector and a "naked" nucleic acid according to the invention, placed under the control of appropriate regulatory sequences, is introduced by local injection at the level of the chosen tissue, for example a smooth muscle tissue, the "naked" nucleic acid being absorbed by the cells of this tissue.

According to yet another aspect, the subject of the invention is also a preventive or curative therapeutic method of treating diseases caused by a deficiency of the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH, glucuronate, or sulfate, such a method comprising administering to a patient a therapeutically effective quantity of any one of the ABCC12 polypeptides isoforms according to the invention, said polypeptide being combined with one or more physiologically appropriate vehicles and/or excipients.

The invention also provides methods for screening small molecules and compounds that act on any one of the ABCC12 protein isoforms to identify agonists and antagonists of such polypeptides that can restore or promote improved the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH, glucuronate, or sulfate to effectively cure and or prevent dysfunctions thereof. These methods are useful to identify small molecules and compounds for therapeutic use in the treatment of diseases due to a deficiency of the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH conjugated drugs, glucuronate, or sulfate.

Therefore, the invention also relates to the use of any one of ABCC12 polypeptides isoforms or a cell expressing the ABCC12 polypeptides according to the invention, for screening active ingredients for the prevention and/or treatment of diseases resulting from a dysfunction of the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH conjugated drugs, glucuronate, or sulfate.

The invention also relates to a method of screening a compound or small molecule, an agonist or antagonist of any one of ABCC12 polypeptides, said method comprising the following steps:

- a) preparing a membrane vesicle comprising any one of the ABCC12 polypeptides and a lipid substrate comprising a detectable marker;

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

18

b) incubating the vesicle obtained in step a) with an agonist or antagonist candidate compound;

c) qualitatively and/or quantitatively measuring release of the lipid substrate comprising a detectable marker; and

5 d) comparing the release measurement obtained in step b) with a measurement of release of a labelled lipid substrate by a vesicle that has not been previously incubated with the agonist or antagonist candidate compound.

In a first specific embodiment, the short and long ABCC12 polypeptides isoforms comprise SEQ ID NO: 33 or 34, respectively.

10 The invention also relates to a method of screening a compound or small molecule, an agonist or antagonist of any one of ABCC12 polypeptides, said method comprising the following steps:

a) obtaining a cell, for example a cell line, that, either naturally or after transfecting the cell with any one of ABCC12 encoding nucleic acids, expressing the corresponding ABCC12 polypeptides;

15 b) incubating the cell of step a) in the presence of an anion labelled with a detectable marker;

c) washing the cell of step b) in order to remove the excess of the labelled anion which has not penetrated into these cells;

20 d) incubating the cell obtained in step c) with an agonist or antagonist candidate compound for any one of ABCC12 polypeptides;

e) measuring efflux of the labelled anion; and

f) comparing the value of efflux of the labelled anion determined in step e) with a value of efflux of a labelled anion measured with cell which has not been previously incubated in the presence of the agonist or antagonist candidate compound for the ABCC12 polypeptides.

In a specific embodiment, the ABCC12 polypeptide comprises SEQ ID NO: 33 or 34.

#### **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

30

Figure 1: represents the alignment of ABCC11, ABCC12 (long isoform), and ABCC5 proteins. Identical amino acids are shaded, gaps are indicated by periods. Walker A and B motifs and the ABC transporter family signature sequence

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

19

C are underlined and labelled with respective letters. Amino acid sequences were aligned with the PILEUP program in the Genetics Computer Group Package. Potential transmembrane spanning segments are given in bold type.

5

Figure 2: represents the physical map of the chromosome 16 and localization of the human ABCC12 and ABCC11 genes. Human ABCC12 and ABCC11 genes, flanked by markers D1653093 and D165409, are separated by about 200kb, and organized in a head-to-tail fashion, with their 5' ends facing the centromere. Loci for ICCA, PKC, and their overlap, are defined by brackets. ABCC11 and ABCC12 genes are indicated by gray and black arrows, respectively.

10

Figure 3: represents the expression profiling of the human ABCC12 gene by PCR on human Multiple Tissue cDNA (MTC®, Clontech). Each lane contains normalized, first-strand cDNA from 16 human tissues/cells. Lanes 1-66 thus represent cDNA from heart, brain, placenta, lung, liver, muscle, kidney, pancreas, spleen, thymus, testis, ovary, intestine, colon, leukocyte, and prostate, respectively. N represents the negative control ; M represent the marker lane (1kb Plus DNA Ladder). The following primer pairs amplified specific gene products : ABCC12 : forward 5'-GGT GAC AGA CAA GCG AGT TCA GAC AAT G-3', reverse 5'-CTT TGC TCC TCT GGG CCA GTG-3'.

15

20

Figure 4: displays the splicing pattern of the ABCC12 and ABCC11 genes. Clear boxes represent exons, and vertical lines define splice sites. The exon numbers for each gene is shown both above and below the drawing. Filled boxes indicate the exons coding for ABC domains.

25

Figure 5: displays a phylogenetic relationship of genes in the ABCC subfamily. Complete protein sequences of all members of the ABCC subfamily were aligned with the CLUSTALW program. The distance measure is given in substitutions per amino acid.

30



**DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION****GENERAL DEFINITIONS**

5

The present invention contemplates isolation of a human gene encoding ABCC12 polypeptide of the invention, including a full length, or naturally occurring form of ABCC12 and any antigenic fragments thereof from any animal, particularly mammalian or avian, and more particularly human source.

10

In accordance with the present invention, conventional molecular biology, microbiology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art are used. Such techniques are fully explained in the literature (Sambrook et al., 1989, *Molecular cloning a laboratory manual*, 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York; Glover, 1985, *DNA Cloning: A practical approach*, volumes I and II oligonucleotide synthesis, MRL Press, LTD., Oxford, U.K.; Hames and Higgins, 1985, *Transcription and translation*; Hames and Higgins, 1984, *Animal Cell Culture*; Freshney, 1986, *Immobilized Cells And Enzymes*, IRL Press; and Perbal, 1984, *A practical guide to molecular cloning*).

15

As used herein, the term "gene" refers to an assembly of nucleotides that encode a polypeptide, and includes cDNA and genomic DNA nucleic acids.

20

The term "isolated" for the purposes of the present invention designates a biological material (nucleic acid or protein) which has been removed from its original environment (the environment in which it is naturally present).

25

For example, a polynucleotide present in the natural state in a plant or an animal is not isolated. The same nucleotide separated from the adjacent nucleic acids in which it is naturally inserted in the genome of the plant or animal is considered as being "isolated".

Such a polynucleotide may be included in a vector and/or such a polynucleotide may be included in a composition and remains nevertheless in the isolated state because of the fact that the vector or the composition does not constitute its natural environment.

30

The term "purified" does not require the material to be present in a form exhibiting absolute purity, exclusive of the presence of other compounds. It is rather a relative definition.

A polynucleotide is in the "purified" state after purification of the starting material or of the natural material by at least one order of magnitude, preferably 2 or 3 and preferably 4 or 5 orders of magnitude.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

21

For the purposes of the present description, the expression "nucleotide sequence" may be used to designate either a polynucleotide or a nucleic acid. The expression "nucleotide sequence" covers the genetic material itself and is therefore not restricted to the information relating to its sequence.

5 The terms "nucleic acid", "polynucleotide", "oligonucleotide" or "nucleotide sequence" cover RNA, DNA, or cDNA sequences or alternatively RNA/DNA hybrid sequences of more than one nucleotide, either in the single-stranded form or in the duplex, double-stranded form.

A "nucleic acid" is a polymeric compound comprised of covalently linked subunits called nucleotides. Nucleic acid includes polyribonucleic acid (RNA) and polydeoxyribonucleic acid (DNA), both of which may be single-stranded or double-stranded. DNA includes cDNA, genomic DNA, synthetic DNA, and semi-synthetic DNA. The sequence of nucleotides that encodes a protein is called the sense sequence or coding sequence.

15 The term "nucleotide" designates both the natural nucleotides (A, T, G, C) as well as the modified nucleotides that comprise at least one modification such as (1) an analog of a purine, (2) an analog of a pyrimidine, or (3) an analogous sugar, examples of such modified nucleotides being described, for example, in the PCT application No. WO 95/04 064.

For the purposes of the present invention, a first polynucleotide is considered as being "complementary" to a second polynucleotide when each base of the first nucleotide is paired with the complementary base of the second polynucleotide whose orientation is reversed. The complementary bases are A and T (or A and U), or C and G.

"Heterologous" DNA refers to DNA not naturally located in the cell, or in a chromosomal site of the cell. Preferably, the heterologous DNA includes a gene foreign to the cell.

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

Accordingly, the term "sequence similarity" in all its grammatical forms refers to the degree of identity or correspondence between nucleic acid or amino acid sequences of proteins

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

22

that may or may not share a common evolutionary origin (*see* Reeck et al., *supra*). However, in common usage and in the instant application, the term "homologous," when modified with an adverb such as "highly," may refer to sequence similarity and not a common evolutionary origin.

5 In a specific embodiment, two DNA sequences are "substantially homologous" or "substantially similar" when at least about 50% (preferably at least about 75%, and more preferably at least about 90 or 95%) of the nucleotides match over the defined length of the DNA sequences. Sequences that are substantially homologous can be identified by comparing the sequences using standard software available in sequence data banks, or in a Southern  
10 hybridization experiment under, for example, stringent conditions as defined for that particular system. Defining appropriate hybridization conditions is within the skill of the art. See, e.g., Maniatis et al., *supra*; Glover et al. (1985. DNA Cloning: A practical approach, volumes I and II oligonucleotide synthesis, MRL Press, Ltd, Oxford, U.K.); Hames and Higgins (1985. Transcription and Translation).

15 Similarly, in a particular embodiment, two amino acid sequences are "substantially homologous" or "substantially similar" when greater than 30% of the amino acids are identical, or greater than about 60% are similar (functionally identical). Preferably, the similar or homologous sequences are identified by alignment using, for example, the GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison,  
20 Wisconsin) pileup program.

The "percentage identity" between two nucleotide or amino acid sequences, for the purposes of the present invention, may be determined by comparing two sequences aligned optimally, through a window for comparison.

The portion of the nucleotide or polypeptide sequence in the window for comparison  
25 may thus comprise additions or deletions (for example "gaps") relative to the reference sequence (which does not comprise these additions or these deletions) so as to obtain an optimum alignment of the two sequences.

The percentage is calculated by determining the number of positions at which an identical nucleic base or an identical amino acid residue is observed for the two sequences  
30 (nucleic or peptide) compared, and then by dividing the number of positions at which there is identity between the two bases or amino acid residues by the total number of positions in the window for comparison, and then multiplying the result by 100 in order to obtain the percentage sequence identity.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

23

The optimum sequence alignment for the comparison may be achieved using a computer with the aid of known algorithms contained in the package from the company WISCONSIN GENETICS SOFTWARE PACKAGE, GENETICS COMPUTER GROUP (GCG), 575 Science Doctor, Madison, WISCONSIN.

5 By way of illustration, it will be possible to produce the percentage sequence identity with the aid of the BLAST software (versions BLAST 1.4.9 of March 1996, BLAST 2.0.4 of February 1998 and BLAST 2.0.6 of September 1998), using exclusively the default parameters (Altschul et al, 1990, . Mol. Biol., 215:403-410; Altschul et al, 1997, Nucleic  
10 "request" sequence, with the aid of the Altschul et al. algorithm. The request sequence and the databases used may be of the peptide or nucleic types, any combination being possible.

The term "corresponding to" is used herein to refer to similar or homologous sequences, whether the exact position is identical or different from the molecule to which the similarity or homology is measured. A nucleic acid or amino acid sequence alignment may  
15 include spaces. Thus, the term "corresponding to" refers to the sequence similarity, and not the numbering of the amino acid residues or nucleotide bases.

A gene encoding the ABCC12 polypeptides isoforms of the invention, whether genomic DNA or cDNA, can be isolated from any source, particularly from a human cDNA or genomic library. Methods for obtaining genes are well known in the art, as described above  
20 (*see, e.g.*, Sambrook et al., 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York).

Accordingly, any animal cell potentially can serve as the nucleic acid source for the molecular cloning of the ABCC12 gene. The DNA may be obtained by standard procedures known in the art from cloned DNA (*e.g.*, a DNA "library"), and preferably is obtained from a  
25 cDNA library prepared from tissues with high level expression of the protein and/or the transcripts, by chemical synthesis, by cDNA cloning, or by the cloning of genomic DNA, or fragments thereof, purified from the desired cell (*See, for example*, Sambrook et al., 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York; Glover, 1985, *DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II*  
30 *Oligonucleotide Synthesis*, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K).

Clones derived from genomic DNA may contain regulatory and intron DNA regions in addition to coding regions; clones derived from cDNAs will not contain intron sequences.

Whatever the source, the gene should be molecularly cloned into a suitable vector for propagation of the gene.

In the molecular cloning of the gene from genomic DNA, DNA fragments are generated, some of which will encode the desired gene. The DNA may be cleaved at specific sites using various restriction enzymes. Alternatively, one may use DNase in the presence of manganese to fragment the DNA, or the DNA can be physically sheared, as for example, by sonication. The linear DNA fragments can then be separated according to size by standard techniques, including but not limited to, agarose and polyacrylamide gel electrophoresis and column chromatography.

Once the DNA fragments are generated, identification of the specific DNA fragment containing the desired ABCC12 gene may be accomplished in a number of ways. For example, if an amount of a portion of the ABCC12 gene or its specific RNA, or a fragment thereof, is available and can be purified and labelled, the generated DNA fragments may be screened by nucleic acid hybridization to the labelled probe (Benton and Davis, *Science* (1977), 196:180; Grunstein et al., *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1975) 72:3961). For example, a set of oligonucleotides corresponding to the partial coding sequence information obtained for the ABCC12 proteins can be prepared and used as probes for DNA encoding the ABCC12, as was done in a specific example, *infra*, or as primers for cDNA or mRNA (e.g., in combination with a poly-T primer for RT-PCR). Preferably, a fragment is selected that is highly unique to the ABCC12 nucleic acids or polypeptides of the invention. Those DNA fragments with substantial homology to the probe will hybridize. As noted above, the greater the degree of homology, the more stringent hybridization conditions can be used. In a specific embodiment, various stringency hybridization conditions are used to identify homologous ABCC12 gene.

Further selection can be carried out on the basis of the properties of the gene, e.g., if the gene encodes a protein product having the isoelectric, electrophoretic, amino acid composition, or partial amino acid sequence of the ABCC12 proteins as disclosed herein. Thus, the presence of the gene may be detected by assays based on the physical, chemical, or immunological properties of its expressed product. For example, cDNA clones, or DNA clones which hybrid-select the proper mRNAs, can be selected which produce a protein that, e.g., has similar or identical electrophoretic migration, isoelectric focusing or non-equilibrium pH gel electrophoresis behaviour, proteolytic digestion maps, or antigenic properties as known for ABCC12.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

25

ABCC12 gene of the invention may also be identified by mRNA selection, *i.e.*, by nucleic acid hybridization followed by *in vitro* translation. According to this procedure, nucleotide fragments are used to isolate complementary mRNAs by hybridization. Such DNA fragments may represent available, purified ABCC12 DNA, or may be synthetic oligonucleotides designed from the partial coding sequence information. Immunoprecipitation analysis or functional assays (*e.g.*, tyrosine phosphatase activity) of the *in vitro* translation products of the products of the isolated mRNAs identifies the mRNA and, therefore, the complementary DNA fragments, that contain the desired sequences. In addition, specific mRNAs may be selected by adsorption of polysomes isolated from cells to immobilized antibodies specifically directed against any one of the ABCC12 polypeptides of the invention.

A radiolabeled ABCC12 cDNA can be synthesized using the selected mRNA (from the adsorbed polysomes) as a template. The radiolabeled mRNA or cDNA may then be used as a probe to identify homologous ABCC12 DNA fragments from among other genomic DNA fragments.

"Variant" of a nucleic acid according to the invention will be understood to mean a nucleic acid which differs by one or more bases relative to the reference polynucleotide. A variant nucleic acid may be of natural origin, such as an allelic variant which exists naturally, or it may also be a nonnatural variant obtained, for example, by mutagenic techniques.

In general, the differences between the reference (generally, wild-type) nucleic acid and the variant nucleic acid are small such that the nucleotide sequences of the reference nucleic acid and of the variant nucleic acid are very similar and, in many regions, identical. The nucleotide modifications present in a variant nucleic acid may be silent, which means that they do not alter the amino acid sequences encoded by said variant nucleic acid.

However, the changes in nucleotides in a variant nucleic acid may also result in substitutions, additions or deletions in the polypeptide encoded by the variant nucleic acid in relation to the polypeptides encoded by the reference nucleic acid. In addition, nucleotide modifications in the coding regions may produce conservative or non-conservative substitutions in the amino acid sequence of the polypeptide.

Preferably, the variant nucleic acids according to the invention encode polypeptides which substantially conserve the same function or biological activity as the polypeptide of the reference nucleic acid or alternatively the capacity to be recognized by antibodies directed against the polypeptides encoded by the initial reference nucleic acid.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

26

Some variant nucleic acids will thus encode mutated forms of the polypeptides whose systematic study will make it possible to deduce structure-activity relationships of the proteins in question. Knowledge of these variants in relation to the disease studied is essential since it makes it possible to understand the molecular cause of the pathology.

5 "Fragment" will be understood to mean a nucleotide sequence of reduced length relative to the reference nucleic acid and comprising, over the common portion, a nucleotide sequence identical to the reference nucleic acid. Such a nucleic acid "fragment" according to the invention may be, where appropriate, included in a larger polynucleotide of which it is a constituent. Such fragments comprise, or alternatively consist of, oligonucleotides ranging in  
10 length from 8, 10, 12, 15, 18, 20 to 25, 30, 40, 50, 70, 80, 100, 200, 500, 1000 or 1500 consecutive nucleotides of a nucleic acid according to the invention.

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

A nucleic acid molecule is "hybridizable" to another nucleic acid molecule, such as a cDNA, genomic DNA, or RNA, when a single stranded form of the nucleic acid molecule can anneal to the other nucleic acid molecule under the appropriate conditions of temperature and  
30 solution ionic strength (*see* Sambrook et al., *supra*). The conditions of temperature and ionic strength determine the "stringency" of the hybridization. For preliminary screening for homologous nucleic acids, low stringency hybridization conditions, corresponding to a  $T_m$  of 55°, can be used, *e.g.*, 5x SSC, 0.1% SDS, 0.25% milk, and no formamide; or 30%

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

27

formamide, 5x SSC, 0.5% SDS. Moderate stringency hybridization conditions correspond to a higher  $T_m$ , e.g., 40% formamide, with 5x or 6x SCC. High stringency hybridization conditions correspond to the highest  $T_m$ , e.g., 50% formamide, 5x or 6x SCC. Hybridization requires that the two nucleic acids contain complementary sequences, although depending on the stringency of the hybridization, mismatches between bases are possible. The appropriate stringency for hybridizing nucleic acids depends on the length of the nucleic acids and the degree of complementation, variables well known in the art. The greater the degree of similarity or homology between two nucleotide sequences, the greater the value of  $T_m$  for hybrids of nucleic acids having those sequences. The relative stability (corresponding to higher  $T_m$ ) of nucleic acid hybridizations decreases in the following order: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. For hybrids of greater than 100 nucleotides in length, equations for calculating  $T_m$  have been derived (see Sambrook et al., *supra*). For hybridization with shorter nucleic acids, i.e., oligonucleotides, the position of mismatches becomes more important, and the length of the oligonucleotide determines its specificity (see Sambrook et al., *supra*). Preferably a minimum length for a hybridizable nucleic acid is at least about 10 nucleotides; preferably at least about 15 nucleotides; and more preferably the length is at least about 20 nucleotides.

In a specific embodiment, the term "standard hybridization conditions" refers to a  $T_m$  of 55°C, and utilizes conditions as set forth above. In a preferred embodiment, the  $T_m$  is 60°C; in a more preferred embodiment, the  $T_m$  is 65°C.

"High stringency hybridization conditions" for the purposes of the present invention will be understood to mean the following conditions:

1- Membrane competition and PREHYBRIDIZATION:

- Mix: 40  $\mu$ l salmon sperm DNA (10 mg/ml)

25 + 40  $\mu$ l human placental DNA (10 mg/ml)

- Denature for 5 minutes at 96°C, then immerse the mixture in ice.

- Remove the 2X SSC and pour 4 ml of formamide mix in the hybridization tube containing the membranes.

- Add the mixture of the two denatured DNAs.

30 - Incubation at 42°C for 5 to 6 hours, with rotation.

2- Labeled probe competition:



WO 02/085943

PCT/EP02/03320

28

- Add to the labeled and purified probe 10 to 50 µl Cot I DNA, depending on the quantity of repeats.
- Denature for 7 to 10 minutes at 95°C.
- Incubate at 65°C for 2 to 5 hours.

5

### 3- HYBRIDIZATION:

- Remove the prehybridization mix.
- Mix 40 µl salmon sperm DNA + 40 µl human placental DNA; denature for 5 min at 96°C, then immerse in ice.
- Add to the hybridization tube 4 ml of formamide mix, the mixture of the two DNAs and the denatured labeled probe/Cot I DNA .
- Incubate 15 to 20 hours at 42°C, with rotation.

10

### 4- Washes and Exposure:

- One wash at room temperature in 2X SSC, to rinse.
- Twice 5 minutes at room temperature 2X SSC and 0.1% SDS at 65°C.
- Twice 15 minutes 0.1X SSC and 0.1% SDS at 65°C.
- Envelope the membranes in clear plastic wrap and expose.

15

The hybridization conditions described above are adapted to hybridization, under high stringency conditions, of a molecule of nucleic acid of varying length from 20 nucleotides to several hundreds of nucleotides. It goes without saying that the hybridization conditions described above may be adjusted as a function of the length of the nucleic acid whose hybridization is sought or of the type of labeling chosen, according to techniques known to one skilled in the art. Suitable hybridization conditions may, for example, be adjusted according to the teaching contained in the manual by Hames and Higgins (1985, *supra*).

20

As used herein, the term "oligonucleotide" refers to a nucleic acid, generally of at least 15 nucleotides, that is hybridizable to a nucleic acid according to the invention. Oligonucleotides can be labelled, *e.g.*, with <sup>32</sup>P-nucleotides or nucleotides to which a label, such as biotin, has been covalently conjugated. In one embodiment, a labeled oligonucleotide can be used as a probe to detect the presence of a nucleic acid encoding any one of the ABCC12 polypeptides of the invention. In another embodiment, oligonucleotides (one or both of which may be labelled) can be used as PCR primers, either for cloning full lengths or fragments of the ABCC12 nucleic acid, or to detect the presence of a nucleic acid encoding

25

30

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

29

the ABCC12 protein. In a further embodiment, an oligonucleotide of the invention can form a triple helix with the ABCC12 DNA molecule. Generally, oligonucleotides are prepared synthetically, preferably on a nucleic acid synthesizer. Accordingly, oligonucleotides can be prepared with non-naturally occurring phosphoester analog bonds, such as thioester bonds,  
5 etc.

"Homologous recombination" refers to the insertion of a foreign DNA sequence of a vector in a chromosome. Preferably, the vector targets a specific chromosomal site for homologous recombination. For specific homologous recombination, the vector will contain sufficiently long regions of homology to sequences of the chromosome to allow  
10 complementary binding and incorporation of the vector into the chromosome. Longer regions of homology, and greater degrees of sequence similarity, may increase the efficiency of homologous recombination.

A DNA "coding sequence" is a double-stranded DNA sequence which is transcribed and translated into a polypeptide in a cell *in vitro* or *in vivo* when placed under the control of appropriate regulatory sequences. The boundaries of the coding sequence are determined by a  
15 start codon at the 5' (amino) terminus and a translation stop codon at the 3' (carboxyl) terminus. A coding sequence can include, but is not limited to, prokaryotic sequences, cDNA from eukaryotic mRNA, genomic DNA sequences from eukaryotic (*e.g.*, mammalian) DNA, and even synthetic DNA sequences. If the coding sequence is intended for expression in a  
20 eukaryotic cell, a polyadenylation signal and transcription termination sequence will usually be located 3' to the coding sequence.

Transcriptional and translational control sequences are DNA regulatory sequences, such as promoters, enhancers, terminators, and the like, that provide for the expression of a coding sequence in a host cell. In eukaryotic cells, polyadenylation signals are control  
25 sequences.

"Regulatory region" means a nucleic acid sequence which regulates the expression of a nucleic acid. A regulatory region may include sequences which are naturally responsible for expressing a particular nucleic acid (a homologous region) or may include sequences of a different origin (responsible for expressing different proteins or even synthetic proteins). In  
30 particular, the sequences can be sequences of eukaryotic or viral genes or derived sequences which stimulate or repress transcription of a gene in a specific or non-specific manner and in an inducible or non-inducible manner. Regulatory regions include origins of replication, RNA

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

30

splice sites, enhancers, transcriptional termination sequences, signal sequences which direct the polypeptide into the secretory pathways of the target cell, and promoters.

A regulatory region from a "heterologous source" is a regulatory region which is not naturally associated with the expressed nucleic acid. Included among the heterologous  
5 regulatory regions are regulatory regions from a different species, regulatory regions from a different gene, hybrid regulatory sequences, and regulatory sequences which do not occur in nature, but which are designed by one having ordinary skill in the art.

A "cassette" refers to a segment of DNA that can be inserted into a vector at specific restriction sites. The segment of DNA encodes a polypeptide of interest, and the cassette and  
10 restriction sites are designed to ensure insertion of the cassette in the proper reading frame for transcription and translation.

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

A coding sequence is "under the control" of transcriptional and translational control sequences in a cell when RNA polymerase transcribes the coding sequence into mRNA, which is then trans-RNA spliced and translated into the protein encoded by the coding sequence.

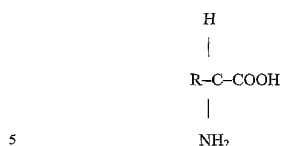
A "signal sequence" is included at the beginning of the coding sequence of a protein to  
25 be expressed on the surface of a cell. This sequence encodes a signal peptide, N-terminal to the mature polypeptide, that directs the host cell to translocate the polypeptide. The term "translocation signal sequence" is used herein to refer to this sort of signal sequence. Translocation signal sequences can be found associated with a variety of proteins native to  
30 eukaryotes and prokaryotes, and are often functional in both types of organisms.

A "polypeptide" is a polymeric compound comprised of covalently linked amino acid residues. Amino acids have the following general structure:

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

31



5

Amino acids are classified into seven groups on the basis of the side chain R: (1) aliphatic side chains, (2) side chains containing a hydroxylic (OH) group, (3) side chains containing sulfur atoms, (4) side chains containing an acidic or amide group, (5) side chains containing a basic group, (6) side chains containing an aromatic ring, and (7) proline, an imino acid in which the side chain is fused to the amino group.

A "protein" is a polypeptide which plays a structural or functional role in a living cell.

The polypeptides and proteins of the invention may be glycosylated or unglycosylated.

"Homology" means similarity of sequence reflecting a common evolutionary origin.

15 Polypeptides or proteins are said to have homology, or similarity, if a substantial number of their amino acids are either (1) identical, or (2) have a chemically similar R side chain. Nucleic acids are said to have homology if a substantial number of their nucleotides are identical.

"Isolated polypeptide" or "isolated protein" is a polypeptide or protein which is 20 substantially free of those compounds that are normally associated therewith in its natural state (e.g., other proteins or polypeptides, nucleic acids, carbohydrates, lipids). "Isolated" is not meant to exclude artificial or synthetic mixtures with other compounds, or the presence of impurities which do not interfere with biological activity, and which may be present, for example, due to incomplete purification, addition of stabilizers, or compounding into a 25 pharmaceutically acceptable preparation.

"Fragment" of a polypeptide according to the invention will be understood to mean a polypeptide whose amino acid sequence is shorter than that of the reference polypeptide and which comprises, over the entire portion with these reference polypeptides, an identical amino acid sequence. Such fragments may, where appropriate, be included in a larger polypeptide of 30 which they are a part. Such fragments of a polypeptide according to the invention may have a length of 5, 10, 15, 20, 30 to 40, 50, 100, 200 or 300 amino acids.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

32

"Variant" of a polypeptide according to the invention will be understood to mean mainly a polypeptide whose amino acid sequence contains one or more substitutions, additions or deletions of at least one amino acid residue, relative to the amino acid sequence of the reference polypeptide, it being understood that the amino acid substitutions may be either conservative or nonconservative.

