

(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2010-504088
(P2010-504088A)

(43) 公表日 平成22年2月12日(2010.2.12)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 2 G 0 4 5
C 12 N 9/10 (2006.01)	C 12 N 9/10	4 B 0 2 4
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 B 0 5 0
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19	4 B 0 6 3
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21	4 B 0 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 118 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-528732 (P2009-528732)	(71) 出願人	505403119 プロビオドルグ エージー ドイツ連邦共和国 0 6 1 2 0 ハルレ/ サアレ ウエインベルグウエグ 2 2
(86) (22) 出願日	平成19年9月21日 (2007. 9. 21)	(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(85) 翻訳文提出日	平成21年5月15日 (2009. 5. 15)	(72) 発明者	ステブハン スチルリング ドイツ連邦共和国 0 6 1 3 0 ザールラ ント州 ハルレ グロクケンウエグ 4
(86) 國際出願番号	PCT/EP2007/060013	(72) 発明者	ホルゲル クイニス ドイツ連邦共和国 0 6 1 1 0 ザールラ ント州 ハルレ ステインウエグ 3 9
(87) 國際公開番号	W02008/034891	(72) 発明者	ジェエンス - ウルリクフ ラフフェルド ドイツ連邦共和国 0 6 1 2 0 リエスカ ウ ミトテルストラスセ 2 3
(87) 國際公開日	平成20年3月27日 (2008. 3. 27)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/846, 244		
(32) 優先日	平成18年9月21日 (2006. 9. 21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/947, 780		
(32) 優先日	平成19年7月3日 (2007. 7. 3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】グルタミニルシクラーゼに関連した新規遺伝子

(57) 【要約】

本発明は、グルタミニルシクラーゼ (QC, EC 2.3.2.5) のアイソザイムである新規グルタミニル-ペプチドシクロトランスフェラーゼ様タンパク質 (QPCTL) に、及びこれらのアイソザイムをコードする単離された核酸に關し、これらの全ては、新たな治療薬の発見のために、シクラーゼ活性を測定するために、及びこれらのグルタミニルシクラーゼアイソザイムに対する化合物の阻害活性を決定するために有用である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) 配列番号：11～18の1つのアミノ酸配列を含むポリペプチド、若しくは(b)それに対して少なくとも約75%類似であり、かつ同じ生物学的機能を示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするか；又は配列番号：2～9の1つの選択的スプライスバリエントであるか；又は前記(a)若しくは(b)をコードする核酸からの少なくとも14個の隣接するヌクレオチドを含むプローブであるか；又は前述のいずれか一つに対して相補的である、単離された核酸。

【請求項 2】

DNA又はRNAである、請求項1記載の単離された核酸。

10

【請求項 3】

配列番号：2～9のいずれか1つの全長を含むDNA転写物であるか、又は配列番号：2～9の1つの全コード領域に対して相補的である、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項 4】

請求項3記載のDNAに対して向けられたアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

配列番号：2～9のいずれか1つの全長を含む、RNA転写物である、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項 6】

配列番号：2～9の1つの選択的スプライスバリエントである、請求項1記載の単離された核酸。

20

【請求項 7】

配列番号：19、又は20に対応する、請求項6記載のスプライスバリエント。

【請求項 8】

請求項6、又は7記載の核酸によってコードされるポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号：11～18の1つに対して少なくとも約85%類似するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項 10】

配列番号：11～18の1つに対して少なくとも約95%類似するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項1記載の単離された核酸。

30

【請求項 11】

配列番号：11～18の1つと少なくとも約50%の同一性を有するポリペプチドをコードする、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項 12】

配列番号：2～9の1つからの少なくとも14個の隣接するヌクレオチドを含む、請求項1記載の核酸プローブ。

【請求項 13】

配列番号：53～61のいずれか1つに対応する、請求項12記載の核酸プローブ。

【請求項 14】

請求項1記載の核酸プラスその発現を駆動するように前記核酸と作動可能に連結された発現制御エレメントを含む、単離された組換えポリヌクレオチド分子。

【請求項 15】

プロモーターに作動可能に連結された、配列番号：11～18のいずれか1つに記載された全アミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項1の核酸を含む発現ベクターであって、適合性宿主細胞に存在する、前記発現ベクター。

【請求項 16】

配列番号：11～18の1つのアミノ酸配列の少なくとも成熟タンパク質部分をコードする請求項1記載の核酸の挿入によって遺伝子操作された哺乳動物、昆虫、又は細菌の宿主細胞。

50

【請求項 17】

配列番号：11～18の1つの成熟タンパク質部分を含むポリペプチドを产生するための方法であって、前記ポリペプチドの产生に十分な条件下で請求項16記載の宿主細胞を培養すること含む、前記产生方法。

【請求項 18】

前記ポリペプチドが前記細胞の表面に発現されて、前記培養から該ポリペプチド、又はその断片を回収することを更に含む、請求項17記載の产生方法。

【請求項 19】

任意にグリコシル化されていてもよく、かつ(a)配列番号：11～18のいずれか1つに記載された成熟タンパク質のアミノ酸配列を有するか；(b)(a)の成熟タンパク質の1つに対して少なくとも約75%の類似性を有する成熟タンパク質のアミノ酸配列を有し、かつ同じ生物学的機能を示すか；(c)配列番号：11～18のいずれか1つの成熟タンパク質と少なくとも約50%の同一性を有する成熟タンパク質のアミノ酸配列を有するか；又は(d)(a)の免疫学的に反応性の断片である、ポリペプチド。

10

【請求項 20】

(a)の成熟タンパク質に対して少なくとも約85%の類似性を有する成熟タンパク質である、請求項19記載のポリペプチド。

【請求項 21】

(a)の成熟タンパク質に対して少なくとも約95%の類似性を有する成熟タンパク質である、請求項19記載のポリペプチド。

20

【請求項 22】

配列番号：11～18の1つの成熟タンパク質のアミノ酸配列を有するか、又はそれぞれの成熟タンパク質と同じ生物学的機能を示すその断片である、請求項19記載のポリペプチド。

【請求項 23】

請求項の19～22いずれか1項記載のポリペプチド又は断片を認識する抗体。

【請求項 24】

配列番号：11～18の1つのアミノ酸配列を有するポリペプチドを認識する、請求項23記載の抗体。

30

【請求項 25】

請求項19記載の少なくとも1つの成熟タンパク質の酵素活性を阻害することができる化合物をスクリーニングする方法であって、前記成熟タンパク質、及び前記成熟タンパク質のために適した基質を、1つ以上の試験化合物又はその塩の存在下においてインキュベートすること、前記成熟タンパク質の酵素活性を測定すること、前記活性を試験化合物の非存在下で決定された相当する活性と比較すること、及び酵素活性を低減させる試験化合物又は化合物群を選択することを含む、前記方法。

【請求項 26】

請求項19記載の少なくとも1つの成熟タンパク質の酵素活性を阻害しない選択的QC-阻害剤をスクリーニングする方法であって、前記成熟タンパク質、及び適切な基質をQCの1つ以上の阻害剤又はその塩の存在下においてインキュベートすること、前記成熟タンパク質の酵素活性を測定すること、前記活性をQC阻害剤の非存在下で決定された相当する活性と比較すること、及び前記成熟タンパク質の酵素活性を低減させない化合物を選択することを含む、前記方法。

40

【請求項 27】

QCの酵素活性を阻害しない選択的QPCTL-阻害剤をスクリーニングする方法であって、前記QCをQPCTLの1つ以上の阻害剤又はその塩の存在下においてインキュベートすること、QCの酵素活性を測定すること、前記活性をQPCTL阻害剤の非存在下で決定された相当する活性を比較すること、及び前記QPCTLタンパク質の酵素活性を低減させない化合物を選択することを含む、前記方法。

【請求項 28】

50

請求項19～22のいずれか1項記載の前記成熟タンパク質の1つの生物学的機能を阻害する、QPCTLアンタゴニスト。

【請求項 29】

小分子阻害剤である、請求項28記載のQPCTLアンタゴニスト。

【請求項 30】

請求項25又は27記載のスクリーニング法によって同定された、請求項29記載の阻害剤。

【請求項 31】

請求項26記載のスクリーニング法によって同定された、選択的QC阻害剤。

【請求項 32】

少なくとも1つQPCTL阻害剤、又はその薬学的許容し得る塩を、任意に従来の担体及び／又は賦形剤と組み合わせて含む、非経口、経腸、又は経口投与のための医薬組成物。 10

【請求項 33】

アルツハイマー病、家族性英国痴呆症、家族性デンマーク痴呆症、ダウン症候群、ハンチントン病、ケネディ病、潰瘍疾患、ヘリコバクターピロリ (*Helicobacter pylori*) 感染を伴う又は伴わない十二指腸癌、結直腸癌、ゾリンジャー・エリソン症候群、ヘリコバクターピロリ感染を伴う又は伴わない胃癌、病原性精神病状態、統合失調症、不妊症、新形成、炎症性宿主反応、癌、悪性転移、メラノーマ、乾癬、リウマチ様関節炎、アテローム性動脈硬化症、体液性及び細胞媒介免疫応答の障害、内皮における白血球接着及び遊走プロセス、摂食障害、睡眠-覚醒状態障害、エネルギー代謝の恒常性制御の障害、自律神経機能障害、ホルモンバランス障害、又は体液の制御の障害、多発性硬化症、ギランバレー症候群、並びに慢性炎症性脱髓性多発神経根筋障害から選択される疾患の予防又は治療のための医薬の製造のための、請求項32記載の医薬組成物の使用。 20

【請求項 34】

アルツハイマー病、家族性英国痴呆症、家族性デンマーク痴呆症、ダウン症候群、ハンチントン病、ケネディ病、潰瘍疾患、ヘリコバクターピロリ感染を伴う又は伴わない十二指腸癌、結直腸癌、ゾリンジャー・エリソン症候群、ヘリコバクターピロリ感染を伴う又は伴わない胃癌、病原性精神病状態、統合失調症、不妊症、新形成、炎症性宿主反応、癌、悪性転移、メラノーマ、乾癬、リウマチ様関節炎、アテローム性動脈硬化症、体液性及び細胞媒介免疫応答の障害、内皮における白血球接着及び遊走プロセス、摂食障害、睡眠-覚醒状態障害、エネルギー代謝の恒常性制御の障害、自律神経機能障害、ホルモンバランス障害、又は体液の制御の障害、多発性硬化症、ギランバレー症候群、及び慢性炎症性脱髓性多発神経根筋障害から選択される疾患から選択される疾患の予防又は治療のための医薬の製造のための、QPCTL阻害剤、又はその医薬として許容し得る塩の使用。 30

【請求項 35】

QPCTL阻害剤が競合阻害剤である、請求項32～34のいずれか1項記載の医薬組成物又は使用。

【請求項 36】

QPCTL阻害剤が、QPCTLの活性部位に結合した金属イオンに結合する、請求項32～35のいずれか1項記載の医薬組成物又は使用。

【請求項 37】

QPCTLが、配列番号：11～18、21、及び22の1つから選択される、請求項32～36のいずれか1項記載の医薬組成物又は使用。 40

【請求項 38】

QPCTLが、配列番号：11及び12の1つから選択される、請求項37記載の医薬組成物又は使用。

【請求項 39】

請求項28～30のいずれか1項記載の阻害剤が使用される、請求項32～38のいずれか1項記載の医薬組成物又は使用。

【請求項 40】

QPCTL阻害剤を含む、診断アッセイ。 50

【請求項 4 1】

請求項33又は34において定義した疾患及び／又は状態のいずれか1つを診断する方法であって、

-前記疾患及び／又は状態で苦しめられていることが疑われる対象から試料を収集する工程、

-前記試料をグルタミニルペプチドシクロトランスフェラーゼの阻害剤と接触させる工程、及び

-前記対象が前記疾患及び／又は状態によって苦しめられているか否かを決定する工程、

、
を含む、前記方法。

【請求項 4 2】

前記対象がヒトである、請求項41記載の方法。

【請求項 4 3】

前記試料が、血液試料、血清試料、脳脊髄溶液の試料、又は尿試料である、請求項41又は42記載の方法。

【請求項 4 4】

検出手段として請求項40記載の診断アッセイ、及び決定手段を含む、請求項41～43の方法を実施するための診断キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

(技術分野)

本発明は、グルタミニルシクラーゼ (QC、EC 2.3.2.5) のアイソザイムである新規グルタミニル-ペプチドシクロトランスフェラーゼ様タンパク質 (QPCTL) に、及びこれらのアイソザイムをコードする単離された核酸に関し、これらの全ては、新たな治療薬の発見のために、シクラーゼ活性を測定するために、及びこれらのグルタミニルシクラーゼアイソザイムに対する化合物の阻害活性を決定するために有用である。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

(発明の背景)

グルタミニルシクラーゼ (QC、EC 2.3.2.5) は、N末端のグルタミン残基のピログルタミン酸 (pGlu*) への分子内の環化を触媒してアンモニアを遊離させる。QCは、Messerによって1963年に熱帯植物パパイア (Carica papaya) のラテックスから最初に単離された (Messer, M. の文献 1963 Nature 4874、1299)。24年後、対応する酵素活性が、動物下垂体において発見された (Busby, W. H. J. らの文献、1987 J Biol Chem 262、8532-8536；Fischer, W. H.、及びSpiess, J. の文献、1987 Proc Natl Acad Sci U S A 84、3628-3632)。哺乳動物QCについては、QCによるGlnのpGluへの変換を、TRH、及びGnRHの前駆体について示すことができる (Busby, W. H. J. らの文献、1987 J Biol Chem 262、8532-8536；Fischer, W. H.、及びSpiess, J. の文献、1987 Proc Natl Acad sci USA 84、3628-3632)。加えて、QCの初期の局在実験により、ウシ下垂体における触媒作用のその推定産物との共局在が明らかになり、ペプチドホルモン合成において示唆される機能を更に改善する (Bockers, T. M. らの文献、1995 J Neuroendocrinol 7、445-453)。対照的に、植物QCの生理機能は、あまり明らかではない。C. パパイア由来の酵素の場合、病原微生物に対する植物防御における役割が示唆された (El Moussaoui, A. らの文献、2001 Cell Mol Life Sci 58、556-570)。その他の植物由来の推定上のQCが、最近配列比較によって同定された (Dahl, S. W. らの文献、2000 Protein Expr Purif 20、27-36)。しかし、これらの酵素の生理機能は、いまだあいまいである。

【0 0 0 3】

植物、及び動物由来の公知のQCは、基質のN末端の位置のL-グルタミンに対する厳密な特異性を示し、これらの動力学的挙動は、ミカエリス メンテンの式に従うことが見いだ

10

20

30

40

50

された (Pohl, T. らの文献、1991 Proc Natl Acad Sci U S A 88、10059-10063 ; Consalvo, A. P. らの文献、1988 Anal Biochem 175、131-138 ; Gololobov, M. Y. らの文献、1996 Biol Chem Hoppe Seyler 377、395-398)。しかし、C. パパイア由来のQCの一次構造と哺乳類由来の高度に保存されたQCのものと比較では、何ら配列相同性が明らかにならなかつた (Dahl, S. W. らの文献、2000 Protein Expr Purif 20、27-36)。植物QCが新たな酵素ファミリーに属するように見えるのに対して (Dahl, S. W. らの文献、2000 Protein Expr Purif 20、27-36)、哺乳動物QCは、細菌アミノペプチダーゼに対して明白な配列相同性を有することが見いだされ (Bateman, R. C. らの文献、2001 Biochemistry 40、11246-11250)、植物および動物由来のQCが異なる進化の起源を有するという結論に至った。

【0004】

最近では、組換えヒトQC、並びに脳抽出物からのQC-活性が、N末端グルタミニル、並びにグルタミン酸環化の両方を触媒することが示された。最も注意を引くのは、シクラーゼで触媒されるGlu₁-変換は、pH 6.0周辺を好むが、一方pGlu-誘導体へのGln₁-変換は、約8.0の最適pHで生じるという知見である。pGlu-A 関連ペプチドの形成は、組換えヒトQC、及びブタ下垂体抽出物由来のQC-活性の阻害によって抑制することができるので、酵素QCは、アルツハイマー病の治療のための薬物開発の標的である。