A "variant" of a polypeptide or protein is any analogue, fragment, derivative, or mutant which is derived from a polypeptide or protein and which retains at least one biological property of the polypeptide or protein. Different variants of the polypeptide or protein may exist in nature. These variants may be allelic variations characterized by differences in the nucleotide sequences of the structural gene coding for the protein, or may involve differential splicing or post-translational modification. Variants also include a related protein having substantially the same biological activity, but obtained from a different species.

The skilled artisan can produce variants having single or multiple amino acid substitutions, deletions, additions, or replacements. These variants may include, *inter alia*: (a) variants in which one or more amino acid residues are substituted with conservative or non-conservative amino acids, (b) variants in which one or more amino acids are added to the polypeptide or protein, (c) variants in which one or more of the amino acids includes a substituent group, and (d) variants in which the polypeptide or protein is fused with another polypeptide such as serum albumin. The techniques for obtaining these variants, including genetic (suppressions, deletions, mutations, etc.), chemical, and enzymatic techniques, are known to persons having ordinary skill in the art.

If such allelic variations, analogues, fragments, derivatives, mutants, and modifications, including alternative mRNA splicing forms and alternative post-translational modification forms result in derivatives of the polypeptide which retain any of the biological properties of the polypeptide, they are intended to be included within the scope of this invention.

A "vector" is a replicon, such as plasmid, virus, phage or cosmid, to which another DNA segment may be attached so as to bring about the replication of the attached segment. A "replicon" is any genetic element (e.g., plasmid, chromosome, virus) that functions as an autonomous unit of DNA replication *in vivo*, i.e., capable of replication under its own control.

The present invention also relates to cloning vectors containing a gene encoding analogs and derivatives of any one of the ABCC12 polypeptides of the invention. The production and use of derivatives and analogs related to any one of the ABCC12 proteins are

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

33

within the scope of the present invention. In a specific embodiment, the derivatives or analogs are functionally active, *i.e.*, capable of exhibiting one or more functional activities associated with a wild-type ABCC12 polypeptides of the invention.

ABCC12 derivatives can be made by altering encoding nucleic acid sequences by  
5 substitutions, additions or deletions that provide for functionally equivalent molecules. Preferably, derivatives are made that have enhanced or increased functional activity relative to native ABCC12. Alternatively, such derivatives may encode soluble fragments of the ABCC12 extracellular domains that have the same or greater affinity for the natural ligand of ABCC12 polypeptide of the invention. Such soluble derivatives may be potent inhibitors of  
10 ligand binding to ABCC12.

Due to the degeneracy of nucleotide coding sequences, other DNA sequences which encode substantially same amino acid sequences as that of ABCC12 gene may be used in the practice of the present invention. These include but are not limited to allelic genes, homologous genes from other species, and nucleotide sequences comprising all or portions of  
15 ABCC12 gene which are altered by the substitution of different codons that encode the same amino acid residue within the sequence, thus producing a silent change. Likewise, the ABCC12 derivatives of the invention include, but are not limited to those containing, as a primary amino acid sequence, all or part of the amino acid sequence of any one of the ABCC12 proteins including altered sequences in which functionally equivalent amino acid  
20 residues are substituted for residues within the sequence resulting in a conservative amino acid substitution. For example, one or more amino acid residues within the sequence can be substituted by another amino acid of a similar polarity, which acts as a functional equivalent, resulting in a silent alteration. Substitutes for an amino acid within the sequence may be selected from other members of the class to which the amino acid belongs. For example, the  
25 nonpolar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan and methionine. Amino acids containing aromatic ring structures are phenylalanine, tryptophan, and tyrosine. The polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include arginine, lysine and histidine. The negatively charged (acidic)  
30 amino acids include aspartic acid and glutamic acid. Such alterations will not be expected to affect apparent molecular weight as determined by polyacrylamide gel electrophoresis, or isoelectric point.

Particularly preferred substitutions are:

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

34

- Lys for Arg and vice versa such that a positive charge may be maintained;
- Glu for Asp and vice versa such that a negative charge may be maintained;
- Ser for Thr such that a free -OH can be maintained; and
- Gln for Asn such that a free CONH<sub>2</sub> can be maintained.

5 Amino acid substitutions may also be introduced to substitute an amino acid with a particularly preferable property. For example, a Cys may be introduced as a potential site for disulfide bridges with another Cys. A His may be introduced as a particularly "catalytic" site (i.e., His can act as an acid or base and is the most common amino acid in biochemical catalysis). Pro may be introduced because of its particularly planar structure, which induces  
10 b-turns in the protein's structure.

The genes encoding ABCC12 derivatives and analogs of the invention can be produced by various methods known in the art. The manipulations which result in their production can occur at the gene or protein level. For example, the cloned ABCC12 sequence can be modified by any of numerous strategies known in the art (Sambrook et al., 1989,  
15 *supra*). The sequence can be cleaved at appropriate sites with restriction endonuclease(s), followed by further enzymatic modification if desired, isolated, and ligated *in vitro*. Production of a gene encoding a derivative or analog of the ABCC12, should ensure that the modified gene remains within the same translational reading frame as the ABCC12 gene, uninterrupted by translational stop signals, in the region where the desired activity is encoded.

20 Additionally, the ABCC12-encoding nucleic acids can be mutated *in vitro* or *in vivo*, to create and/or destroy translation, initiation, and/or termination sequences, or to create variations in coding regions and/or form new restriction endonuclease sites or destroy pre-existing ones, to facilitate further *in vitro* modification. Preferably, such mutations enhance the functional activity of the mutated ABCC12 gene products. Any technique for mutagenesis  
25 known in the art may be used, including *inter alia*, *in vitro* site-directed mutagenesis (Hutchinson et al., (1978) *Biol. Chem.* 253:6551; Zoller and Smith, (1984) *DNA*, 3:479-488; Oliphant et al., (1986) *Gene* 44:177; Hutchinson et al., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:710; Huygen et al., (1996) *Nature Medicine*, 2(8):893-898) and use of TAB® linkers (Pharmacia). PCR techniques are preferred for site-directed mutagenesis (Higuchi, 1989,  
30 "Using PCR to Engineer DNA", in *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H. Erlich, ed., Stockton Press, Chapter 6, pp. 61-70).

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

35

Identified and isolated ABCC12 gene may then be inserted into an appropriate cloning vector. A large number of vector-host systems known in the art may be used. Possible vectors include, but are not limited to, plasmids or modified viruses, but the vector system must be compatible with the host cell used. Examples of vectors include, but are not limited to, *Escherichia coli*, bacteriophages such as lambda derivatives, or plasmids such as pBR322 derivatives or pUC plasmid derivatives, *e.g.*, pGEX vectors, pmal-c, pFLAG, etc. The insertion into a cloning vector can, for example, be accomplished by ligating the DNA fragment into a cloning vector which has complementary cohesive termini. However, if the complementary restriction sites used to fragment the DNA are not present in the cloning vector, the ends of the DNA molecules may be enzymatically modified. Alternatively, any site desired may be produced by ligating nucleotide sequences (linkers) onto the DNA termini; these ligated linkers may comprise specific chemically synthesized oligonucleotides encoding restriction endonuclease recognition sequences. Recombinant molecules can be introduced into host cells via transformation, transfection, infection, electroporation, etc., so that many copies of the gene sequence are generated. Preferably, the cloned gene is contained on a shuttle vector plasmid, which provides for expansion in a cloning cell, *e.g.*, *Escherichia coli*, and facile purification for subsequent insertion into an appropriate expression cell line, if such is desired. For example, a shuttle vector, which is a vector that can replicate in more than one type of organism, can be prepared for replication in both *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by linking sequences from an *Escherichia coli* plasmid with sequences from the yeast 2 $\mu$  plasmid.

In an alternative method, the desired gene may be identified and isolated after insertion into a suitable cloning vector in a "shot gun" approach. Enrichment for the desired gene, for example, by size fractionation, can be done before insertion into the cloning vector.

The nucleotide sequence coding for the ABCC12 polypeptides or antigenic fragments, derivatives or analogs thereof, or functionally active derivatives, including chimeric proteins thereof, may be inserted into an appropriate expression vector, *i.e.*, a vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted protein-coding sequence. Such elements are termed herein a "promoter." Thus, nucleic acid encoding the ABCC12 polypeptides of the invention are operationally associated with a promoter in an expression vector of the invention. Both cDNA and genomic sequences can be cloned and expressed under control of such regulatory sequences. An expression vector also preferably includes a replication origin.



WO 02/085943

PCT/EP02/03320

36

The necessary transcriptional and translational signals can be provided on a recombinant expression vector, or they may be supplied by a native gene encoding ABCC12 and/or its flanking regions.

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

A recombinant ABCC12 protein of the invention, or functional fragments, derivatives, chimeric constructs, or analogs thereof, may be expressed chromosomally, after integration of the coding sequence by recombination. In this regard, any of a number of amplification systems may be used to achieve high levels of stable gene expression (See Sambrook et al., 1989, *supra*).

The cell into which the recombinant vector comprising the nucleic acid encoding any one of the ABCC12 polypeptides according to the invention is cultured in an appropriate cell culture medium under conditions that provide for expression of any one of the ABCC12 polypeptides by the cell.

Any of the methods previously described for the insertion of DNA fragments into a cloning vector may be used to construct expression vectors containing a gene consisting of appropriate transcriptional/translational control signals and the protein coding sequences. These methods may include *in vitro* recombinant DNA and synthetic techniques and *in vivo* recombination (genetic recombination).

Expression of ABCC12 polypeptides may be controlled by any promoter/enhancer element known in the art, but these regulatory elements must be functional in the host selected for expression. Promoters which may be used to control ABCC12 gene expression include, but are not limited to, the SV40 early promoter region (Benoist and Chambon, 1981 Nature 290:304-310), the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto, et al., 1980 Cell 22:787-797), the herpes thymidine kinase promoter (Wagner et al., 1981 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445), the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster et al., 1982 Nature 296:39-42); prokaryotic expression vectors

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

37

such as the  $\beta$ -lactamase promoter (Villa-Komaroff, et al., 1978 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731), or the *tac* promoter (DeBoer, et al., 1983 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25); see also "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242:74-94; promoter elements from yeast or other fungi such as the Gal 4 promoter, the ADC (alcohol dehydrogenase) promoter, PGK (phosphoglycerol kinase) promoter, alkaline phosphatase promoter; and the animal transcriptional control regions, which exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals: elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (Swift et al., 1984 Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986 Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987); insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan, 1985 Nature: 315:115-122), immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid cells (Grosschedl et al., 1984 Cell 38:647-658; Adames et al., 1985 Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987 Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444), mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder et al., 1986 Cell 45:485-495), albumin gene control region which is active in liver (Pinkert et al., 1987 Genes and Devel. 1:268-276), alpha-fetoprotein gene control region which is active in liver (Krumlauf et al., 1985 Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987 Science 235:53-58), alpha 1-antitrypsin gene control region which is active in the liver (Kelsey et al., 1987 Genes and Devel. 1:161-171) beta-globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogam et al., 1985 Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986 Cell 46:89-94), myelin basic protein gene control region which is active in oligodendrocyte cells in the brain (Readhead et al., 1987 Cell 48:703-712), myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, 1985 Nature 314:283-286), and gonadotropic releasing hormone gene control region which is active in the hypothalamus (Mason et al., 1986 Science 234:1372-1378).

Expression vectors containing a nucleic acid encoding one of the ABCC12 polypeptides of the invention can be identified by five general approaches: (a) polymerase chain reaction (PCR) amplification of the desired plasmid DNA or specific mRNA, (b) nucleic acid hybridization, (c) presence or absence of selection marker gene functions, (d) analyses with appropriate restriction endonucleases, and (e) expression of inserted sequences.

In the first approach, the nucleic acids can be amplified by PCR to provide for detection of the amplified product. In the second approach, the presence of a foreign gene inserted in an expression vector can be detected by nucleic acid hybridization using probes comprising

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

38

sequences that are homologous to an inserted marker gene. In the third approach, the recombinant vector/host system can be identified and selected based upon the presence or absence of certain "selection marker" gene functions (e.g., b-galactosidase activity, thymidine kinase activity, resistance to antibiotics, transformation phenotype, occlusion body formation in baculovirus, etc.) caused by the insertion of foreign genes in the vector. In another example, if the nucleic acid encoding any one of the ABCC12 polypeptides is inserted within the "selection marker" gene sequence of the vector, recombinants containing the ABCC12 nucleic acids can be identified by the absence of the ABCC12 gene functions. In the fourth approach, recombinant expression vectors are identified by digestion with appropriate restriction enzymes. In the fifth approach, recombinant expression vectors can be identified by assaying for the activity, biochemical, or immunological characteristics of the gene product expressed by the recombinant, provided that the expressed protein assumes a functionally active conformation.

A wide variety of host/expression vector combinations may be employed in expressing the nucleic acids of this invention. Useful expression vectors, for example, may consist of segments of chromosomal, non-chromosomal and synthetic DNA sequences. Suitable vectors include derivatives of SV40 and known bacterial plasmids, e.g., *Escherichia coli* plasmids col El, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX (Smith *et al.*, 1988, Gene 67:31-40), pMB9 and their derivatives, plasmids such as RP4; phage DNAs, e.g., the numerous derivatives of phage  $\lambda$ , e.g., NM989, and other phage DNA, e.g., M13 and filamentous single stranded phage DNA; yeast plasmids such as the 2 $\mu$  plasmid or derivatives thereof; vectors useful in eukaryotic cells, such as vectors useful in insect or mammalian cells; vectors derived from combinations of plasmids and phage DNAs, such as plasmids that have been modified to employ phage DNA or other expression control sequences; and the like.

For example, in a baculovirus expression systems, both non-fusion transfer vectors, such as but not limited to pVL941 (*Bam*H1 cloning site; Summers), pVL1393 (*Bam*H1, *Sma*I, *Xba*I, *Eco*R1, *Nor*I, *Xma*III, *Bgl*II, and *Pst*I cloning site; Invitrogen), pVL1392 (*Bgl*III, *Pst*I, *Nor*I, *Xma*III, *Eco*R1, *Xba*I, *Sma*I, and *Bam*H1 cloning site; Summers and Invitrogen), and pBlueBacIII (*Bam*H1, *Bgl*III, *Pst*I, *Nco*I, and *Hind*III cloning site, with blue/white recombinant screening possible; Invitrogen), and fusion transfer vectors, such as but not limited to pAc700 (*Bam*H1 and *Kpn*I cloning site, in which the *Bam*H1 recognition site begins with the initiation codon; Summers), pAc701 and pAc702 (same as pAc700, with different reading frames), pAc360 (*Bam*H1 cloning site 36 base pairs downstream of a polyhedrin initiation codon;

Invitrogen(195)), and pBlueBacHisA, B, C (three different reading frames, with *Bam*HI, *Bgl*II, *Pst*I, *Nco*I, and *Hind*III cloning site, an N-terminal peptide for ProBond purification, and blue/white recombinant screening of plaques; Invitrogen (220) can be used.

Mammalian expression vectors contemplated for use in the invention include vectors  
 5 with inducible promoters, such as the dihydrofolate reductase (DHFR) promoter, *e.g.*, any expression vector with a *DHFR* expression vector, or a *DHFR*/methotrexate co-amplification vector, such as pED (*Pst*I, *Sal*I, *Sba*I, *Sma*I, and *Eco*RI cloning site, with the vector expressing both the cloned gene and *DHFR*; See, Kaufman, *Current Protocols in Molecular Biology*, 16.12 (1991). Alternatively, a glutamine synthetase/methionine sulfoximine co-amplification  
 10 vector, such as pEE14 (*Hind*III, *Xba*I, *Sma*I, *Sba*I, *Eco*RI, and *Bcl*I cloning site, in which the vector expresses glutamine synthase and the cloned gene; Celltech). In another embodiment, a vector that directs episomal expression under control of Epstein Barr Virus (EBV) can be used, such as pREP4 (*Bam*HI, *Sfi*I, *Xho*I, *Not*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *Pvu*II, and *Kpn*I cloning site, constitutive RSV-LTR promoter, hygromycin selectable marker; Invitrogen), pCEP4  
 15 (*Bam*HI, *Sfi*I, *Xho*I, *Not*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *Pvu*II, and *Kpn*I cloning site, constitutive hCMV immediate early gene, hygromycin selectable marker; Invitrogen), pMEP4 (*Kpn*I, *Pvu*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Not*I, *Xho*I, *Sfi*I, *Bam*HI cloning site, inducible methallothionein IIa gene promoter, hygromycin selectable marker; Invitrogen), pREP8 (*Bam*HI, *Xho*I, *Not*I, *Hind*III, *Nhe*I, and *Kpn*I cloning site, RSV-LTR promoter, histidinol selectable marker; Invitrogen),  
 20 pREP9 (*Kpn*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Not*I, *Xho*I, *Sfi*I, and *Bam*HI cloning site, RSV-LTR promoter, G418 selectable marker; Invitrogen), and pEBVHis (RSV-LTR promoter, hygromycin selectable marker, N-terminal peptide purifiable via ProBond resin and cleaved by enterokinase; Invitrogen). Selectable mammalian expression vectors for use in the invention include pRc/CMV (*Hind*III, *Bst*XI, *Not*I, *Sba*I, and *Apa*I cloning site, G418 selection;  
 25 Invitrogen), pRc/RSV (*Hind*III, *Spe*I, *Bst*XI, *Not*I, *Xba*I cloning site, G418 selection; Invitrogen), and others. Vaccinia virus mammalian expression vectors (*see*, Kaufman, 1991, *supra*) for use according to the invention include but are not limited to pSC11 (*Sma*I cloning site, TK- and b-gal selection), pMJ601 (*Sal*I, *Sma*I, *Afl*II, *Nar*I, *Bsp*MI, *Bam*HI, *Apa*I, *Nhe*I, *Sac*II, *Kpn*I, and *Hind*III cloning site; TK- and b-gal selection), and pTKgptF1S (*Eco*RI, *Pst*I,  
 30 *Sal*I, *Acc*I, *Hind*III, *Sba*I, *Bam*HI, and *Hpa*I cloning site, TK or XPRT selection).

Yeast expression systems can also be used according to the invention to express the any one of the ABCC12 polypeptides. For example, the non-fusion pYES2 vector (*Xba*I, *Sph*I, *Sho*I, *Not*I, *Gst*XI, *Eco*RI, *Bst*XI, *Bam*HI, *Sac*I, *Kpn*I, and *Hind*III cloning sit;

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

40

Invitrogen) or the fusion pYESHisA, B, C (*Xba*I, *Sph*I, *Sho*I, *Nae*I, *Bst*XI, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sac*I, *Kpn*I, and *Hind*III cloning site, N-terminal peptide purified with ProBond resin and cleaved with enterokinase; Invitrogen), to mention just two, can be employed according to the invention.

5 Once a particular recombinant DNA molecule is identified and isolated, several methods known in the art may be used to propagate it. Once a suitable host system and growth conditions are established, recombinant expression vectors can be propagated and prepared in quantity. As previously explained, the expression vectors which can be used include, but are not limited to, the following vectors or their derivatives: human or animal  
10 viruses such as vaccinia virus or adenovirus; insect viruses such as baculovirus; yeast vectors; bacteriophage vectors (*e.g.*, lambda), and plasmid and cosmid DNA vectors, to name but a few.

In addition, a host cell strain may be chosen which modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired.  
15 Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the translational and post-translational processing and modification (*e.g.*, glycosylation, cleavage for example of the signal sequence) of proteins. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the desired modification and processing of the foreign proteins expressed. For example, expression in a bacterial system can be used to produce a nonglycosylated core protein  
20 product. However, the transmembrane ABCC12 proteins expressed in bacteria may not be properly folded. Expression in yeast can produce a glycosylated product. Expression in eukaryotic cells can increase the likelihood of "native" glycosylation and folding of a heterologous protein. Moreover, expression in mammalian cells can provide a tool for reconstituting, or constituting, ABCC12 activity. Furthermore, different vector/host  
25 expression systems may affect processing reactions, such as proteolytic cleavages, to a different extent.

Vectors are introduced into the desired host cells by methods known in the art, *e.g.*, transfection, electroporation, microinjection, transduction, cell fusion, DEAE dextran, calcium phosphate precipitation, lipofection (lysosome fusion), use of a gene gun, or a DNA vector  
30 transporter (see, *e.g.*, Wu et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:963-967; Wu and Wu, 1988, J. Biol. Chem. 263:14621-14624; Hartmut et al., Canadian Patent Application No. 2,012,311, filed March 15, 1990).

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

41

A cell has been "transfected" by exogenous or heterologous DNA when such DNA has been introduced inside the cell. A cell has been "transformed" by exogenous or heterologous DNA when the transfected DNA effects a phenotypic change. Preferably, the transforming DNA should be integrated (covalently linked) into chromosomal DNA making up the genome  
5 of the cell.

A recombinant marker protein expressed as an integral membrane protein can be isolated and purified by standard methods. Generally, the integral membrane protein can be obtained by lysing the membrane with detergents, such as but not limited to, sodium dodecyl sulfate (SDS), Triton X-100 polyoxyethylene ester, Ipagel/nonidet P-40 (NP-40)  
10 (octylphenoxy)-polyethoxyethanol, digoxin, sodium deoxycholate, and the like, including mixtures thereof. Solubilization can be enhanced by sonication of the suspension. Soluble forms of the protein can be obtained by collecting culture fluid, or solubilizing inclusion bodies, *e.g.*, by treatment with detergent, and if desired sonication or other mechanical processes, as described above. The solubilized or soluble protein can be isolated using  
15 various techniques, such as polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), isoelectric focusing, 2-dimensional gel electrophoresis, chromatography (*e.g.*, ion exchange, affinity, immunoaffinity, and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, immunoprecipitation, or by any other standard technique for the purification of proteins.

Alternatively, a nucleic acid or vector according to the invention can be introduced *in vivo* by lipofection. For the past decade, there has been increasing use of liposomes for  
20 encapsulation and transfection of nucleic acids *in vitro*. Synthetic cationic lipids designed to limit the difficulties and dangers encountered with liposome mediated transfection can be used to prepare liposomes for *in vivo* transfection of a gene encoding a marker (Felgner, *et. al.* (1987. PNAS 84:7413); Mackey, *et al.* (1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :8027-8031);  
25 Ulmer *et al.* (1993. Science 259 :1745-1748). The use of cationic lipids may promote encapsulation of negatively charged nucleic acids, and also promote fusion with negatively charged cell membranes (Felgner and Ringold, (1989. Science 337:387-388)). Particularly useful lipid compounds and compositions for transfer of nucleic acids are described in International Patent Publications WO95/18863 and WO96/17823, and in U.S. Patent No.  
30 5,459,127. The use of lipofection to introduce exogenous genes into the specific organs *in vivo* has certain practical advantages. Molecular targeting of liposomes to specific cells represents one area of benefit. It is clear that directing transfection to particular cell types would be particularly preferred in a tissue with cellular heterogeneity, such as pancreas, liver,

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

42

kidney, and the brain. Lipids may be chemically coupled to other molecules for the purpose of targeting [see Mackey, et. al., *supra*]. Targeted peptides, e.g., hormones or neurotransmitters, and proteins such as antibodies, or non-peptide molecules could be coupled to liposomes chemically.

5 Other molecules are also useful for facilitating transfection of a nucleic acid *in vivo*, such as a cationic oligopeptide (e.g., International Patent Publication WO95/21931), peptides derived from DNA binding proteins (e.g., International Patent Publication WO96/25508), or a cationic polymer (e.g., International Patent Publication WO95/21931).

It is also possible to introduce the vector *in vivo* as a naked DNA plasmid (see U.S. Patents 5,693,622, 5,589,466 and 5,580,859). Naked DNA vectors for gene therapy can be introduced into the desired host cells by methods known in the art, e.g., transfection, electroporation, microinjection, transduction, cell fusion, DEAE dextran, calcium phosphate precipitation, use of a gene gun, or use of a DNA vector transporter (see, Wu et al., 1992, *supra*; Wu and Wu, 1988, *supra*; Hartmut et al., Canadian Patent Application No. 2,012,311, filed March 15, 1990; Williams et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-2730). Receptor-mediated DNA delivery approaches can also be used (Curiel et al., 1992, Hum. Gene Ther. 3:147-154; Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432).

"Pharmaceutically acceptable vehicle or excipient" includes diluents and fillers which are pharmaceutically acceptable for method of administration, are sterile, and may be aqueous or oleaginous suspensions formulated using suitable dispersing or wetting agents and suspending agents. The particular pharmaceutically acceptable carrier and the ratio of active compound to carrier are determined by the solubility and chemical properties of the composition, the particular mode of administration, and standard pharmaceutical practice.

Any nucleic acid, polypeptide, vector, or host cell of the invention will preferably be introduced *in vivo* in a pharmaceutically acceptable vehicle or excipient. The phrase "pharmaceutically acceptable" refers to molecular entities and compositions that are physiologically tolerable and do not typically produce an allergic or similar untoward reaction, such as gastric upset, dizziness and the like, when administered to a human. Preferably, as used herein, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "excipient" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the compound is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils,

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

43

including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water or aqueous solution saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions are preferably employed as excipients, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical excipients are described in

5 "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin.

Naturally, the invention contemplates delivery of a vector that will express a therapeutically effective amount of the ABCC12 polypeptide for gene therapy applications. The phrase "therapeutically effective amount" is used herein to mean an amount sufficient to reduce by at least about 15 percent, preferably by at least 50 percent, more preferably by at least 90 percent, and still more preferably prevent, a clinically significant deficit in the activity, function and response of the host. Alternatively, a therapeutically effective amount is sufficient to cause an improvement in a clinically significant condition in the host.

#### NUCLEIC ACIDS OF THE ABCC12 GENE

15 The applicants have identified a novel human ABCC-like gene, designated ABCC12. The applicants have also determined that this novel gene is located on the region of chromosome 16q12 (figure 2).

The applicants have further determined transcript sequences that correspond to the coding sequences (CDS) of the short and long ABCC12 proteins isoforms. According to the invention, the ABCC12 gene comprises 29 exons and 28 introns. All exons were flanked by GT and AG dinucleotides consistent with the consensus sequences for splice junctions in eukaryotic genes (Table 1). The applicants have also identified two ABCC12 transcripts that differ by the length and sequence of exon 15 as shown in Table 1. Exon 15 of the short transcript comprises 76 nucleotides as set forth in SEQ ID No.: 17, whereas Exon 15 of the long transcript has 9 additional nucleotides at the 3' end, as set forth in SEQ ID No: 32.

The short transcript of the human novel ABCC12 gene thus consists of 4273 nucleotides as set forth in SEQ ID No: 1, while the long transcript is as set forth in SEQ ID No.: 2.

30 **Table 1: Splice sites sequences and exon sizes of ABCC12**

Exon	Size (bp)	Splice acceptor	Splice donor
1	119	Not determined	CCTGTGCAAGGtaagtcaga
2	156	ttgtctgcagGTTAGCACCC	ATGCCAAAAGgtaccaggat
3	152	ttatcacagATTTCGAGTC	GGGCCGCTGagtgcggcagc



WO 02/085943

PCT/EP02/03320

44

4	230	ttacagacagTTCATTTCA	TGTTGGCGAGGtaagctggc
5	174	ttctttccagGTGCTCAATA	ACCGTTCAGGtaacggcat
6	148	ttgattccagATGTTTATGG	ACTATCCAAAGtaaggacaag
7	149	ctttttgcagATATAAGAAG	CCACCCGTGtaagagctg
8	108	tggtttccagGCATTTAGTG	GAGAATGAAGgtalaactaa
9	279	ttaattcttagAAAATTCCTCA	GGTGAAGAAAGtggtggtgt
10	72	tctctggcagGGGAAGATCT	CCTAGGACAGGtaagctgtg
11	125	gttggtccagATCCAGCTGC	ATCACCAGAGtaaatattaa
12	73	gcaccaacagGTATCAGCAG	CCTGACTGAGGtgagcgggg
13	254	ctgtccacagATTGGGGAGC	CCAGCTACAGGtgatgggac
14	135	actctctcagTCTTAGAGT	GCAGTTCAGGtaactcaca
15	76 or 85	ttgtctccagGATCCTGAAC	GAAGATGCTGgtataatcgg or GGTAAATCGgttagaatcc
16	72	ctcaccctagTTCGTGCTCC	GACACAAAAGgtatttacc
17	90	gtctccacagTTCCTGAGCA	GCTTCTGGAGgttcagttata
18	104	cccttctcagGGTACCTCCT	GGGCTCACGGgtgagttcc
19	198	ttctccaaagATGACTCTGT	GTTTGAATAAGtgaggccac
20	227	ttctccacagATCTTAAAGA	TTCGTGTACGgtaggcccat
21	138	ttctctccagCATTTTCCAC	GCATCACCtagtgagtcaca
22	157	aaactccagTCACTCTCTC	CATCATCCAGgtaatgcctg
23	90	ttttcaacagTGAAGCGGAC	ATACATTTCCgttaagaatt
24	190	tcctttacagACTGTGTGTC	ACAGGTTCGGgtgaggacaa
25	160	tggttcccagGAAACTCACC	GTACAGTAAGgtagctgttt
26	79	ttcaatgcagGTACACTTTC	GAGAGACACgttaggtctct
27	114	tgtttttgtagTAATGAAAC	TAAATCAAGgttaagaaaac
28	165	tcctccacagATCATCTCC	AAATGGGAAGgtatagggaag
29	87+3'UTR	tgactttccagGTGATTGAGT	Not determined

The applicants have characterized exonic sequences of a novel human ABCC12 gene, which are particularly useful according to the invention for the production of various means of

5 detection of the corresponding ABCC12 gene, or nucleotide expression products in a sample.

Several exons of ABCC12 gene have been characterized by their nucleotide sequence and are identified in Tables 2 and 3. Exon 15 only differs in Tables 2 and 3. The human ABCC12 gene consists of 29 exons, having sizes which range from 72 to 279 bp. A differential splicing generates a first short isoform having an Exon of 76 nucleotides as set

10 forth in SEQ ID No.:17, and a second long isoform having an Exon 15 of 85 nucleotides, as set forth in SEQ ID NO: 32. Of the 28 introns in the ABCC12 gene, 16 are class 0 (where the splice occurs between codons), six are class 1 (where the codon is interrupted between the first and the second nucleotide), and six are class 2 (where the splice occurs between the second and the third nucleotide of the codon).

15 **Table 2 : Human ABCC12 exons and introns DNA (short isoform)**

SEQ ID NO:	Exon or intron number	Exon start in mRNA	Exon stop in mRNA	exon start in genomic fragment	exon stop in genomic fragment	length of exon	intron start in fragment	intron stop in fragment	Length of intron
3	1	1	119	111347	111469	119	111466	113705	2240

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

45

4	2	120	275	113706	113865	156	113862	116417	2556
5	3	276	423	116418	116569	152	116566	116850	285
6	4	424	657	116851	117080	230	117085	118434	1350
7	5	658	831	118435	118608	174	118609	119395	787
8	6	832	979	119396	119543	148	119544	123935	4392
9	7	980	1128	123936	124084	149	124085	126875	2791
10	8	1129	1236	126876	126983	108	126984	129033	2050
11	9	1237	1515	129034	129312	279	129313	133486	4174
12	10	1516	1587	133487	133558	72	133559	135930	2372
13	11	1588	1712	135931	136055	125	136056	-	-
14	12	1713	1785	3997	4069	73	4070	5711	1642
15	13	1786	1989	5712	5915	204	5916	9419	3504
16	14	1990	2124	9420	9554	135	9555	9667	113
17	15	2125	2209	9668	9752	85	9753	9822	70
18	16	2201	2272	9823	9894	72	9895	12800	2906
19	17	2273	2362	12801	12890	90	12891	13904	1014
20	18	2363	2466	13905	14008	104	14009	15993	1985
21	19	2467	2664	15994	16191	198	16192	16961	770
22	20	2665	2891	16962	17188	227	17189	20320	3132
23	21	2892	3029	20321	20458	138	20459	24427	3969
24	22	3030	3186	24428	24584	157	24585	30120	5536
25	23	3187	3276	30121	30210	90	30211	32595	2385
26	24	3277	3466	32596	32785	190	32786	33244	459
27	25	3467	3626	33245	33404	160	33405	34510	1106
28	26	3627	3705	34511	34589	79	34590	35623	1034
29	27	3706	3819	35624	35737	114	35738	37256	1519
30	28	3820	3984	37257	37421	165	37422	37528	107
31	29	3985	4273	37529	37817	289	37818	-	-

Table 3 : Human ABCC12 exons and introns DNA (long isoform)

SEQ ID NO:	Exon or intron number	Exon start in mRNA	Exon stop in mRNA	exon start in genomic fragment	exon stop in genomic fragment	length of exon	intron start in fragment	intron stop in fragment	Length of intron
3	1	1	119	111347	111465	119	111466	113705	2240
4	2	120	275	113706	113861	156	113862	116417	2556
5	3	276	423	116418	116569	152	116566	116850	285
6	4	424	657	116851	117080	230	117085	118434	1350
7	5	658	831	118435	118608	174	118609	119395	787
8	6	832	979	119396	119543	148	119544	123935	4392
9	7	980	1128	123936	124084	149	124085	126875	2791
10	8	1129	1236	126876	126983	108	126984	129033	2050
11	9	1237	1515	129034	129312	279	129313	133486	4174
12	10	1516	1587	133487	133558	72	133559	135930	2372
13	11	1588	1712	135931	136055	125	136056	-	-
14	12	1713	1785	3997	4069	73	4070	5711	1642
15	13	1786	1989	5712	5915	204	5916	9419	3504
16	14	1990	2124	9420	9554	135	9555	9667	113
32	15	2125	2209	9668	9752	85	9753	9822	70

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

46

18	16	2210	2281	9823	9894	72	9895	12800	2906
19	17	2282	2371	12801	12890	90	12891	13904	1014
20	18	2372	2475	13905	14008	104	14009	15993	1985
21	19	2476	2673	15994	16191	198	16192	16961	770
22	20	2674	2900	16962	17188	227	17189	20320	3132
23	21	2901	3038	20321	20458	138	20459	24427	3969
24	22	3039	3195	24428	24584	157	24585	30120	5536
25	23	3196	3285	30121	30210	90	30211	32595	2385
26	24	3286	3475	32596	32785	190	32786	33244	459
27	25	3476	3635	33245	33404	160	33405	34510	1106
28	26	3636	3714	34511	34589	79	34590	35623	1034
29	27	3715	3828	35624	35737	114	35738	37256	1519
30	28	3829	3993	37257	37421	165	37422	37528	107
31	29	3994	4282	37529	37817	289	37818	-	-

Thus the present invention also relates to a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary sequence thereof.

The invention also relates to a nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a nucleic acid comprising at least 8 consecutive nucleotides of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence.

The subject of the invention is, in addition, a nucleic acid having at least 80% nucleotide identity with a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a nucleic acid having at least 85%, preferably 90%, more preferably 95% and still more preferably 98% nucleotide identity with a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32.

The invention also relates to a nucleic acid hybridizing, under high stringency conditions, with a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

#### **cDNA MOLECULE ENCODING THE SHORT AND LONG ISOFORMS OF ABCC12 PROTEINS**

The applicants have further determined the cDNA sequences and the coding sequences (CDS) corresponding to the human ABCC12 gene, which encode the short and long human corresponding proteins isoforms (Example 2).

The cDNA molecule of the novel human ABCC12 gene consists of 4273 nucleotides as set forth in SEQ ID NO: 1 and contains a 4071 nucleotide coding sequence corresponding

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

47

to a 1356 amino acids (aa) ABCC12 polypeptide isoform (SEQ ID NO: 33) produced in subjects not affected by disorders of paroxysmal kinesigenic choreoathetosis. The cDNA molecule of the novel human ABCC12 gene having the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 comprises an open reading frame beginning from the nucleotide at position 1  
5 (base A of the ATG codon for initiation of translation) to the nucleotide at position 4071 (base A of the TAA stop codon) of SEQ ID NO:1, which encodes a full length ABCC12 polypeptide of 1356 amino acids of sequence SEQ ID NO:33.

The long form of cDNA molecule of the novel human ABCC12 gene consist of 4282 nucleotides as set forth in SEQ ID No: 2 and contains a 4080 nucleotide coding sequence  
10 corresponding to a 1359 amino acids (aa) ABCC12 polypeptide isoform (SEQ ID No: 34) produced in subjects not affected by disorders of paroxysmal kinesigenic choreoathetosis. The cDNA coding the long isoform of the ABCC12 protein, having the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID No: 2, comprises an open reading frame beginning from the nucleotide 1 at position 1 (base A of the ATG codon for initiation of the translation) to the nucleotide at  
15 position 4080 (base A of the TAA stop codon) of SEQ ID No: 2, which encodes the long isoform of the ABCC12 polypeptide of 1359 amino acids of sequence ID No: 34.

The present invention is thus directed to a nucleic acid comprising SEQ ID NO: 1 and 2, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a nucleic acid comprising a nucleotide sequence as  
20 depicted in SEQ ID NO :1 and 2, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a nucleic acid comprising at least eight consecutive nucleotides of SEQ ID NO: 1 and 2, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The subject of the invention is also a nucleic acid having at least 80% nucleotide identity with a nucleic acid comprising nucleotides of SEQ ID NO: 1-2, or a nucleic acid  
25 having a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a nucleic acid having at least 85%, preferably 90%, more preferably 95% and still more preferably 98% nucleotide identity with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1-2, or a complementary nucleotide sequence thereof.

Another subject of the invention is a nucleic acid hybridizing, under high stringency conditions, with a nucleic acid comprising nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1-2, or a  
30 nucleic acid having a complementary nucleotide sequence thereof.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

48

The invention also relates to a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34.

The invention relates to a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 33 or 34.

5 The invention also relates to a polypeptide comprising amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34.

The invention also relates to a polypeptide comprising amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 33 or 34.

10 The invention also relates to a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 80% amino acid identity with a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34, or a peptide fragment thereof.

The invention also relates to a polypeptide having at least 85%, preferably 90%, more preferably 95% and still more preferably 98% amino acid identity with a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34.

15 Preferably, a polypeptide according to the invention will have a length of 4, 5 to 10, 15, 18 or 20 to 25, 35, 40, 50, 70, 80, 100 or 200 consecutive amino acids of a polypeptide according to the invention comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34.

Topology predictions based on hydropathy profiles and comparison with other known ABC transporters, suggest that the encoded ABCC12 proteins isoforms are full  
20 ABC transporters containing two ATP-binding domains (including Walker A and B domains, and signature motifs) and two transmembrane domains (Figure 1). The amino acid sequence of ABCC12 is 47% identical to the human ABCC5 protein, and 37% to human ABCC4. The ABCC12 protein, like ABCC4 and ABCC5 proteins, is smaller than another well-known member of the subgroup, ABCC1 (MRP1), appearing to lack the extra  
25 N-terminal domain (Borst et al., *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92, 1295-302), which has been shown, however, not to be required for the transport function (Bakos et al., *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 32167-75).

**Table 4: Homology / Identity percentages between the amino acid sequences of ABCC11, ABCC5, ABCC4, ABCC1, and ABCA1 along the entire sequence**

30

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

	ABCC5	ABCC1	ABCC4	ABC-A1	ABCC12
ABCC5	100/100		49		
ABCC1	49/38	100/100			
ABCC4	49/38	52/41	100/100		
ABC-A1	-	-	-	100/100	
ABCC12	57/47	48/36	49/37	-	100/100

Alignment of the amino acid sequences of ABCC12, ABCC4, and ABCC5 genes reveals an identity ranging from 49 to 41% along the entire sequence (Table 4 and Figure 1).

Phylogenetic analysis of the ABCC subfamily proteins clearly demonstrates a close evolutionary relationship of the ABCC12 gene with the ABCC5 gene (Figure 5). In addition, the analysis of the tree suggests a recent duplication of the ABCC8 and ABCC9 genes, while ABCC10 seems to be one of the first genes to separate from the common ancestor. ABCC1, ABCC2, ABCC3, and ABCC6 genes constitute a well-defined sub-cluster, while the ABCC4 and CFTR (ABCC7) genes form another reliable subset despite apparent early divergence.

#### 15 NUCLEOTIDE PROBES AND PRIMERS

Nucleotide probes and primers hybridizing with a nucleic acid (genomic DNA, messenger RNA, cDNA) according to the invention also form part of the invention.

According to the invention, nucleic acid fragments derived from a polynucleotide comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32 or of a complementary nucleotide sequence are useful for the detection of the presence of at least one copy of a nucleotide sequence of the ABCC12 gene or of a fragment or of a variant (containing a mutation or a polymorphism) thereof in a sample.

The nucleotide probes or primers according to the invention comprise a nucleotide sequence comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The nucleotide probes or primers according to the invention comprise at least 8 consecutive nucleotides of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence.

Preferably, nucleotide probes or primers according to the invention have a length of 10, 12, 15, 18 or 20 to 25, 35, 40, 50, 70, 80, 100, 200, 500, 1000, 1500 consecutive nucleotides of a nucleic acid according to the invention, in particular of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

50

Alternatively, a nucleotide probe or primer according to the invention consists of and/or comprise the fragments having a length of 12, 15, 18, 20, 25, 35, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 consecutive nucleotides of a nucleic acid according to the invention, more particularly of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence.

The definition of a nucleotide probe or primer according to the invention therefore covers oligonucleotides which hybridize, under the high stringency hybridization conditions defined above, with a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence.

According to a preferred embodiment, a nucleotide primer according to the invention comprises a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 35-46 or a complementary nucleic acid sequence thereof.

Examples of primers and pairs of primers which make it possible to amplify various regions of the ABCC12 gene are presented in Table 5 below. The location of each primer of SEQ ID NOs: 35-46 within SEQ ID NO: 1 and 2, and its hybridizing region is indicated in Table 5. The abbreviation "Comp" refers to the complementary nucleic acid sequence.

**Table 5: Primers for the amplification of nucleic fragments of the ABCC12 gene**

SEQ ID NO:	NAME	PRIMERS	POSITION (short isoform)	POSITION (long isoform)
35	028397_A	TCCTTCGCCACATTTTC	157-174	157-174
36	028397_B	ATTGAGCACCTCGCCAAC	comp 666-649	comp 666-649
37	028397_C	TTCTCATTACCAAATCCTCC	428-448	428-448
38	028397_D	ACATTAAACATGGCAATCAGAC	comp 1157-1136	comp 1157-1136
39	028397_E	GTGTGATTGCCATGTTAATGT	1136-1157	1136-1157
40	028397_G	GGAGTGCATTAAGAAGACGC	1929-1948	1929-1948
41	028397_H	CAGAGAGGAGGATGCCAT	comp 2643-2626	comp 2652-2635
42	028397_K	CACTGCAAGCATGGTGTTT	2556-2574	2565-2583
43	028397_L	CTCATCGGTGTGACTCTCA	comp 3663-3645	comp 3672-3654
44	028397_O	TTTGAGAGTCACACCGATGAGAT	3643-3665	3652-3674
45	028397_P	CCCAGAACCAACCCCAAG	comp 4273-4256	comp 4282-4265
46	028397_R	GGCTCTGTGAGATGAATAGG	4104-4123	4113-4132

According to a preferred embodiment, a nucleotide primer according to the invention comprises a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 35-46, or a complementary nucleic acid sequence thereof.

A nucleotide primer or probe according to the invention may be prepared by any suitable method well known to persons skilled in the art, including by cloning and action of

restriction enzymes or by direct chemical synthesis according to techniques such as the phosphodiester method by Narang et al. (1979, *Methods Enzymol.*, 68:90-98) or by Brown et al. (1979, *Methods Enzymol.*, 68:109-151), the diethylphosphoramidite method by Beaucage et al. (1981, *Tetrahedron Lett.*, 22: 1859-1862) or the technique on a solid support described in EU patent No. EP 0,707,592.

Each of the nucleic acids according to the invention, including the oligonucleotide probes and primers described above, may be labeled, if desired, by incorporating a marker which can be detected by spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical or chemical means. For example, such markers may consist of radioactive isotopes ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ ), fluorescent molecules (5-bromodeoxyuridine, fluorescein, acetylaminofluorene, digoxigenin) or ligands such as biotin. The labeling of the probes is preferably carried out by incorporating labeled molecules into the polynucleotides by primer extension, or alternatively by addition to the 5' or 3' ends. Examples of nonradioactive labeling of nucleic acid fragments are described in particular in French patent No. 78 109 75 or in the articles by Urdea et al. (1988, *Nucleic Acids Research*, 11:4937-4957) or Sanchez-Pescador et al. (1988, *J. Clin. Microbiol.*, 26(10):1934-1938).

Preferably, the nucleotide probes and primers according to the invention may have structural characteristics of the type to allow amplification of the signal, such as the probes described by Urdea et al. (1991, *Nucleic Acids Symp Ser.*, 24:197-200) or alternatively in European patent No. EP-0,225,807 (CHIRON).

The oligonucleotide probes according to the invention may be used in particular in Southern-type hybridizations with the genomic DNA or alternatively in northern-type hybridizations with the corresponding messenger RNA when the expression of the corresponding transcript is sought in a sample.

The probes and primers according to the invention may also be used for the detection of products of PCR amplification or alternatively for the detection of mismatches.

Nucleotide probes or primers according to the invention may be immobilized on a solid support. Such solid supports are well known to persons skilled in the art and comprise surfaces of wells of microtiter plates, polystyrene beads, magnetic beads, nitrocellulose bands or microparticles such as latex particles.

Consequently, the present invention also relates to a method of detecting the presence of a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleotide sequence, or a nucleic acid fragment or variant of any one of SEQ



WO 02/085943

PCT/EP02/03320

52

ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleotide sequence in a sample, said method comprising the steps of:

1) bringing one or more nucleotide probes or primers according to the invention into contact with the sample to be tested;

5 2) detecting the complex which may have formed between the probe(s) and the nucleic acid present in the sample.

According to a specific embodiment of the method of detection according to the invention, the oligonucleotide probes and primers are immobilized on a support.

According to another aspect, the oligonucleotide probes and primers comprise a  
10 detectable marker.

The invention relates, in addition, to a box or kit for detecting the presence of a nucleic acid according to the invention in a sample, said box or kit comprising:

a) one or more nucleotide probe(s) or primer(s) as described above;

b) where appropriate, the reagents necessary for the hybridization reaction.

15 According to a first aspect, the detection box or kit is characterized in that the probe(s) or primer(s) are immobilized on a support.

According to a second aspect, the detection box or kit is characterized in that the oligonucleotide probes comprise a detectable marker.

According to a specific embodiment of the detection kit described above, such a kit  
20 will comprise a plurality of oligonucleotide probes and/or primers in accordance with the invention which may be used to detect a target nucleic acid of interest or alternatively to detect mutations in the coding regions or the non-coding regions of the nucleic acids according to the invention, more particularly of nucleic acids comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence.

25 Thus, the probes according to the invention, immobilized on a support, may be ordered into matrices such as "DNA chips". Such ordered matrices have in particular been described in US patent No. 5,143,854, in published PCT applications WO 90/15070 and WO 92/10092.

Support matrices on which oligonucleotide probes have been immobilized at a high density are for example described in US patent No. 5,412,087 and in published PCT  
30 application WO 95/11995.

The nucleotide primers according to the invention may be used to amplify any one of the nucleic acids according to the invention, and more particularly a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleotide

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

53

sequence. Alternatively, the nucleotide primers according to the invention may be used to amplify a nucleic acid fragment or variant of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleotide sequence.

5 In a particular embodiment, the nucleotide primers according to the invention may be used to amplify a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleotide sequence.

Another subject of the invention relates to a method of amplifying a nucleic acid according to the invention, and more particularly a nucleic acid comprising a) any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence, b) as depicted in any one of SEQ  
10 ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleotide sequence, contained in a sample, said method comprising the steps of:

a) bringing the sample in which the presence of the target nucleic acid is suspected into contact with a pair of nucleotide primers whose hybridization position is located respectively on the 5' side and on the 3' side of the region of the target nucleic acid whose amplification is  
15 sought, in the presence of the reagents necessary for the amplification reaction; and

b) detecting the amplified nucleic acids.

To carry out the amplification method as defined above, use will be preferably made of any of the nucleotide primers described above.

The subject of the invention is, in addition, a box or kit for amplifying a nucleic acid  
20 according to the invention, and more particularly a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence, or as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleotide sequence, said box or kit comprising:

a) a pair of nucleotide primers in accordance with the invention, whose hybridization position is located respectively on the 5' side and 3' side of the target nucleic acid whose  
25 amplification is sought; and optionally,

b) reagents necessary for the amplification reaction.

Such an amplification box or kit will preferably comprise at least one pair of nucleotide primers as described above.

The subject of the invention is, in addition, a box or kit for amplifying all or part of a  
30 nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence, said box or kit comprising:

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

54

1) a pair of nucleotide primers in accordance with the invention, whose hybridization position is located respectively on the 5' side and 3' side of the target nucleic acid whose amplification is sought; and optionally,

2) reagents necessary for an amplification reaction.

5 Such an amplification box or kit will preferably comprise at least one pair of nucleotide primers as described above.

The invention also relates to a box or kit for detecting the presence of a nucleic acid according to the invention in a sample, said box or kit comprising:

a) one or more nucleotide probes according to the invention;

10 b) where appropriate, reagents necessary for a hybridization reaction.

According to a first aspect, the detection box or kit is characterized in that the nucleotide probe(s) and primer(s) are immobilized on a support.

According to a second aspect, the detection box or kit is characterized in that the nucleotide probe(s) and primer(s) comprise a detectable marker.

15 According to a specific embodiment of the detection kit described above, such a kit will comprise a plurality of oligonucleotide probes and/or primers in accordance with the invention which may be used to detect target nucleic acids of interest or alternatively to detect mutations in the coding regions or the non-coding regions of the nucleic acids according to the invention. According to preferred embodiment of the invention, the target nucleic acid  
20 comprises a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleic acid sequence. Alternatively, the target nucleic acid is a nucleic acid fragment or variant of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleotide sequence.

25 According to the present invention, a primer according to the invention comprises, generally, all or part of any one of SEQ ID NOs: 35-46, or a complementary sequence thereof.

The nucleotide primers according to the invention are particularly useful in methods of genotyping subjects and/or of genotyping populations, in particular in the context of studies of association between particular allele forms or particular forms of groups of alleles (haplotypes) in subjects and the existence of a particular phenotype (character) in these  
30 subjects, for example the predisposition of these subjects to develop diseases a pathology whose candidate chromosomal region is situated on chromosome 16, more precisely on the 16q arm and still more precisely in the 16q12 locus, such as a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

**RECOMBINANT VECTORS**

The invention also relates to a recombinant vector comprising a nucleic acid according to the invention. "Vector" for the purposes of the present invention will be understood to mean a circular or linear DNA or RNA molecule which is either in single-stranded or double-stranded form.

Preferably, such a recombinant vector will comprise a nucleic acid chosen from the following nucleic acids:

- a) a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof;
- b) a nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof;
- c) a nucleic acid having at least eight consecutive nucleotides of a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleotide sequence thereof;
- d) a nucleic acid having at least 80% nucleotide identity with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof;
- e) a nucleic acid having 85%, 90%, 95%, or 98% nucleotide identity with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof;
- f) a nucleic acid hybridizing, under high stringency hybridization conditions, with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of 1) any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof;
- g) a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34; and
- h) a nucleic acid encoding a polypeptide comprising amino acid sequence SEQ ID NO: 33 or 34.

According to a first embodiment, a recombinant vector according to the invention is used to amplify a nucleic acid inserted therein, following transformation or transfection of a desired cellular host.

According to a second embodiment, a recombinant vector according to the invention corresponds to an expression vector comprising, in addition to a nucleic acid in accordance

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

56

with the invention, a regulatory signal or nucleotide sequence that directs or controls transcription and/or translation of the nucleic acid and its encoded mRNA.

According to a preferred embodiment, a recombinant vector according to the invention will comprise in particular the following components:

- 5 (1) an element or signal for regulating the expression of the nucleic acid to be inserted, such as a promoter and/or enhancer sequence;
- (2) a nucleotide coding region comprised within the nucleic acid in accordance with the invention to be inserted into such a vector, said coding region being placed in phase with the regulatory element or signal described in (1); and
- 10 (3) an appropriate nucleic acid for initiation and termination of transcription of the nucleotide coding region of the nucleic acid described in (2).

In addition, the recombinant vectors according to the invention may include one or more origins for replication in the cellular hosts in which their amplification or their expression is sought, markers or selectable markers.

- 15 By way of example, the bacterial promoters may be the *LacI* or *LacZ* promoters, the T3 or T7 bacteriophage RNA polymerase promoters, the lambda phage PR or PL promoters.

The promoters for eukaryotic cells will comprise the herpes simplex virus (HSV) virus thymidine kinase promoter or alternatively the mouse metallothionein-L promoter.

- Generally, for the choice of a suitable promoter, persons skilled in the art can preferably refer to the book by Sambrook et al. (1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York) cited above or to the techniques described by Fuller et al. (1996, *Immunology, In: Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al.(eds.).
- 20

- When the expression of the genomic sequence of any one of the ABCC12 gene will be sought, use will preferably be made of the vectors capable of containing large insertion sequences. In a particular embodiment, bacteriophage vectors such as the P1 bacteriophage vectors such as the vector p158 or the vector p158/neo8 described by Sternberg (1992, Trends Genet., 8:1-16; 1994, Mamm. Genome, 5:397-404) will be preferably used.
- 25

- The preferred bacterial vectors according to the invention are for example the vectors pBR322(ATCC37017) or alternatively vectors such as pAA223-3 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), and pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, UNITED STATES).
- 30

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

57

There may also be cited other commercially available vectors such as the vectors pQE70, pQE60, pQE9 (Qiagen), psiX174, pBluescript SA, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A, pWLNCO, pSV2CAT, pOG44, pXTI, pSG (Stratagene).

They may also be vectors of the baculovirus type such as the vector pVL1392/1393 (Pharmingen) used to transfect cells of the Sf9 line (ATCC No. CRL 1711) derived from *Spodoptera frugiperda*.

They may also be adenoviral vectors such as the human adenovirus of type 2 or 5.

A recombinant vector according to the invention may also be a retroviral vector or an adeno-associated vector (AAV). Such adeno-associated vectors are for example described by Flotte et al. (1992, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 7:349-356), Samulski et al. (1989, J. Virol., 63:3822-3828), or McLaughlin BA et al. (1996, Am. J. Hum. Genet., 59:561-569).

To allow the expression of a polynucleotide according to the invention, the latter must be introduced into a host cell. The introduction of a polynucleotide according to the invention into a host cell may be carried out *in vitro*, according to the techniques well known to persons skilled in the art for transforming or transfecting cells, either in primer culture, or in the form of cell lines. It is also possible to carry out the introduction of a polynucleotide according to the invention *in vivo* or *ex vivo*, for the prevention or treatment of diseases linked to ABC12 deficiencies.

To introduce a polynucleotide or vector of the invention into a host cell, a person skilled in the art can preferably refer to various techniques, such as the calcium phosphate precipitation technique (Graham et al., 1973, Virology, 52:456-457; Chen et al., 1987, Mol. Cell. Biol., 7 : 2745-2752), DEAE Dextran (Gopal, 1985, Mol. Cell. Biol., 5:1188-1190), electroporation (Tur-Kaspa, 1896, Mol. Cell. Biol., 6:716-718; Potter et al., 1984, Proc Natl Acad Sci U S A., 81(22):7161-5), direct microinjection (Harland et al., 1985, J. Cell. Biol., 101:1094-1095), liposomes charged with DNA (Nicolau et al., 1982, Methods Enzymol., 149:157-76; Fraley et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352).

Once the polynucleotide has been introduced into the host cell, it may be stably integrated into the genome of the cell. The integration may be achieved at a precise site of the genome, by homologous recombination, or it may be randomly integrated. In some embodiments, the polynucleotide may be stably maintained in the host cell in the form of an episome fragment, the episome comprising sequences allowing the retention and the replication of the latter, either independently, or in a synchronized manner with the cell cycle.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

58

According to a specific embodiment, a method of introducing a polynucleotide according to the invention into a host cell, in particular a host cell obtained from a mammal, *in vivo*, comprises a step during which a preparation comprising a pharmaceutically compatible vector and a "naked" polynucleotide according to the invention, placed under the control of appropriate regulatory sequences, is introduced by local injection at the level of the chosen tissue, for example myocardial tissue, the "naked" polynucleotide being absorbed by the myocytes of this tissue.