【0005】

EP 02 011 349.4は、昆虫グルタミニルシクラーゼをコードするポリヌクレオチド、並びにこれによりコードされるポリペプチドを開示する。この出願は、本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む宿主細胞を更に提供する。昆虫QCを含む単離されたポリペプチド、及び宿主細胞は、グルタミニルシクラーゼ活性を低減させる薬剤をスクリーニングする方法に有用である。このような薬剤は、殺虫薬として有用である。

【0006】

QCの阻害剤は、QCアイソザイムの阻害剤としても有用であり得るし、特に阻害剤の構造、これらの使用、及びこれらの產生に関して、これらの全体が本明細書に組み込まれるWO 2004/098625、WO2004/098591、WO2005/039548、及びWO2005/075436に記述されている。

【0007】

(定義)

(酵素阻害剤)

可逆的酵素阻害剤：競合阻害剤、非競合的可逆的阻害剤、緩慢結合又は密接結合阻害剤、遷移状態類似体、及び多基質類似体を含む。

【0008】

(競合阻害剤)は、

- i) 酵素との非共有結合性の相互作用、
- ii) 酵素活性部位に関して基質との競合、

を示す。

【0009】

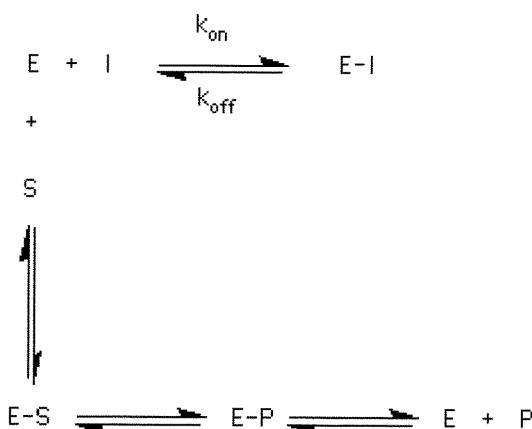
可逆的酵素阻害剤の主要な作用機序、及び解離定数の定義は、以下の通りに視覚化することができる：

10

20

30

【化1】



10

20

30

40

酵素阻害剤[E-I]複合体の形成が、基質の結合を妨げ、従って、反応は、正常な生理学的産物Pに進行することができない。阻害剤濃度[I]が高いほど、より多くの[E-I]を生じて、基質が結合することができる遊離酵素があまり残らない。

【0010】

(非競合的可逆的阻害剤)は、

- i)活性部位以外の部位(アロステリックな結合部位)に結合し、
- ii)触媒活性を低減し、又は停止する酵素の高次構造上の変化を引き起こす。

【0011】

(緩慢結合又は密接結合阻害剤)は、

- i)阻害剤と酵素との間に平衡にゆっくりと到達する競合阻害剤であり、
- ii)(k_{on} が、緩徐である)、おそらく、酵素、又は阻害剤において生じなければならぬ高次構造上の変化のために、

a)遷移状態類似体であることが多く、

b)酵素濃度と同様の濃度にて効率的であり(nM以下の K_D 値)、

c) k_{off} 値がとても低いため、この種の阻害剤は、「ほぼ」不可逆的である。

【0012】

(遷移状態類似体)は、酵素が触媒する反応の遷移状態を模倣する競合阻害剤である。酵素触媒作用は、遷移状態のエネルギーの低下によって生じ、従って、遷移状態結合は、基質結合を上回って有利である。

【0013】

(多基質類似体)

2つ以上の基質を含む反応については、2つ以上の基質に似た構造的特徴を含む、競合阻害剤、又は遷移状態類似体をデザインすることができる。

【0014】

(不可逆的酵素阻害剤)：結合していない酵素と酵素阻害剤複合体との間の平衡($E + I \rightleftharpoons E-I$)を共有結合により完全に右にさせて(~100 kcal/モル)、不可逆的阻害を生じる。

【0015】

(親和標識薬)

- ・(不可逆的阻害剤に向けられた活性部位)(競合的不可逆的阻害剤)は、酵素によつ

50

て認識されて（可逆的、特異的な結合）、続いて共有結合形成をし、かつ

i) 構造的に基質、遷移状態、又は産物に類似しており、薬物と標的酵素との間の特異的な相互作用が可能であり、

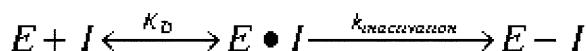
ii) 反応性官能基（例えば、求核試薬、-COCH₂Br）を含み、共有結合形成が可能である。

【0016】

下記の反応スキームは、その標的酵素との活性部位に向けられた試薬を記述し、式中K_Dは、解離定数であり、かつk_{inactivation}は、共有結合形成の速度である。

【化2】

10



・メカニズムに基づいた酵素不活性化剤（また、自殺阻害剤とも呼ばれる）は、酵素活性部位に結合する活性部位向けられた試薬（非反応性）であり、そこで、それは、酵素の触媒能力によって反応性の形態（活性化される）に変換される。一旦活性化されると、阻害剤と酵素との間に共有結合が形成される。

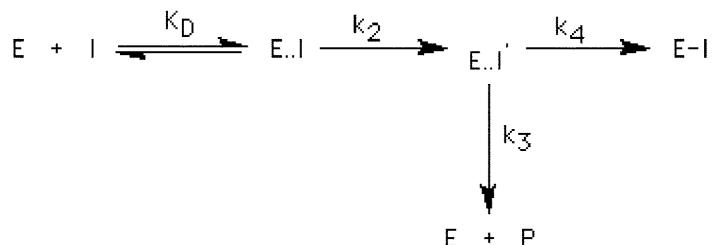
【0017】

下記の反応スキームは、メカニズムに基づいた酵素不活性化剤の作用機序を示し、式中K_Dは、解離複合体であり、k₂は、一旦酵素に結合した際の阻害剤の活性化の速度であり、k₃は、酵素からの酵素（産物は、なおも反応性であり得る）から活性化された阻害剤Pの解離の速度であり、及びk₄は、活性化された阻害剤と酵素との間の共有結合形成の速度である。

20

【化3】

30



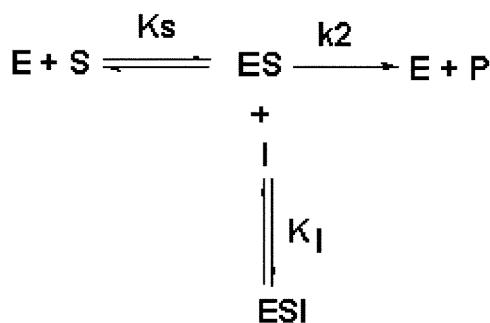
不活性化（共有結合形成、k₄）は、解離（k₃）の前に生じなければならず、さもなければ、ここで、反応性阻害剤は、環境中に放出される。分配比、k₃/k₄：放出された産物の不活性化に対する比は、効率的な系の不活性化、及び最小の望ましくない副反応のために最小化されるべきである。大きな分配比（解離のほうが有利である）では、非特異反応を引き起こす。

【0018】

（不競合的酵素阻害剤）：不競合的阻害剤（ES複合体のみに結合する阻害剤）の定義から、以下の平衡を書くことができる：

40

【化4】



10

ES複合体は、 K_s と同じ解離定数で基質を分離するが、ESI複合体は、それを分離しない（すなわちは、ゼロと同じ K_s 値を有する）。ミカエリス-メンテン型酵素の K_m は、低減されることが予想される。基質濃度を増加させると、ESI濃度の増加を引き起こし（反応生成物へと進行することができない複合体）、従って、阻害は、除去することができない。

【0019】

競合的酵素阻害剤は、本発明では好ましい。競合的可逆的酵素阻害剤は、最も好ましい。「 K_I 」、又は「 K_D 」、及び「 K_{D_0} 」という用語は、酵素に対する阻害剤の結合、及びその後の酵素からの放出を記述する結合定数である。別の尺度は、所与の基質濃度にて50%酵素活性を生じる阻害剤濃度を反映する「 IC_{50} 」値である。

20

【0020】

本明細書に使用される「QC」という用語は、グルタミル-ペプチドシクロトランスクエラーゼ (QPCT) と同義であるグルタミルシクラーゼ (QC)；及びグルタミル-ペプチドシクロトランスクエラーゼ様タンパク質 (QPCTL) と同義であるQC様酵素を含む。QC、及びQC様酵素は、同一、又は同様の酵素活性を有し、QC活性として更に定義される。この点に関しては、QC様酵素は、それらの分子構造がQCとは基本的に異なり得る。

20

【0021】

「QC活性」は、グルタミルシクラーゼ (QC、QPCT)、及びQC様酵素 (QPCTL) の触媒活性として定義される。これらの酵素は、CSFなどの、腎臓、肝臓、小腸、脳、及び体液を含む哺乳類の体の種々の組織において見いだされ、そこで、これらは、高特異性で生物活性ペプチドのN末端にてグルタミン、又はグルタミン酸を環化する。

30

【0022】

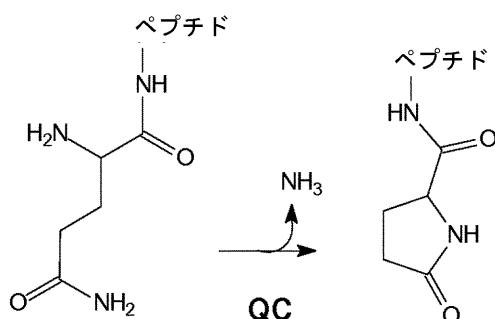
特に、本明細書に使用される「QC活性」という用語は、アンモニアの遊離下での、N末端グルタミン残基のピログルタミン酸 (pGlu⁺)への、又はN末端L-ホモグルタミン若しくはL- -ホモグルタミンの環状ピロホモグルタミン誘導体への分子内環化として定義される。従って、スキーム1、及び2を参照されたい。

【0023】

スキーム1：QCによるグルタミンの環化

【化5】

40

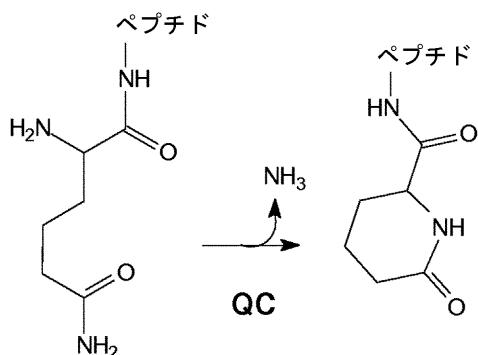


50

【0024】

スキーム2: QCによるL-ホモグルタミンの環化

【化6】



10

【0025】

本明細書に使用される「EC」という用語は、グルタミン酸シクラーゼ(EC)としてのグルタミニルシクラーゼ(QC、QPCT)、及びQC様酵素(QPCTL)の副活性を含み、EC活性として更に定義される。

【0026】

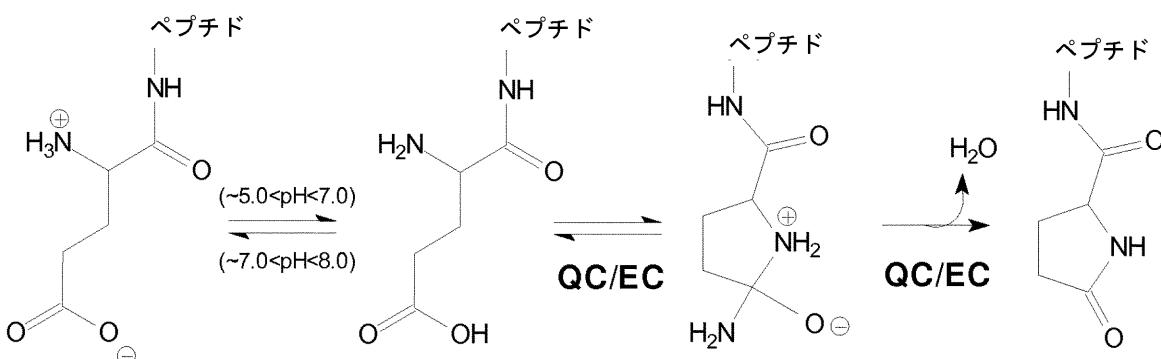
本明細書に使用される「EC活性」という用語は、グルタミニルシクラーゼ(QC、QPCT)、及びQC様酵素(QPCTL)によるN末端グルタミン酸残基のピログルタミン酸(pGlu*)への分子内の環化として定義される。従って、スキーム3を参照されたい。

20

【0027】

スキーム3: QC(EC)による無電荷グルタミルペプチドのN末端環化

【化7】



30

【0028】

「QC-阻害剤」、又は「グルタミニルシクラーゼ阻害剤」という用語は、一般に当業者に公知であり、酵素阻害剤を意味し、好ましくは酵素と阻害剤の直接の相互作用によって、グルタミニルシクラーゼ(QC、QPCT)、若しくはQC様酵素(QPCTL)、又はこれらのグルタミルシクラーゼ(EC)活性の触媒活性を阻害する。

40

【0029】

本明細書で定義される「選択的QC-阻害剤」という用語は、グルタミニルシクラーゼ(QC、QPCT)の触媒活性を阻害するが、少なくとも1つのQC様酵素(QPCTL)を阻害せず、又はより低い能力で阻害する酵素阻害剤を意味する。好ましいは選択的QC-阻害剤は、少なくとも1つのQC様酵素(QPCTL)の阻害のためのそのki値より1桁低いki値でグルタミニルシクラーゼ(QC、QPCT)を阻害する。より好ましくは、グルタミニルシクラーゼ(QC、QPCT)の阻害のための前記選択的QC-阻害剤のki値は、少なくとも1つのQC様酵素(QPCTL)の阻害のためのそのki値よりも2桁低い。更に好ましいのは、グルタミニルシクラーゼ(QC、QPCT)の阻害のためのこれらのki値が、少なくとも1つのQC様酵素(QPCTL)の阻害の

50

ためのこれらの k_i 値よりも3桁低い選択的QC-阻害剤である。最も好ましくは、QC様酵素 (QPCTL) を阻害しない選択的QC-阻害剤である。

【0030】

本明細書で定義される「選択的QPCTL-阻害剤」という用語は、少なくとも1つのQC様酵素 (QPCTL) の触媒活性を阻害するが、グルタミニルシクラーゼ (QC, QPCT) の活性を阻害せず、又はより低い能力で阻害する酵素阻害剤を意味する。好ましくは、グルタミニルシクラーゼ (QC, QPCT) の阻害のためのその k_i 値よりも1桁低い k_i 値で少なくとも1つのQC様酵素 (QPCTL) を阻害する選択的QPCTL-阻害剤である。より好ましくは、少なくとも1つのQC様酵素 (QPCTL) の阻害のための前記選択的QPCTL-阻害剤の k_i 値は、グルタミニルシクラーゼ (QC, QPCT) の阻害のためのその k_i 値よりも2桁低い。更に好ましいのは、少なくとも1つのQC様酵素 (QPCTL) の阻害のためのこれらの k_i 値が、グルタミニルシクラーゼ (QC, QPCT) の阻害のためのこれらの k_i 値よりも3桁低い選択的QPCTL-阻害剤である。最も好ましくは、グルタミニルシクラーゼ (QC, QPCT) の活性を阻害しない選択的QPCTL-阻害剤である。

10

【0031】

(QC阻害の能力)

QC阻害との相関を考慮して、好ましい実施態様において、本方法、及び医学的使用では、 $10\text{ }\mu\text{M}$ 以下、より好ましくは $1\text{ }\mu\text{M}$ 以下、更により好ましくは $0.1\text{ }\mu\text{M}$ 以下、若しくは $0.01\text{ }\mu\text{M}$ 以下、又は最も好ましくは $0.01\text{ }\mu\text{M}$ 以下のQC阻害のための K_i をもつ薬剤を利用する。実際に、マイクロモル以下、好ましくはナノモル、及び更により好ましくはピコモルの範囲の K_i 値をもつ阻害剤が想定される。従って、活性薬剤は、便宜上、「QC阻害剤」として本明細書に記述してあるが、このような命名法は、本発明の対象を特定の作用機序に限定することを意図していないことが理解されるであろう。