Compositions for use *in vitro* and *in vivo* comprising "naked" polynucleotides are for example described in PCT Application No. WO 95/11307 (Institut Pasteur, Inserm, University of Ottawa) as well as in the articles by Tacson et al. (1996, Nature Medicine, 2(8):888-892) and Huygen et al. (1996, Nature Medicine, 2(8):893-898).

According to a specific embodiment of the invention, a composition is provided for the *in vivo* production of the ABCC12 proteins. This composition comprises a polynucleotide encoding the ABCC12 polypeptides placed under the control of appropriate regulatory sequences, in solution in a physiologically acceptable vector.

The quantity of vector which is injected into the host organism chosen varies according to the site of the injection. As a guide, there may be injected between about 0.1 and about 100 µg of polynucleotide encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms into the body of an animal, preferably into a patient likely to develop a disease linked ABCC12 deficiency.

Consequently, the invention also relates to a pharmaceutical composition intended for the prevention of or treatment of a patient or subject affected by ABCC12 deficiency, comprising a nucleic acid encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms, in combination with one or more physiologically compatible excipients.

Preferably, such a composition will comprise a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2, wherein the nucleic acid is placed under the control of an appropriate regulatory element or signal.

The subject of the invention is, in addition, a pharmaceutical composition intended for the prevention of or treatment of a patient or a subject affected ABCC12 deficiency, comprising a recombinant vector according to the invention, in combination with one or more physiologically compatible excipients.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

59

The invention relates to the use of a nucleic acid according to the invention, encoding the ABCC12 protein, for the manufacture of a medicament intended for the prevention or the treatment of subjects affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

5 The invention also relates to the use of a recombinant vector according to the invention, comprising a nucleic acid encoding any one of the ABCC12 proteins, for the manufacture of a medicament intended for the prevention of paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

10 The invention further relates to the use of a nucleic acid according to the invention, encoding any one of the ABCC12 proteins, for the manufacture of a medicament intended for the prevention or the treatment of pathologies linked to the dysfunction of transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH, glucuronate, or sulfate.

15 The invention also relates to the use of a recombinant vector according to the invention, comprising a nucleic acid encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms, for the manufacture of a medicament intended for the treatment of and prevention of pathologies linked to the dysfunction of transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH, glucuronate, or sulfate.

20 The subject of the invention is therefore also a recombinant vector comprising a nucleic acid according to the invention that encodes any one of the ABCC12 proteins or polypeptides isoforms.

The invention also relates to the use of such a recombinant vector for the preparation of a pharmaceutical composition intended for the treatment and/or for the prevention of diseases or conditions associated with deficiency or paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

25 The present invention also relates to the use of cells genetically modified *ex vivo* with such a recombinant vector according to the invention, or of cells producing a recombinant vector, wherein the cells are implanted in the body, to allow a prolonged and effective expression *in vivo* of at least a biologically active ABCC12 polypeptide isoform.

Vectors useful in methods of somatic gene therapy and compositions containing such vectors.

30 The present invention also relates to a new therapeutic approach for the treatment of pathologies linked to ABCC12 deficiencies. It provides an advantageous solution to the disadvantages of the prior art, by demonstrating the possibility of treating the pathologies linked to the ABCC12 deficiency by gene therapy, by the transfer and expression *in vivo* of a



WO 02/085943

PCT/EP02/03320

60

gene encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms involved in the paroxysmal kinesigenic choreoathetosis. The invention thus offers a simple means allowing a specific and effective treatment of the 16q12 located pathologies such as, paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

5 Gene therapy consists in correcting a deficiency or an abnormality (mutation, aberrant expression and the like) and in bringing about the expression of a protein of therapeutic interest by introducing genetic information into the affected cell or organ. This genetic information may be introduced either *ex vivo* into a cell extracted from the organ, the modified cell then being reintroduced into the body, or directly *in vivo* into the appropriate tissue. In  
10 this second case, various techniques exist, among which various transfection techniques involving complexes of DNA and DEAE-dextran (Pagano et al., *J. Virol.* 1 (1967)891), of DNA and nuclear proteins (Kaneda et al., 1989, *Science* 243:375), of DNA and lipids (Felgner et al., 1987, *PNAS* 84:7413), the use of liposomes (Fraleigh et al., 1980, *J.Biol.Chem.*, 255:10431), and the like. More recently, the use of viruses as vectors for the transfer of genes  
15 has appeared as a promising alternative to these physical transfection techniques. In this regard, various viruses have been tested for their capacity to infect certain cell populations. In particular, the retroviruses (RSV, HMS, MMS, and the like), the HSV virus, the adeno-associated viruses and the adenoviruses.

The present invention therefore also relates to a new therapeutic approach for the  
20 treatment of pathologies linked to ABCC12 deficiencies, consisting in transferring and in expressing *in vivo* genes encoding ABCC12. In a particularly preferred manner, the applicant has now found that it is possible to construct recombinant vectors comprising a nucleic acid encoding any one of the ABCC12 proteins, to administer these recombinant vectors *in vivo*, and that this administration allows a stable and effective expression of at least one of the  
25 biologically active ABCC12 proteins *in vivo*, with no cytopathological effect.

Adenoviruses constitute particularly efficient vectors for the transfer and the expression of any one of the ABCC12 gene. The use of recombinant adenoviruses as vectors makes it possible to obtain sufficiently high levels of expression of this gene to produce the desired therapeutic effect. Other viral vectors such as retroviruses or adeno-associated viruses  
30 (AAV) can allow a stable expression of the gene are also claimed.

The present invention is thus likely to offer a new approach for the treatment and prevention of ABCC12 deficiencies.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

61

The subject of the invention is therefore also a defective recombinant virus comprising a nucleic acid according to the invention that encodes the ABCC12 protein or polypeptide.

5 The invention also relates to the use of such a defective recombinant virus for the preparation of a pharmaceutical composition which may be useful for the treatment and/or for the prevention of ABCC12 deficiencies.

The present invention also relates to the use of cells genetically modified *ex vivo* with such a defective recombinant virus according to the invention, or of cells producing a defective recombinant virus, wherein the cells are implanted in the body, to allow a prolonged and effective expression *in vivo* of the biologically active ABCC12 polypeptides.

10 The present invention is particularly advantageous because it is possible to induce a controlled expression, and with no harmful effect of ABCC12 in organs which are not normally involved in the expression of this protein. In particular, a significant release of the ABCC12 protein is obtained by implantation of cells producing vectors of the invention, or infected *ex vivo* with vectors of the invention.

The activity of these ABCC protein transporters produced in the context of the present invention may be of the human or animal ABCC12 type. The nucleic sequence used in the context of the present invention may be a cDNA, a genomic DNA (gDNA), an RNA (in the case of retroviruses) or a hybrid construct consisting, for example, of a cDNA into which one or more introns (gDNA) would be inserted. It may also involve synthetic or semisynthetic sequences. In a particularly advantageous manner, a cDNA or a gDNA is used. In particular, the use of a gDNA allows a better expression in human cells. To allow their incorporation into a viral vector according to the invention, these sequences are preferably modified, for example by site-directed mutagenesis, in particular for the insertion of appropriate restriction sites. The sequences described in the prior art are indeed not constructed for use according to the invention, and prior adaptations may prove necessary, in order to obtain substantial expressions. In the context of the present invention, the use of nucleic sequences encoding the human ABCC12 proteins are preferred. Moreover, it is also possible to use a construct encoding a derivative of the ABCC12 protein. A derivative of any one the ABCC12 proteins comprises, for example, any sequence obtained by mutation, deletion and/or addition relative to the native sequence, and encoding a product retaining the lipophilic substances transport activity. These modifications may be made by techniques known to a person skilled in the art (see general molecular biological techniques below). The biological activity of the derivatives

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

62

thus obtained can then be easily determined, as indicated in particular in the examples of the measurement of the efflux of the substrate from cells. The derivatives for the purposes of the invention may also be obtained by hybridization from nucleic acid libraries, using as probe the native sequence or a fragment thereof.

5 These derivatives are in particular molecules having a higher affinity for their binding sites, molecules exhibiting greater resistance to proteases, molecules having a higher therapeutic efficacy or fewer side effects, or optionally new biological properties. The derivatives also include the modified DNA sequences allowing improved expression *in vivo*.

In a first embodiment, the present invention relates to a defective recombinant virus  
10 comprising a cDNA encoding the ABCC12 polypeptides isoforms. In another preferred embodiment of the invention, a defective recombinant virus comprises a genomic DNA (gDNA) encoding the ABCC12 polypeptide isoform. Preferably, the ABCC12 polypeptides isoforms comprise an amino acid sequence SEQ ID NO: 33 or 34, respectively.

The vectors of the invention may be prepared from various types of viruses.  
15 Preferably, vectors derived from adenoviruses, adeno-associated viruses (AAV), herpesviruses (HSV) or retroviruses are used. It is preferable to use an adenovirus, for direct administration or for the ex vivo modification of cells intended to be implanted, or a retrovirus, for the implantation of producing cells.

The viruses according to the invention are defective, that is to say that they are  
20 incapable of autonomously replicating in the target cell. Generally, the genome of the defective viruses used in the context of the present invention therefore lacks at least the sequences necessary for the replication of said virus in the infected cell. These regions may be either eliminated (completely or partially), or made non functional, or substituted with other sequences and in particular with the nucleic sequence encoding any one of the ABCC12  
25 protein isoforms. Preferably, the defective virus retains, nevertheless, the sequences of its genome which are necessary for the encapsidation of the viral particles.

As regards more particularly adenoviruses, various serotypes, whose structure and properties vary somewhat, have been characterized. Among these serotypes, human  
30 adenoviruses of type 2 or 5 (Ad 2 or Ad 5) or adenoviruses of animal origin (see Application WO 94/26914) are preferably used in the context of the present invention. Among the adenoviruses of animal origin which can be used in the context of the present invention, there may be mentioned adenoviruses of canine, bovine, murine (example: Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, avian or simian (example: SAV) origin. Preferably,

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

63

the adenovirus of animal origin is a canine adenovirus, more preferably a CAV2 adenovirus [Manhattan or A26/61 strain (ATCC VR-800) for example]. Preferably, adenoviruses of human or canine or mixed origin are used in the context of the invention. Preferably, the defective adenoviruses of the invention comprise the ITRs, a sequence allowing the encapsidation and the sequence encoding the ABCC12 proteins isoforms. Preferably, in the genome of the adenoviruses of the invention, the E1 region at least is made non functional. Still more preferably, in the genome of the adenoviruses of the invention, the E1 gene and at least one of the E2, E4 and L1-L5 genes are non functional. The viral gene considered may be made non functional by any technique known to a person skilled in the art, and in particular by total suppression, by substitution, by partial deletion or by addition of one or more bases in the gene(s) considered. Such modifications may be obtained *in vitro* (on the isolated DNA) or *in situ*, for example, by means of genetic engineering techniques, or by treatment by means of mutagenic agents. Other regions may also be modified, and in particular the E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) and L5 (WO95/02697) region. According to a preferred embodiment, the adenovirus according to the invention comprises a deletion in the E1 and E4 regions and the sequence encoding ABCC12 is inserted at the level of the inactivated E1 region. According to another preferred embodiment, it comprises a deletion in the E1 region at the level of which the E4 region and the sequence encoding the ABCC12 proteins isoforms (French Patent Application FR94 13355) are inserted.

The defective recombinant adenoviruses according to the invention may be prepared by any technique known to persons skilled in the art (Levrero et al., 1991 Gene 101; EP 185 573; and Graham, 1984, EMBO J., 3:2917). In particular, they may be prepared by homologous recombination between an adenovirus and a plasmid carrying, *inter alia*, the nucleic acid encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms. The homologous recombination occurs after cotransfection of said adenoviruses and plasmid into an appropriate cell line. The cell line used must preferably (i) be transformable by said elements, and (ii), contain the sequences capable of complementing the part of the defective adenovirus genome, preferably in integrated form in order to avoid the risks of recombination. By way of example of a line, there may be mentioned the human embryonic kidney line 293 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., 36:59), which contains in particular, integrated into its genome, the left part of the genome of an Ad5 adenovirus (12%) or lines capable of complementing the E1 and E4 functions as described in particular in Applications No. WO 94/26914 and WO95/02697.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

64

As regards the adeno-associated viruses (AAV), they are DNA viruses of a relatively small size, which integrate into the genome of the cells which they infect, in a stable and site-specific manner. They are capable of infecting a broad spectrum of cells, without inducing any effect on cellular growth, morphology or differentiation. Moreover, they do not appear to be involved in pathologies in humans. The genome of AAVs has been cloned, sequenced and characterized. It comprises about 4700 bases, and contains at each end an inverted repeat region (ITR) of about 145 bases, serving as replication origin for the virus. The remainder of the genome is divided into 2 essential regions carrying the encapsidation functions: the left hand part of the genome, which contains the rep gene, involved in the viral replication and the expression of the viral genes; the right hand part of the genome, which contains the cap gene encoding the virus capsid proteins.

The use of vectors derived from AAVs for the transfer of genes *in vitro* and *in vivo* has been described in the literature (see in particular WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). These applications describe various constructs derived from AAVs, in which the rep and/or cap genes are deleted and replaced by a gene of interest, and their use for transferring *in vitro* (on cells in culture) or *in vivo* (directly into an organism) said gene of interest. However, none of these documents either describes or suggests the use of a recombinant AAV for the transfer and expression *in vivo* or *ex vivo* one of the ABCC12 proteins, or the advantages of such a transfer. The defective recombinant AAVs according to the invention may be prepared by cotransfection, into a cell line infected with a human helper virus (for example an adenovirus), of a plasmid containing the sequence encoding the ABCC12 protein bordered by two AAV inverted repeat regions (ITR), and of a plasmid carrying the AAV encapsidation genes (rep and cap genes). The recombinant AAVs produced are then purified by conventional techniques.

As regards the herpesviruses and the retroviruses, the construction of recombinant vectors has been widely described in the literature: see in particular Breakfield et al., (1991. New Biologist, 3:203); EP 453242, EP178220, Bernstein et al. (1985); McCormick, (1985. BioTechnology, 3:689), and the like.

In particular, the retroviruses are integrating viruses, infecting dividing cells. The genome of the retroviruses essentially comprises two long terminal repeats (LTRs), an encapsidation sequence and three coding regions (gag, pol and env). In the recombinant vectors derived from retroviruses, the gag, pol and env genes are generally deleted, completely or partially, and replaced with a heterologous nucleic acid sequence of interest. These vectors

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

65

may be produced from various types of retroviruses such as in particular MoMuLV ("murine moloney leukemia virus"; also called MoMLV), MSV ("murine moloney sarcoma virus"), HaSV ("harvey sarcoma virus"); SNV ("spleen necrosis virus"); RSV ("rous sarcoma virus") or Friend's virus.

5 To construct recombinant retroviruses containing a sequence encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms according to the invention, a plasmid containing in particular the LTRs, the encapsidation sequence and said coding sequence is generally constructed, and then used to transfect a so-called encapsidation cell line, capable of providing in trans the retroviral functions deficient in the plasmid. Generally, the encapsidation lines are therefore capable of  
10 expressing the gag, pol and env genes. Such encapsidation lines have been described in the prior art, and in particular the PA317 line (US 4,861,719), the PsiCRIP line (WO 90/02806) and the GP+envAm-12 line (WO 89/07150). Moreover, the recombinant retroviruses may contain modifications at the level of the LTRs in order to suppress the transcriptional activity, as well as extended encapsidation sequences, containing a portion of the gag gene (Bender et  
15 al., 1987, J. Virol., 61:1639). The recombinant retroviruses produced are then purified by conventional techniques.

To carry out the present invention, it is preferable to use a defective recombinant adenovirus. The particularly advantageous properties of adenoviruses are preferred for the *in vivo* expression of a protein having a lipophilic substrate transport activity. The adenoviral  
20 vectors according to the invention are particularly preferred for a direct administration *in vivo* of a purified suspension, or for the ex vivo transformation of cells, in particular autologous cells, in view of their implantation. Furthermore, the adenoviral vectors according to the invention exhibit, in addition, considerable advantages, such as in particular their very high infection efficiency, which makes it possible to carry out infections using small volumes of  
25 viral suspension.

According to another particularly preferred embodiment of the invention, a line producing retroviral vectors containing the sequence encoding any one of the ABCC12 protein isoforms is used for implantation *in vivo*. The lines which can be used to this end are in particular the PA317 (US 4,861,719), PsiCrip (WO 90/02806) and GP+envAm-12  
30 (US 5,278,056) cells modified so as to allow the production of a retrovirus containing a nucleic sequence encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms according to the invention. For example, totipotent stem cells, precursors of blood cell lines, may be collected and isolated from a subject. These cells, when cultured, may then be transfected with the

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

66

retroviral vector containing the sequence encoding any one of the ABCC12 protein isoforms under the control of viral, nonviral or nonviral promoters specific for macrophages or under the control of its own promoter. These cells are then reintroduced into the subject. The differentiation of these cells will be responsible for blood cells expressing one of the ABCC12  
5 protein isoforms.

Preferably, in the vectors of the invention, the sequence encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms is placed under the control of signals allowing its expression in the infected cells. These may be expression signals which are homologous or heterologous, that is to say signals different from those which are naturally responsible for the expression of  
10 the ABCC12 proteins. They may also be in particular sequences responsible for the expression of other proteins, or synthetic sequences. In particular, they may be sequences of eukaryotic or viral genes or derived sequences, stimulating or repressing the transcription of a gene in a specific manner or otherwise and in an inducible manner or otherwise. By way of example, they may be promoter sequences derived from the genome of the cell which it is desired to  
15 infect, or from the genome of a virus, and in particular the promoters of the E1A or major late promoter (MLP) genes of adenoviruses, the cytomegalovirus (CMV) promoter, the RSV-LTR and the like. Among the eukaryotic promoters, there may also be mentioned the ubiquitous promoters (HPRT, vimentin,  $\alpha$ -actin, tubulin and the like), the promoters of the intermediate filaments (desmin, neurofilaments, keratin, GFAP, and the like), the promoters of therapeutic  
20 genes (of the MDR, CFTR or factor VIII type, and the like), tissue-specific promoters (pyruvate kinase, villin, promoter of the fatty acid binding intestinal protein, promoter of the smooth muscle cell  $\alpha$ -actin, promoters specific for the liver; Apo AI, Apo AII, human albumin and the like) or promoters corresponding to a stimulus (steroid hormone receptor, retinoic acid receptor and the like). In addition, these expression sequences may be modified  
25 by addition of enhancer or regulatory sequences and the like. Moreover, when the inserted gene does not contain expression sequences, it may be inserted into the genome of the defective virus downstream of such a sequence.

In a specific embodiment, the invention relates to a defective recombinant virus comprising a nucleic acid encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms the control of a  
30 promoter chosen from RSV-LTR or the CMV early promoter.

As indicated above, the present invention also relates to any use of a virus as described above for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment and/or prevention of pathologies linked to the transport of lipophilic substances.

The present invention also relates to a pharmaceutical composition comprising one or more defective recombinant viruses as described above. These pharmaceutical compositions may be formulated for administration by the topical, oral, parenteral, intranasal, intravenous, intramuscular, subcutaneous, intraocular or transdermal route and the like. Preferably, the pharmaceutical compositions of the invention comprises a pharmaceutically acceptable vehicle or physiologically compatible excipient for an injectable formulation, in particular for an intravenous injection, such as for example into the patient's portal vein. These may relate in particular to isotonic sterile solutions or dry, in particular, freeze-dried, compositions which, upon addition depending on the case of sterilized water or physiological saline, allow the preparation of injectable solutions. Direct injection into the patient's portal vein is preferred because it makes it possible to target the infection at the level of the liver and thus to concentrate the therapeutic effect at the level of this organ.

The doses of defective recombinant virus used for the injection may be adjusted as a function of various parameters, and in particular as a function of the viral vector, of the mode of administration used, of the relevant pathology or of the desired duration of treatment. In general, the recombinant adenoviruses according to the invention are formulated and administered in the form of doses of between  $10^4$  and  $10^{14}$  pfu/ml, and preferably  $10^6$  to  $10^{10}$  pfu/ml. The term "pfu" (plaque forming unit) corresponds to the infectivity of a virus solution, and is determined by infecting an appropriate cell culture and measuring, generally after 48 hours, the number of plaques that result from infected cell lysis. The techniques for determining the pfu titer of a viral solution are well documented in the literature.

As regards retroviruses, the compositions according to the invention may directly contain the producing cells, with a view to their implantation.

In this regard, another subject of the invention relates to any mammalian cell infected with one or more defective recombinant viruses according to the invention. More particularly, the invention relates to any population of human cells infected with such viruses. These may be in particular cells of blood origin (totipotent stem cells or precursors), fibroblasts, myoblasts, hepatocytes, keratinocytes, smooth muscle and endothelial cells, glial cells and the like.



The cells according to the invention may be derived from primary cultures. These may be collected by any technique known to persons skilled in the art and then cultured under conditions allowing their proliferation. As regards more particularly fibroblasts, these may be easily obtained from biopsies, for example according to the technique described by Ham  
5 (1980). These cells may be used directly for infection with the viruses, or stored, for example by freezing, for the establishment of autologous libraries, in view of a subsequent use. The cells according to the invention may be secondary cultures, obtained for example from pre-established libraries (see for example EP 228458, EP 289034, EP 400047, EP 456640).

The cells in culture are then infected with a recombinant virus according to the  
10 invention, in order to confer on them the capacity to produce a biologically active ABCC12 protein. The infection is carried out *in vitro* according to techniques known to persons skilled in the art. In particular, depending on the type of cells used and the desired number of copies of virus per cell, persons skilled in the art can adjust the multiplicity of infection and optionally the number of infectious cycles produced. It is clearly understood that these steps  
15 must be carried out under appropriate conditions of sterility when the cells are intended for administration *in vivo*. The doses of recombinant virus used for the infection of the cells may be adjusted by persons skilled in the art according to the desired aim. The conditions described above for the administration *in vivo* may be applied to the infection *in vitro*. For the infection with a retrovirus, it is also possible to co-culture a cell to be infected with a cell  
20 producing the recombinant retrovirus according to the invention. This makes it possible to eliminate purification of the retrovirus.

Another subject of the invention relates to an implant comprising mammalian cells infected with one or more defective recombinant viruses according to the invention or cells producing recombinant viruses, and an extracellular matrix. Preferably, the implants  
25 according to the invention comprise  $10^5$  to  $10^{10}$  cells. More preferably, they comprise  $10^6$  to  $10^8$  cells.

More particularly, in the implants of the invention, the extracellular matrix comprises a gelling compound and optionally a support allowing the anchorage of the cells.

For the preparation of the implants according to the invention, various types of  
30 gelling agents may be used. The gelling agents are used for the inclusion of the cells in a matrix having the constitution of a gel, and for promoting the anchorage of the cells on the support, where appropriate. Various cell adhesion agents can therefore be used as gelling

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

69

agents, such as in particular collagen, gelatin, glycosaminoglycans, fibronectin, lectins and the like. Preferably, collagen is used in the context of the present invention. This may be collagen of human, bovine or murine origin. More preferably, type I collagen is used.

As indicated above, the compositions according to the invention preferably comprise  
5 a support allowing the anchorage of the cells. The term anchorage designates any form of biological and/or chemical and/or physical interaction causing the adhesion and/or the attachment of the cells to the support. Moreover, the cells may either cover the support used, or penetrate inside this support, or both. It is preferable to use in the context of the invention a solid, nontoxic and/or biocompatible support. In particular, it is possible to use  
10 polytetrafluoroethylene (PTFE) fibers or a support of biological origin.

The present invention thus offers a very effective means for the treatment or prevention of pathologies linked to the transport of lipophilic substances.

In addition, this treatment may be applied to both humans and any animals such as ovines, bovines, domestic animals (dogs, cats and the like), horses, fish and the like.

15

#### RECOMBINANT HOST CELLS

The invention relates to a recombinant host cell comprising a nucleic acid of the invention, and more particularly, a nucleic acid comprising a nucleotide sequence selected from SEQ ID NO: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

20 The invention also relates to a recombinant host cell comprising a nucleic acid of the invention, and more particularly a nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted in SEQ ID NO: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

According to another aspect, the invention also relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector according to the invention. Therefore, the invention also  
25 relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector comprising any of the nucleic acids of the invention, and more particularly a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of selected from SEQ ID NO: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector  
30 comprising a nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleotide sequence thereof.

The preferred host cells according to the invention are for example the following:

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

70

a) prokaryotic host cells: strains of *Escherichia coli* (strain DH5- $\alpha$ ), of *Bacillus subtilis*, of *Salmonella typhimurium*, or strains of genera such as *Pseudomonas*, *Sireptomycetes* and *Staphylococcus* ;

b) eukaryotic host cells: HeLa cells (ATCC No. CCL2), Cv 1 cells (ATCC No. CCL70), COS cells (ATCC No. CRL 1650), Sf-9 cells (ATCC No. CRL 1711), CHO cells (ATCC No. CCL-61) 3T3 cells (ATCC No. CRL-6361) or human Erythroleukemia K562 (ATCC N° CCL-243).

#### METHODS FOR PRODUCING ABCC12 POLYPEPTIDES ISOFORMS

10 The invention also relates to a method for the production of a polypeptide comprising an amino acid sequence SEQ ID NOs: 33 or 34, said method comprising the steps of:

a) inserting a nucleic acid encoding said polypeptide into an appropriate vector;

b) culturing, in an appropriate culture medium, a previously transformed host cell or transfecting a host cell with the recombinant vector of step a);

15 c) recovering the conditioned culture medium or lysing the host cell, for example by sonication or by osmotic shock;

d) separating and purifying said polypeptide from said culture medium or alternatively from the cell lysates obtained in step c); and

e) where appropriate, characterizing the recombinant polypeptide produced.

20 The polypeptides according to the invention may be characterized by binding to an immunoaffinity chromatography column on which the antibodies directed against this polypeptide or against a fragment or a variant thereof have been previously immobilized.

According to another aspect, a recombinant polypeptide according to the invention may be purified by passing it over an appropriate series of chromatography columns, according to methods known to persons skilled in the art and described for example in F. Ausubel et al (1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y).

25 A polypeptide according to the invention may also be prepared by conventional chemical synthesis techniques either in homogeneous solution or in solid phase. By way of illustration, a polypeptide according to the invention may be prepared by the technique either in homogeneous solution described by Houben Weyl (1974, Methode der Organischen

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

71

Chemie, E. Wunsch Ed., 15-I:15-II) or the solid phase synthesis technique described by Merrifield (1965, *Nature*, 207(996):522-523; 1965, *Science*, 150(693):178-185).

A polypeptide termed "homologous" to a polypeptide having an amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 33 or 34 also forms part of the invention. Such a homologous  
5 polypeptide comprises an amino acid sequence possessing one or more substitutions of an amino acid by an equivalent amino acid of SEQ ID NO: 33 or 34.

An "equivalent amino acid" according to the present invention will be understood to mean for example replacement of a residue in the L form by a residue in the D form or the replacement of a glutamic acid (E) by a pyro-glutamic acid according to techniques well  
10 known to persons skilled in the art. By way of illustration, the synthesis of peptide containing at least one residue in the D form is described by Koch (1977). According to another aspect, two amino acids belonging to the same class, that is to say two uncharged polar, nonpolar, basic or acidic amino acids, are also considered as equivalent amino acids.

Polypeptides comprising at least one nonpeptide bond such as a retro-inverse bond  
15 (NHCO), a carba bond (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) or a ketomethylene bond (CO-CH<sub>2</sub>) also form part of the invention.

Preferably, the polypeptides according to the invention comprising one or more additions, deletions, substitutions of at least one amino acid will retain their capacity to be recognized by antibodies directed against the nonmodified polypeptides.

20

#### ANTIBODIES

The ABCC12 polypeptide isoforms according to the invention, in particular 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of any one of SEQ ID NO: 33 or 34, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of any  
25 one of SEQ ID NO: 33 or 34, or 3) a polypeptide termed "homologous" to a polypeptide comprising amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 33 or 34, may be used for the preparation of an antibody, in particular for detecting the production of a normal or altered form of ABCC12 polypeptides in a patient.

An antibody directed against a polypeptide termed "homologous" to a polypeptide  
30 having an amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 33 or 34 also forms part of the invention. Such an antibody is directed against a homologous polypeptide comprising an amino acid sequence possessing one or more substitutions of an amino acid by an equivalent amino acid of SEQ ID NO: 33 or 34.

"Antibody" for the purposes of the present invention will be understood to mean in particular polyclonal or monoclonal antibodies or fragments (for example the F(ab)'<sub>2</sub> and Fab fragments) or any polypeptide comprising a domain of the initial antibody recognizing the target polypeptide or polypeptide fragment according to the invention.

5 Monoclonal antibodies may be prepared from hybridomas according to the technique described by Kohler and Milstein (1975, *Nature*, 256:495-497).

According to the invention, a polypeptide produced recombinantly or by chemical synthesis, and fragments or other derivatives or analogs thereof, including fusion proteins, may be used as an immunogen to generate antibodies that recognize a polypeptide according  
10 to the invention. Such antibodies include but are not limited to polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, and an Fab expression library. The anti-ABCC5, anti-ABCC4, or anti-ABCC1 antibodies of the invention may be cross reactive, *e.g.*, they may recognize corresponding ABCC12 polypeptide from different species. Polyclonal antibodies have greater likelihood of cross reactivity. Alternatively, an antibody of the invention may be  
15 specific for a single form of ABCC12. Preferably, such an antibody is specific for human ABCC12.

Various procedures known in the art may be used for the production of polyclonal antibodies to the ABCC12 polypeptide or derivative or analog thereof. For the production of antibody, various host animals can be immunized by injection with the ABCC12 polypeptide,  
20 or a derivatives (*e.g.*, fragment or fusion protein) thereof, including but not limited to rabbits, mice, rats, sheep, goats, etc. In one embodiment, the ABCC12 polypeptide or a fragment thereof can be conjugated to an immunogenic carrier, *e.g.*, bovine serum albumin (BSA) or keyhole limpet hemocyanin (KLH). Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, including but not limited to Freund's  
25 (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanins, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (*bacille Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum*.

For preparation of monoclonal antibodies directed toward the ABCC12 polypeptides  
30 isoforms, or a fragment, analog, or derivative thereof, any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture may be used. These include but are not limited to the hybridoma technique originally developed by Kohler and Milstein (1975, *Nature*, 256:495-497), as well as the trioma technique, the human B-cell

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

73

hybridoma technique (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today*, 4:72; Cote et al. 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2026-2030), and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole et al., 1985, In: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). In an additional embodiment of the invention, monoclonal antibodies can be produced in germ-free animals (WO 89/12690). In fact, according to the invention, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Morrison et al., 1984, *J. Bacteriol.* 159:870; Neuberger et al., 1984, *Nature*, 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452-454) by splicing the genes from a mouse antibody molecule specific for the ABCC12 polypeptide together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used; such antibodies are within the scope of this invention. Such human or humanized chimeric antibodies are preferred for use in therapy of human diseases or disorders (described *infra*), since the human or humanized antibodies are much less likely than xenogenic antibodies to induce an immune response, in particular an allergic response, themselves.

According to the invention, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Patent Nos. 5,476,786 and 5,132,405 to Huston; U.S. Patent 4,946,778) can be adapted to produce ABCC12 polypeptide-specific single chain antibodies. An additional embodiment of the invention utilizes the techniques described for the construction of Fab expression libraries (Huse et al., 1989, *Science* 246:1275-1281) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for the ABCC12 polypeptide, or its derivative, or analog.

Antibody fragments which contain the idiotype of the antibody molecule can be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited to: the  $F(ab')_2$  fragment which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule; the Fab' fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the  $F(ab')_2$  fragment, and the Fab fragments which can be generated by treating the antibody molecule with papain and a reducing agent.

In the production of antibodies, screening for the desired antibody can be accomplished by techniques known in the art, e.g., radioimmunoassay, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoradiometric assays, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, *in situ* immunoassays (using colloidal gold, enzyme or radioisotope labels, for example), western blots, precipitation reactions, agglutination assays (e.g., gel agglutination assays, hemagglutination assays), complement

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

74

fixation assays, immunofluorescence assays, protein A assays, and immunoelectrophoresis assays, etc. In one embodiment, antibody binding is detected by detecting a label on the primary antibody. In another embodiment, the primary antibody is detected by detecting binding of a secondary antibody or reagent to the primary antibody. In a further embodiment, the secondary antibody is labelled. Many means are known in the art for detecting binding in an immunoassay and are within the scope of the present invention. For example, to select antibodies which recognize a specific epitope of the ABCC12 polypeptides, one may assay generated hybridomas for a product which binds to one ABCC12 polypeptide fragment containing such epitope. For selection of an antibody specific to one ABCC12 polypeptide from a particular species of animal, one can select on the basis of positive binding with one ABCC12 polypeptide expressed by or isolated from cells of that species of animal.

The foregoing antibodies can be used in methods known in the art relating to the localization and activity of the ABCC12 polypeptide isoforms, e.g., for Western blotting, ABCC12 polypeptide *in situ*, measuring levels thereof in appropriate physiological samples, etc. using any of the detection techniques mentioned above or known in the art.

In a specific embodiment, antibodies that agonize or antagonize the activity of one ABCC12 polypeptide can be generated. Such antibodies can be tested using the assays described *infra* for identifying ligands.

The present invention relates to an antibody directed against 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 33 or 34, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 33 or 34, or 3) a polypeptide termed "homologous" to a polypeptide comprising amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 33 or 34, also forms part of the invention, as produced in the trioma technique or the hybridoma technique described by Kozbor et al. (1983, *Hybridoma*, 2(1):7-16).

The invention also relates to single-chain Fv antibody fragments (ScFv) as described in US patent No. 4,946,778 or by Martineau et al. (1998, *J Mol Biol*, 280(1):117-127).

The antibodies according to the invention also comprise antibody fragments obtained with the aid of phage libraries as described by Ridder et al., (1995, *Biotechnology* (NY), 13(3):255-260) or humanized antibodies as described by Reinmann et al. (1997, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 13(11):933-943) and Leger et al., (1997, *Hum Antibodies*, 8(1):3-16).

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

75

The antibody preparations according to the invention are useful in immunological detection tests intended for the identification of the presence and/or of the quantity of antigens present in a sample.

5 An antibody according to the invention may comprise, in addition, a detectable marker which is isotopic or nonisotopic, for example fluorescent, or may be coupled to a molecule such as biotin, according to techniques well known to persons skilled in the art.

Thus, the subject of the invention is, in addition, a method of detecting the presence of a polypeptide according to the invention in a sample, said method comprising the steps of:

10 a) bringing the sample to be tested into contact with an antibody directed against 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 33 or 34, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 33 or 34, or 3) a polypeptide termed "homologous" to a polypeptide comprising amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34, and

b) detecting the antigen/antibody complex formed.

15 The invention also relates to a box or kit for diagnosis or for detecting the presence of a polypeptide in accordance with the invention in a sample, said box comprising:

a) an antibody directed against 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:33 or 34, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 33 or 34, or 3) a polypeptide termed "homologous"

20 to a polypeptide comprising amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34, and

b) a reagent allowing the detection of the antigen/antibody complexes formed.

#### PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND THERAPEUTIC METHODS OF TREATMENT

25 The invention also relates to pharmaceutical compositions intended for the prevention and/or treatment of a deficiency in the transport of cholesterol or inflammatory lipid substances, characterized in that they comprise a therapeutically effective quantity of a polynucleotide capable of giving rise to the production of an effective quantity of the ABCC12 functional polypeptide, in particular a polypeptide comprising an amino acid

30 sequence of SEQ ID NO: 33 or 34.

The invention also provides pharmaceutical compositions comprising a nucleic acid encoding any one of ABCC12 polypeptides isoforms according to the invention and pharmaceutical compositions comprising the ABCC12 polypeptides isoforms according to the



WO 02/085943

PCT/EP02/03320

76

invention intended for the prevention and/or treatment of diseases which are mapped on the chromosome locus 16q12.

The present invention also relates to a new therapeutic approach for the treatment of pathologies linked to the transport of lipophilic substances, comprising transferring and  
5 expressing *in vivo* nucleic acids encoding the ABCC12 proteins isoforms according to the invention.

Thus, the present invention offers a new approach for the treatment and/or the prevention of pathologies such as the paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

Consequently, the invention also relates to a pharmaceutical composition intended for  
10 the prevention of or treatment of subjects affected by a dysfunction of the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH conjugated drugs, glucuronate, or sulfate, comprising a nucleic acid encoding the ABCC12 proteins isoforms in combination with one or more physiologically compatible vehicle and/or excipient.

15 According to a specific embodiment of the invention, a composition is provided for the *in vivo* production any one of the ABCC12 proteins isoforms. This composition comprises a nucleic acid encoding any one of the ABCC12 polypeptides isoforms placed under the control of appropriate regulatory sequences, in solution in a physiologically acceptable vehicle and/or excipient.

20 Therefore, the present invention also relates to a composition comprising a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34, wherein the nucleic acid is placed under the control of appropriate regulatory elements.

Preferably, such a composition will comprise a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2, placed under the control of appropriate regulatory elements.

25 According to another aspect, the subject of the invention is also a preventive and/or curative therapeutic method of treating diseases caused by a deficiency in the transport of lipophilic substances, such a method comprising a step in which there is administered to a patient a nucleic acid encoding any one of the ABCC12 polypeptides isoforms according to the invention in said patient, said nucleic acid being, where appropriate, combined with one or  
30 more physiologically compatible vehicles and/or excipients.

The invention also relates to a pharmaceutical composition intended for the prevention of or treatment of subjects affected by, a deficiency of the ABCC12 gene, comprising a

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

77

recombinant vector according to the invention, in combination with one or more physiologically compatible excipients.

According to a specific embodiment, a method of introducing a nucleic acid according to the invention into a host cell, in particular a host cell obtained from a mammal, *in vivo*, comprises a step during which a preparation comprising a pharmaceutically compatible vector and a "naked" nucleic acid according to the invention, placed under the control of appropriate regulatory sequences, is introduced by local injection at the level of the chosen tissue, for example a smooth muscle tissue, the "naked" nucleic acid being absorbed by the cells of this tissue.

The invention also relates to the use of a nucleic acid according to the invention, encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms, for the manufacture of a medicament intended for the prevention and/or treatment in various forms or more particularly for the treatment of subjects affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

The invention also relates to the use of a recombinant vector according to the invention, comprising a nucleic acid encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms for the manufacture of a medicament intended for the prevention and/or treatment of subjects affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

The invention also relates to the use of a nucleic acid according to the invention, encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms, for the manufacture of a medicament intended for the prevention and/or treatment in various forms or more particularly for the treatment of subjects affected by a deficiency in the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH conjugated drugs, glucuronate, or sulfate.

The invention also relates to the use of a recombinant vector according to the invention, comprising a nucleic acid encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms, for the manufacture of a medicament intended for the prevention and/or treatment of a deficiency in the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH conjugated drugs, glucuronate, or sulfate.

As indicated above, the present invention also relates to the use of a defective recombinant virus according to the invention for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment and/or prevention of pathologies linked to the paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

78

The invention relates to the use of such a defective recombinant virus for the preparation of a pharmaceutical composition intended for the treatment and/or prevention of a deficiency associated with the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH conjugated drugs, glucuronate, or sulfate.

5 Thus, the present invention also relates to a pharmaceutical composition comprising one or more defective recombinant viruses according to the invention.

The present invention also relates to the use of cells genetically modified *ex vivo* with a virus according to the invention, or of producing cells such as viruses, implanted in the body, allowing a prolonged and effective expression *in vivo* one of the biologically active

10 ABCC12 proteins isoforms.

The present invention shows that it is possible to incorporate a nucleic acid encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms into a viral vector, and that these vectors make it possible to effectively express a biologically active, mature form. More particularly, the invention shows that the *in vivo* expression of the ABCC12 gene may be obtained by direct

15 administration of an adenovirus or by implantation of a producing cell or of a cell genetically modified by an adenovirus or by a retrovirus incorporating such a DNA.

Preferably, the pharmaceutical compositions of the invention comprise a pharmaceutically acceptable vehicle or physiologically compatible excipient for an injectable formulation, in particular for an intravenous injection, such as for example into the patient's

20 portal vein. These may relate in particular to isotonic sterile solutions or dry, in particular, freeze-dried, compositions which, upon addition depending on the case of sterilized water or physiological saline, allow the preparation of injectable solutions. Direct injection into the patient's portal vein is preferred because it makes it possible to target the infection at the level of the liver and thus to concentrate the therapeutic effect at the level of this organ.

25 A "pharmaceutically acceptable vehicle or excipient" includes diluents and fillers which are pharmaceutically acceptable for method of administration, are sterile, and may be aqueous or oleaginous suspensions formulated using suitable dispersing or wetting agents and suspending agents. The particular pharmaceutically acceptable carrier and the ratio of active compound to carrier are determined by the solubility and chemical properties of the

30 composition, the particular mode of administration, and standard pharmaceutical practice.

Any nucleic acid, polypeptide, vector, or host cell of the invention will preferably be introduced *in vivo* in a pharmaceutically acceptable vehicle or excipient. The phrase "pharmaceutically acceptable" refers to molecular entities and compositions that are

physiologically tolerable and do not typically produce an allergic or similar untoward reaction, such as gastric upset, dizziness and the like, when administered to a human. Preferably, as used herein, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally  
5 recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "excipient" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the compound is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water or aqueous solution saline solutions  
10 and aqueous dextrose and glycerol solutions are preferably employed as excipients, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical excipients are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin.

The pharmaceutical compositions according to the invention may be equally well administered by the oral, rectal, parenteral, intravenous, subcutaneous or intradermal route.

15 According to another aspect, the subject of the invention is also a preventive and/or curative therapeutic method of treating diseases caused by a deficiency in the transport of cholesterol or inflammatory lipid substances, comprising administering to a patient or subject a nucleic acid encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms, said nucleic acid being combined with one or more physiologically compatible vehicles and/or excipients.

20 In another embodiment, the nucleic acid, recombinant vectors, and compositions according to the invention can be delivered in a vesicle, in particular a liposome (see Langer, 1990, Science, 249:1527-1533; Treat et al., 1989, *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss: New York, pp. 353-365; and Lopez-Berestein, 1989, In: *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*,  
25 Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss: New York, pp. 317-327).

In a further aspect, recombinant cells that have been transformed with a nucleic acid according to the invention and that express high levels of any one of the ABCC12 proteins isoforms according to the invention can be transplanted in a subject in need of the ABCC12 polypeptide. Preferably autologous cells transformed with the ABCC12 encoding nucleic acid  
30 according to the invention are transplanted to avoid rejection; alternatively, technology is available to shield non-autologous cells that produce soluble factors within a polymer matrix that prevents immune recognition and rejection.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

80

A subject in whom administration of the nucleic acids, polypeptides, recombinant vectors, recombinant host cells, and compositions according to the invention is performed is preferably a human, but can be any animal. Thus, as can be readily appreciated by one of ordinary skill in the art, the methods and pharmaceutical compositions of the present invention are particularly suited to administration to any animal, particularly a mammal, and including, but by no means limited to, domestic animals, such as feline or canine subjects, farm animals, such as but not limited to bovine, equine, caprine, ovine, and porcine subjects, wild animals (whether in the wild or in a zoological garden), research animals, such as mice, rats, rabbits, goats, sheep, pigs, dogs, cats, etc., avian species, such as chickens, turkeys, songbirds, etc., *i.e.*, for veterinary medical use.

Preferably, a pharmaceutical composition comprising a nucleic acid, a recombinant vector, or a recombinant host cell, as defined above, will be administered to the patient or subject.

#### 15 METHODS OF SCREENING AN AGONIST OR ANTAGONIST COMPOUND FOR THE ABCC12 POLYPEPTIDE

According to another aspect, the invention also relates to various methods of screening compounds or small molecules for therapeutic use which are useful in the treatment of diseases due to a deficiency in the transport of cholesterol or inflammatory lipid substances.

The invention therefore also relates to the use any one of the ABCC12 proteins isoforms, or of cells expressing the ABCC12 polypeptide, for screening active ingredients for the prevention and/or treatment of diseases resulting from a dysfunction in the ABCC12 gene. The catalytic sites and oligopeptide or immunogenic fragments any one of the ABCC12 proteins isoforms can serve for screening product libraries by a whole range of existing techniques. The polypeptide fragment used in this type of screening may be free in solution, bound to a solid support, at the cell surface or in the cell. The formation of the binding complexes between the ABCC12 polypeptides isoforms fragments and the tested agent can then be measured.

Another product screening technique which may be used in high-flux screenings giving access to products having affinity for the protein of interest is described in application WO84/03564. In this method, applied to any one of the ABCC12 proteins isoforms, various products are synthesized on a solid surface. These products react with the

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

81

corresponding ABCC12 proteins isoforms or fragment thereof and the complex is washed. The products binding any one of the ABCC12 proteins isoforms are then detected by methods known to persons skilled in the art. Non-neutralizing antibodies can also be used to capture a peptide and immobilize it on a support.

5 Another possibility is to perform a product screening method using the ABCC12 neutralizing competition antibodies, any one of the ABCC12 proteins isoforms and a product potentially binding any one of the ABCC12 proteins isoforms. In this manner, the antibodies may be used to detect the presence of a peptide having a common antigenic unit with any one of the ABCC12 proteins isoforms.

10 Of the products to be evaluated for their ability to increase activity of ABCC12, there may be mentioned in particular kinase-specific ATP homologs involved in the activation of the molecules, as well as phosphatases, which may be able to avoid the dephosphorylation resulting from said kinases. There may be mentioned in particular inhibitors of the phosphodiesterase (PDE) theophylline and 3-isobutyl-1-methylxanthine type or the

15 adenylyl cyclase forskolin activators.

Accordingly, this invention relates to the use of any method of screening products, *i.e.*, compounds, small molecules, and the like, based on the method of translocation of cholesterol or lipophilic substances between the membranes or vesicles, this being in all synthetic or cellular types, that is to say of mammals, insects, bacteria, or yeasts expressing constitutively or having incorporated human ABCC12 encoding nucleic acid. To this effect, labeled

20 lipophilic substances analogs may be used.

Furthermore, knowing that the disruption of numerous transporters have been described (van den Hazel et al., 1999, *J. Biol Chem*, 274: 1934-41), it is possible to think of using cellular mutants having a characteristic phenotype and to complement the function

25 thereof with the ABCC12 proteins isoforms and to use the whole for screening purposes.

The invention also relates to a method of screening a compound or small molecule active on the transport of a substrate, an agonist or antagonist of any one of the ABCC12 polypeptides, said method comprising the following steps:

- a) preparing a membrane vesicle comprising any one of the ABCC12 proteins isoforms and the substrate comprising a detectable marker;
- 30 b) incubating the vesicle obtained in step a) with an agonist or antagonist candidate compound;

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

82

c) qualitatively and/or quantitatively measuring release of the substrate comprising a detectable marker; and

d) comparing the release measurement obtained in step b) with a measurement of release of labeled substrate by a vesicle that has not been previously incubated with the agonist or antagonist candidate compound.

ABCC12 polypeptides isoforms comprise an amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 and 34.

According to a first aspect of the above screening method, the membrane vesicle is a synthetic lipid vesicle, which may be prepared according to techniques well known to a person skilled in the art. According to this particular aspect, the ABCC12 proteins isoforms may be recombinant proteins.

According to a second aspect, the membrane vesicle is a vesicle of a plasma membrane derived from cells expressing at least one of ABCC12 polypeptides isoforms. These may be cells naturally expressing any one of the ABCC12 proteins isoforms or cells transfected with a nucleic acid encoding at least one ABCC12 polypeptide or recombinant vector comprising a nucleic acid encoding the ABCC12 polypeptides isoforms.

According to a third aspect of the above screening method, the substrate is an anionic drug, such as the methotrexate (MTX).

According to a fourth aspect of the above screening method, the substrate is a neutral drug conjugated to acidic ligands such as GSH, glucuronate, or sulfate conjugated drugs.

According to a fifth aspect, the substrate is radioactively labelled, for example with an isotope chosen from  $^3\text{H}$  or  $^{125}\text{I}$ .

According to a sixth aspect, the substrate is labelled with a fluorescent compound, such as NBD or pyrene.

According to a seventh aspect, the membrane vesicle comprising the labelled substrates and the ABCC12 polypeptides is immobilized at the surface of a solid support prior to step b).

According to an eighth aspect, the measurement of the fluorescence or of the radioactivity released by the vesicle is the direct reflection of the activity of the substrate transport by any one of the ABCC12 proteins isoforms.

The invention also relates to a method of screening a compound or small molecule active on the transport of anion, an agonist or antagonist of any one of the ABCC12 proteins isoforms, said method comprising the following steps:

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

83

a) obtaining cells, for example a cell line, that, either naturally or after transfecting the cell with the ABCC12 encoding nucleic acid, expresses any one of the ABCC12 proteins isoforms;

5 b) incubating the cells of step a) in the presence of an anion labelled with a detectable marker;

c) washing the cells of step b) in order to remove the excess of the labelled anion which has not penetrated into these cells;

d) incubating the cells obtained in step c) with an agonist or antagonist candidate compound for the ABCC12 polypeptides;

10 e) measuring efflux of the labelled anion; and

f) comparing the value of efflux of the labelled anion determined in step e) with a value of the efflux of a labelled anion measured with cells that have not been previously incubated in the presence of the agonist or antagonist candidate compound of ABCC12 polypeptides.

15 In a first specific embodiment, the ABCC12 polypeptides isoforms comprise an amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 and 34.

According to a second aspect, the cells used in the screening method described above may be cells not naturally expressing, or alternatively expressing at a low level, the ABCC12 polypeptides, said cells being transfected with a recombinant vector according to the invention  
20 capable of directing the expression of a nucleic acid encoding any one of the ABCC12 proteins isoforms.

According to a third aspect, the cells may be cells having a natural deficiency in anion transport, or cells pretreated with one or more anion channel inhibitors such as Verapamil™ or tetraethylammonium.

25 According to a fourth aspect of said screening method, the anion is a radioactively labelled iodide, such as the salts  $K^{125}I$  or  $Na^{125}I$ .

According to a fifth aspect, the measurement of efflux of the labelled anion is determined periodically over time during the experiment, thus making it possible to also establish a kinetic measurement of this efflux.

30 According to a sixth aspect, the value of efflux of the labelled anion is determined by measuring the quantity of labelled anion present at a given time in the cell culture supernatant.

According to a seventh aspect, the value of efflux of the labelled anion is determined as the proportion of radioactivity found in the cell culture supernatant relative to the total



WO 02/085943

PCT/EP02/03320

84

radioactivity corresponding to the sum of the radioactivity found in the cell lysate and the radioactivity found in the cell culture supernatant.

in the presence of a compound stimulating the production of interleukine and of an agonist or antagonist candidate compound;

5 The following examples are intended to further illustrate the present invention but do not limit the invention.

#### **EXAMPLES**

##### **EXAMPLE 1 : Search of human ABCC12 gene in genomic database**

10 Searches of the GeneBank HTGS database were performed with the TBLASTN and TBLASTP programs with the known ABC transporter nucleotide and protein sequences as queries. Amino acid alignments were generated with the PILEUP program included in the Genetics Computer Group (GCG) Package. The GRAIL and GeneScan programs on Genome analysis pipeline I were utilized to predict genomic structures of the new genes.

15 The human ABCC12 transporter gene sequence was detected on the bacterial artificial chromosome (BAC) clone #AC007600 from the GenBank HTGS database. cDNA sequencing, genomic structure prediction programs, and computer searches determined the sequence and genomic structure of the new gene belonging to the ABCC subfamily.

Primers were designed from expressed sequence tag (EST) clone sequences and  
20 from predicted cDNA sequences from 5' and 3' regions of genes. ABCC12 cDNA sequence was confirmed by PCR amplification of testis or liver cDNA (Clontech). Sequencing was performed on the ABI 377 sequencer according to the manufacturer's protocols (Perkin Elmer). Positions of introns were determined by comparison between genomic (BAC AC007600) and cDNA sequences.

25

##### **EXAMPLE 2: Radiation hybrid Mapping (Figure 2)**

The chromosomal localization of the human ABCC12 gene was determined by mapping on the GeneBridge4 radiation hybrid panel (Research Genetics), according to the manufacturer's protocol.

30 Radiation hybrid mapping placed *ABCC12* to the centromeric region of human chromosome 16, flanked by markers D16S3093 and D16S409 (Figure 2). The region encompasses 5.4 cM, or 132.5 cR, and could not be narrowed down further due to the lack of recombination and/or mapped polymorphic markers in this region. The ABCC12 gene

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

85

most likely localized on chromosome 16q12.1, since it maps closer to the 16q marker D16S409 (13.24 cR) than the 16p marker D16S3093 (119.40 cR) (Figure 2). The ABCC12 was located at the same locus, separated by about 200kb from ABCC11. ABCC11 and ABCC12 are located tandemly with their 5' ends facing towards the centromere. Two more

5 ABCC subfamily genes, *ABCC1* and *ABCC6*, have been mapped to the short arm of the same chromosome, to 16p13.1 (Cole et al., (1992) Science, 258, 1650-1654 ; Allikmets et al., (1996) Human Mol. Genet. (1996) 5, 1649-1655. The 3' ends of *ABCC1* and *ABCC6* are only about 9 kb apart from each other so the genes face opposite directions (Cai et al., *J Mol Med*, 2000, 78, 36-46).

10 The locus for paroxysmal kinesigenic choreoathetosis (PKC) has been assigned to 16p11.2-q12.1, between markers D16S3093 and D16S416 (Tomita et al., *Am J Hum Genet*, 1999, 65, 1688-97 ; Bennett et al., 2000; Figure 2). An overlapping locus has been predicted to contain the gene for infantile convulsions with paroxysmal choreoathetosis (ICCA; Lee et al., *Hum Genet*, 1998, 103, 608-12). It was suggested that mutations in a

15 novel ion-channel gene on chromosome 16 might be responsible for PKC and/or ICCA (Bennett et al., *Neurology*, 2000, 54, 125-30). Since another member of the ABCC subfamily, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), functions as a cyclic AMP-regulated channel, and also as a regulator of other ion channels and transporters (Kleizen et al., *J Cell Biol*, 2000, 79, 544-56), it is feasible that this gene may

20 function as ion channels (or regulators) and that mutations in these could result in a disease phenotype. Expression analysis of ABCC12 reveals that this gene is expressed in muscle and brain tissues, supporting the working hypothesis of the skeletal muscle or brain-related etiology of PKC. In summary, chromosomal localization, potential function, and expression profile make this gene a promising candidate for PKC/ICCA.

25

#### EXAMPLE 3: Phylogenetic Analysis (Figure 5)

Phylogenetic analyses of the ABCC subfamily proteins clearly demonstrate a relatively recent duplication of the ABCC11 and ABCC12 genes (Fig 5). The resulting neighbor-joining tree shows with maximum confidence (100-level of bootstrap support) a

30 close evolutionary relationship of the ABCC11/ABCC12 cluster with the ABCC5 gene (Fig 5). In addition, the analysis of the tree suggests a recent duplication of the ABCC8 and ABCC9 genes, while ABCC10 seems to be one of the first genes to separate from the common ancestor. ABCC11, ABCC12, ABCC3, and ABCC6 genes constitute a well-

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

86

defined sub-cluster, while the ABCC4 and CFTR (ABCC7) genes form another reliable subset despite apparent early divergence.

#### EXAMPLE 4 : Cell lines.

5 The human erythroleukemia K562 cells were obtained from the American Tissue Culture Collection (Rockville MD) and were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM 2-glutamine. The 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) resistant cells, K562/PMEA, were derived as described by (Hatse et al., *Mol Pharmacol*, 1996, 50, 1231-42). T-lymphoblast cell lines  
10 CEM and (-)2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC) resistant CEM-3TC cells [REFERENCES]. Cell lines, CEMss and CEM-r1, were described by (Robbins et al., *Mol Pharmacol*, 1995, 47, 391-7). CEM-r1 is highly resistant to PMEA due to an overexpression of *ABCC4* (Schuetz et al., *Nat Med*, 1999, 5, 1048-51). Total RNA from these six cell lines (three pairs of wild type and resistant cell lines) was isolated with TRIZOL (GIBCO BRL), and  
15 RT-PCR performed at varying cycle numbers oligonucleotide primers as mentioned in the brief description of Figure 3, products were subcloned and verified by direct sequencing.