20

【0032】

(QC阻害剤の分子量)

一般に、本方法、又は医学的使用のQC阻害剤は、例えば 1000g/モル 以下、 500g/モル 以下、好ましくは 400g/モル 以下、及び更により好ましくは 350g/モル 以下、又は更に 300g/モル 以下の分子量をもつ小分子であるだろう。

30

【0033】

本明細書に使用される「対象」という用語は、治療、観察、又は実験の目的とされた動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトをいう。

【0034】

本明細書に使用される「治療上有効量」という用語は、治療される疾患、又は障害の症候の軽減を含む、研究者、獣医師、医師、又はその他の臨床家によって試みられている、組織系、動物、又はヒトにおいて、生物学的、若しくは医学的反応を誘発する活性化合物、又は医薬品の量を意味する。

40

【0035】

本明細書に使用される「医薬として許容し得る」という用語は、ヒト、及び獣医学的使用の両方を包含し：例えば、「医薬として許容し得る」という用語は、獣医学的に許容し得る化合物、又はヒト医薬、及び保健医療において許容し得る化合物を包含する。

40

【0036】

(ギランバレー症候群 (GBS))

別名は、ランドリーギランバレー症候群であり、急性特発性の多発性神経炎、感染性多発性神経炎、又は急性炎症性多発神経障害である。

【0037】

ギランバレー症候群は、体の防御（免疫）系が誤って神経系の一部を攻撃するときに生じる重篤な障害である。これは、神経炎症を引き起こして、筋肉脱力を生じさせ、更に悪化し続ける。

【0038】

ギランバレー症候群は、自己免疫疾患である。ギランバレー症候群の正確な原因は、未

50

知である。本症候群は、任意の年齢にて生じるが、最も一般的には年齢30～50の間の男女両方の人々において生じる。それは、軽微な感染、通常呼吸器（肺）感染、又は胃腸（腸）感染の後であることが多い。通常、本来の感染の徴候は、ギランバレーの症候が始まる前に消滅してしまう。ギランバレー症候群は、神経の一部に損傷を与える炎症を生じる。この神経損傷は、刺痛、筋肉脱力、及び麻痺を生じさせる。炎症は、通常神経の被覆（髓鞘）に影響を及ぼす。このような損傷は、脱髓と呼ばれる。脱髓は、神経シグナリングを阻らせる。神経のその他の部分に対する損傷は、神経の作用の停止を引き起こし得る。

【0039】

ギランバレーの症候は、非常に迅速に悪化する。最も重篤な症候に達するのに、ほんの数時間だけがかかる。筋肉脱力、又は筋肉機能の喪失（麻痺）は、体の両側に影響を及ぼす。筋肉脱力が脚で開始する場合、次いで腕に広がり、これは、上行性麻痺を呼ばれる。

10

【0040】

患者は、刺痛、足痛、又は手痛、及びぎこちなさに気がつくであろう。筋肉機能の喪失が悪化するにつれ、患者は、呼吸補助を必要とするであろう。

【0041】

ギランバレーのための治療法はない。しかし、多くの治療を、症候を低減させ、合併症を治療し、及び回復の速度を上げるのを補助するために利用することができる。症候が重篤であるときは、患者は、呼吸の助け、治療、及び理学療法のために病院に行く必要があるだろう。人の血液を除去して、それを静脈内補液と置き換え、又は抗体を含まない血液を提供するために、血漿泳動（plasmaphoresis）と呼ばれる方法が使用される。高投与免疫グロブリン療法は、ギランバレー症候の重症度、及び期間を低減させるために使用される別 の方法である。その他の治療は、合併症の予防に向けられる。

20

【0042】

（慢性炎症性脱髓性（demyelinizing）多発神経根筋障害（CIDP））

GBSに似ているが、慢性経過によって特徴づけられる疾患は、慢性炎症性脱髓性多発神経根筋障害（CIDP）と呼ばれる。CIDPについて一般に適用できる定義は、GBSとは対照的に、進行期が4週より長く、たいてい6月より長く持続すること、及び欠陥が患者に残ったままであることが多いことという観察を除いて、未だない。GBS、及びCIDPを伴った重篤な不全麻痺を生じさせるメカニズムは、おそらくTリンパ球によって媒介される免疫反応、及び炎症、これに続く末梢ニューロンの脱髓を含む。この仮説は、GBS患者の血清、及び脳脊髄液で観察される補体化合物、及びサイトカインの量の増加によって確認される。脱髓の過程は、特に神経根の領域において、現在、神経伝導遮断の発症の決定的なメカニズムと考えられている。1つの理論は、疾患の発症における比較的初期の重要な段階としての、血液/脳脊髄液（CSF）バリアの障害に基づく。別の理論では、疾患の結果として血液/CSFバリアにおいて発生するその漏出を求め、かつCSFにおけるタンパク質含有量の増加を生じさせる。任意の割合にて、非特異的血清成分は、免疫系に直接関連することなく、血液からCSFに浸透し、ニューロン、又はグリアの機能障害を生じさせ、及び/又はニューロン活性を修飾し得る。代わりのメカニズムは、CSFの流速の低減であり、これによりCSFのタンパク質含有量の増加を説明し得る。この解釈には、血液/CSFバリアの障害、又は選択性の修飾を必要としない。言及した全ての効果は、GBS、及びCIDPの経過のために重要であり得るが、症候へのこれらの実際の貢献は、いまだ明らかにされていない。CSFにおけるタンパク質濃度の増加と特異的な電気生理学的知見、又は病像との間の関連を確立することはできていない。電位依存的ナトリウムチャネルと相互作用する、GBS患者、及び多発性硬化症患者のCSFの因子が最近記述された（Wuzらの文献、1995、Muscle and Nerve 18,772-781）。Brinkmeierの文献（Brinkmeierらの文献、1996、Muscle and Nerve 19,54-62）は、因子が3kDa未満の、及びよりストリンジェントな試験条件下では1kDa分子量を有することを報告する。この観察、及びプロテアーゼとのCSFのインキュベーション後でさえも因子の活性が実質的に低減しなかったという事実に基づいて、著者らは、因子が抗体でもサイトカインでもないと結論した。

30

【0043】

40

50

(多発性硬化症 (MS))

多発性硬化症は、中枢神経系（脳、及び脊髄）に影響を及ぼす自己免疫性疾患である。多発性硬化症は、通常男性以上に女性に発症する。本障害は、最も一般的には、20～40歳の間に始まるが、任意の年齢にて襲い得る。正確な原因は、知られていないが、MSは、神経細胞を囲む髓鞘に対する損傷によって生じると考えられる。それは、進行性疾患であり、損傷が時間とともに更に悪化することを意味する。炎症は、ミエリンを破壊して、複数の瘢痕組織の領域が残る（硬化症）。体の自身の免疫細胞が神経系を襲うときに、炎症が生じる。炎症が、神経活動電位を遅らせて、又は遮断するようになり、MSの症候を引き起こす。炎症の繰り返される発症、又は突然の再発が、脳、及び脊髄の任意の領域に沿って生じ得る。それぞれの発作の位置、及び程度が変化するので、症候も変化する。通常、数日、数週、又は数月持続する症状発現は、症候の回数の低減、又は症候なし（緩解）と交互に現れる。再発（再燃）は、一般的であるが、緩解の期間を伴わないノンストップの進行も生じ得る。

10

【0044】

何が発作をトリガーするのか、明らかではない。MSである患者は、典型的には、健康な人よりも高い免疫細胞数を有し、免疫応答が役割を担っているかもしれないことを示唆する。最も一般的な理論では、ウイルス、若しくは遺伝子欠損、又は両方の組み合わせを指摘する。また、疾患に対する遺伝的な関連があるようにもみえる。MSは、北ヨーロッパ、北米、南オーストラリア、及びニュージーランドにおいてその他の領域よりも生じる可能性が高い。地理的研究は、環境要因が関与するであろうことを示す。MSの家族歴がある人々、及びMSに関してより高い発生率の地理的領域に住む人々は、より高い疾患のリスクを有する。

20

【0045】

現時点では、多発性硬化症のための治療法は知られていない。しかし、疾患を遅らせるであろう多数の療法がある。治療の目標は、症候を制御すること、及び通常の生活の質を維持することである。

【発明の開示】

【0046】

(発明の要旨)

本発明は、グルタミニルシクラーゼに関連したタンパク質のファミリーの新規メンバーを構成するグルタミニルシクラーゼ活性をもつタンパク質を提供し、全長タンパク質、選択的スプライス形態、サブユニット、及び突然変異体、並びに前述のものをコードするスクレオチド配列を含む。また、本発明は、上記タンパク質の基質、相互作用タンパク質、アゴニスト、アンタゴニスト、又は阻害剤をスクリーニングする方法を、並びに更に、タンパク質、及び／又は突然変異体を含む医薬組成物、その誘導体、及び／又は類似体、及び／又はそれに対するリガンドを提供する。

30

【0047】

グルタミニルシクラーゼ（配列番号1の核酸配列、配列番号10のタンパク質配列）に対して有意な配列類似性を有するこれらの新規タンパク質は、ヒト（更に、ヒトisoQCとも命名した）（GenBankアクセッション番号NM_017659）、マウス（GenBankアクセッション番号NM_027455）、カニクイザル（*Macaca fascicularis*）（GenBankアクセッション番号AB168255）、アカゲザル（*Macaca mulatta*）（GenBankアクセッション番号XM_001110995）、ネコ（GenBankアクセッション番号XM_541552）、ラット（GenBankアクセッション番号XM_001066591）、ウシ（GenBankアクセッション番号BT026254）由来のタンパク質（QPCTL）、又は少なくとも50%/75%の配列同一性/類似性、好ましくは70%/85%の配列同一性/類似性、最も好ましくは90%/95%の配列同一性/類似性を有するこれらの類似体である。

40

【0048】

タンパク質配列は、配列番号：11～18に示してある。更なる開示は、これらのタンパク質をコードする核酸配列である（配列番号：2～9）。表1は、新規タンパク質と公知のグルタミニルシクラーゼとの間の類似性を例示する。表2は、新規タンパク質と公知のグル

50

タミニルシクラーゼとの間の同一性を例示する。

【表1】

表1：グルタミニルシクラーゼと新規グルタミニル-ペプチドシクロトランスフェラーゼ様タンパク質のタンパク質配列の類似性

QPCTL 供与源	ヒトisoQC (配列番号11)	ヒトQC (配列番号10)
ヒトisoQC (配列番号11)	-	71.98%
カニクイザル (配列番号13)	99.48%	72.24%
アカゲザル (配列番号14)	99.48%	72.24%
イヌ (配列番号15)	95.82%	72.31%
ラット (配列番号16)	95.30%	70.77%
マウス (配列番号17)	95.04%	70.77%
ウシ (配列番号18)	96.08%	72.31%

【表2】

表2：グルタミニルシクラーゼと新規グルタミニル-ペプチドシクロトランスフェラーゼ様タンパク質のタンパク質配列の同一性

QPCTL 供与源	ヒトisoQC (配列番号11)	ヒトQC (配列番号10)
ヒトisoQC (配列番号11)	-	45.24%
カニクイザル (配列番号13)	98.17%	44.99%
アカゲザル (配列番号14)	98.17%	44.99%
イヌ (配列番号15)	88.51%	45.13%
ラット (配列番号16)	84.33%	45.38%
マウス (配列番号17)	84.07%	44.62%
ウシ (配列番号18)	84.60%	45.64%

【0049】

異なる供与源からのQPCTLの間には、95～99%の高類似性、及び84～98%の高同一性がある（図2を参照されたい）。ヒト及びマウスグルタミニルシクラーゼとの配列類似性に基づくと（図1を参照されたい）、これらのQPCTLが酵素としての役割を含むが、限定されない、機能を有するであろうと予測された。クローニング、発現、生化学的、及び分子特性

10

20

30

40

50

付けにより、この仮説が確認された。

【0050】

脳、前立腺、及び肺組織におけるQPCTLの発現パターンは、下記に記述した疾患における役割と一致する。グルタミニルシクラーゼとしての酵素活性は、QPCTLを活性化又は阻害する分子が後述するように多数の治療的な適用を有するであろうことを証明する。

【0051】

本明細書に記述したQPCTL活性、及びこれらの発現パターンは、ホルモン、ペプチド、及びケモカインのような生化学的メディエーターの酵素修飾を介した免疫系、及び神経内分泌系の生理学的制御因子としてこれらの機能的な役割と適合し得る。阻害剤の使用に基づいてQCに関して前述した多数の機能は、一部は、その作用によるものであろうし、及びQPCTLのような同様のタンパク質のものであろう。従って、QCの、QPCTLの、及びその他の関連した酵素の選択的かつ強力な阻害剤の発見は、これらの、及び任意の新たに同定されたグルタミニル-ペプチドシクロトランスフェラーゼ、並びにこのようなタンパク質の機能(群)を修飾するその他の活性化合物の有効かつ安全な薬学的使用を達成するために、中心的であることが考えられる。

10

【0052】

従って、本発明は、新規タンパク質、又はポリペプチド、従ってコードする核酸、これらのタンパク質を発現するように核酸で修飾された細胞、これらのタンパク質に対する抗体、これらのタンパク質の活性の阻害剤である新たな治療薬の発見のためのスクリーニング法(、又はQCの阻害剤であり、及びタンパク質の阻害剤でない)、及びこのようなスクリーニング法によって発見された治療薬を提供する。新規タンパク質、及び従ってコードする核酸は、例えば神経変性、生殖性、炎症性、及び代謝性の障害などの特定の疾患の治療のための新たな治療薬を発見するために、並びに更に、治療的、又は診断的価値を持つ抗体の製造に使用することができる。

20

【0053】

本発明の一つの態様に従って、好ましくはヒト起源の、新規の、成熟した、生物学的に活性なタンパク質が提供される。このようなタンパク質は、標準的な技術によって適切な動物(ヒトを含む)組織、又は体液から少量で単離されるかもしれないが；しかし、より大量には、タンパク質を発現するように遺伝子改変された細胞の培養においてより都合よく製造される。

30

【0054】

本発明の別の態様に従って、mRNA、DNA、cDNA、そのゲノムDNAを含む本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0055】

本発明の更なる態様に従って、本発明の核酸配列に特異的にハイブリダイズするために十分な長さの核酸分子を含む核酸プローブも提供される。

【0056】

本発明のなお更なる態様に従って、インピトロでの科学的研究、例えばDNAの合成、及びDNAベクターの製造のために有用なこのようなポリペプチドを产生するための、組換え技術を利用する方法が提供される。このようなポリペプチドを产生するための方法は、このようなポリペプチド及び/又は成熟タンパク質をコードする核酸配列を含むDNAベクターがトランスフェクトされた組換え原核生物及び/又は真核生物の宿主細胞を、このようなタンパク質の発現を促進する条件下で培養すること、並びにその後のこののようなタンパク質、又は発現された産物の断片の回収を含む。

40

【0057】

更にもう一つ態様に従って、本発明は、疾患治療のためにQPCTLポリペプチド、及びポリヌクレオチドを使用するための方法を提供する。

【0058】

本発明の更に別の態様に従って、成熟タンパク質の生物活性、例えばQC活性、又はEC活性を阻害する化合物の発見のために、このようなポリペプチド、又はこのようなポリペプ

50

チドをコードするポリヌクレオチドを利用するための方法が提供され、従って、このような阻害剤も提供される。

【0059】

より具体的な態様に従って、本発明は、(a)配列番号：11～18から選択されるQPCTLポリペプチドをコードする、若しくは(b)それに対して少なくとも約75%類似し、かつ同じ生物学的機能を示すアミノ酸配列を有するか、又は配列番号：2～9の1つの選択的スライスバリエントであるか、又は前記(a)若しくは(b)をコードする核酸からの少なくとも14個の隣接するヌクレオチドを含むプローブであるか、又は前述のいずれか一つに対して相補的である、単離された核酸を提供する。