#### Reverse transcription

In a total volume of 11.5 µl, 500 ng of mRNA poly(A)+ (Clontech) mixed with 500  
20 ng of oligodT are denaturated at 70°C for 10 min and then chilled on ice. After addition of 10 units of RNasin, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTP, Superscript first strand buffer and 200 units of Superscript II (Life Technologies), the reaction is incubated for 45 min at 42°C.

#### PCR

25 Each polymerase chain reaction contained 400 µM each dNTP, 2 units of *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polymerase (Ampli Taq Gold; Perkin Elmer), 0.5 µM each primer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, PCR buffer and 50 ng of DNA, or about 25 ng of cDNA, or 1/50<sup>th</sup> of primary PCR mixture. Reactions were carried out for 30 cycles in a Perkin Elmer 9700 thermal cycler in 96-well microtiter plates. After an initial denaturation at 94°C for 10 min, each cycle  
30 consisted of: a denaturation step of 30 s (94°C), a hybridization step of 30 s (64°C for 2 cycles, 61°C for 2 cycles, 58°C for 2 cycles and 55°C for 28 cycles), and an elongation step of 1 min/kb (72°C). PCR ended with a final 72°C extension of 7 min. In case of RT-PCR,

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

87

control reactions without reverse transcriptase and reactions containing water instead of cDNA were performed for every sample.

#### DNA Sequencing

5 PCR products are analyzed and quantified by agarose gel electrophoresis, purified with a P100 column. Purified PCR products were sequenced using ABI Prism BigDye terminator cycle sequencing kit (Perkin Elmer Applied Biosystems). The sequence reaction mixture was purified using Microcon-100 microconcentrators (Amicon, Inc., Beverly). Sequencing reactions were resolved on an ABI 377 DNA sequencer (Perkin Elmer Applied Biosystems) according to manufacturer's protocol (Applied Biosystems, Perkin Elmer).

#### Primers

Oligonucleotides were selected using Prime from GCG package or Oligo 4 (National Biosciences, Inc.) softwares. Primers were ordered from Life Technologies, Ltd and used without further purification.

#### **EXAMPLE 5: Expression of ABCC12 in human tissues and nucleoside -resistant cell lines**

20 The expression pattern for the ABCC12 gene was examined by PCR on multiple tissue expression arrays (Clontech) with gene specific primers resulting in about 500bp PCR fragments (Figure 3). Approximately 5000 bp mRNA species was observed by Northern blot (data not shown). The primers used in expression studies amplified the ABCC12 cDNA from exon 6 to exon 9, resulting in a 588 bp PCR fragment (Figure 3).

25 Systematic analysis of the tissue source of the ABCC12 ESTs from the public dbEST and the proprietary Incyte LifeSeq Gold databases resulted in 18 ESTs, with the majority being derived from CNS (11). The others were from testis (3 clones), and immune system (4).

#### **EXAMPLE 6 : Construction of the expression vector containing the complete cDNA of ABCC12 in mammalian cells**

30 The ABCC12 gene may be expressed in mammalian cells. A typical eukaryotic expression vector contains a promoter which allows the initiation of the transcription of the mRNA, a sequence encoding the protein, and the signals required for the termination of the

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

88

transcription and for the polyadenylation of the transcript. It also contains additional signals such as enhancers, the Kozak sequence and sequences necessary for the splicing of the mRNA. An effective transcription is obtained with the early and late elements of the SV40 virus promoters, the retroviral LTRs or the CMV virus early promoter. However, cellular  
5 elements such as the actin promoter may also be used. Many expression vectors may be used to carry out the present invention, an example of such a vector is pcDNA3 (Invitrogen).

**EXAMPLE 7 : Production of normal and mutated ABCC12 polypeptides isoforms**

The normal ABCC12 polypeptide encoded by complete corresponding cDNAs whose  
10 isolation is described in Example 2, or the mutated ABCC12 polypeptide whose complete cDNA may also be obtained according to the techniques described in Example 2, may be easily produced in a bacterial or insect cell expression system using the baculovirus vectors or in mammalian cells with or without the vaccinia virus vectors. All the methods are now  
15 widely described and are known to persons skilled in the art. A detailed description thereof will be found for example in F. Ausubel et al. (1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y).

**EXAMPLE 8 : Production of an antibody directed against a mutated ABCC12 polypeptide.**

The antibodies in the present invention may be prepared by various methods (Current  
20 Protocols In Molecular Biology Volume 1 edited by Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl - Massachusetts General Hospital Harvard Medical School, chapter 11, 1989). For example, the cells expressing a polypeptide of the present invention are injected into an animal in order to  
25 induce the production of serum containing the antibodies. In one of the methods described, the proteins are prepared and purified so as to avoid contaminations. Such a preparation is then introduced into the animal with the aim of producing polyclonal antisera having a higher activity.

In the preferred method, the antibodies of the present invention are monoclonal  
30 antibodies. Such monoclonal antibodies may be prepared using the hybridoma technique (Köhler et al, 1975, Nature, 256:495 ; Köhler et al, 1976, Eur. J. Immunol. 6:292; Köhler et al, 1976, Eur. J. Immunol., 6:511; Hammeling et al., 1981, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., pp. 563-681). In general, such methods involve immunizing the

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

89

animal (preferably a mouse) with a polypeptide or better still with a cell expressing the polypeptide. These cells may be cultured in a suitable tissue culture medium. However, it is preferable to culture the cells in an Eagle medium (modified Earle) supplemented with 10% fetal bovine serum (inactivated at 56°C) and supplemented with about 10 g/l of nonessential amino acids, 1000 U/ml of penicillin and about 100 µg/ml of streptomycin.

The splenocytes of these mice are extracted and fused with a suitable myeloma cell line. However, it is preferable to use the parental myeloma cell line (SP2O) available from the ATCC. After fusion, the resulting hybridoma cells are selectively maintained in HAT medium and then cloned by limiting dilution as described by Wands et al. (1981, Gastroenterology, 80:225-232). The hybridoma cells obtained after such a selection are tested in order to identify the clones secreting antibodies capable of binding to the polypeptide.

Moreover, other antibodies capable of binding to the polypeptide may be produced according to a 2-stage procedure using anti-idiotypic antibodies such a method is based on the fact that the antibodies are themselves antigens and consequently it is possible to obtain an antibody recognizing another antibody. According to this method, the antibodies specific for the protein are used to immunize an animal, preferably a mouse. The splenocytes of this animal are then used to produce hybridoma cells, and the latter are screened in order to identify the clones which produce an antibody whose capacity to bind to the specific antibody-protein complex may be blocked by the polypeptide. These antibodies may be used to immunize an animal in order to induce the formation of antibodies specific for the protein in a large quantity.

It is preferable to use Fab and F(ab')<sub>2</sub> and the other fragments of the antibodies of the present invention according to the methods described here. Such fragments are typically produced by proteolytic cleavage with the aid of enzymes such as Pepsin (in order to produce the Fab fragments) or Pepsin (in order to produce the F(ab')<sub>2</sub> fragments). Otherwise, the secreted fragments recognizing the protein may be produced by applying the recombinant DNA or synthetic chemistry technology.

For the *in vivo* use of antibodies in humans, it would be preferable to use "humanized" chimeric monoclonal antibodies. Such antibodies may be produced using genetic constructs derived from hybridoma cells producing the monoclonal antibodies described above. The methods for producing the chimeric antibodies are known to persons skilled in the art (for a review, see : Morrison (1985, Science 229:1202); Oi et al., (1986, Biotechnology, 4:214); Cabilly et al., US patent No. 4,816,567; Taniguchi et al., EP 171496; Morrison et al.,

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

90

EP 173494 ; Neuberger et al., WO 8601533 ; Robinson et al., WO 8702671 ; Boulianne et al ; (1984, Nature, 312:643) ; and Neuberger et al., (1985, Nature, 314:268).

**EXAMPLE 9: Identification of a causal gene for a disease linked to the chromosome locus, such as paroxysmal kinesigenic choreoathetosis by causal mutation or a transcriptional difference**

Northern blot or RT-PCR analysis, according to the methods described in Example 4, using RNA specific to affected or nonaffected individuals makes it possible to detect notable variations in the level of expression of the gene studied, in particular in the absence of transcription of the gene.

**EXAMPLE 10: Construction of recombinant vectors comprising a nucleic acid encoding the ABCC12 protein**

**Synthesis of a nucleic acid encoding the human ABCC12 protein:**

Total RNA (500 ng) isolated from a human cell (for example, placental tissue, Clontech, Palo Alto, CA, USA, or THP1 cells) may be used as source for the synthesis of the cDNA of the human ABCC12 gene. Methods to reverse transcribe mRNA to cDNA are well known in the art. For example, one may use the system "Superscript one step RT-PCR (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA).

Oligonucleotide primers specific for ABCC12 cDNA may be used for this purpose, containing sequences as set forth in any of SEQ ID NO: 35-46. These oligonucleotide primers may be synthesized by the phosphoramidite method on a DNA synthesizer of the ABI 394 type (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Sites recognized by the restriction enzyme NotI may be incorporated into the amplified ABCC12 cDNA to flank the cDNA region desired for insertion into the recombinant vector by a second amplification step using 50 ng of human ABCC12 cDNA as template, and 0.25  $\mu$ M of the ABCC12 specific oligonucleotide primers used above containing, at their 5' end, the site recognized by the restriction enzyme NotI (5'-GCGGCCGC-3'), in the presence of 200  $\mu$ M of each of said dideoxynucleotides dATP, dCTP, dTTP and dGTP as well as the *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase (Stratagene, Inc. La Jolla, CA, USA).

The PCR reaction may be carried out over 30 cycles each comprising a step of denaturation at 95°C for one minute, a step of renaturation at 50°C for one minute and a step

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

91

of extension at 72°C for two minutes, in a thermocycler apparatus for PCR (Cetus Perkin Elmer Norwalk, CT, USA).

Cloning of the cDNA of the human ABCC12 gene into an expression vector:

5 The human ABCC12 cDNA insert may then be cloned into the NotI restriction site of an expression vector, for example, the pCMV vector containing a cytomegalovirus (CMV) early promoter and an enhancer sequence as well as the SV40 polyadenylation signal (Beg et al., 1990, PNAS, 87:3473; Applebaum-Boden, 1996, JCI 97), in order to produce an expression vector designated pABCC12.

10 The sequence of the cloned cDNA can be confirmed by sequencing on the two strands using the reaction set "ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing ready" (marketed by Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a capillary sequencer of the ABI 310 type (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

15 Construction of a recombinant adenoviral vector containing the cDNA of the human ABCC12 gene:

Modification of the expression vector pCMV-β:

The β-galactosidase cDNA of the expression vector pCMV-β (Clontech, Palo Alto, CA, USA, Gene Bank Accession No. U02451) may be deleted by digestion with the  
20 restriction endonuclease NotI and replaced with a multiple cloning site containing, from the 5' end to the 3' end, the following sites: NotI, AscI, RsrII, AvrII, SmaI, and NotI, cloned at the region of the NotI restriction site. The sequence of this multiple cloning site is:  
5'-CGGCCGCGCGCGCCCGACCGCCTAGGATTAAATCGCGGCCCGCG-3'.

The DNA fragment between the EcoRI and SmaI sites of the modified expression  
25 vector pCMV may be isolated and cloned into the modified XbaI site of the shuttle vector pXCXII (McKinnon et al., 1982, Gene, 19:33; McGrory et al., 1988, Virology, 163:614).

Modification of the shuttle vector pXCXII:

A multiple cloning site comprising, from the 5' end to the 3' end the XbaI, EcoRI, SfiI,  
30 PmeI, NheI, SrfI, PacI, SalI and XbaI restriction sites having the sequence:  
5'CTCTAGAATTCGGCCTCCGTGGCCGTTTAAACGCTAGCGCCCGGCTTAATTAA  
GTCGACTCTAGAGC-3', may be inserted at the level of the XbaI site (nucleotide at position



WO 02/085943

PCT/EP02/03320

92

3329) of the vector pXCXII (McKinnon et al., 1982, *Gene* 19:33; McGrory et al., 1988, *Virology*, 163:614).

The EcoRI-Sall DNA fragment isolated from the modified vector pCMV- $\beta$  containing the CMV promoter/enhancer, the donor and acceptor splicing sites of FV40 and the polyadenylation signal of FV40 may then be cloned into the EcoRI-Sall site of the modified shuttle vector pXCX, designated pCMV-11.

Preparation of the shuttle vector pAD12-ABCA:

The human ABCC12 cDNA is obtained by an RT-PCR reaction, as described above, and cloned at the level of the NotI site into the vector pCMV-12, resulting in the obtaining of the vector pCMV-ABCC12.

Construction of the ABC1 recombinant adenovirus:

The recombinant adenovirus containing the human ABCC12 cDNA may be constructed according to the technique described by McGrory et al. (1988, *Virology*, 163:614).

Briefly, the vector pAD12-ABCA is cotransfected with the vector tGM17 according to the technique of Chen and Okayama (1987, *Mol Cell Biol.*, 7:2745-2752).

Likewise, the vector pAD12-Luciferase was constructed and cotransfected with the vector pJM17.

The recombinant adenoviruses are identified by PCR amplification and subjected to two purification cycles before a large-scale amplification in the human embryonic kidney cell line HEK 293 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA).

The infected cells are collected 48 to 72 hours after their infection with the adenoviral vectors and subjected to five freeze-thaw lysing cycles.

The crude lysates are extracted with the aid of Freon (Halocarbene 113, Matheson Product, Secaucus, N.J. USA), sedimented twice in cesium chloride supplemented with 0.2% murine albumine (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) and dialysed extensively against buffer composed of 150 mM NaCl, 10 mM Hepes (pH 7.4), 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM CaCl<sub>2</sub>.

The recombinant adenoviruses are stored at -70°C and titrated before their administration to animals or their incubation with cells in culture.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

93

The absence of wild-type contaminating adenovirus is confirmed by screening with the aid of PCR amplification using oligonucleotide primers located in the structural portion of the deleted region.

5 Validation of the expression of the human ABCC12 cDNA:

Polyclonal antibodies specific for a human ABCC12 polypeptide may be prepared as described above in rabbits and chicks by injecting a synthetic polypeptide fragment derived from an ABCC12 protein, comprising all or part of an amino acid sequence as described in SEQ ID NO: 33 or 34. These polyclonal antibodies are used to detect and/or quantify the  
10 expression of the human ABCC12 gene in cells and animal models by immunoblotting and/or immunodetection.

Expression *in vitro* of the human ABCC12 cDNA in cells:

Cells of the HEK293 line and of the COS-7 line (American Tissue Culture Collection,  
15 Bethesda, MD, USA), as well as fibroblasts in primary culture derived from Tangier patients or from patients suffering from hypo-alpha-lipoproteinemia are transfected with the expression vector pCMV-ABCC12 (5-25 µg) using Lipofectamine (BRL, Gaithersburg, MD, USA) or by coprecipitation with the aid of calcium chloride (Chen et al., 1987, Mol Cell Biol., 7:2745-2752).

20 These cells may also be infected with the vector pABCC12-AdV (Index of infection, MOI=10).

The expression of human ABCC12 may be monitored by immunoblotting as well as by quantification of the efflux of cholesterol induced by apoA-1 using transfected and/or  
25 infected cells.

Expression *in vivo* of the ABCC12 gene in various animal models:

An appropriate volume (100 to 300 µl) of a medium containing the purified recombinant adenovirus (pABCA-AdV or pLucif-AdV) containing from  $10^8$  to  $10^9$  lysis  
30 plaque-forming units (pfu) are infused into the Saphenous vein of mice (C57BL/6, both control mice and models of transgenic or knock-out mice) on day 0 of the experiment.

The evaluation of the physiological role of the ABCC12 protein in the transport of cholesterol or inflammatory lipid substances is carried out by determining the total quantity of

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

94

cholesterol or appropriate inflammatory lipid substances before (day zero) and after (days 2, 4, 7, 10, 14) the administration of the adenovirus.

Kinetic studies with the aid of radioactively labelled products are carried out on day 5 after the administration of the vectors rLucif-AdV and rABCA-AdV in order to evaluate the effect of the expression of the ABCC12 gene on the transport of cholesterol and inflammatory lipid substances.

Furthermore, transgenic mice and rabbits overexpressing the ABCC12 gene may be produced, in accordance with the teaching of Vaisman (1995) and Hoeg (1996) using constructs containing the human ABCC12 cDNA under the control of endogenous promoter such as ABCC12, or CMV or apoE.

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

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

95

## CLAIMS

1. An isolated nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.
- 5 2. An isolated nucleic acid comprising at least eight consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.
3. An isolated nucleic acid comprising at least 80% nucleotide identity with a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide  
10 sequence thereof.
4. The isolated nucleic acid according to claim 3, wherein the nucleic acid comprises an 85%, 90%, 95%, or 98% nucleotide identity with the nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.
5. An isolated nucleic acid that hybridizes under high stringency conditions with a  
15 nucleic acid comprising a) any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.
6. An isolated nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.
7. A nucleotide probe or primer specific of ABCC12 gene, wherein the nucleotide  
20 probe or primer comprises at least 15 consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof.
8. A nucleotide probe or primer specific for an ABCC12 gene, wherein the nucleotide probe or primer comprises a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NO: 35-46, or a complementary nucleotide sequence thereof.
- 25 9. A method of amplifying a region of the nucleic acid according to claim 1, wherein the method comprises:
  - a) contacting the nucleic acid with two nucleotide primers, wherein the first nucleotide primer hybridizes at a position 5' of the region of the nucleic acid, and the second nucleotide primer hybridizes at a position 3' of the region of the nucleic acid, in the presence of reagents  
30 necessary for an amplification reaction; and
  - b) detecting the amplified nucleic acid region.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

96

10. A method of amplifying a region of the nucleic acid according to claim 1, wherein the two nucleotide primers are selected from the group consisting of
- a) a nucleotide primer comprising at least 15 consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleotide sequence,
  - 5 b) a nucleotide primer as in any one of claims 7-9,
  - c) a nucleotide primer comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 35-46, or a nucleic acid having a complementary sequence thereof.
11. A kit for amplifying the nucleic acid according to claim 1, wherein the kit comprises:
- 10 a) two nucleotide primers whose hybridization position is located respectively 5' and 3' of the region of the nucleic acid; and optionally,
  - b) reagents necessary for an amplification reaction.
12. The kit according to claim 11, wherein the two nucleotide primers are selected from the group consisting of
- 15 a) a nucleotide primer comprising at least 15 consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleotide sequence,
  - b) a nucleotide primer as in any one of claims 7-9,
  - c) a nucleotide primer comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 35-46, or a nucleic acid having a complementary sequence thereof.
- 20 13. The nucleotide probe or primer according to any of claim 7-9, wherein the nucleotide probe or primer comprises a marker compound.
14. A method of detecting a nucleic acid according to claim 1, wherein the method comprises:
- a) contacting the nucleic acid with a nucleotide probe selected from the group
  - 25 consisting of
    - 1) a nucleotide probe comprising at least 15 consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or a complementary nucleotide sequence thereof,
    - 2) a nucleotide primer as in any one of claims 7-9,
    - 30 3) a nucleotide probe comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 35-46, or a complementary nucleotide sequence thereof, and
  - b) detecting a complex formed between the nucleic acid and the probe.
15. The method of claim 14, wherein the probe is immobilized on a support.

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

97

16. A kit for detecting the nucleic acid according to claim 1, wherein the kit comprises
- a) a nucleotide probe selected from the group consisting of 1) a nucleotide probe comprising at least 15 consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-32, or of a complementary nucleotide sequence, 2) a nucleotide primer as in any one of claims 7-9, 3) a nucleotide probe comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 35-46, or a complementary nucleotide sequence thereof, and optionally,
  - b) reagents necessary for a hybridization reaction.
17. The kit according to claim 16, wherein the probe is immobilized on a support.
18. A recombinant vector comprising the nucleic acid according claim 1.
19. The vector according to claim 18, wherein the vector is an adenovirus.
20. A recombinant host cell comprising the recombinant vector according to claim 21.
21. A recombinant host cell comprising the nucleic acid according claim 1.
22. An isolated nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of any one of SEQ ID NO: 33 or 34.
23. A recombinant vector comprising the nucleic acid according to claim 22.
24. A recombinant host cell comprising the nucleic acid according to claim 22.
25. A recombinant host cell comprising the recombinant vector according to claim 23.
26. An isolated polypeptide selected from the group consisting of
- a) a polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 33 or 34,
  - b) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34, and
  - c) a polypeptide homologous to a polypeptide comprising amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34.
27. An antibody directed against the isolated polypeptide according to claim 26.
28. The antibody according to claim 27, wherein the antibody comprises a detectable compound.
29. A method of detecting a polypeptide, wherein the method comprises
- a) contacting the polypeptide with an antibody according to claim 27; and
  - b) detecting an antigen/antibody complex formed between the polypeptide and the antibody.
30. A diagnostic kit for detecting a polypeptide, wherein the kit comprises
- a) the antibody according to claim 27; and

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

98

b) a reagent allowing detection of an antigen/antibody complex formed between the polypeptide and the antibody.

31. A pharmaceutical composition comprising the nucleic acid according to claim 1 and a physiologically compatible excipient.

5 32. A pharmaceutical composition comprising the recombinant vector according to claim 18 and a physiologically compatible excipient.

33. Use of the nucleic acid according to claim 1 for the manufacture of a medicament intended for the prevention and/or treatment of a subject affected by paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

10 34. Use of a recombinant vector according to claim 21 for the manufacture of a medicament for the prevention and/or treatment of subjects affected by paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

35. Use of isolated ABCC12 polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34 for the manufacture of a medicament intended for the prevention and/or treatment of subjects affected by paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

15 36. A pharmaceutical composition comprising a polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 33 or 34, and a physiologically compatible excipient.

37. Use of isolated ABCC12 polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 33 or 34 for screening an active ingredient for the prevention or treatment of paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

20 38. Use of a recombinant host cell expressing the ABCC12 polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 33 or 34 for screening an active ingredient for the prevention or treatment of paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

39. A method of screening an agonist or an antagonist of the ABCC12 polypeptide, wherein the method comprises

25 a) preparing a membrane vesicle comprising at least one of the ABCC12 polypeptide and a substrate comprising a detectable marker;

b) incubating the vesicle obtained in step a) with an agonist or antagonist candidate compound;

30 c) qualitatively and/or quantitatively measuring a release of the substrate comprising the detectable marker; and

WO 02/085943

99

PCT/EP02/03320

d) comparing the release of the substrate measured in step b) with a measurement of a release of a labeled substrate by a membrane vesicle that has not been previously incubated with the agonist or antagonist candidate compound.

40. A method of screening an agonist, or an antagonist of ABCC12 polypeptide,  
5 wherein the method comprises

a) incubating a cell that expresses the ABCC12 polypeptide with an anion labeled with a detectable marker;

b) washing the cell of step a) whereby excess labeled anion that has not penetrated into the cell is removed;

10 c) incubating the cell obtained in step b) with an agonist or antagonist candidate compound for the ABCC12 polypeptide;

d) measuring efflux of the labeled anion from the cell; and

e) comparing the efflux of the labeled anion determined in step d) with efflux of a labeled anion measured with a cell that has not been previously incubated with the agonist or  
15 antagonist candidate compound.

41. An implant comprising the recombinant host cell according to claim 24 or 25.



[illegible]

FIGURE 1

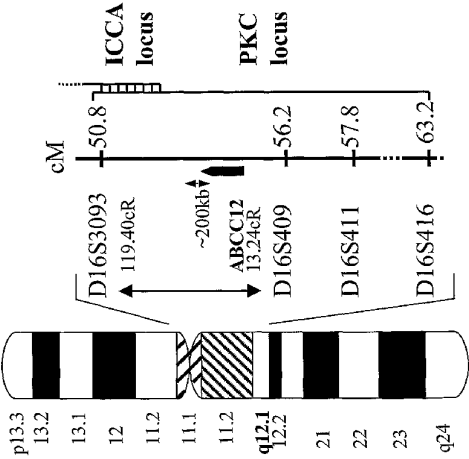


FIGURE 2

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

3/5



FIGURE 3

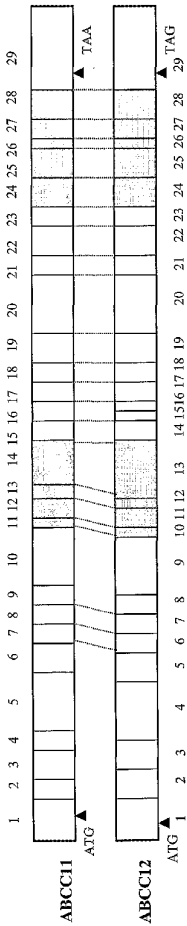
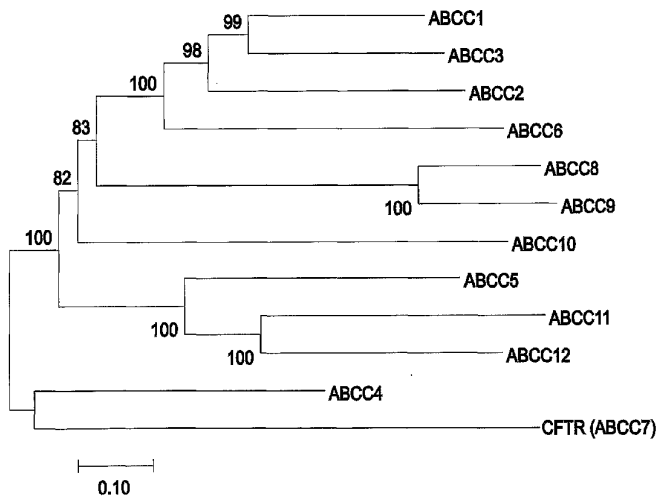


FIGURE 4

FIGURE 5



WO 02/085943

PCT/EP02/03320

1

## LISTE DE SEQUENCES

<110> AVENTIS PHARMA SA  
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES,