【0060】

別の具体的な態様に従って、本発明は、(a)配列番号：10～18のいずれか1つに記載された成熟タンパク質の；好ましくは配列番号：11～18のいずれか1つに記載された成熟タンパク質のアミノ酸配列を有するか、(b)(a)の成熟タンパク質の1つに対して少なくとも約75%の類似性を有し、かつ同じ生物学的機能を示す成熟タンパク質のアミノ酸配列を有するか；(c)配列番号：10～18のいずれか1つに記載された成熟タンパク質；好ましくは配列番号：11～18のいずれか1つに記載された成熟タンパク質と少なくとも約50%の同一性を有する成熟タンパク質のアミノ酸配列を有するか、又は(d)(a)の免疫学的に反応性の断片である、任意にグリコシル化されていてもよいポリペプチドを提供する。

【0061】

更にもう一つ具体的な態様に従って、本発明は、好ましくは配列番号：11～18のタンパク質から選択される、本発明に従った少なくとも1つの成熟タンパク質の酵素活性を阻害することができる化合物をスクリーニングする方法であって、前記成熟タンパク質、及び前記成熟タンパク質のための適切な基質を、1つ以上の試験化合物、又はその塩の存在下においてインキュベートすること、前記成熟タンパク質の酵素活性を測定すること、前記活性を試験化合物の非存在下で決定したのに相当する活性を比較すること、及び酵素活性を低減させる試験化合物、又は化合物を選択することを含む、前記方法を提供する。

【0062】

更に、本発明は、QC-阻害剤、選択的QC-阻害剤、又は選択的QPCTL-阻害剤を使用する能力に基づいた、診断キット、及び方法に属する。

【0063】

本発明のこれらの、及びその他の態様は、以下の詳細な説明から当業者に明らかであるはずである。

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】ヒトQC(hQC)、ヒトisoQC(hisoQC)、マウスQC(mQC)、及びマウスisoQC(misoQC)の配列整列を示す。複数の配列整列を、PBIL(Pole Bioinformatique Lyonnais)(<http://npsa-pbil.ibcp.fr>)にてClustalWをデフォルト設定で使用して行った。亜鉛イオン結合残基の保存を、ヒトQC(hQC; GenBank X71125、配列番号：10)、ヒトisoQC(hisoQC; GenBank NM_017659、配列番号：11)、マウスQC(mQC; GenBank NM_027455、配列番号：79)、及びマウスisoQC(misoQC; GenBank BC058181、配列番号：17)について太字体で、かつ下線を引いて示してある。

【図2】ヒト(hisoQC; GenBank NM_017659、配列番号：11)、カニクイザル(Macaca fascicularis)(M_fascicularis; GenBank AB168255、配列番号：13)、アカゲザル(Macaca mulatta)(M_mulatta; GenBank XM_001110995、配列番号：14)、イヌ(Canis familiaris)(C_familiaris; GenBank XM_541552、配列番号：15)、ラット(Rattus norvegicus)(R_norvegicus; GenBank XM_001066591、配列番号：16)、マウス(Mus musculus)(M_musculus; GenBank BC058181、配列番号：17)、及びウシ(Bos taurus)(B_taurus; GenBank BT026254、配列番号：18)由来isoQCの配列整列を示す。複数の配列整列を、PBIL(Pole Bioinformatique Lyonnais)(<http://npsa-pbil.ibcp.fr>)にてClustalWをデフォルト設定で使用して行った。保存された亜鉛イオン結合残基のアミノ酸には、下

10

20

30

40

50

線を引いてあり、かつ太字体でタイプしてある。

【図3】ヒトQC(hQC、配列番号：10)、及びヒトisoQC(hisoQC、配列番号：12)、及び他の金属ペプチダーゼClan MHのM28ファミリーメンバーの配列整列を示す。複数の配列整列は、ch.EMBnet.orgにてClustalWを使用してデフォルト設定で行った。ヒトQC(hQC；Swiss-Prot Q16769、配列番号：10)内の単一の亜鉛イオンを結合するアミノ酸残基の保存をヒトisoQC(isoQC；Swiss-Prot Q53HE4、配列番号：12)(残基19-382)、ストレプトマイセス・グリセウス(Streptomyces griseus)由来のZn依存的アミノペプチダーゼ(SGAP；Swiss-Prot P80561、配列番号：80)、及びビブリオ・プロテオリチカス(Vibrio proteolyticus)由来の成熟Zn依存的ロイシル-アミノペプチダーゼ(VpAP；Swiss-Prot Q01693、配列番号：81)について示してある。それぞれのアミノ酸残基には、下線を引いてあり、かつ太字体でタイプしてある。

【図4】ヒトQC(hQC、配列番号：10)、及びヒトisoQC(hisoQC、配列番号：11)の配列整列を示し、2つの推定上の翻訳開始を示す(メチオニンI-太字体、下線を引いた；メチオニンII-太字体)。複数の配列整列を、PBIL(Pole Bioinformatique Lyonnais)http://npsa-pbil.ibcp.frにてClustalWを使用してデフォルト設定で行った。ヒトisoQCに存在する膜貫通ドメインは、黒いバーによって示してある。

【図5】メチオニンII(太字体)で開始するヒトQC(hQC、配列番号：10)、及びヒトisoQC(hisoQC配列番号：12)の配列整列を示す。複数の配列整列を、ch.EMBnet.orgにてClustalWを使用してデフォルト設定で行った。金属結合に関与するアミノ酸には、下線を引いてあり、かつ太字体でタイプしてある。ヒトisoQCに存在する膜貫通ドメインは、黒いバーによって示してある。

【図6】RT-PCRによるisoQC発現の解析を示す。SH-SY5Y、LN405、HaCaT、及びHep-G2における検出。レーン：bp、DNA標準；1、SH-SY5YからのヒトisoQCの増幅されたPCR産物；2、LN405からのヒトisoQCの増幅されたPCR産物；3、HaCaTからのヒトisoQCの増幅されたPCR産物；4、Hep-G2からのヒトisoQCの増幅されたPCR産物。

【図7】免疫組織化学によるisoQC(Met I、配列番号：11)細胞下局在の解析を示す。メチオニンIにて開始するヒトisoQC(図5を参照されたい)は、LN 405においてEGFPとの融合タンパク質(isoQC(MetI)-EGFP)として発現した。マンノシダーゼII対比染色は、AB3712(Chemicon)を使用して行った。マージは、isoQC(MetI)-EGFP、及びマンノシダーゼII染色のオーバレイを表す。

【図8】免疫組織化学によるisoQC(Met I、配列番号：11)細胞下局在の解析を示す。メチオニンIにて開始するヒトisoQCは、LN 405においてEGFPとの融合タンパク質(isoQC(MetI)-EGFP)として発現した。ミトコンドリアの対比染色は、MAB1273(Chemicon)を使用して行った。マージは、isoQC(MetI)-EGFP、及びミトコンドリアの染色のオーバレイを表す。

【図9】免疫組織化学によるisoQC(Met II、配列番号：12)細胞下局在の解析を示す。メチオニンIIにて開始するヒトisoQCは、LN 405においてEGFPとの融合タンパク質(isoQC(MetII)-EGFP)として発現した。マンノシダーゼII対比染色は、AB3712(Chemicon)を使用して行った。マージは、isoQC(MetII)-EGFP、及びマンノシダーゼII染色のオーバレイを表す。

【図10】免疫組織化学によるisoQC(Met II、配列番号：12)細胞下局在の解析を示す。メチオニンIIにて開始するヒトisoQCは、LN 405においてEGFPとの融合タンパク質(isoQC(MetII)-EGFP)として発現した。ミトコンドリアの対比染色は、MAB1273(Chemicon)を使用して行った。マージは、isoQC(MetII)-EGFP、及びミトコンドリアの染色のオーバレイを表す。

【図11】免疫組織化学によるisoQC(Met I、配列番号：11)細胞下局在の解析を示す。メチオニンIにて開始するヒトisoQCは、COS-7においてEGFPとの融合タンパク質(isoQC(MetI)-EGFP)として発現した。マンノシダーゼII対比染色は、AB3712(Chemicon)を使用して行った。マージは、isoQC(MetI)-EGFP、及びマンノシダーゼII染色のオーバレイを表す。

10

20

30

40

50

【図12】免疫組織化学によるisoQC (Met I、配列番号：11) 細胞下局在の解析を示す。メチオニンIにて開始するヒトisoQCは、COS-7においてEGFPとの融合タンパク質 (isoQC (MetI) EGFP) として発現した。ミトコンドリアの対比染色は、MAB1273 (Chemicon) を使用して行った。マージは、isoQC (MetI)-EGFP、及びミトコンドリアの染色のオーバーレイを表す。

【図13】免疫組織化学によるisoQC (Met II、配列番号：12) 細胞下局在の解析を示す。メチオニンIIにて開始するヒトisoQCは、COS-7においてEGFPとの融合タンパク質 (isoQC (MetII) EGFP) として発現した。マンノシダーゼII対比染色は、AB3712 (Chemicon) を使用して行った。マージは、isoQC (MetII)-EGFP、及びマンノシダーゼII染色のオーバーレイを表す。

10

【図14】免疫組織化学によるisoQC (Met II、配列番号：12) 細胞下局在の解析を示す。メチオニンIIにて開始するヒトisoQCは、COS-7においてEGFPとの融合タンパク質 (isoQC (MetII) EGFP) として発現した。ミトコンドリアの対比染色は、MAB1273 (Chemicon) を使用して行った。マージは、isoQC (MetII)-EGFP、及びミトコンドリアの染色のオーバーレイを表す。

【図15】阻害剤P150/03による、ヒトisoQCで触媒されるH-Gln-AMCのpGlu-AMCへの変換の阻害を示す。データは、直線的競合阻害を考慮するミカエリス-メンテン反応速度論モデルに従って評価した。阻害剤濃度は、以下の通りであった：

【表3】

20

▽	0 μM
▲	0.3125 μM
△	0.625 μM
■	1.25 μM
□	2.5 μM
●	5 μM

30

決定された K_i -値は、 $240 \pm 8 \text{nM}$ であった。

【図16】分光光度アッセイを使用して決定される、ヒトisoQCで触媒されるH-Gln-Ala-OHのpGlu-Ala-OHへの変換を示す。データは、ミハエリス メンテン型反応速度論に従って評価した。動力学的パラメーターは、それぞれ K_m 、及び V_{max} 値について、 $324 \pm 28 \mu\text{M}$ 、及び $7.4 \pm 0.2 \text{nM/分}$ であった。

【図17】酵母P. pastoris (P. pastoris)において異種発現されたヒトisoQCタンパク質構築物の概略図を提供する。2つの突然変異を一部のタンパク質に導入して、位置55 (I 55N) にグリコシル化部位、及び位置351 (C351A) に変異されたシステイン残基を生じさせた。発現のために、膜貫通ドメインを含むN末端を酵母 (YSS) の分泌シグナルに置き換えた。N末端分泌シグナルを含む構築物は、培地に効率的に分泌されるはずである。

40

【図18】発現する酵母細胞の培地において決定したQC活性を示す。膜貫通ドメインのため、天然の構築物は、培地に分泌されなかった (実行されていない)。グリコシル化 (I 55N) に起因して、タンパク質は、最も効率的に分泌される。突然変異C351Aは、培地においてより高いQC活性の検出を生じた。構築物は、図17に記述してある。

【図19】トランスジェニックP. pastoris (P. pastoris) 株の培地からの、構築物YSS hisoQC155NC351A C-Hisに基づいた、ヒトisoQCの精製を示す。QCは、IMAC (固定された金属アフィニティクロマトグラフィー、レーン3)、HIC (疎水性相互作用クロマトグラフィー、レーン4)、及び脱塩 (レーン5) の組み合わせによって精製した。酵素のグリコシル化は、タンパク質 (レーン6) の移動の変化を生じる酵素的脱グリコシルによって証明された。レーン1、タンパク質標準：レーン2、精製前の培地。

50

【図20】形質転換された大腸菌 (E. coli) の細胞ホモジネートからの、構築物GST-his oQC C-Hisに基づいた、ヒトisoQCの精製を示す。isoQCは、IMAC (固定された金属アフィニティクロマトグラフィー、レーン3、)、GST-親和性 (レーン4)、脱塩 (レーン5) 及びイオン交換クロマトグラフィー (レーン6) の組み合わせによって精製した。レーン1、タンパク質標準 : レーン2、精製前の細胞ホモジネート。酵母、及び大腸菌 (E. coli) において発現されたhisoQC間の分子量の相違は、N末端GST-タグ融合によって生じる。発現された構築物を図の上部に模式的に提供してある。

【図21】ヒトisoQC (YSShisoQC155NC351A C-His ; 図17を比較)、GST-hisoQC、及びヒトQCによるジペプチド-代用薬、ジペプチド、及びオリゴペプチドの変換のための、特異性定数を示す。GST-hisoQCの特異性は、最も低く、YSShisoQC155NC351A C-Hisが続いた。最高の特異性は、ヒトQCを示し、より高い全体の酵素活性を示している。

【図22】酵母において発現されたヒトisoQC (hisoQC)、及びヒトQC (hQC) で調査した触媒作用のpH-依存を示す。両タンパク質は、pH 7~8の間に最適pHを示す。適合曲線は、1つがpHにて酸性pHにて、2つが塩基性pHにて触媒作用に影響する、3つの解離基に基づく。

【図23】アミロイド- 関連ペプチドA (3-11) のN末端に存在するグルタミン酸の変換の解析を示す。解析は、Mass-Tof質量分析法を使用して行い、基質、及び生成物は、放出された水の質量である約18Daだけ単一の炭化分子のそれらの分子量/電荷比が異なる。両方の場合において、同じタンパク質濃度が試料に存在し、ヒトisoQCがN末端のグルタミン酸も変換することを明らかに示唆していたが、ヒトQCよりも遅かった。

【図24】リアルタイムPCR使用して解析したマウスQC (mQC、配列番号 : 79)、及びそのアイソザイムmisoQC (配列番号 : 17) の組織分布を示す。両酵素は、試験した器官において発現される。しかし、mQCの発現レベルは、末梢器官と比較して脳においてより高かった。対照的に、misoQCは、より類似したレベルで全ての試験した器官、及び組織において発現され、遍在性の「ハウスキーピング」タンパク質を示している。

【図25】金属-キレート化化合物1,10-フェナントロリン (丸)、及びEDTA (四角) によるヒトisoQC (hisoQC) の時間依存的阻害を示す。残留するhisoQC活性は、30 分間にそれぞれの試薬と共にhisoQCの添加 (黒い記号)、又はブレインキュベーション (白い記号) の後に、直接決定した。

【図26】HEK293細胞における、pcDNA、及び天然酵素hisoQC (Met I、配列番号 : 11)、hisoQC (Met II、配列番号 : 12)、及びhQC、(配列番号 : 10) の発現の後の、QC活性の細胞下局在の生化学的解析を示す。(A) $\mu\text{mol}/\text{分}/\text{g}$ での細胞分画内の比活性。(B) nM/分での絶対活性。(C) ベクターをトランスフェクトした対照 (pcDNA) と比較した、HEK293における、C末端FLAG-タグを有するh-isoQC (Met I、配列番号 : 11)、h-isoQC (Met II、配列番号 : 12)、及びhQC (配列番号 : 10) の発現、続くFLAG-エピトープ (抗-DYKDDDDK-抗体、Cell Signaling)、ヒトミトコンドリアの65kDaタンパク質 (抗ヒトミトコンドリア、Chemicon)、又はヒトシアル酸転移酵素ST1GAL3 (Abnova) のいずれかを検出する特異的抗体を適用するウエスタンプロット解析。

【図27】EGFP (1、4) に融合されたヒトisoQC (hisoQC) シグナル配列 (27A) メチオニンI-セリン53、及び (27B) メチオニンII-セリン53の細胞下局在を示す。ゴルジ複合体は、抗マンノシダーゼII抗体 (2) を使用して染色され、ミトコンドリアは、ヒトミトコンドリアの65kDaタンパク質を検出する抗体 (5) を使用して染色した。共局在性は、EGFP蛍光、及びRed X蛍光 (3、6) の重ね合せによって示している。