<120> NUCLEIC ACIDS OF THE HUMAN ABCC12 GENE, VECTORS  
CONTAINING SUCH NUCLEIC ACIDS, AND USES THEREOF

<130> ABCC12 GENE

<140> ST01006

<141> 2002-03-05

<150> 60/272,759

<151> 2001-03-05

<160> 46

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4273

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggtggggtg	aaggacccta	ccttatctca	gatctggacc	agcgaggcgg	gcgagatcc	60
tttgacagaa	gatatgaccc	cagcctgaag	accatgatcc	cagtgcgacc	ctgtgcaagg	120
tttagacccta	acctggttga	tgalaccggg	ctactccccc	togtaccatt	tctctggctc	180
acgcgcgtga	tgggtgaagt	ctaacggcaa	aggctgaccg	tgaacacct	gccccattg	240
tgcacatagt	actcatctga	caccaatgcc	aaaagatttc	gagtcctttg	ggatgaagag	300
gtagcaaggg	tggctcctga	gaagcctct	ctgagccacg	tgggtgtgaa	attccagagg	360
acacgcgtgt	tgatggacat	cgtggccaac	atcctgtgca	tcatcatggc	agccataggg	420
cgcacagttc	tcattcacca	aatcctccag	cagactgaga	ggacctctgg	gaaagtctgg	480
gttggcattg	gactgtgcac	agcccttttt	gcccaccgag	ttaccaaaat	ctctcttttg	540
ggccttgctc	gggccaatca	ctaccgcacg	gccatccgg	tgaagtgagc	gctctccacc	600
ttggtttttt	aaaactaggt	gtccttcacg	acattgaacc	acactctgt	tggcgagggtg	660
ctcaaatatc	tgtcaagtga	tactattctt	ttgtttgaa	ctgcctttgt	tgtctctttg	720
ccagccaacca	tcaccatcct	aatggtcttt	tgtggggcgt	acgccttttt	cattctgggg	780
cccacagctc	tcactgggat	atcagtgat	gtcatattca	taccggtcca	gatgtttatg	840
gccaaagctca	attcagcttt	cgaaggtca	gcaattttgg	tgacagacaa	gcgagttcag	900
acaatgaatg	agtttctgac	ctgcatcagg	ctgatcaaaa	tgtatgcoct	ggagaaatct	960
ttttaccaaca	ctatccaaga	tataagaagg	agggaaagaa	aattactgga	aaaagctgga	1020
tttgtccaaa	gtggaaactc	tggcctggcc	ccatcgtgtg	ccaccaagc	catcgtgctg	1080
acattatcct	gccacatcct	cctggaagcg	aaactcacgc	caccctgggc	atttagtggtg	1140
altgcatgt	ttaattgta	gaagttttcc	attgcaatct	tgcctttctc	catcaaaaga	1200
atggctgaag	cgaatgtctc	tctaaggaga	atgaagaaaa	ttctcataga	taaaagccgc	1260
ccatctttaca	tcacccaacc	agaagaccca	gatactgtct	tgcttttagc	aaatgccacc	1320
ttgacatggg	agcatgaagc	cagcaggaag	agtaccacca	agaaattgca	gaaccagaaa	1380
aggcattttat	gcaagaacaa	gaggtcagag	gcatacagtg	agaggaatcc	accagccaag	1440
ggagccactg	gcccagaaga	gcaagtgac	agctccaat	cggttctgca	cagcataagc	1500
tttgtgtgga	gaaagggaag	gatcttggga	atagtggga	atgtgggaag	tggaaagagc	1560
tcctcctttg	cagctcctct	aggacagatg	cagctgcaga	aaggggtggt	ggcagtcatt	1620
ggaacttttg	cctacgtttc	acagcaggca	tggatctttc	atggaaatgt	gagagaaaac	1680
atactctttg	gagaaaagta	tgatcaacca	aggtatcagc	acacagtcgc	cgtctgtggc	1740
ctccagaagg	acctgagcaa	cctcccttat	ggagacctga	ctgagattgg	ggagcggggc	1800
ctcaacctct	ctggggggca	gagggcagag	attagcctgg	ccgcgcgtgt	ctactccgac	1860
cgtcagctct	acctgtctga	gcacccctgt	tgggcccgtg	acgcccaagt	ggggaagcac	1920
gtctttggag	agtgcatcaa	gaagcagctc	aggggaaga	cagtgtgtct	ggtgacccac	1980
cagctacagt	tcttagagtc	ttgtgatgaa	gttattttat	tagaagatgg	agagattttg	2040
gaagaaggaa	cccacaagga	gttaattggag	gagagagggc	gctatgcaaa	actgattcac	2100
aacctgcgag	gattgcagtt	caaggatcct	gaacaccttt	acaatgcagc	aatggtgga	2160
gccttcaagg	agagccctgc	tgaagagag	gaagatgctg	ttttggctct	aggaatgag	2220
aaagatgaag	gaaaagaatc	tgaacagggc	tcagaatttg	tagacacaaa	agttctgag	2280
caccagctca	tcacagactga	atccccccag	gaaggaaacc	tgacctgaaa	aacatatac	2340
acgtacatta	aggtctctgg	agggtaacct	ctttctctct	tcaatgtgtt	cctctctctc	2400
ctgatgattg	gcagcgtctg	cttcagcaac	tgggtggctgg	gtctctgtgt	ggacaagggc	2460
tcaaggatga	cctgtggggc	ccaggccaac	aggacatgt	gtgaggtcgg	cgcggtgctg	2520
gcagacatcg	gtcagcatgt	gtaccagtgg	gtgtacactg	caagcatggt	gttcatgctg	2580
gtgtttggcg	tcaccaaagg	cttcgtcttc	accaagacca	cactgatggc	atcctcctct	2640

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

2

```

ctgcctgaaca cgggtgttga taagatotta aagagcccaa tgagtttctt tgacacgact 2700
cccactggca cgtcaatgaa cgtttttccc aaggatatgg acgagctgga tgtgaggctg 2760
ccgtttcaacg cagagaactt tctgcagcag ttttttatgg tgggttttat tctcgtgatc 2820
ttggctgtcg tgtttcctgc tgtcctttta gtctggcca gcttctgtgt aggttctctc 2880
attctgtttac gcattttcca cagaggagtc caggagctca agaaggtgga gaattgtcagc 2940
cggtaacccc ggttcaacca catcacctcc tccatgcagg gcttgggcat cattcaagcc 3000
tatggcaaga aggagagctg catcacctat cactctctct acttcaactg tgcctcgaag 3060
tgggtltgcgc tggagaatgga tgcctcatg aacatcctta ccttcaactgt ggccttgttg 3120
gtgaccctga gtttctctct catcagtaact tcatcacaag gctgtcalt gtacatcctc 3180
atccagctga cgggactgct ccaagtgtgt gtgcgaacgg gaacagagac gcaagccaaa 3240
ttcacctccg tggagctgct cagggaaatc atttcgacct gtgttctcga atgcactcat 3300
cccctcaaaag tggggacctg tcccaaggac tggcccgact gtggggagat cacttccaga 3360
gactatcaga tggatatacg agacaacacc ccccttgttc tggacagcct gaacttgaac 3420
atcacaagtg ggcagacagt cgggattctt ggaagacacg gttccggaaa gtccatcgta 3480
ggaaatggctt tcttctgctc gttgagagca gcaagtggca caactgttat tgaatgaagt 3540
gatatctgca tctctcagctt ggaagacctc agaaccgaag tgaatgtgat cccacaggat 3600
ccctgtccctg tctgagtgac agtaaggtac aacttggatc cctttgagag tcaacccgat 3660
gagatgctct ggcaggttct ggaagagaca ttcattgagag acacaataat gaaactccca 3720
gaaaaattac aggcagaagt cacagaaaat ggagaaaact tctcagtagg ggaacgtcag 3780
ctgcttttgtg tggcccgagc tcttctcgtt aattcaaaag tcaattctct tgaatgaagc 3840
acgcctctca tggactccaa gactgcaccc ctggttccga acacccatca agatgctctc 3900
aaggctgcca ctgtgctgac catgcgcacc cgcctcaaca cagttctbca ctgagatgag 3960
gtctctgttga tggaaaatgg gaaggtgatt gactttgaca agcctgaagt ccttgcagag 4020
aagccagatt ctgcalttgc gatgttacta gcagcagaag tcaatgttga gaggtcctg 4080
cgctctgatt tagaggagga agaggtctgt tgagatgaat agggaggagc ttccaggagg 4140
gggctgtctc tctccgcagc cagccctggt ctccagcccc tcccatccac ggagtgagct 4200
ggggtcgaag ttgtcccaac tgcatactc agtccatgtc accccacttg gtgggcttgg 4260
ggttgtttct ggg 4273

```

```

<210> 2
<211> 4282
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 2
atgtgtgggtg aaggacccta ctttatctca gatctggacc agcgagggcg gggagagatcc 60
tttgcagaaa gatatacccc cagcctgaag accatgatcc cagtgcgacc ctgtgcagg 120
ttagacacca acccgggtga tgaatccggg ctactctcct tgcacacatt ttcctggctc 180
acgcgggtga tggtagaagg ctacggcga agcctgaacc tagacaccc tgcctccattg 240
tcgacatatg actcatctga caccatgcc aaaagatttc gactcctttg ggaatgaag 300
gtagcaagggt tgggtcctga gaaggcctct ctgagccacg tgggtgtgaa attccagagg 360
acacgcgtgt tgaatggcat cgtggccaac atcctgtgca tcatcatggc agcctatagg 420
ccgacagttc tgaatgacca aalccctcag cagactgaga ggaactctgg gaaagctgg 480
gttggcctttg gactgtgat agcctttttt gccacagagt ttaccaaagt cttcttttgg 540
gccccttgcct gggccatcaa ctaccgcacg gccatccggt tgaaggtggc gctctccacc 600
ttggtttttg aaaaactagt gtccctcaag acattgacc acatctctgt tggcgagggt 660
ctcaatatac tgtcaagtga tagctattct ttgtttgaag ctgccttght ttgtcctttg 720
ccagcaacca tcccgatctc aatggtcttt tgtcggcggt acgctttttt cactctgggg 780
cccacagctc tcatcggtat atcagtgat gtcatattca taccgttcca gatgtttatg 840
gccaagctca ctacagctt ccgaaggtca gcaattttgg tgaagacaa gcagagtcag 900
acaaatgaatg agttctgac ctgcatcagg ctgatcaaaa tgaatgcctg ggagaaatct 960
tttaaccaaca ctatccaaga tataagaagg agggaaagaa aaltactgga aaagctgga 1020
tttgtccaaa gtgaaaactc tgccttgccc cccatgtgtt ccaacatagc catcgtgctg 1080
acattatcct gccacatcct cctgagacgc aaactcacc caccgtggc atttagtgtg 1140
attgcatgtt ttaatgtaat gaagttttcc attgcaatct tgcctttctc catcaaaaga 1200
atgggtgaag cgaatgtctc tctaaggaga atgaagaaaa ttctcataga taaggccccc 1260
ccctcttaca cctcccaacc agaaagacca gatactgtgt tgccttttag aaatggccac 1320
ttgacatggg gcatgaagg cagcaggaaa agtaccocaa agaaattgca gaaccgaaa 1380
aggcalttat gcaagaaaca gaggtcagag gcatacagt agaggagtcc accgccaag 1440
ggagccactg gcccgaggga gcaaatggac agcctcaaat cggttctgca cagcataagg 1500
tttgtggtag gaaaggggaa gatcttggga atagtggga atgtgggag tggaaagagc 1560
tccctccttg cagctctcct aggcagatg cagctgcaga aagggttgtt ggcagtcact 1620
ggaaactttgg cctacgtttc acagcaggca tggatctttc atggaaatgt gagagaaaa 1680
atcctctttg gagaaaaata tgaatccaaa aggtatcagc acacagtcgg cgtctgtggc 1740
ctccagagag acctgagcaa cctcccttat ggagactgta ctgagattgg ggagcggggg 1800
ctcaacctct ctggggggca gaggcagagg attagcctgg cccgcgtgt ctactccgac 1860
cgtcagctct acctgctgca gcaccccttg tggcgctgg agcccaact ggggaagcac 1920
gtctttgagg agtgcattaa gaagcgcctc aggggaaggc cagtgtctct ggtgaaccac 1980
cagctacagt tcttagagtc ttgtgatgaa gttattttat tagaagatgg agagatttgt 2040

```

WO 02/085943

PC/EP02/03320

3

```

gaaaggggaa cccacaagga gtaaatggag gagagagggc gctatgcaaa actgattcac 2100
aaccttcgag gatltgcagt caagatcct gaacaccttt acaatgcagc aatggtggaa 2160
gcottcaagg agagccctgc tgagagagag gaagatgctg gtataatcgt tttggtcca 2220
ggaatgaga aagatgaagc aaagaatct gaacaggtc cagaatttgt agacacaaaa 2280
gttctcgagc accagctcat ccagactgaa tccccccagg aaggaaacct gacctgaaa 2340
acatacacca cgtacattaa ggcttctgga gggtacctcc tttctctctt cactgtgttc 2400
ctcttctccc tgatgattgg cagcgctgcc ttcagcaact ggtggctggg tctctggctg 2460
gaagagggct cagggatgac ctgtgggccc cagggcaaca ggaacctgtg tgaggtcggc 2520
gggttgctgg cagacatcgg tcagcatgtg taccagtggg tctacactgc aagcatgggt 2580
ttcatgctgg tgtttggcgt caaccaaggc ttctcttcca caagaccac actgatggca 2640
tctctctctc tgcatgaacg ggtgtttgat aagatcttaa agagccaat gatttcttt 2700
gacacgactc ccactggaag gctaataaac cgtttttcca aggatattga ctagctggat 2760
gtgaggtctg cgtttcaagc agagaacttt ctgcagcagt ttttlatggt ggtgtttatt 2820
ctcgtgactc tggctgctgt gtttctctgt gtctcttttg tctgtggcag cctgtctga 2880
ggcttctcca tttctttacg catlttccac agagggatcc agggctcaa gaaggtggag 2940
aagtcagcc cgtcacctgt gtccacccac atcactctct cctggcaggc ctggggcctc 3000
attcacgctc atggcaagaa ggagagctgc atcacctatc acctctctta ctlttaactg 3060
gcctcgaagt ggtttgcgct gagaatggat gtctcatga acatcttacc ctctactgt 3120
gcctgtgttg tgaccctgag tttctctctc atcagtactc catccaaagg cctgtcatgt 3180
tcatacatca tccagctgag cggactgctc caagtgtgtg tgcgaacggg aacagagacc 3240
caagccaaat tcacctcgtt ggagctgctc agggaaatca tttcgacctg tgttctgaa 3300
tgactcactc cctcaaaagt ggggacctgt cccaaggact ggcccagctg tggggagatc 3360
accttcagag acatcagat gacatacaga gacaaacccc cctctgtct cgaagcctg 3420
aacttgaaca tacaagtggt gcagacagtc gggattgttg gaagaacagg ttcgggaaag 3480
tcactgcttg gaatggcttt gttctgtctg tggagccag ccagtggcac aatcttatt 3540
gatgaggttg atatctgcat tctcagcttg gaagacctca gaaccaagct gactgtgcat 3600
ccacagatc ctgtctgttt tctaggtaca gtaaggtaca acttgatcc ctttgagagt 3660
cacacgactg agatgctctg gcaggttctg gagagaaact tcatgagaga cacaataagt 3720
aaactccagc aaaaattaca ggcagaagtc acagaaaatg gaaaaaactt ctcataggg 3780
gaacgtcagg tcttctgtgt ggcctgaggt ctctccgta attcaaatg cttctcctt 3840
gatgaagcca ccgctctat ggaactcagc actgacaccc tggttcaga ccccatcaca 3900
gatgcttcca agggctgcac tctgctgacc atgcgccacc gctcaaac acgttctcac 3960
tgcgatacag tcttggttat ggaataatgg aaggtgattg agtttgaca gctgaagtc 4020
cttgacagaa agccagattc tgcatttgcg atgttactag cagcagaagt cagattgtag 4080
aggtcctggc ggtgattctc agagagggaa gaggctctgt gatagataa gtaggagctc 4140
tcaggagggt gggctgtctc ctccgcaggc agccctgtgc ttcagccctc cccatccagc 4200
gagtgagctg gggctgaagt ctccccact gccatactca gtccatgtca ccccatcttg 4260
tgggcttggg gttggtctcg gg

```

<210> 3  
 <211> 119  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 atggtgggtg aaggaacccta cttatctca gatctggacc agcaggcccg cggagatcc 60  
 ttgcaaaaa gatatgaccc cagctgaag accatgatcc cagtgcgacc ctgtgcaag 119

<210> 4  
 <211> 156  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 gttagcacc aaccgggttg atgatgcgg gtaactctcc ttgccacat tttctggct 60  
 cagcgggtg atggtgaaag gctacgggca aaggctgacc gtacacacc tgcctccatt 120  
 gtgcacatat gactcatctg acaccaatgc caaaag 156

<210> 5  
 <211> 152  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 5  
 atttcggatc ctttgggatg aagaggtagc aaggggtggc cctgagaag cttctctgag 60  
 ccacgtggtg tggaaatcc agaggacag cgtgtgtat gacatgttg caaacatct 120  
 gtgcacatc atggcagcca tagggccagc ag 152



WO 02/085943

PCT/EP02/03320

4

```
<210> 6
<211> 230
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 6
ttctcattca ccaaatcctc cagcagactg agaggacctc tgggaaagtc tgggttgcca 60
ttggactgtg catagccctt ttggccaccg agtttaccac agtcttcttt tgggcocttg 120
cctggggccat caactaccgc acggccatcc ggttgaaggt ggcgctctcc accttgggtt 180
ttgaaaacct agtgtccttc aagacattga cccacatctc tgttggcgag 230

<210> 7
<211> 174
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7
gtgtcaata tactgtcaag tgatagctat tctttgtttg aagctgcctt gttttgtcct 60
ttgccaacca ccattccgat cctaattgtc ttttgtgcgg cgtacgcctt ttccattctg 120
gggccacacg ctctcatcgg gatatacgtg tatgtcatat tcataccctg ccag 174

<210> 8
<211> 148
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 8
atgtttatgg ccaagctcaa ttacgcttcc cgaaggtcag caattttggt gacagacaag 60
cgagtccaga caatgaatga gtttctgacc tgcatacagg tgatcaaaat gtatgcctgg 120
gagaaatctt ttaccaacac tatccaag 148

<210> 9
<211> 149
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 9
atataagaag gagggaaaag aaattactgg aaaaagctgg atttgtccaa agtggaaact 60
ctgcccctgg ccccatcgtg tccaccatag ccactgtgct gacattatcc tggcacatcc 120
tcctgagacg caaacctacc gcaccctgtg 149

<210> 10
<211> 108
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 10
gcatttagtg tgattgccat gtttaatgta atgaagtttt ccattgcaat cttgcocctc 60
tccatcaag caatgggtga agcgaatgtc tctctaagga gaatgaag 108

<210> 11
<211> 279
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 11
aaaattctca tagataaaa ccccccatct tacatcacc aaccagaaga cccagatact 60
gtcttgcttt tagcaaatgc cacttgaca tgggagcatg aagccagcag gaaaagtacc 120
ccaaagaaat tgcagaacca gaaaaggcat ttatgcaaga aacagaggtc agaggcatcc 180
agtgaagaga gtccaccagc caaggagacc actggcccaagg aggagcaaa tgacagcctc 240
aatcgggttc tgcacagcat aagctttgtg gtgagaaa 279
```

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

5

<210> 12  
<211> 72  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
gggaagatct tgggaatatg tgggaatgtg ggaagtggaa agagctccct ccttgcaagt 60  
ctctaggac ag 72

<210> 13  
<211> 125  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 13  
atgcagctgc agaaaggggt ggtggcagtc aatggaactt tggcctacgt ttcacagcag 60  
gcattggatct ttcatggaaa tgtgagagaa aacatactct ttggagaaaa gtatgatcac 120  
caaaag 125

<210> 14  
<211> 73  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 14  
gtatcagcac acagtccgcg tctgtggcct ccagaaggac ctgagcaacc tccctatgg 60  
agacctgact gag 73

<210> 15  
<211> 204  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
attggggagc ggggcctcaa cctctctggg gggcagagcc agaggattag cctggccccc 60  
gctgtctact ccgaccgtca gctctacctg ctggacgacc cctgttggc cgtggagccc 120  
caegtgggga agcacgtctt tgaggagtgc attaagaaga cgctcagggg aaagacagtc 180  
gtcctgggtga cccaccagct acag 204

<210> 16  
<211> 135  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
ttcttagagt ctgtgatga agttatttta ttagaagatg gagagatttg tgaagaggga 60  
acccacaagg agttaatgga ggagagaggg cgctatgcaa aactgattca caacctgcga 120  
ggattgcagt tcaag 135

<210> 17  
<211> 76  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 17  
gatcctgaac acctttacaa tgcagcaatg gtggaagcct tcaaggagag cctgtctgag 60  
agagaggaag atgctg 76

<210> 18  
<211> 72  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 18

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

6

ttttgggtcc aggaatgag aaagatgaag gaaaagaatc tgaacaggc tcagaatttg 60  
tagacacaaa ag 72

<210> 19  
<211> 90  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 19  
ttcctgagca ccagctcacc cagactgaat ccccccagga aggaacogtg acctggaaaa 60  
catatcacac gtacattaag gcttctggag 90

<210> 20  
<211> 104  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 20  
ggtacotcct ttctctcttc actgtgttcc tcttctctct gatgattggc agcgctgcct 60  
tcagacaactg gtggctgggt ctctgggttg acaagggctc acgg 104

<210> 21  
<211> 198  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 21  
atgacotgtg ggccccaggg caacaggacc atgtgtgagg tcggcgcggt gctggcagac 60  
atcggtcagc atgtgtacca gtgggtgtac actgcaagca tgggtttcat gctgggtgtt 120  
ggcgtcacca aaggcttcgt ctccaccaag acccaactga tggcatcttc ctctctgcat 180  
gacacggtgt ttgataag 198

<210> 22  
<211> 227  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 22  
atctttaaaga gcccaatgag ttcttttgac acgactccca ctggcaggct aatgaacgt 60  
ttttccaagg atatggaagc gctggatgtg aggtgcctgt ttcaagcaga gaaatttctg 120  
cagcagtttt ttatgttgtt gtttattctc gtatctctgg ctgctgtgtt tctgctgtc 180  
cttttagtcg tggcagcct tgcgttaggc ttcttcattc tgttacg 227

<210> 23  
<211> 138  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 23  
cattttccac agaggagtc aggagctcaa gaaggtggag aatgtcagcc ggtcaccccg 60  
gttcacccac atcacctcct ccattgcagg cctgggcctc attcacgctc atggcaagaa 120  
ggagagctgc atcaccta 138

<210> 24  
<211> 157  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 24  
tcaactcttc tactttaact gtgcctcag gtggtttgag ctgagaatgg atgtcctcat 60  
gaacatcctt accttoactg tggccttgtt ggtgacctg agtttctcct caatcagtac 120  
ttcatccaaa ggctgtcat tgcatacat catccag 157

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

7

<210> 25  
<211> 90  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 25  
ctgagcggac tgcctcaagt gtgtgtgga acgggaacag agaagcaagc caaattcacc 60  
tccgtggagc tgcctcaggga atacatttcg 90

<210> 26  
<211> 190  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 26  
acctgtgttc ctgaatgcac tcctcccttc aaagtgggga cctgtcccaa ggactggccc 60  
agctgtgggg agatcacott cagagactat cagatgagat acagagacaa cccccctt 120  
gtcttcgaca gcctgaactt gaacatacaa agtgggcaga cagtcgggat tgttgaaga 180  
acaggttcg 190

<210> 27  
<211> 160  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 27  
gaaagtcatc gttaggaaat gctttgtttc gtctgttga gccagccagt ggcacattct 60  
ttattgatga ggtggatatt tgcattctca gcttgaaga cctcagaacc aagctgactg 120  
tgatcccaaa ggatcctgtc ctgtttgtag gtacagtaag 160

<210> 28  
<211> 79  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 28  
gtacaacttg gatccctttg agagtccac cagatgagat cctctggcagg tctcggagag 60  
aacattcatg agagacaca 79

<210> 29  
<211> 114  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 29  
ataatgaaac tcccagaaaa attacaggca gaagtcacag aaaatggaga aaacttctca 60  
gtaggggaac gtcagctgct ttgtgtggcc cagagctctc tccgtaatc aaag 114

<210> 30  
<211> 165  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 30  
atcattctcc ttgatgaagc caccgcctct atggactcca agactgacac cctggttcag 60  
aacaccatca aagatgcott caagggtgc actgtgtga ccatggocca cgcctcaac 120  
acagtttcca actgcgacca cgtcctggtt atggaaaatg ggaag 165

<210> 31  
<211> 289  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 31

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

8

```

gtgattgagt ttgacaagcc tgaagtccct gcagagaagc cagattctgc atttgcgatg 60
ttactagcag cagaagtcaag attgtagagg tcctggcggc tgattctaga ggaggaaagag 120
gctctgtgag atgaatagga ggagtcttca ggaggagggg ctgtctcttc cgcaggcagc 180
cctggtcttc agccctctcc atccacggag tgagctgggg ctgaagttgt cccactgcc 240
atactcaatc catgtcacc cacttggtgg gcttgggggt ggttctggg 289

```

```

<210> 32
<211> 85
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 32
gatcctgaac acctttacaa tgcagcaatg gtggaagcct tcaaggagag cctgctgag 60
agagaggaag atgctggtat aatcg 85

```

```

<210> 33
<211> 1356
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 33
Met Val Gly Glu Gly Pro Tyr Leu Ile Ser Asp Leu Asp Gln Arg Gly
1      5      10      15
Arg Arg Arg Ser Phe Ala Glu Arg Tyr Asp Pro Ser Leu Lys Thr Met
20     25     30
Ile Pro Val Arg Pro Cys Ala Arg Leu Ala Pro Asn Pro Val Asp Asp
35     40     45
Ala Gly Leu Leu Ser Phe Ala Thr Phe Ser Trp Leu Thr Pro Val Met
50     55     60
Val Lys Gly Tyr Arg Gln Arg Leu Thr Val Asp Thr Leu Pro Pro Leu
65     70     75     80
Ser Thr Tyr Asp Ser Ser Asp Thr Asn Ala Lys Arg Phe Arg Val Leu
85     90     95
Trp Asp Glu Glu Val Ala Arg Val Gly Pro Glu Lys Ala Ser Leu Ser
100    105    110
His Val Val Trp Lys Phe Gln Arg Thr Arg Val Leu Met Asp Ile Val
115    120    125
Ala Asn Ile Leu Cys Ile Ile Met Ala Ala Ile Gly Pro Thr Val Leu
130    135    140
Ile His Gln Ile Leu Gln Gln Thr Glu Arg Thr Ser Gly Lys Val Trp
145    150    155    160
Val Gly Ile Gly Leu Cys Ile Ala Leu Phe Ala Thr Glu Phe Thr Lys
165    170    175
Val Phe Phe Trp Ala Leu Ala Trp Ala Ile Asn Tyr Arg Thr Ala Ile
180    185    190
Arg Leu Lys Val Ala Leu Ser Thr Leu Val Phe Glu Asn Leu Val Ser
195    200    205
Phe Lys Thr Leu Thr His Ile Ser Val Gly Glu Val Leu Asn Ile Leu
210    215    220
Ser Ser Asp Ser Tyr Ser Leu Phe Glu Ala Ala Leu Phe Cys Pro Leu
225    230    235    240
Pro Ala Thr Ile Pro Ile Leu Met Val Phe Cys Ala Ala Tyr Ala Phe
245    250    255

```

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

9

Phe Ile Leu Gly Pro Thr Ala Leu Ile Gly Ile Ser Val Tyr Val Ile  
 260 265 270  
 Phe Ile Pro Val Gln Met Phe Met Ala Lys Leu Asn Ser Ala Phe Arg  
 275 280 285  
 Arg Ser Ala Ile Leu Val Thr Asp Lys Arg Val Gln Thr Met Asn Glu  
 290 295 300  
 Phe Leu Thr Cys Ile Arg Leu Ile Lys Met Tyr Ala Trp Glu Lys Ser  
 305 310 315 320  
 Phe Thr Asn Thr Ile Gln Asp Ile Arg Arg Arg Glu Arg Lys Leu Leu  
 325 330 335  
 Glu Lys Ala Gly Phe Val Gln Ser Gly Asn Ser Ala Leu Ala Pro Ile  
 340 345 350  
 Val Ser Thr Ile Ala Ile Val Leu Thr Leu Ser Cys His Ile Leu Leu  
 355 360 365  
 Arg Arg Lys Leu Thr Ala Pro Val Ala Phe Ser Val Ile Ala Met Phe  
 370 375 380  
 Asn Val Met Lys Phe Ser Ile Ala Ile Leu Pro Phe Ser Ile Lys Ala  
 385 390 395 400  
 Met Ala Glu Ala Asn Val Ser Leu Arg Arg Met Lys Lys Ile Leu Ile  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Pro Pro Ser Tyr Ile Thr Gln Pro Glu Asp Pro Asp Thr  
 420 425 430  
 Val Leu Leu Leu Ala Asn Ala Thr Leu Thr Trp Glu His Glu Ala Ser  
 435 440 445  
 Arg Lys Ser Thr Pro Lys Lys Leu Gln Asn Gln Lys Arg His Leu Cys  
 450 455 460  
 Lys Lys Gln Arg Ser Glu Ala Tyr Ser Glu Arg Ser Pro Pro Ala Lys  
 465 470 475 480  
 Gly Ala Thr Gly Pro Glu Glu Gln Ser Asp Ser Leu Lys Ser Val Leu  
 485 490 495  
 His Ser Ile Ser Phe Val Val Arg Lys Gly Lys Ile Leu Gly Ile Cys  
 500 505 510  
 Gly Asn Val Gly Ser Gly Lys Ser Ser Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gly  
 515 520 525  
 Gln Met Gln Leu Gln Lys Gly Val Val Ala Val Asn Gly Thr Leu Ala  
 530 535 540  
 Tyr Val Ser Gln Gln Ala Trp Ile Phe His Gly Asn Val Arg Glu Asn  
 545 550 555 560  
 Ile Leu Phe Gly Glu Lys Tyr Asp His Gln Arg Tyr Gln His Thr Val  
 565 570 575  
 Arg Val Cys Gly Leu Gln Lys Asp Leu Ser Asn Leu Pro Tyr Gly Asp  
 580 585 590  
 Leu Thr Glu Ile Gly Glu Arg Gly Leu Asn Leu Ser Gly Gly Gln Arg  
 595 600 605  
 Gln Arg Ile Ser Leu Ala Arg Ala Val Tyr Ser Asp Arg Gln Leu Tyr  
 610 615 620