【図28】ヒトグリコシルトランスフェラーゼの公開された配列 : -N-アセチルガラクトサミニド -2,6-シアリルトランスフェラーゼ1 (ST6GalNAc1 ; E.C. 2.4.99.3) ; -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ1 (b4Gal-T1、E.C. 2.4.1.-) ; ガラクトシド3(4)-L-フコシル基転移酵素 (FucT-III ; E.C. 2.4.1.65)、及び糖タンパク質-フコシルガラクトシド- -N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ (NAGAT、E.C.2.4.1.40) との比較において、ヒトisoQC (hisoQC)、及びマウスisoQC (misoQC) のドメイン構造を示す。列の下に収載されたとおりのアミノ酸の数。サイトゾル部分には、陰影をつけてあり

10

20

30

40

50

、膜貫通ヘリックスは、黒であり、かつ管腔部分は、白で図示してある。

【図29】異なる癌腫株化細胞におけるヒトisoQC (QPCTL) mRNAの定量化を示す。QPCTL発現は、50ngの総RNAに対して規準化した。ボックスの中の黒いバーは、それぞれの中央値を表す。

【図30】異なるメラノーマ株化細胞におけるヒトisoQC (QPCTL) mRNA発現の定量化を示す。QPCTL発現は、50ngの総RNAに対して規準化した。

【図31】異なる患者からの軟部組織癌腫、胃癌腫、及び甲状腺癌腫由来試料におけるヒトisoQC (QPCTL) mRNA発現の定量化を示す。QPCTL発現は、50ngの総RNAに対して規準化した。ボックスの中の黒いバーは、それぞれの中央値を表す。

【図32】これらの分化段階に対する異なる胃癌腫におけるヒトisoQC (QPCTL) mRNA発現を示す。QPCTL発現は、50ngの総RNAに対して規準化した。ボックスの中の黒いバーは、それぞれの中央値を表す。

【図33】異なる甲状腺癌腫におけるヒトQC (QPCT) mRNA発現の比較を示す。QPCT発現は、50ngの総RNAに対して規準化した。ボックスの中の黒いバーは、それぞれの中央値を表す。（FTC：濾胞性甲状腺癌腫；PTC：乳頭甲状腺癌腫；UTC：未分化甲状腺癌腫）。

【図34】異なる甲状腺癌腫におけるヒトisoQC (QPCTL) mRNA発現の比較を示す。QPCTL発現は、50ngの総RNAに対して規準化した。ボックスの中の黒いバーは、それぞれの中央値を表す。（FTC：濾胞性甲状腺癌腫；PTC：乳頭甲状腺癌腫；UTC：未分化甲状腺癌腫）。

【図35】HEK293細胞におけるヒトQC (QPCT)、ヒトisoQC (QPCTL)、及びCCL2のmRNA発現に対する異なる刺激の影響を示す。転写物の量は、刺激をしていない基礎発現に相対的に示してある。使用した刺激の濃度をx軸図面上に示してある。

【図36】FTC-133細胞におけるヒトQC (QPCT)、ヒトisoQC (QPCTL)、及びCCL2のmRNA発現に対する異なる刺激の影響を示す。転写物の量は、刺激をしていない基礎発現に相対的に示してある。使用した刺激の濃度をx軸図面上に示してある。

【図37】THP-1細胞におけるヒトQC (QPCT)、ヒトisoQC (QPCTL)、及びCCL2のmRNA発現に対する異なる刺激の影響を示す。転写物の量は、刺激をしていない基礎発現に相対的に示してある。使用した刺激の濃度をx軸図面上に示してある。

【図38】THP-1細胞におけるヒトQC (QPCT)、CCL2、CCL7、CCL8、及びCCL13のmRNA発現に対する異なる刺激の影響を示す。転写物の量は、刺激をしていない基礎発現に相対的に示してある。使用した刺激の濃度をx軸図面上に示してある。

【図39】HEK293 (A)、FTC-133 (b)、及びTHP-1 (C)におけるヒトQC (QPCT)、ヒトisoQC (QPCTL)、及びHIF1 のmRNAレベルに対する低酸素の影響を示す。

【0065】

10

20

30

【表4】

配列の一覧

配列番号	説明	
1	ヒトQC、核酸	10
2	ヒトisoQC Met I、核酸	
3	ヒトisoQC Met II、核酸	
4	カニクイザルQPCTL、核酸	
5	アカゲザルQPCTL、核酸	
6	イヌ(<i>Canis familiaris</i>) QPCTL、核酸	
7	ラットQPCTL、核酸	
8	マウスQPCTL、核酸	
9	ウシQPCTL、核酸	
10	ヒトQC、タンパク質	20
11	ヒトisoQC Met I、タンパク質	
12	ヒトisoQC Met II、タンパク質	
13	カニクイザルQPCTL、タンパク質	
14	アカゲザルQPCTL、タンパク質	
15	イヌ(<i>Canis familiaris</i>) QPCTL、タンパク質	
16	ラットQPCTL、タンパク質	
17	マウスQPCTL、タンパク質	30
18	ウシQPCTL、タンパク質	
19	ヒトisoQCスプライス形態1、核酸	
20	ヒトisoQCスプライス形態2、核酸	
21	ヒトisoQCスプライス形態1、タンパク質	
22	ヒトisoQCスプライス形態2、タンパク質	
23	アミロイド β ペプチド(A β)(1-42)	
24	A β (1-40)	40
25	A β (3-42)	
26	A β (3-40)	
27	A β (11-42)	
28	A β (11-40)	

29	pGlu ³ - A β (3-42)	
30	pGlu ³ - A β (3-40)	
31	pGlu ³ - A β (11-42)	
32	pGlu ³ - A β (11-40)	
33	ABri	10
34	ADan	
35	ガストリン17	
36	ガストリン34	
37	pGlu-Abri	
38	pGlu-ADan	
39	pGlu-ガストリン17	
40	pGlu-ガストリン34	
41	ニューロテンシン	20
42	GnRH	
43	CCL16	
44	CCL8	
45	CCL2	
46	CCL18	
47	フラクタルキン	
48	CCL7	
49	オレキシンA	30
50	サブスタンスP	
51	QYNAD	
52	pGlu-YNAD	
53	株化細胞をスクリーニングするために使用したヒトisoQCフォワードプライマー	
54	株化細胞をスクリーニングするために使用したヒトisoQCリバースプライマー	
55	ヒトisoQCの単離のために使用したフォワードプライマー	40
56	ヒトisoQCの単離のために使用したリバースプライマー	
57	ヒトisoQC (アイソフォームMet I) をベクター-pEGFP-N3内にクローニングするために使用したフォワードプライマー	
58	ヒトisoQC (アイソフォームMet II) をベクター-pEGFP-N3内にクローニングするために使用したフォワードプライマー	

59	ヒトisoQC (アイソフォームMet I及びMet II) をベクターpEGFP-N3内にクローニングするために使用したリバースプライマー
60	ヒトisoQCをベクターpET41a内にクローニングするために使用したフォワードプライマー
61	ヒトisoQCをベクターpET41a内にクローニングするために使用したリバースプライマー
62	ヒトisoQCをC末端のヒスチジンタグをもつベクターpPICZ α A内にクローニングするためのフォワードプライマー
63	ヒトisoQCをN末端のヒスチジンタグをもつベクターpPICZ α A内にクローニングするためのフォワードプライマー
64	ヒトisoQCをN末端のヒスチジンタグをもつベクターpPICZ α A内にクローニングするためのリバースプライマー
65	isoQCのリアルタイムPCR解析のためのフォワードプライマー
66	ヒトisoQCをC末端のヒスチジンタグをもつベクターpPICZ α A内にクローニングするためのリバースプライマー
67	isoQCのリアルタイムPCR解析のためのリバースプライマー
68	マウスisoQC cDNAのクローニングのためのフォワードプライマー
69	マウスisoQC cDNAのクローニングのためのリバースプライマー
70	マウスisoQC cDNAのクローニングのためのフォワードプライマー
71	マウスQCのリアルタイムPCR解析のためのフォワードプライマー
72	マウスQCのリアルタイムPCR解析のためのリバースプライマー
73	マウスQCのリアルタイムPCR解析のためのフォワードプライマー
74	マウスQCのリアルタイムPCR解析のためのリバースプライマー
75	部位特異的変異誘発hisQC 155Nのためのフォワードプライマー
76	部位特異的変異誘発hisQC 155Nのためのリバースプライマー
77	部位特異的変異誘発hisQC C351Aのためのフォワードプライマー
78	部位特異的変異誘発hisQC C351Aのためのリバースプライマー
79	マウスグルタミニルシクラーゼタンパク質
80	ストレプトマイセス・グリセウス (<i>Streptomyces griseus</i>) SGAP
81	ビブリオ・プロテオリチカス (<i>Vibrio proteolyticus</i>) VpAP
82	pcDNA 3.1への天然のhQCの挿入のためのフォワードプライマー
83	pcDNA 3.1への天然のhQCの挿入のためのリバースプライマー
84	pcDNA 3.1への挿入のための終止コドンを含むhisQCの増幅のためのリバースプライマー
85	増幅EGFPのためのフォワードプライマー

10

20

30

40

86	増幅EGFPのためのリバースプライマー
87	EGFPとの融合のためのhisQC N末端配列の増幅のためのリバースプライマー
88	pcDNA 3.1への挿入のための増幅hQC C-FLAGのためのリバースプライマー
89	pcDNA 3.1への挿入のための増幅hisQC C-FLAGのためのリバースプライマー

【発明を実施するための形態】

10

【0066】

(発明の詳細な説明)

本発明の態様に従って、異なる供与源からのQPCTLの推定されるアミノ酸配列（配列番号：11～18、21、及び22）を有する成熟ポリペプチドをコードする配列番号：2～9、19、及び20の単離された核酸配列（ポリヌクレオチド）が提供される。

【0067】

ヒトからのQPCTLの推定されるアミノ酸配列（配列番号：11、及び12、21、及び22）を有する成熟ポリペプチドをコードする配列番号：2、及び3、19、及び20の単離された核酸配列（ポリヌクレオチド）が、本発明では好ましい。

【0068】

配列番号：11、及び12のヒトQPCTLの推定されるアミノ酸配列を有する成熟ポリペプチドをコードする、配列番号：2、及び3の単離された核酸配列（ポリヌクレオチド）が、本発明ではより好ましい。

20

【0069】

配列番号：21、及び22のヒトQPCTLの選択的スプライス形態の推定されるアミノ酸配列を有する成熟ポリペプチドをコードする配列番号：19、及び20の単離された核酸配列（ポリヌクレオチド）が、本発明では更に好ましい。

【0070】

配列番号：11のヒトQPCTLの推定されるアミノ酸配列を有する成熟ポリペプチドをコードする配列番号：2の単離された核酸配列（ポリヌクレオチド）が、本発明では最も好ましい。

30

【0071】

配列番号：12のヒトQPCTLの推定されるアミノ酸配列を有する成熟ポリペプチドをコードする配列番号：3の単離された核酸配列（ポリヌクレオチド）が、本発明では更に最も好ましい。

【0072】

上述した実施態様、及び優先度は、QPCTL核酸、並びにQPCTLタンパク質、任意の所望の方法、使用、診断、治療、スクリーニング、エフェクター、阻害剤、並びに本発明に従ったその他の使用、及び方法に適用される。

【0073】

本発明のポリヌクレオチドは、鑄型としてヒトQCを適用して、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) にてNucleotide BLASTを使用する類似性検索によって発見された。検索により、領域19q13.32においてコードされる、染色体19上の推定上のQPCTLの発見することとなった。検索に基づいて、ヒトisoQCの株化細胞スクリーニングのためのプライマーをデザインした（表4）。ヒトQPCTLのための単離されたcDNAは、長さが382アミノ酸のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含み、これは、ヒトQCに関連があり、45.24%の配列同一性、及び71.98%の類似性を示す。細胞下局在の予測のために異なる生物情報科学アルゴリズム (www.expasy.ch) を適用することにによっても、信頼できる結果を生じなかった。予測は、予測プログラムに応じて、ゴルジ装置、又はミトコンドリアに移った。

40

50

【 0 0 7 4 】

金属ペプチダーゼClan MHのM28ファミリーメンバーの他のメンバーとのヒトQPCTLのアミノ酸配列の整列では、ヒトQPCTLタンパク質がヒト及びマウスQC（図1）、及び細菌アミノペプチダーゼ（図3）に対して全体の配列相同性、及び構造相同性を有することを示す。更なるヒトQPCTL関連遺伝子についてのデータベース検索では、齧歯類、サル、ウシ、及びイヌQPCTLの存在を明らかにした。新規ヒトQPCTLとのこれらの配列の整列では、これらがそのヒト対応物とかなりの相同性を示すことを示す。ヒトQCの亜鉛-複合体形成残基（Asp-Glu-His）は、異なる起源からのQPCTL内で保存される（図2）。

【 0 0 7 5 】

ヒトisoQC遺伝子は、少なくとも8つのエキソンを含む。ヒトisoQCタンパク質をコードする配列は、エキソン1～7に位置する。ヒトisoQCは、位置19q13.32にて染色体19にマップする。ヒトisoQCについての株化細胞スクリーニングにより、肝臓（Hep-G2、肝臓癌）、皮膚（HaCaT、ケラチノサイト）、及びニューロン組織（LN405、星細胞腫；SH-SY5Y、神経芽細胞腫）からの細胞起源の転写物が明らかになった（図6）。

10

【 0 0 7 6 】

単離されたQPCTL-cDNAを、いくつかの発現宿主における機能発現について試験した。ヒトQCについてうまく適用されたP.パストリス（P. pastoris）における発現は、酵素的に活性なタンパク質を生じなかった。哺乳動物細胞における発現は、活性の検出を生じたが、発現レベルは、非常に低かった。従って、酵素的に活性なタンパク質の単離は、当業者の知識では可能でなかった。酵素的に活性なタンパク質は、非常に例外的な発現条件：1%グルコースの存在における37にて4時間の発現、20 μM IPTGを使用する発現の誘導を適用して、大腸菌（E. coli）におけるGST-QPCTL融合タンパク質の発現を行うことのみによって単離された。本発現条件では、大腸菌（E. coli）において、ペプチド鎖の機能的な折りたたみのために必要である低レベルの発現を生じる。

20

【 0 0 7 7 】

別の実施態様において、本発明は、QPCTLノックアウト動物、好ましくはラット、又はマウスに関する。QPCTL遺伝子の機能の更なる解析におけるノックアウトマウスの使用は、有益なツールとなる。

【 0 0 7 8 】

本発明のポリヌクレオチドは、RNAの形態で、又はDNAの形態であってもよく；DNAには、cDNA、ゲノムDNA、及び合成DNAを含むことが理解されるはずである。DNAは、二本鎖、又は一本鎖であってもよく、一本鎖の場合、コード鎖、又は非コード（アンチセンス）鎖であってもよい。成熟ポリペプチドをコードするコード配列は、配列番号2～9に示されたコード配列と同一であってもよく、又は遺伝暗号、又は一塩基多型の重複、若しくは縮重の結果として、同じ成熟ポリペプチドをコードする異なるコード配列であってもよい。例えば、それは、また、配列番号11～18のいずれか1つの全長を含むRNA転写物であってもよい。

30

【 0 0 7 9 】

配列番号2～9の成熟タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、単独で成熟タンパク質のためのコード配列；成熟ポリペプチドのためのコード配列プラスリーダー配列、若しくは分泌配列、又はプロタンパク質配列などの更なるコード配列；並びに成熟タンパク質のためのコード配列（及び任意に更なるコード配列）プラスイントロン、又は成熟タンパク質のためのコード配列の5'及び/若しくは3'非コード配列などの非コード配列を含んでいてもよいが、限定されない。

40

【 0 0 8 0 】

従って、「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」という用語、又は「ポリペプチドをコードする核酸」という用語は、成熟タンパク質のためのコード配列のみを含むポリヌクレオチド又は核酸、並びに更なるコード配列及び/又は非コード配列を含むものを包含することが理解されるべきである。ポリヌクレオチド、及び核酸という用語は、同義的に使用される。

50

【0081】

また、本発明は、成熟タンパク質のためのコード配列が、ポリヌクレオチドを含む宿主細胞からのポリペプチドの発現、及び分泌を助けるポリヌクレオチド配列に対して同じリーディングフレームで融合されていてもよく；例えば、細胞からポリペプチドの輸送を制御するための分泌配列として機能するリーダー配列をこうして融合してもよい。このようなリーダー配列を有するポリペプチドは、プロタンパク質、又はプレプロタンパクと称し、宿主細胞によって切断されてタンパク質の成熟形態を形成するリーダー配列を有してもよい。これらのポリヌクレオチドは、それが、成熟タンパク質プラスN末端にて更なるアミノ酸残基であるプロタンパク質をコードするように、5'伸長された領域を有してもよい。このようなプロ配列を有する発現産物は、成熟タンパク質の不活性型であるプロタンパク質と称されるが；しかし、一旦プロ配列が切断されたならば、活性な成熟タンパク質が残る。従って、例えば、本発明のポリヌクレオチドは、成熟タンパク質、又はプロ配列を有するタンパク質、若しくはプロ配列及びシグナルペプチド（リーダー配列）両方を有するタンパク質をコードしていてもよい。

10

【0082】

また、本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドの精製のために、マーカー配列に対してインフレームで融合されたコード配列を有してもよい。マーカー配列は、ポリヒスチジンタグ、赤血球凝集素（HA）タグ、c-mycタグ、又はV5タグであってもよく、哺乳類宿主のときは、例えばCOS-1細胞が使用される。

20

【0083】

HAタグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに対応するであろう（Wilson, I. らの文献、Cell, 37 : 767 (1984)）、及びc-mycタグは、ヒトMycタンパク質由来のエピトープであってもよい（Evans, G. I. らの文献、Mol. Cell. Biol. 5 : 3610-3616 (1985)）。

【0084】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチド鎖を產生するのに関与するDNAのセグメントを意味し；これには、コード領域に先行し、及び続く領域（リーダー、及びトレーラ）、並びに個々のコードセグメント（エキソン）間の介在配列（イントロン）を含む。

【0085】

「有意な配列相同性」という用語は、アミノ酸残基の少なくとも25%、好ましくは少なくとも40%が保存されること、及び保存されていない残基のうち、少なくとも40%が保存的置換であることを意味することが意図される。

30

【0086】

本発明の全長遺伝子の断片は、全長cDNAを単離するための、並びに遺伝子に対して有意な配列相同性を有し、かつ同様の生物活性、又は機能を有するタンパク質、又はポリペプチドをコードするであろうその他のcDNAを単離するための、cDNAライブラリーのためハイブリダイゼーションプローブとして使用してもよい。同様の生物活性、又は機能とは、本出願の目的では、それぞれQC-、及びEC-活性として定義されるペプチド、タンパク質、ホルモン、若しくはその他の基質のN末端グルタミン又はグルタミン酸からピログルタミン酸を形成する能力を意味する。このタイプのこのようなプローブは、少なくとも14塩基（配列番号：2～9の1つからの少なくとも14個の隣接するヌクレオチド）、好ましくは少なくとも30塩基を有し、その他には、例えば50以上の塩基を含んでいてもよい。配列番号53～61のプローブが好ましい。また、このようなプローブは、調節領域、及びプロモーター領域、エキソン、並びにイントロンを含む、全長転写物、及び／若しくはゲノムクローン、又は完全な遺伝子を含むクローンに対応するcDNAクローンを同定するために使用してもよい。本発明の遺伝子のものに対して配列相補性を有する標識されたオリゴヌクレオチドは、ヒトcDNA、ゲノムDNA、若しくはmRNAのライブラリー、又はその他の供与源、若しくは動物からの同様のライブラリーをスクリーニングして、プローブがハイブリダイズするライブラリーのメンバーの位置を決めるために有用である。一例として、公知のDNA配列を使用してオリゴヌクレオチドプローブを合成してもよく、次いでこれを、ライブラリ

40

50

ーをスクリーニングするために使用して、関心対象の遺伝子のコード領域を単離する。

【0087】

本発明は、少なくとも70%、好ましくは少なくとも90%、及びより好ましくは少なくとも95%の同一性、又は類似性が配列の間にあり、かつ従って、同様の生物活性を有するタンパク質をコードする、先に記述した配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドを更に提供することを想定する。その上、当技術分野において公知のとおり、アミノ酸配列が、配列の個々の残基について同じか、又は保存されたアミノ酸置換を含むときに、2つのポリペプチドの間には「類似性」がある。同一性、及び類似性は、配列分析ソフトウェア（例えば、PBIL（Pole Bioinformatique Lyonnais）<http://npsa-pbil.ibcp.fr>におけるClustalW）を使用して測定してもよい。本発明は、特にストリングエントな条件下で先に記述したポリヌクレオチドにハイブリダイズするこのようなポリヌクレオチドを提供する。本明細書に使用される「ストリングエントな条件」という用語は、少なくとも約70%の同一性がある場合に、ポリヌクレオチド配列と配列番号：2～9のポリヌクレオチド配列との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する。

10

【0088】

適切には、ストリングエントな条件は、例えばプレハイブリダイゼーション、及びハイブリダイゼーション溶液における塩、若しくはホルムアミドの濃度によって、又はハイブリダイゼーション温度によって定義することができ、当該技術分野において周知である。特に、ストリングエンシーは、塩の濃度を低減させることによって、ホルムアミドの濃度を増加させることによって、及び／又はハイブリダイゼーション温度を上昇することによって増加することができる。

20

【0089】

例えば、高ストリングエンシー条件下でのハイブリダイゼーションは、約37～42にて約50%のホルムアミドを使用してもよいが、低減されたストリングエンシー条件下でのハイブリダイゼーションは、約30～35にて約35%～25%のホルムアミドを使用してもよい。高ストリングエンシー条件下でのハイブリダイゼーションのための条件の一つの特定のセットでは、42、50%のホルムアミド、5×SSPE、0.3%SDS、及び200 μg/mlの剪断され、かつ変性されたサーモン精子DNAを使用する。低減されたストリングエンシー下でのハイブリダイゼーションについては、上記の通りの同様の条件を、35の低減した温度にて35%のホルムアミドにおいて使用してもよい。ストリングエンシーの特定のレベルに対応する温度領域は、関心対象の核酸のピリミジンに対するプリンの比率を算出し、それに応じて温度を調整することによって更に狭くすることができる。上記の範囲、及び条件に対する変更は、当該技術分野において周知である。好ましくは、ハイブリダイゼーションは、配列間で少なくとも95%、及びより好ましくは少なくとも97%の同一性がある場合にのみ、生じるべきである。先に記述したポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドは、好ましい実施態様において、配列番号：2～9のcDNAの1つによってコードされる成熟タンパク質と同じ生物学的機能、又は活性を実質的に示すポリペプチドをコードする。

30

【0090】

言及したように、適切なポリヌクレオチドプローブは、少なくとも14塩基、好ましくは30塩基、及びより好ましくは少なくとも50塩基を有してもよく、先に記述したように、それに対して同一性を有し、かつ活性を保持しても、又は保持していなくてもよい本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズするであろう。例えば、このようなポリヌクレオチドは、例えばこのようなポリヌクレオチドの回収のために、又は診断プローブとして、若しくはPCRプライマーとして、それぞれ配列番号：2～9のポリヌクレオチドにハイブリダイズするためのプローブとして使用してもよい。従って、本発明は、それぞれ配列番号：11～18のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド、並びにこれらの断片を含み、該断片は、好ましくは、このようなポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに対して少なくとも30塩基、及びより好ましく

40

50

は少なくとも50塩基を有する。

【0091】

周知のように、遺伝暗号は、特定のアミノ酸が複数のヌクレオチドトリプレット（コドン）によってコードされるという点で重複性であり、本発明には、本明細書において配列が具体的に例示されたものとは異なるコドンを使用して同じアミノ酸をコードするこれらのポリヌクレオチド配列を含む。このようなポリヌクレオチド配列は、本明細書において、「等価」ポリヌクレオチド配列と称する。本発明は、配列番号：11～18のいずれか1つの推定アミノ酸配列を有するポリペプチドの1つの、成熟タンパク質の一部、又は全体などの断片、類似体、及び誘導体をコードする先に記述したポリヌクレオチドの変異体を更に含む。ポリヌクレオチドの変異型は、ポリヌクレオチドの天然に存在する対立遺伝子変異体、又はポリヌクレオチドの天然に存在しない変異体であってもよい。例えば、核酸の変異体は、単に遺伝暗号の縮重により生じるアミノ酸のためのコドン配列の相違であってもよく、又は欠失体、置換変異体、及び付加、又は挿入変異体があってもよい。当技術分野に公知のとおり、対立遺伝子変異体は、コードされるポリペプチドの生物学的機能を実質的に変化させない1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、又は付加を有していてもよいポリヌクレオチド配列の代替形態である。

10

【0092】

本発明は、配列番号：11～18の推定されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、並びにこのようなポリペプチドの断片、類似体、及び誘導体を更に含む。「断片」、「誘導体」、及び「類似体」という用語は、配列番号：11～18のポリペプチドをいうときに、このようなポリペプチドと本質的に同じ生物学的機能、又は活性を保持するポリペプチドを意味する。類似体には、例えばプロタンパク質部分の切断によって活性化されて活性な成熟タンパク質を產生することができるプロタンパク質を含むかもしれない。本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然のポリペプチド、又は合成ポリペプチドであってもよいが；しかし、これらは、好ましくは、グリコシリ化され、又はグリコシリ化されていない、組換えポリペプチドである。

20

【0093】

配列番号11～18のいずれか1つのポリペプチドの断片、誘導体、又は類似体は、(i)アミノ酸残基の1つ以上が保存され、若しくは非保存されたアミノ酸残基（好ましくは、保存されたアミノ酸残基）で置換されているものであってもよく、かつこのような置換されたアミノ酸残基は、遺伝暗号によってコードされたものであっても、若しくはなくともよく、又は(ii)アミノ酸残基の1つ以上が置換基を含むものであってもよく、又は(iii)リーダー配列、若しくは分泌配列、又は成熟ポリペプチドの精製のために使用される配列、若しくはプロタンパク質配列などの付加アミノ酸が成熟タンパク質に融合されているものであってもよい。このような断片、誘導体、及び類似体は、本明細書の教示に基づいて提供することが当業者の範囲内であると考えられる。

30

【0094】

本発明のポリペプチド、及びポリヌクレオチドは、単離された形態であるべきであり、好ましくは、これらは、実質的に均一、又は純粋に精製される。実質的に均一とは、少なくとも約85%の純度を意味する。

40

【0095】

「単離された」という用語は、材料がその本来の環境（例えば、それが天然に存在する場合、天然の環境）から除去されたことを意味するために使用される。例えば、生きている動物に存在する天然に存在するポリヌクレオチド、又はポリペプチドは、単離されているとはみなされないが、同じポリヌクレオチド、又はポリペプチドが、天然の系に共存する材料の実質的に全てから分離されたときは、単離されたとみなされる。DNAについて、本用語には、例えば、ベクターに、自律的に複製するプラスミド、若しくはウイルスに、又は原核生物、若しくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれているか；又はその他の配列から独立した分離した分子（例えば、cDNA、又はポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）、若しくは制限エンドヌクレアーゼ消化によって產生されるゲノム、又はcDNA断片）として存在

50

する、組換えDNAを含む。また、これには、例えば更なるポリペプチド配列、例えば融合タンパク質をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAを含む。更に、QPCTLの選択的スプライスバリエントをコードする配列番号2~9の1つに示したヌクレオチドの一部を含む組換えDNAも含まれる。種々の選択的スプライスバリエントを配列番号：19~22において例示してある。

【0096】

本発明のポリペプチドは、配列番号11~18のポリペプチド（特に成熟タンパク質）、並びに配列番号11~18のポリペプチドのいずれか1つに対して少なくとも75%の類似性（例えば、好ましくは少なくとも50%、及びより好ましくは少なくとも70%の同一性）、より好ましくは、配列番号11~18のポリペプチドの1つに対して少なくとも85%の類似性（例えば、好ましくは少なくとも70%の同一性）、及び最も好ましくは配列番号11~18のポリペプチドの1つに対して少なくとも95%の類似性（例えば、好ましくは少なくとも90%の同一性）を有するポリペプチドいずれかの1つを含む。その上、これらには、好ましくは、少なくとも30アミノ酸、及びより好ましくは少なくとも50アミノ酸の配列を含むこのようなポリペプチドの正確な部分を含むべきである。

10

【0097】

本発明のポリペプチドの断片、又は部分は、ペプチド合成によって対応する全長ポリペプチドを产生するための中間体として使用してもよい。また、本発明のポリヌクレオチドの断片、又は部分は、本発明の全長ポリヌクレオチドを合成するために使用してもよい。

20

【0098】

また、本発明は、このようなポリヌクレオチドを含むベクター、このようなベクターで遺伝子操作されている宿主細胞、及び前述のものを使用する組換え技術によるポリペプチドの產生を含む。宿主細胞は、例えばクローニングベクター、又は発現ベクターであってもよい、このようなベクターで遺伝子操作される（導入され、又は形質転換され、又はトランسفェクトされる）。ベクターは、例えば、プラスミド、ウイルス粒子、ファージ、その他の形態であってもよい。操作された宿主細胞は、プロモーターを活性化し、形質転換体を選択し、又は本発明の遺伝子を增幅するために適切なように修飾された従来の栄養培地において培養することができる。温度、pH、その他などの培養条件は、発現のために選択した宿主細胞で一般に使用されるものであり、当業者に周知である。

30

【0099】

本発明のポリヌクレオチドは、組換え技術によってポリペプチドを产生するために使用してもよい。従って、例えば、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドを発現するための種々の発現ベクターのいずれか一つに含まれてもよい。このようなベクターには、染色体の、非染色体の、及び合成のDNA配列、例えば、SV40の誘導体；細菌プラスミド；ファージDNA；バキュロウイルス；酵母プラスミド；プラスミド、及びファージDNAの組み合わせに由来するベクター、ワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、及び仮性狂犬病などのウイルスDNAを含む。しかし、それが宿主において複製可能で、かつ生存可能な限り、その他の任意のベクターを使用してもよい。

30

【0100】

適切なDNA配列は、種々の手順のいずれによってベクターに挿入されてもよい。一般に、DNA配列は、当該技術分野において周知の手順によって適切な制限エンドヌクレアーゼ部位（群）に挿入され、該手順は、本技術分野における技術の範囲内であると考えられる。

40

【0101】

発現ベクターのDNA配列は、mRNA合成を指揮するための適切な発現制御配列（群）（プロモーター）に機能的に連結される。このようなプロモーターの代表例としては：LTR、又はSV40プロモーター、大腸菌（E. coli）lac、又はtrp、ファージP. sub. Lプロモーター、及び原核生物細胞、若しくは真核生物細胞、又はこれらのウイルスにおける遺伝子の発現を制御することが知られているその他のプロモーターが挙げられるであろう。

50

【0102】

また、発現ベクターには、翻訳開始、及び転写ターミネーターのためのリボソーム結合部位を含むべきである。また、ベクターには、発現を増幅するために適した配列を含んでいてもよい。加えて、発現ベクターには、好ましくは、真核生物細胞培養のためのジヒドロ葉酸還元酵素、若しくはネオマイシン耐性など、又は大腸菌 (*E. coli*) におけるテトラサイクリン-、若しくはアンピシリン-耐性などの、形質転換された宿主細胞の選択のための表現型形質を提供するために、1つ以上の選択可能なマーカー遺伝子を含む。