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

10

Leu Leu Asp Asp Pro Leu Ser Ala Val Asp Ala His Val Gly Lys His  
 625 630 635 640  
 Val Phe Glu Glu Cys Ile Lys Lys Thr Leu Arg Gly Lys Thr Val Val  
 645 650 655  
 Leu Val Thr His Gln Leu Gln Phe Leu Glu Ser Cys Asp Glu Val Ile  
 660 665 670  
 Leu Leu Glu Asp Gly Glu Ile Cys Glu Lys Gly Thr His Lys Glu Leu  
 675 680 685  
 Met Glu Glu Arg Gly Arg Tyr Ala Lys Leu Ile His Asn Leu Arg Gly  
 690 695 700  
 Leu Gln Phe Lys Asp Pro Glu His Leu Tyr Asn Ala Ala Met Val Glu  
 705 710 715 720  
 Ala Phe Lys Glu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Glu Asp Ala Val Leu Ala  
 725 730 735  
 Pro Gly Asn Glu Lys Asp Glu Gly Lys Glu Ser Glu Thr Gly Ser Glu  
 740 745 750  
 Phe Val Asp Thr Lys Val Pro Glu His Gln Leu Ile Gln Thr Glu Ser  
 755 760 765  
 Pro Gln Glu Gly Thr Val Thr Trp Lys Thr Tyr His Thr Tyr Ile Lys  
 770 775 780  
 Ala Ser Gly Gly Tyr Leu Leu Ser Leu Phe Thr Val Phe Leu Phe Leu  
 785 790 795 800  
 Leu Met Ile Gly Ser Ala Ala Phe Ser Asn Trp Trp Leu Gly Leu Trp  
 805 810 815  
 Leu Asp Lys Gly Ser Arg Met Thr Cys Gly Pro Gln Gly Asn Arg Thr  
 820 825 830  
 Met Cys Glu Val Gly Ala Val Leu Ala Asp Ile Gly Gln His Val Tyr  
 835 840 845  
 Gln Trp Val Tyr Thr Ala Ser Met Val Phe Met Leu Val Phe Gly Val  
 850 855 860  
 Thr Lys Gly Phe Val Phe Thr Lys Thr Thr Leu Met Ala Ser Ser Ser  
 865 870 875 880  
 Leu His Asp Thr Val Phe Asp Lys Ile Leu Lys Ser Pro Met Ser Phe  
 885 890 895  
 Phe Asp Thr Thr Pro Thr Gly Arg Leu Met Asn Arg Phe Ser Lys Asp  
 900 905 910  
 Met Asp Glu Leu Asp Val Arg Leu Pro Phe His Ala Glu Asn Phe Leu  
 915 920 925  
 Gln Gln Phe Phe Met Val Val Phe Ile Leu Val Ile Leu Ala Ala Val  
 930 935 940  
 Phe Pro Ala Val Leu Leu Val Val Ala Ser Leu Ala Val Gly Phe Phe  
 945 950 955 960  
 Ile Leu Leu Arg Ile Phe His Arg Gly Val Gln Glu Leu Lys Lys Val  
 965 970 975  
 Glu Asn Val Ser Arg Ser Pro Trp Phe Thr His Ile Thr Ser Ser Met  
 980 985 990  
 Gln Gly Leu Gly Ile Ile His Ala Tyr Gly Lys Lys Glu Ser Cys Ile

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

11

```

          995              1000              1005
Thr Tyr His Leu Leu Tyr Phe Asn Cys Ala Leu Arg Trp Phe Ala Leu
1010              1015              1020
Arg Met Asp Val Leu Met Asn Ile Leu Thr Phe Thr Val Ala Leu Leu
1025              1030              1035              1040
Val Thr Leu Ser Phe Ser Ser Ile Ser Thr Ser Ser Lys Gly Leu Ser
1045              1050              1055
Leu Ser Tyr Ile Ile Gln Leu Ser Gly Leu Leu Gln Val Cys Val Arg
1060              1065              1070
Thr Gly Thr Glu Thr Gln Ala Lys Phe Thr Ser Val Glu Leu Leu Arg
1075              1080              1085
Glu Tyr Ile Ser Thr Cys Val Pro Glu Cys Thr His Pro Leu Lys Val
1090              1095              1100
Gly Thr Cys Pro Lys Asp Trp Pro Ser Cys Gly Glu Ile Thr Phe Arg
1105              1110              1115              1120
Asp Tyr Gln Met Arg Tyr Arg Asp Asn Thr Pro Leu Val Leu Asp Ser
1125              1130              1135
Leu Asn Leu Asn Ile Gln Ser Gly Gln Thr Val Gly Ile Val Gly Arg
1140              1145              1150
Thr Gly Ser Gly Lys Ser Ser Leu Gly Met Ala Leu Phe Arg Leu Val
1155              1160              1165
Glu Pro Ala Ser Gly Thr Ile Phe Ile Asp Glu Val Asp Ile Cys Ile
1170              1175              1180
Leu Ser Leu Glu Asp Leu Arg Thr Lys Leu Thr Val Ile Pro Gln Asp
1185              1190              1195              1200
Pro Val Leu Phe Val Gly Thr Val Arg Tyr Asn Leu Asp Pro Phe Glu
1205              1210              1215
Ser His Thr Asp Glu Met Leu Trp Gln Val Leu Glu Arg Thr Phe Met
1220              1225              1230
Arg Asp Thr Ile Met Lys Leu Pro Glu Lys Leu Gln Ala Glu Val Thr
1235              1240              1245
Glu Asn Gly Glu Asn Phe Ser Val Gly Glu Arg Gln Leu Leu Cys Val
1250              1255              1260
Ala Arg Ala Leu Leu Arg Asn Ser Lys Ile Ile Leu Leu Asp Glu Ala
1265              1270              1275              1280
Thr Ala Ser Met Asp Ser Lys Thr Asp Thr Leu Val Gln Asn Thr Ile
1285              1290              1295
Lys Asp Ala Phe Lys Gly Cys Thr Val Leu Thr Ile Ala His Arg Leu
1300              1305              1310
Asn Thr Val Leu Asn Cys Asp His Val Leu Val Met Glu Asn Gly Lys
1315              1320              1325
Val Ile Glu Phe Asp Lys Pro Glu Val Leu Ala Glu Lys Pro Asp Ser
1330              1335              1340
Ala Phe Ala Met Leu Leu Ala Ala Glu Val Arg Leu
1345              1350              1355

```



WO 02/085943

PCT/EP02/03320

12

<210> 34  
 <211> 1359  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 34  
 Met Val Gly Glu Gly Pro Tyr Leu Ile Ser Asp Leu Asp Gln Arg Gly  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Arg Ser Phe Ala Glu Arg Tyr Asp Pro Ser Leu Lys Thr Met  
 20 25 30  
 Ile Pro Val Arg Pro Cys Ala Arg Leu Ala Pro Asn Pro Val Asp Asp  
 35 40 45  
 Ala Gly Leu Leu Ser Phe Ala Thr Phe Ser Trp Leu Thr Pro Val Met  
 50 55 60  
 Val Lys Gly Tyr Arg Gln Arg Leu Thr Val Asp Thr Leu Pro Pro Leu  
 65 70 75 80  
 Ser Thr Tyr Asp Ser Ser Asp Thr Asn Ala Lys Arg Phe Arg Val Leu  
 85 90 95  
 Trp Asp Glu Glu Val Ala Arg Val Gly Pro Glu Lys Ala Ser Leu Ser  
 100 105 110  
 His Val Val Trp Lys Phe Gln Arg Thr Arg Val Leu Met Asp Ile Val  
 115 120 125  
 Ala Asn Ile Leu Cys Ile Ile Met Ala Ala Ile Gly Pro Thr Val Leu  
 130 135 140  
 Ile His Gln Ile Leu Gln Gln Thr Glu Arg Thr Ser Gly Lys Val Trp  
 145 150 155 160  
 Val Gly Ile Gly Leu Cys Ile Ala Leu Phe Ala Thr Glu Phe Thr Lys  
 165 170 175  
 Val Phe Phe Trp Ala Leu Ala Trp Ala Ile Asn Tyr Arg Thr Ala Ile  
 180 185 190  
 Arg Leu Lys Val Ala Leu Ser Thr Leu Val Phe Glu Asn Leu Val Ser  
 195 200 205  
 Phe Lys Thr Leu Thr His Ile Ser Val Gly Glu Val Leu Asn Ile Leu  
 210 215 220  
 Ser Ser Asp Ser Tyr Ser Leu Phe Glu Ala Ala Leu Phe Cys Pro Leu  
 225 230 235 240  
 Pro Ala Thr Ile Pro Ile Leu Met Val Phe Cys Ala Ala Tyr Ala Phe  
 245 250 255  
 Phe Ile Leu Gly Pro Thr Ala Leu Ile Gly Ile Ser Val Tyr Val Ile  
 260 265 270  
 Phe Ile Pro Val Gln Met Phe Met Ala Lys Leu Asn Ser Ala Phe Arg  
 275 280 285  
 Arg Ser Ala Ile Leu Val Thr Asp Lys Arg Val Gln Thr Met Asn Glu  
 290 295 300  
 Phe Leu Thr Cys Ile Arg Leu Ile Lys Met Tyr Ala Trp Glu Lys Ser  
 305 310 315 320  
 Phe Thr Asn Thr Ile Gln Asp Ile Arg Arg Arg Glu Arg Lys Leu Leu  
 325 330 335  
 Glu Lys Ala Gly Phe Val Gln Ser Gly Asn Ser Ala Leu Ala Pro Ile

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

13

```

340          345          350
Val Ser Thr Ile Ala Ile Val Leu Thr Leu Ser Cys His Ile Leu Leu
355          360          365
Arg Arg Lys Leu Thr Ala Pro Val Ala Phe Ser Val Ile Ala Met Phe
370          375          380
Asn Val Met Lys Phe Ser Ile Ala Ile Leu Pro Phe Ser Ile Lys Ala
385          390          395          400
Met Ala Glu Ala Asn Val Ser Leu Arg Arg Met Lys Lys Ile Leu Ile
405          410          415
Asp Lys Ser Pro Pro Ser Tyr Ile Thr Gln Pro Glu Asp Pro Asp Thr
420          425          430
Val Leu Leu Leu Ala Asn Ala Thr Leu Thr Trp Glu His Glu Ala Ser
435          440          445
Arg Lys Ser Thr Pro Lys Lys Leu Gln Asn Gln Lys Arg His Leu Cys
450          455          460
Lys Lys Gln Arg Ser Glu Ala Tyr Ser Glu Arg Ser Pro Pro Ala Lys
465          470          475          480
Gly Ala Thr Gly Pro Glu Glu Gln Ser Asp Ser Leu Lys Ser Val Leu
485          490          495
His Ser Ile Ser Phe Val Val Arg Lys Gly Lys Ile Leu Gly Ile Cys
500          505          510
Gly Asn Val Gly Ser Gly Lys Ser Ser Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gly
515          520          525
Gln Met Gln Leu Gln Lys Gly Val Val Ala Val Asn Gly Thr Leu Ala
530          535          540
Tyr Val Ser Gln Gln Ala Trp Ile Phe His Gly Asn Val Arg Glu Asn
545          550          555          560
Ile Leu Phe Gly Glu Lys Tyr Asp His Gln Arg Tyr Gln His Thr Val
565          570          575
Arg Val Cys Gly Leu Gln Lys Asp Leu Ser Asn Leu Pro Tyr Gly Asp
580          585          590
Leu Thr Glu Ile Gly Glu Arg Gly Leu Asn Leu Ser Gly Gly Gln Arg
595          600          605
Gln Arg Ile Ser Leu Ala Arg Ala Val Tyr Ser Asp Arg Gln Leu Tyr
610          615          620
Leu Leu Asp Asp Pro Leu Ser Ala Val Asp Ala His Val Gly Lys His
625          630          635          640
Val Phe Glu Glu Cys Ile Lys Lys Thr Leu Arg Gly Lys Thr Val Val
645          650          655
Leu Val Thr His Gln Leu Gln Phe Leu Glu Ser Cys Asp Glu Val Ile
660          665          670
Leu Leu Glu Asp Gly Glu Ile Cys Glu Lys Gly Thr His Lys Glu Leu
675          680          685
Met Glu Glu Arg Gly Arg Tyr Ala Lys Leu Ile His Asn Leu Arg Gly
690          695          700
Leu Gln Phe Lys Asp Pro Glu His Leu Tyr Asn Ala Ala Met Val Glu
705          710          715          720

```

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

14

Ala Phe Lys Glu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Glu Asp Ala Gly Ile Ile  
 725 730 735  
 Val Leu Ala Pro Gly Asn Glu Lys Asp Glu Gly Lys Glu Ser Glu Thr  
 740 745 750  
 Gly Ser Glu Phe Val Asp Thr Lys Val Pro Glu His Gln Leu Ile Gln  
 755 760 765  
 Thr Glu Ser Pro Gln Glu Gly Thr Val Thr Trp Lys Thr Tyr His Thr  
 770 775 780  
 Tyr Ile Lys Ala Ser Gly Tyr Leu Leu Ser Leu Phe Thr Val Phe  
 785 790 795 800  
 Leu Phe Leu Leu Met Ile Gly Ser Ala Ala Phe Ser Asn Trp Trp Leu  
 805 810 815  
 Gly Leu Trp Leu Asp Lys Gly Ser Arg Met Thr Cys Gly Pro Gln Gly  
 820 825 830  
 Asn Arg Thr Met Cys Glu Val Gly Ala Val Leu Ala Asp Ile Gly Gln  
 835 840 845  
 His Val Tyr Gln Trp Val Tyr Thr Ala Ser Met Val Phe Met Leu Val  
 850 855 860  
 Phe Gly Val Thr Lys Gly Phe Val Phe Thr Lys Thr Thr Leu Met Ala  
 865 870 875  
 Ser Ser Ser Leu His Asp Thr Val Phe Asp Lys Ile Leu Lys Ser Pro  
 885 890 895  
 Met Ser Phe Phe Asp Thr Thr Pro Thr Gly Arg Leu Met Asn Arg Phe  
 900 905 910  
 Ser Lys Asp Met Asp Glu Leu Asp Val Arg Leu Pro Phe His Ala Glu  
 915 920 925  
 Asn Phe Leu Gln Gln Phe Phe Met Val Val Phe Ile Leu Val Ile Leu  
 930 935 940  
 Ala Ala Val Phe Pro Ala Val Leu Leu Val Val Ala Ser Leu Ala Val  
 945 950 955 960  
 Gly Phe Phe Ile Leu Leu Arg Ile Phe His Arg Gly Val Gln Glu Leu  
 965 970 975  
 Lys Lys Val Glu Asn Val Ser Arg Ser Pro Trp Phe Thr His Ile Thr  
 980 985 990  
 Ser Ser Met Gln Gly Leu Gly Ile Ile His Ala Tyr Gly Lys Lys Glu  
 995 1000 1005  
 Ser Cys Ile Thr Tyr His Leu Leu Tyr Phe Asn Cys Ala Leu Arg Trp  
 1010 1015 1020  
 Phe Ala Leu Arg Met Asp Val Leu Met Asn Ile Leu Thr Phe Thr Val  
 1025 1030 1035 1040  
 Ala Leu Leu Val Thr Leu Ser Phe Ser Ser Ile Ser Thr Ser Ser Lys  
 1045 1050 1055  
 Gly Leu Ser Leu Ser Tyr Ile Ile Gln Leu Ser Gly Leu Leu Gln Val  
 1060 1065 1070  
 Cys Val Arg Thr Gly Thr Glu Thr Gln Ala Lys Phe Thr Ser Val Glu  
 1075 1080 1085

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

15

Leu Leu Arg Glu Tyr Ile Ser Thr Cys Val Pro Glu Cys Thr His Pro  
1090 1095 1100  
Leu Lys Val Gly Thr Cys Pro Lys Asp Trp Pro Ser Cys Gly Glu Ile  
1105 1110 1115 1120  
Thr Phe Arg Asp Tyr Gln Met Arg Tyr Arg Asp Asn Thr Pro Leu Val  
1125 1130 1135  
Leu Asp Ser Leu Asn Leu Asn Ile Gln Ser Gly Gln Thr Val Gly Ile  
1140 1145 1150  
Val Gly Arg Thr Gly Ser Gly Lys Ser Ser Leu Gly Met Ala Leu Phe  
1155 1160 1165  
Arg Leu Val Glu Pro Ala Ser Gly Thr Ile Phe Ile Asp Glu Val Asp  
1170 1175 1180  
Ile Cys Ile Leu Ser Leu Glu Asp Leu Arg Thr Lys Leu Thr Val Ile  
1185 1190 1195 1200  
Pro Gln Asp Pro Val Leu Phe Val Gly Thr Val Arg Tyr Asn Leu Asp  
1205 1210 1215  
Pro Phe Glu Ser His Thr Asp Glu Met Leu Trp Gln Val Leu Glu Arg  
1220 1225 1230  
Thr Phe Met Arg Asp Thr Ile Met Lys Leu Pro Glu Lys Leu Gln Ala  
1235 1240 1245  
Glu Val Thr Glu Asn Gly Glu Asn Phe Ser Val Gly Glu Arg Gln Leu  
1250 1255 1260  
Leu Cys Val Ala Arg Ala Leu Leu Arg Asn Ser Lys Ile Ile Leu Leu  
1265 1270 1275 1280  
Asp Glu Ala Thr Ala Ser Met Asp Ser Lys Thr Asp Thr Leu Val Gln  
1285 1290 1295  
Asn Thr Ile Lys Asp Ala Phe Lys Gly Cys Thr Val Leu Thr Ile Ala  
1300 1305 1310  
His Arg Leu Asn Thr Val Leu Asn Cys Asp His Val Leu Val Met Glu  
1315 1320 1325  
Asn Gly Lys Val Ile Glu Phe Asp Lys Pro Glu Val Leu Ala Glu Lys  
1330 1335 1340  
Pro Asp Ser Ala Phe Ala Met Leu Leu Ala Ala Glu Val Arg Leu  
1345 1350 1355

<210> 35  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: PRIMER

<400> 35  
tccttcgcca cattttcc

18

<210> 36  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

16

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: PRIMER  
<400> 36  
attgagcacc tcgccaac 18  
  
<210> 37  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: PRIMER  
<400> 37  
ttctcattca ccaaatacct c 21  
  
<210> 38  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: PRIMER  
<400> 38  
acattaaaca tggcaatcac ac 22  
  
<210> 39  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: PRIMER  
<400> 39  
gtgtgattgc catgtttaat gt 22  
  
<210> 40  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: PRIMER  
<400> 40  
ggagtgcatt aagaagacgc 20  
  
<210> 41  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: PRIMER  
<400> 41  
cagagaggag gatgccat 18  
  
<210> 42  
<211> 19  
<212> ADN

WO 02/085943

PCT/EP02/03320

17

<213> Séquence artificielle  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: PRIMER  
<400> 42  
cactgcaagc atggtgttc 19  
  
<210> 43  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: PRIMER  
<400> 43  
ctcatcggtg tgactctca 19  
  
<210> 44  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: PRIMER  
<400> 44  
tttgagagtc acaccgatga gat 23  
  
<210> 45  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: PRIMER  
<400> 45  
cccagaacca accccaag 18  
  
<210> 46  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: PRIMER  
<400> 46  
ggctctgtga gatgaatagg 20

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
31 October 2002 (31.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/085943 A3(51) International Patent Classification: C07K 14/705,  
C12N 15/85, 15/861, 15/10, 15/12, C07K 16/28, C12Q  
1/68, A61K 48/00, 38/16, G01N 33/50, A61L 27/38(74) Agent: LECCA, Patricia: Aventis Pharma S.A., Direc-  
tion brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony  
Cedex (FR).

(21) International Application Number: PCT/EP02/03320

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

(22) International Filing Date: 5 March 2002 (05.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/272,759 5 March 2001 (05.03.2001) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent  
(BF, BJ, CH, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).(71) Applicants (for all designated States except US): AVEN-  
TIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron,  
F-92165 Antony (FR); THE GOVERNMENT OF THE  
UNITED STATES OF AMERICA [US/US]; U.S. De-  
partment of Health and Human Services, 200 Independence  
Avenue, Washington, DC 20201 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ROSIER-MON-  
TUS, Marie-Francoise [FR/FR]; 21, rue des Baconnets,  
F-92160 Antony (FR); PRADES, Catherine [FR/FR];  
30, avenue du Général De Gaulle, F-94320 Thiais (FR).  
ARNOULD-REGUIGNE, Isabelle [FR/FR]; 112,  
rue de Bry, F-94430 Chennevières Sur Marne (FR).  
DENEFLÉ, Patrice [FR/FR]; 45, avenue des Fusillés  
de Chateaubriand, F-94100 Saint Maur (FR). DEAN,  
Michael [US/US]; 13621 Hichinpost Lane, Frederick, MD  
(US). ALLIKMETS, Rando [US/US]; 8-J Lamplight  
Village Road, Norroc, NY 10950 (US).

## Published:

with international search report  
before the expiration of the time limit for amending the  
claims and to be republished in the event of receipt of  
amendments— with sequence listing part of description published sepa-  
rately in electronic form and available upon request from  
the International Bureau(88) Date of publication of the international search report:  
17 April 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/085943 A3

(54) Title: NUCLEIC ACIDS OF THE HUMAN ABCC12 GENE, VECTORS CONTAINING SUCH NUCLEIC ACIDS AND  
USES THEREOF(57) Abstract: The present invention relates to a novel human ABCC12 gene as well as the cDNAs encoding the novel short and  
long of ABCC12 proteins isoforms. The invention also relates to vectors and recombinant host cells comprising such nucleic acids,  
nucleotide probes and primers, and means for the detection of polymorphisms and mutations in the ABCC12 gene or in the corre-  
sponding proteins isoforms produced by the allelic form of the ABCC12 gene.

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/03320
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07K14/705 C12N15/85 C12N15/861 C12N15/10 C12N15/12 C07K16/28 C12Q1/68 A61K48/00 A61K38/16 G01N33/50 A61L27/38		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
BIOSIS, EPO-Internal, EMBL, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 1 February 2000 (2000-02-01) STRAUSBERG R: "hd13d01.x1 Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2909377 3' similar to TR:014517 014517 SMRP.; mRNA sequence." Database accession no. AW341683 XP002228124 the whole document	1-6,8-41
X	-& DATABASE SWISS-PROT 'Online! 15 July 1998 (1998-07-15) BELINSKY MG, ET AL.: "Multidrug resistance-associated protein 5 (Multi-specific organic anion transporter-C) (MOAT-C) (pABC11) (SMRP)." Database accession no. 014517 XP002228125 the whole document --- -/-	1-6,8-41
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
28 January 2003		19/02/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3046		Authorized officer Morawetz, R

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 02/03320

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALLIKMETS R ET AL: "Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the Expressed Sequence Tags Database" HUMAN MOLECULAR GENETICS, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 5, no. 10, 1996, pages 1649-1655, XP002120400 ISSN: 0964-6906 see in particular Fig. 2 the whole document	1-6,8-41
X	DATABASE EMBL 'Online! 21 May 1999 (1999-05-21) BRUCE D ET AL.: "Homo sapiens chromosome 16 clone RP11-264A16, complete sequence." Database accession no. AC007600 XP002228126 see e.g. nt: 57276-574921, 29026-129309, 173962-174252 abstract	1-6,8
A	BENNETT LYNDIA B ET AL: "A locus for paroxysmal kinesigenic dyskinesia maps to human chromosome 16." NEUROLOGY, vol. 54, no. 1, 11 January 2000 (2000-01-11), pages 125-130, XP009004537 ISSN: 0028-3878 the whole document	
A	TOMITA HIRO-AKI ET AL: "Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis locus maps to chromosome 16p11.2-q12.1." AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 65, no. 6, December 1999 (1999-12), pages 1688-1697, XP002228122 ISSN: 0002-9297 the whole document	
P,X	TAMMUR J ET AL: "Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 273, no. 1, 25 July 2001 (2001-07-25), pages 89-96, XP004296790 ISSN: 0378-1119 the whole document	1-6,8-41
	---	
	--- --	

Form PCT/BA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/03320
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	YABUUCHI HIKARU ET AL.: "Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABC11 and ABC12." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 288, no. 4, 9 November 2001 (2001-11-09), pages 933-939, XP002228123 ISSN: 0006-291X the whole document	1-6,8-41
P,X	WO 01 57214 A (LEXICON GENETICS INC) 9 August 2001 (2001-08-09) see e.g. SEQ ID NOs: 22, 23, 45	1-6,8-41
P,X	DATABASE GENESEQ 'Online! 13 February 2002 (2002-02-13) DRMANAC RT. ET AL.: "DNA encoding novel human diagnostic protein #25888." Database accession no. AAS90084 XP002228127 the whole document	1-6,8-41
P,X	-& DATABASE GENESEQ 'Online! 18 February 2002 (2002-02-18) DRMANAC RT ET AL., : "Novel human diagnostic protein #25888." Database accession no. AB625897 XP002228128 the whole document	
P,X	-& WO 01 75067 A (HYSEQ INC ;LIU CHENGHUA (US); TANG Y TOM (US); DRMANAC RODOJE T (U) 11 October 2001 (2001-10-11) see protein #25888	
E	WO 02 072632 A (ARNOULD-REGUIGNE ISABELLE ;AVENTIS PHARMA SA (FR); ROSIER-MONTUS M) 19 September 2002 (2002-09-19) figure 1	1-6,8-41

Form: PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/EP 02/03320
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>		
<small>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</small>		
1. <input type="checkbox"/>	<small>Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</small>	
2. <input checked="" type="checkbox"/>	<small>Claims Nos.: 7 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210</small>	
3. <input type="checkbox"/>	<small>Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</small>	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
<small>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</small>		
1. <input type="checkbox"/>	<small>As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</small>	
2. <input type="checkbox"/>	<small>As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</small>	
3. <input type="checkbox"/>	<small>As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</small>	
4. <input type="checkbox"/>	<small>No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</small>	
<small>Remark on Protest</small>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/EP 02 03320

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 7

Present claim 7 relates to a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely a nucleotide probe or primer specific of the ABCC12 gene, wherein the nucleotide probe or primer comprises at least 15 consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of any of SEQ ID NOS: 1-32.

The claim covers all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for none of such products. In the present case, the claim so lacks support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claim also lacks clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				International Application No. PCT/EP 02/03320	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0157214	A	09-08-2001	AU WO	4144601 A 0157214 A2	14-08-2001 09-08-2001
WO 02072632	A	19-09-2002	WO	02072632 A2	19-09-2002

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/14	C 0 7 K 14/705	4 C 0 8 7
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 16/28	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/28	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/53	A 6 1 K 37/02	

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

(74)代理人 100080355

弁理士 西村 公佑

(74)代理人 100127926

弁理士 結田 純次

(74)代理人 100105290

弁理士 三輪 昭次

(72)発明者 マリー・フランソワーズ・ロジエ・モンテュス

フランス国F - 9 2 1 6 0アントニ・リュエデバコネ 2 1

(72)発明者 カトリン・ブラデ

フランス国F - 9 4 3 2 0ティエ・アヴニュデュジェネラルドゥゴール 3 0

(72)発明者 イザベル・アルヌール・レギン

フランス国F - 9 4 4 3 0シェネヴィエーレシュルマルン・リュードゥブリ 1 1 2

(72)発明者 パトリス・デネフル

フランス国F - 9 4 1 0 0サンモール・アヴニュデフュジエドゥシャトーブリアン 4 5

(72)発明者 マイケル・ディーン

アメリカ合衆国メリーランド州フレデリック・ヒッチンボストレイン 1 3 6 2

(72)発明者 ランドー・アリクメツ

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 9 5 0・モンロー・ランプライトヴィレッジロード 8 - J

F ターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BB03 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37

FB02 FB03

4B024 AA01 AA11 BA61 BA63 CA04 CA05 CA06 CA09 DA02 EA02

FA02 FA10 GA11 GA18 HA03 HA08 HA12 HA14 HA17

4B063 QA01 QA12 QA17 QA18 QQ20 QQ43 QQ89 QR32 QR33 QR42

QR48 QR55 QR59 QR62 QR69 QR77 QR82 QS12 QS24 QS25

QS34 QS36 QX01 QX07

4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA24 CA24 CA44 CA46

4C084 AA01 AA02 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 DC50

NA14 ZA01

4C087 AA01 BC83 CA12 NA14 ZA01

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 DA86 EA20 EA50

FA72 FA74