【 0 1 0 3 】

先に記述したような適切なDNA配列、並びに適切なプロモーター配列、又は制御配列を含むベクターを使用して適切な宿主を形質転換し、宿主にタンパク質を発現させてもよい。適切な宿主の代表例としては：大腸菌 (*E. coli*) ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) などの細菌細胞；酵母などの真菌細胞；ショウジョウバエ (*Drosophila*) S2、及びスパドブテラ (*Spodoptera*) Sf9などの昆虫細胞；CHO、COS、又はBowesメラノーマなどの動物細胞；アデノウイルス；植物細胞、その他が挙げられるであろう。適切な宿主の選択は、本明細書の教示から、当該技術分野の技術の範囲内であると考えられる。

10

【 0 1 0 4 】

核酸配列の合成産生は、CLONTECH 95/96 カタログ、215～216ページ、CLONTECH, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, Calif. 94303から明らかなように、当該技術分野において周知である。従って、本発明は、また、本発明のタンパク質の産生のために有用な発現ベクターを含む。本発明は、上で広範に記述したような配列の1つ以上を含む組換え構築物を更に含む。構築物には、本発明の配列が、フォワード、若しくはリバースの向きで挿入されたプラスミド、又はウイルスベクターなどのベクターを含んでいてもよい。この実施態様の好ましい態様において、構築物には、配列に作動可能に連結された、例えばプロモーターを含む制御配列を更に含む。多数の適切なベクター、及びプロモーターが当業者に公知であり、かつ市販されている。以下のベクターが、例証として提供される：細菌 : pQE70、pQE60、pQE-9 (Qiagen)、pBS、pD10、ファージスクリプト (phagescript)、p siX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A (Stratagene)、ptrc 99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、及びpRIT5 (Pharmacia)；並びに真核生物 : pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、及びpSVL (Pharmacia)。しかし、それが宿主において複製可能で、かつ生存可能な限り、その他の任意の適切なプラスミド、又はベクターを使用してもよい。

20

【 0 1 0 5 】

プロモーター領域は、CAT (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) ベクター、又は選択可能なマーカーをもつその他のベクターを使用して任意の所望の遺伝子から選択することができる。

30

【 0 1 0 6 】

2つの適切なベクターは、pKK232-8、及びpCM7である。特に命名された細菌プロモーターには、lacI、lacZ、T3、T7、gpt、ラムダP.sub.R、P.sub.L、及びtrpを含む。真核生物プロモーターには、CMV前早期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、早期、及び後期SV40プロモーター、レトロウイルス由来LTRプロモーター、並びにマウスマタロチオネイン-1プロモーターを含む。適切なベクター、及びプロモーターの選択は、十分に当業者のレベルの範囲内にある。

40

【 0 1 0 7 】

発現ベクターの成分には、一般に以下を含んでいてもよい：1) ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (G418)、又は選択マーカーとしてのハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ (hyg) 遺伝子、2) 大腸菌 (*E. coli*) 複製開始点、3) T7、及びSP6ファージプロモーター配列、4) lacオペレーター配列、5) ラクトースオペロンリプレッサー遺伝子 (lacIq)、並びに6) マルチクローニングサイトリソース。このような複製開始点 (oriC) は、pUC19 (LTI, Gaithersburg, Maryland) に由来してもよい。

【 0 1 0 8 】

50

適切な制限部位を有する配列番号：2～9の1つをコードするポリペプチドのスクレオチド配列は、例えば、以下の実施例1、及び2に記述されたPCRプロトコルに従って、ベクター-EGFP-N3へのisoQC Met I、及びMet IIのクローニングのためのEcoR I (5'プライマーとして)、及びSal I (3' primerとして)のための制限部位、又はベクターpET41aへのisoQCのクローニングのためのSpe I (5'プライマーとして)、及びEcoR I (3'プライマーとして)部位を有するPCRプライマーを使用して產生される。PCRインサートをゲル精製して、適合する制限酵素で消化する。インサート、及びベクターを標準的なプロトコルに従って連結させる。

【0109】

更なる実施態様において、本発明は、上記の構築物を含む宿主細胞を提供する。宿主細胞は、哺乳動物細胞などの高等真核細胞、若しくは酵母細胞などの低級真核細胞であることができ、又は宿主細胞は、細菌細胞などの原核細胞であることができる。宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストランを媒介したトランスフェクション、リポフェクション、又は電気穿孔法 (Davis, L., Dibner, M., Battey, J.の文献 *Basic Methods in Molecular Biology* (1986)) によって遂行することができる。

【0110】

宿主細胞におけるこのような構築物は、好ましくは組換え配列によってコードされる遺伝子産物を產生するための従来法で使用される。或いは、本発明のポリペプチドは、従来のペプチド合成機によって、又はこうして製造された適切な断片の化学的連結によって合成的に產生することができる。

【0111】

成熟タンパク質は、適切なプロモーターの制御下において、哺乳動物細胞、酵母、細菌、又はその他の細胞において発現することができる。また、無細胞翻訳系を、本発明のDNA構築物に由来するRNAを使用してこのようなタンパク質を產生するために使用することができる。原核生物、及び真核生物の宿主で使用するためのに適したクローニングベクター、及び発現ベクターは、Sambrookらの文献、分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning : A Laboratory Manual)、第2版、Cold Spring Harbor、N. Y., (1989) によって記述されている。

【0112】

高等真核生物による本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクターにエンハンサー配列を挿入することによって増加される。エンハンサーには、その転写を増加させるようにプロモーターに対して作用する通常約10～300bpのDNAのシス作動性エレメントを含む。例には、複製開始点bp 100～270の後期側のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモータエンハンサー、複製開始点の後期側上のポリオーマエンハンサ、及びアデノウイルスエンハンサーを含む。

【0113】

一般に、組換え発現ベクターには、複製開始点、並びに宿主細胞の形質転換を可能にする選択可能マークター、例えば大腸菌 (*E. coli*) のアンピシリン耐性遺伝子、及び*S. cerevisiae* TRP1遺伝子、並びに下流の構造配列の転写を指揮するための高度に発現される遺伝子由来のプロモーターを含むであろう。このようなプロモーターは、とりわけ、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) 、 ファクター、酸性ホスファターゼ、又は熱ショックタンパク質などの糖分解酵素をコードするオペロンに由来することができる。異種構造配列は、適切な段階で、翻訳開始配列、及び終結配列、及び好ましくは細胞膜周辺腔、又は細胞外培地への翻訳タンパク質の分泌を指揮することができるリーダー配列と共に、構築される。任意に、異種配列は、発現された組換え産物の安定化、又は簡略精製などの所望の特徴を与えるN末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードすることができる。

【0114】

細菌使用のための有用な発現ベクターは、所望のタンパク質をコードする構造DNA配列

10

20

30

40

50

を、適切な翻訳開始シグナル、及び終止シグナルと共に、機能的プロモーターと動作可能な読み相で挿入することによって構築される。

【0115】

ベクターは、ベクターの維持を保証するために、必要に応じて、宿主内での増幅を提供するために、1つ以上の表現型の選択可能なマーカー、及び複製開始点を含むであろう。形質転換のために適した原核生物宿主には、大腸菌 (E. coli)、枯草菌 (Bacillus subtilis)、ネズミチフス菌 (Salmonella typhimurium)、並びにシュードモナス属 (Pseudomonas)、ストレプトマイセス属 (Streptomyces)、及びブドウ球菌属 (Staphylococcus) の種々の種を含むが、その他も、選択物として使用してもよい。

【0116】

代表的であるが、非限定的な例として、細菌使用のための有用な発現ベクターには、選択可能なマーカー、及び周知のクローニングベクターpBR322 (ATCC 37017) の遺伝因子を含む市販のプラスミドに由来する細菌複製開始点を含むことができる。このような市販のベクターには、例えばpKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)、及びEM1 (Promega Biotec, Madison, Wis., U.S.A.) を含む。これらpBR322「バックボーン」部分を適当なプロモーター、及び発現させる構造配列と結合させる。

10

【0117】

適切な宿主株の形質転換、及び適切な細胞密度までの宿主株増殖の後、選択したプロモーターを適切な手段 (例えば、温度シフト、又は化学物質誘導) によって誘導して、細胞を更なる時間培養する。

20

【0118】

細胞は、典型的には遠心分離によって収集し、次いで物理的、又は化学的手段によって破壊して、生じる粗製抽出物を更なる精製のために保持する。

【0119】

タンパク質の発現に使用した微生物細胞は、凍結融解サイクリング、超音波処理、機械的破壊、及び細胞溶解薬の使用を含む任意の便利な方法によって破壊することができ；このような方法は、当業者に周知である。

30

【0120】

また、種々の哺乳動物細胞培養系を使用して、組換えタンパク質を発現することができる。哺乳動物発現系の例には、Gluzmanの文献、Cell、23: 175 (1981) によって記述されているサル腎臓線維芽細胞のCOS-7株を含む。適合するベクターを発現することができるその他の株化細胞には、例えばC127、3T3、CHO、HeLa、及びBHK株化細胞を含む。哺乳動物発現ベクターには、一般に複製開始点、適切なプロモーター、及びエンハンサー、更に任意の必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位、及びアクセプター部位、転写終結配列、並びに5'フランкиング非転写配列を含むであろう。SV40スプライス部位、及びポリアデニル化部位に由来するDNA配列を使用して、必要とされる非転写遺伝因子を提供してもよい。

【0121】

ポリペプチドは、硫酸アンモニウム沈殿、又はエタノール沈殿、酸抽出、陰イオン、又は陽イオン交換クロマトグラフィー、リン酸セルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、及びレクチンクロマトグラフィーを含む方法によって、組換え細胞培養物から回収すること、及び精製することができる。ポリペプチドが細胞の表面にて発現される場合、回収を促進することができるが、そのようなものは必要条件ではない。また、ポリペプチドのより長い形態の発現後に切断される切断産物の回収が望まれてもよい。本技術分野において公知のようなタンパク質リフォールディング工程を、必要に応じて使用して、成熟タンパク質の構造を完成させることができる。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を最終的な精製工程のために使用することができる。

40

【0122】

本発明のポリペプチドは、精製された天然物であっても、又は原核生物、若しくは真核

50

生物宿主からの組換え技術によって（例えば、培養における細菌、酵母、高等植物、昆虫、又は哺乳動物細胞）產生してもよい。組換え生産法に使用される宿主に応じて、本発明のポリペプチドは、グリコシル化されてもよく、又はグリコシル化されていなくてもよい。また、本発明のポリペプチドは、最初のメチオニンアミノ酸残基を含んでいてもよい。

【0123】

好みの実施態様において、本発明のタンパク質は、実質的にその他のタンパク質からの混入を含まないように、単離し、及び精製される。例えば、本発明のタンパク質は、試料に存在する総タンパク質の少なくとも80重量%、より好みには総タンパク質の少なくとも90%、更により好みには少なくとも95%、及び最も好みには少なくとも98重量%を構成するべきである。

10

【0124】

これらのタンパク質は、水か、ジメチルスルホキシド（DMSO）、若しくはエタノールなどの別の適切な溶媒か、又は適切な溶媒の混合物中の溶液形態であってもよい。

溶媒の混合物の例には、10%（重量による）のエタノール水溶液、及び2%（重量による）DMSO水溶液を含む。溶液には、塩、緩衝剤、カオトロピック試薬、洗浄剤、防腐剤、その他を更に含んでいてもよい。或いは、タンパク質は、凍結乾燥粉末、又は結晶質固体などの固体の形態であってもよく、これには、また、残留溶媒、塩、又はその他を含んでいてもよい。

【0125】

本明細書に使用される「抗体」という用語には、ポリクローナル抗体、親和性精製したポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、並びにF(ab')2、及びFab'タンパク分解断片などの抗体結合性断片を含む。また、キメラ抗体、Fv断片、単鎖抗体、その他などの、遺伝子操作された無処置の抗体、又は断片、並びに合成抗原結合ペプチド、及びポリペプチドも、含まれる。非ヒト抗体は、ヒトフレームワーク、及び定常領域に対して非ヒトCDRを移植することによって、又は完全非ヒト可変ドメインを組み込むこと（任意に、曝露される残基の置換によってヒト様表面でこれらを「覆い隠す」こと、この場合、結果は、「ベニヤ化（veneered）」抗体である）によってヒト化してもよい。一部の場合には、ヒト化抗体は、適当な結合特性を増強するために、ヒト可変領域フレームワークドメイン内に非ヒト残基を保持してもよい。抗体をヒト化することにより、生物学的半減期が増加するであろうし、ヒトに対する投与の有害な免疫反応の可能性が、低減されるはずである。

20

【0126】

本明細書において有用な抗体を產生し、又は選択するための代わりの技術には、ヒトisoQCタンパク質、又はそれに由来するペプチドに対するリンパ球のインビトロ曝露、及びファージ、又は同様のベクターにおける抗体ディスプレイライブラリーの選択（例えば、固定され、若しくは標識されたヒトisoQCタンパク質、又はペプチドを使用することによる）を含む。

30

【0127】

潜在的なヒトisoQCポリペプチド結合ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子は、ファージ上に（ファージディスプレイ）、又は大腸菌（E. coli）などの細菌上に提示されたランダムなペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって得ることができる。このようなポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、当該技術分野において周知の多数の方法で得ることができる。

40

【0128】

当業者に明らかであろうとおり、ポリクローナル抗体は、ヒトisoQCポリペプチド、又はこれらの断片を、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ニワトリ、ウサギ、マウス、及びラットなどの種々の温血動物に接種することによって产生することができる。ヒトisoQCポリペプチドの免疫原性は、ミョウバン（水酸化アルミニウム）、若しくはフロイントの完全、若しくは不完全アジュバントなどのアジュバント、又はリゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、KLH、若しくはジニトロフェノールなどの界面活性物質を使用することによって増加してもよい。ヒトに使用されるアジュバント

50

の中で、BCG (細菌カルメット-ゲラン)、及びコリネバクテリウム・パルバム (*Corynebacterium parvum*) が特に好ましい。また、免疫化のために有用なポリペプチドには、免疫グロブリンポリペプチドと、又はマルトース結合タンパク質と、isoQC、又はその一部の融合物などの融合ポリペプチドを含む。ポリペプチド免疫原は、全長分子、又はその一部であってもよい。ポリペプチド部分が「ハプテン様」である場合、このような部分を、免疫化のために、キーホール リンペットヘモシニアン (KLH)、ウシ血清アルブミン (BSA)、又は破傷風トキソイドなどの巨大分子担体に対して、都合よく結合しても、又は連結してもよい。また、isoQCに対する抗体は、当該技術分野において周知の方法を使用して产生してもよい。このような抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、及び単鎖抗体、Fab断片、及びFab発現ライブラリーによって产生される断片を含んでもよいが、限定されない。

10

【0129】

中和抗体 (すなわち、活性部位にて相互作用を遮断し、又は修飾するもの) は、治療的用途のために特に好ましい。

【0130】

QPCTLに特異的に結合する抗体、結合タンパク質、又はペプチドの产生のために、単鎖抗体、Fab断片、その他の抗体断片、非抗体タンパク質ドメイン、又はペプチドライブラリーをスクリーニングしてもよい。ライブラリーは、ファージディスプレイ、その他の組換えDNA法、又はペプチド合成を使用して作製することができる (Vaughan, T. J. らの文献、Nature Biotechnology 14 : 309-314 (1996))。このようなライブラリーは、一般にQPCTLに特異的な結合を示す配列を同定するための、当該技術分野において周知の方法を使用してスクリーニングされるであろう。

20

【0131】

QPCTLに対する抗体を誘導するために使用されるオリゴペプチド、ペプチド、又は断片は、少なくとも約5アミノ酸、及びより好ましくは、少なくとも約10アミノ酸からなるアミノ酸配列を有することが好ましい。また、これらのオリゴペプチド、ペプチド、又は断片は、天然のタンパク質の一部のアミノ酸配列と同一であることが好ましい。また、QPCTLアミノ酸年の短いひと配列をKLHなどの別のタンパク質の1つと融合してもよく、キメラ分子に対する抗体を产生してもよい。

30

【0132】

QPCTLに対するモノクローナル抗体は、培養における連続的な株化細胞による抗体分子の产生を提供する任意の周知の技術を使用して製造してもよい。これらには、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、及びEBV-ハイブリドーマ技術を含むが、限定されず、ハイブリドーマ細胞によって产生されるモノクローナル抗体が好ましいであろう。

【0133】

加えて、適切な抗原特異性、及び生物活性をもつ分子を得るための、マウス抗体遺伝子のヒト抗体遺伝子へのスプライシングなどの、「キメラ抗体」の产生のために開発された技術を使用することができる。Neuberger, M. S. らの文献、Nature 312 : 604-608 (1984) を参照されたい。或いは、単鎖抗体の产生のために記述された技術を、QPCTL-特異的単鎖抗体を产生するための、当該技術分野において公知の方法を使用して適応させてもよい。関連された特異性をもつが、異なるイディオタイプの組成の抗体を、ランダムコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーからの鎖シャフリングによって产生してもよい。(Burton D. R. の文献 Proc. Natl. Acad. Sci. 88 : 11120-11123 (1991))。

40

【0134】

また、抗体は、リンパ球集団におけるインビオ产生を誘発することによって、又は免疫グロブリンライブラリー、若しくは文献に示されているような、高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによって、产生することもできる。(Orlandi, R. らの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. 86 : 3833-3837 (1989))。

【0135】

50

また、QPCTLに対して特異的な結合部位を含む抗体断片を產生してもよい。例えば、このような断片には、抗体分子のペプシン消化によって產生される $F(ab')_2$ 断片、及び $F(ab')_2$ 断片のジスルフィド架橋を還元させることによって產生されるFab断片を含むが、限定されない。或いは、Fab発現ライブラリーを構築して、望まれる特異性をもつモノクローナルFab断片の迅速かつ簡単な同定を可能にしてもよい。(Huse, W. D.らの文献、Science 254: 1275-1281 (1989))。

【0136】

種々の免疫アッセイを使用して、望まれる特異性を有する抗体を同定してもよい。確立された特異性をもつポリクローナル抗体、若しくはモノクローナル抗体のいずれかを使用する競合的結合アッセイ、又は免疫放射線アッセイのための多数のプロトコルが、当該技術分野において周知である。このような免疫アッセイには、典型的にはQPCTLとその特異抗体との間の複合体形成の測定を含む。2つの非干渉QPCTLエピトープに反応性のモノクローナル抗体を利用する2部位モノクローナルに基づいた免疫アッセイも好ましいが、競合結合アッセイも使用してもよい。

10

【0137】

先に言及したように、QPCTLは、疾患の治療に使用することができる。

【0138】

本発明の本則面に使用するために適した医薬組成物には、活性成分が、疾患の1つに関して意図された目的を達成するための有効量で含まれる組成物を含む。治療的に有効な用量の決定は、十分に当業者能力の範囲内であり、最初に、例えば新生細胞の細胞培養アッセイにおいて、又は動物モデル、通常マウス、ラット、ウサギ、イヌ、若しくはブタにおいて見積もることができる。また、動物モデルを使用して、適切な濃度範囲、及び投与の経路を決定してもよく、次いで該情報が、ヒトにおける投与のために有用な用量、及び経路を決定するために一般に使用される。

20

【0139】

治療的に有効な用量とは、疾患の特定の症候、又は状態を寛解させる、活性成分、例えばQPCTL、若しくはこれらの断片、DPRPの抗体、又はQPCTLのアゴニスト、アンタゴニスト、若しくは阻害剤のその量をいう。例えば、投与される量は、それとの接触によって所望の標的基質のN末端Glu又はGlnを環化するために有効であってもよい。治療有効性、及び毒性は、同様に、ED50(集団の50%において治療的に有効な用量)、又はLD50(集団の50%に対する致死用量)統計を算出することによってなど、細胞培養における、又は実験動物での標準的な薬学的手順によって決定してもよい。治療有効性に対する中毒性の用量比が治療係数であり、これは、LD50/ED50比として表することができる。大きな治療インデックスを示す医薬組成物が好ましい。細胞培養アッセイ、及び動物試験から得られるデータは、ヒト使用のために投薬量の範囲に製剤化する際に使用される。このような組成物に含まれる投薬量は、好ましくは、ほとんど、又は全く毒性のないED50を含む循環濃度の範囲内である。投薬量は、使用される剤形、患者の感受性、及び投与の経路に応じて、この範囲内で変動する。

30

【0140】

正確な投薬量は、通常、活性部分の十分なレベルを提供するように、又は所望の効果を維持するように調整された投薬量、及び投与で、治療を必要としている対象に関連した因子を考慮して、医療従事者によって決定されるであろう。考慮される因子には、疾病状態の重症度、対象の一般的健康、対象の年齢、重量、及び性、食餌、投与の回数、及び頻度、複合製剤(類)、反応感受性、及び療法に対する寛容性/反応を含む。長時間作用性医薬組成物を、特定の製剤の半減期、及びクリアランス速度に応じて、3~4日毎に、毎週、又は更に2週毎に一回投与してもよい。

40

【0141】

本発明のさらに別の態様は、配列番号2~9のポリヌクレオチドのmRNA転写物に対してアンチセンスである配列を有するポリヌクレオチド分子を提供する。アンチセンスポリヌクレオチド分子の投与により、配列番号2~9のQPCTL遺伝子によってコードされるタンパク

50

質の產生を遮断することができる。アンチセンスポリヌクレオチド分子を製造し、及びこのような分子を投与するための技術は、当該技術分野において公知である。例えば、アンチセンスポリヌクレオチド分子は、細胞との融合のためにリポソームにカプセル化することができる。

【0142】

特に、脳、前立腺、肺、心臓、肝臓、脾臓、及び腎臓組織における配列番号2~9のQPCTL遺伝子の発現は、下記に記述した疾患の病態生理学における潜在的役割についての証拠を提供する。従って、更なる態様において、本発明は、不適当なQPCTL活性、又は発現レベルと関連する疾患を検出するための診断アッセイに関する。特異的にQPCTLを結合する抗体は、QPCTLの発現によって特徴づけられる障害の診断のために、又はQPCTLで、若しくはQPCTLのアゴニスト若しくはアンタゴニスト（阻害剤）で治療されている患者をモニターするためのアッセイに使用してもよい。診断目的のために有用な抗体は、治療のための上記のものと同様に製造してもよい。QPCTLのための診断アッセイには、ヒト体液において、又は細胞、若しくは組織の抽出物においてQPCTLを検出するための抗体、及び標識を利用する方法を含む。抗体は、修飾を伴って、又は伴わずに使用してもよく、これらは、共有結合、又は非共有結合でリポーター分子と連結することによって標識されていてもよい。多種多様なリポーター分子が、当該技術分野において公知である。また、触媒的に不活性であるように修飾された組換えQPCTLタンパク質を、ドミナントネガティブ阻害剤として使用することができる。このような修飾には、例えば活性部位の突然変異を含む。

10

【0143】

ELISA、RIA、及びFACSを含む、QPCTLを測定するための種々のプロトコルが当該技術分野において公知であり、QPCTL発現の変化された、又は異常なレベルを診断するための基礎を提供する。QPCTL発現についての正常、又は標準的な値は、正常な哺乳動物対象、好ましくはヒトから摂取した体液、又は細胞抽出物を、複合体形成のために適した条件下で、QPCTLに対する抗体と組み合わせることによって確立される。生物学的試料におけるQPCTLを検出するための方法には、a) 生体試料を提供する工程；b) 生体試料と抗QPCTL抗体とを、QPCTLと抗体との間に複合体形成が生じるために適した条件下で組み合わせる工程；並びにc) QPCTLと抗体との間の複合体形成を検出する工程；を含み、これにより生体試料におけるQPCTLの存在を確立するであろう。

20

【0144】

次いで、複合体形成の量を、種々の方法によって、好ましくは測光手段によって定量化してもよい。対象対照、及び生検組織由来の疾患試料において発現されたQPCTLの量を基準値と比較する。標準値と被験者値との間の偏差により、疾患を診断するためのパラメーターが確立される。

30

【0145】

本発明の別の実施態様において、QPCTLをコードするポリヌクレオチドは、診断目的のために使用され、該ポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補RNA、及びDNA分子、並びにPNAを含んでいてもよい。これらのポリヌクレオチドは、QPCTLの発現が疾患の1つと相関し得る生検組織における遺伝子発現を検出し、及び定量化するために使用してもよい。診断アッセイを使用して、QPCTLの発現を非存在、存在、及び過剰の間で区別して、治療的介入の間のQPCTLレベルの制御をモニターしてもよい。その上、疾患に対する素因、又は薬物に対する反応の改変を示す突然変異をスクリーニングする方法として、QPCTL遺伝子の遺伝薬理学的な单一ヌクレオチド多型（SNP）解析を使用することができる。

40

【0146】

QPCTLポリヌクレオチド、及びポリペプチド配列、その断片、QPCTLの抗体、及びQPCTLのアゴニスト、アンタゴニスト、又は阻害剤は、分子認識イベントを同定するための発見ツール、従ってQPCTLタンパク質と相互作用するタンパク質、ポリペプチド、及びペプチドとして使用することができる。具体例は、108を超えるペプチド配列を一回のパニングのラウンドでスクリーニングすることができるファージディスプレイペプチドライブラリ

50

ーである。このような方法、並びにその他のものには、当該技術の技範囲内で公知であり、かつ配列番号11-18のQPCTLのいずれか一つの活性を阻害し、又は増強する化合物を同定するために利用することができる。

【0147】

QPCTLと相互作用する複合体、又は経路、及びタンパク質などの機能的相互作用を表す結合連結は、酵母ツーハイブリッド系、プロテオミクス（差動的2Dゲル解析、及び質量分析）、及びゲノム科学（マイクロアレイによる差的遺伝子発現、又は遺伝子発現SAGEの連続解析）によって同定することができる。

【0148】

QPCTLに機能的に連結された、及び相互作用のプロセスが同定されたタンパク質は、これらのQPCTL-タンパク質相互作用の阻害剤、アゴニスト、及びアンタゴニスト、並びにモジュレーターをスクリーニングする方法の基礎を形成する。

【0149】

本明細書に使用される「アンタゴニスト」という用語は、QPCTLに結合したときに、QPCTLの生物学的、若しくは免疫学的活性の効果の量、又は期間を低減させる、例えばQPCTL基質のN末端にてGlu-又はGln-残基を環化するペプチダーゼの酵素活性を低減させる阻害剤分子をいう。アンタゴニストは、QPCTLの効果を低減させるタンパク質、核酸、炭水化物、抗体、又は任意のその他の分子を含んでいてもよく；例えば、これらには、競合的、又は非競合的タイプのメカニズムによってQPCTLに結合し、及び不活性化する小分子、並びに有機化合物を含んでいてもよい。QPCTLの小型分子状阻害剤が好ましい。QPCTLの競合的小型分子状阻害剤が最も好まれしい。

【0150】

QPCTL酵素活性阻害剤の具体例は、実施例4に記述してある。阻害剤は、例えばQPCTLシクラーゼ活性の阻害剤、又は代わりに、これらが相互作用するタンパク質に対するQPCTLの結合活性の阻害剤であることができる。このような阻害剤の具体例には、例えば抗QPCTL抗体、ペプチド、タンパク質断片、若しくは小さなペプチジルプロテアーゼ阻害剤、又は所望の細胞タイプ内に導入することができる培地中に処方される小さな非ペプチド有機分子阻害剤を含むことができる。或いは、このような阻害剤は、細胞媒介エンドサイトシス、及びその他の受容体を媒介したイベントによる導入のためにリガンドをターゲットするように付着することができる。このような方法は、更に下記に記述してあり、本明細書に記述されたQPCTLヌクレオチド、及びアミノ酸配列を考慮して、当業者によって実践することができる。

【0151】

QPCTLの更なる使用は、例えばQPCTLに対する結合を阻害するための、並びにアゴニストをスクリーニングするための治療薬としての使用のための潜在的アンタゴニストをスクリーニングするためである。QPCTL、その免疫原性断片、又はそのオリゴペプチドを、任意の種々の薬物をスクリーニングする技術において、予期されるアゴニスト、又はアンタゴニストである化合物のライブラリーをスクリーニングするために使用することができる。このようなスクリーニングに使用される断片は、溶液中で遊離し、固体支持体に固定され、細胞表面上に保持され、又は細胞内に位置していてもよい。次いで、QPCTLと試験される薬剤との間の結合複合体の形成を測定する。QPCTLを阻害するであろうアンタゴニストを発見するためのその他のアッセイは、QCの阻害剤を記述し、かつそれらの全体が本明細書に組み込まれる特許番号WO2004/098625、WO2004/098591、及びWO2005/075436の開示から明らかである。これらのQPCTLの別の価値のある使用は、QCの阻害剤がQPCTLの1つ以上も阻害することによって望まれない副作用を有さないであろうことを示すための、これらのスクリーニングである。

【0152】

QPCTLを結合する分子を同定するために小分子のライブラリーをスクリーニングするために提供される方法には、一般に：a) 小分子のライブラリーを提供すること；b) 小分子のライブラリーを、配列番号11～18のいずれかのポリペプチドと、又はこれらの断片と、

10

20

30

40

50

複合体形成のために適した条件下で組み合わせること；及びc) 複合体形成を検出すること；を含み、このような複合体の存在により、QPCTLに結合する小分子を同定する。

【0153】

アンタゴニストを同定するための1つの方法は、QPCTLを結合する小分子を、QPCTLを発現するベクターで形質転換された細胞からの抽出物内に、色素生産基質（例えば、Ala-Pr-o-AFC、又はAla-Pro-AMC）とともに、通常切断が生じるだろう条件下で送達すること、次いで切断を阻害する分子を同定するために、蛍光、若しくはUV光吸収の変化をモニターすることによって、又は分光光度法によって酵素による切断の阻害についてアッセイすること含む。分子の存在下における、反応速度、又は蛍光、若しくは紫外光吸収の総量の低減により、小分子がQPCTL触媒／酵素活性を低減させるアンタゴニストであることを確立する。一旦このような分子が同定されたら、これらを、QPCTLによるN末端のGlu-又はGln-残基の環化を低減させ、又は阻害するために投与してもよい。

10

【0154】

更にもう一つの具体的な態様に従って、本発明は、好ましくは配列番号：11～18のタンパク質から選択される、本発明に従った少なくとも1つの成熟タンパク質の酵素活性を阻害することができる化合物をスクリーニングする方法であって、前記成熟タンパク質と前記成熟タンパク質のための適切な基質とを、1つ以上の試験化合物又はその塩の存在下においてインキュベートすること、前記成熟タンパク質の酵素活性を測定すること、前記活性を試験化合物の非存在下で決定された相当する活性と比較すること、及び酵素活性を低減させる試験化合物、又は化合物を選択することを含む、前記方法を提供する。

20

【0155】

更にまた、本発明は、選択的QC-阻害剤、すなわちQCの酵素活性を阻害することができる化合物をスクリーニングする方法であって、前記QCは、本発明に従った、好ましくは配列番号：11～18のタンパク質から選択される少なくとも1つの成熟タンパク質の酵素活性を阻害しない、好ましくは配列番号：10のタンパク質であり、該方法は、前記成熟タンパク質と適切な基質とを、1つ以上のQCと阻害剤又はその塩の存在下においてインキュベートすること、前記成熟タンパク質の酵素活性を測定すること、前記活性を、QC阻害剤の非存在下で決定された相当する活性と比較すること、及び前記成熟タンパク質の酵素活性を低減させない化合物を選択することを含む、前記方法を提供する。

30

【0156】

更にまた、本発明は、選択的QPCTL-阻害剤、すなわち少なくとも1つQPCTLタンパク質の酵素活性を阻害することができる化合物をスクリーニングする方法であって、これは、QCの酵素活性を阻害しない、好ましくは配列番号：11～18のタンパク質から選択され、前記QCは、好ましくは配列番号：10のタンパク質であり、前記方法は、前記QCをQPCTLの1つ以上の阻害剤又はその塩の存在下においてインキュベートすること、QCの酵素活性を測定すること、前記活性をQPCTL阻害剤の非存在下で決定される相当する活性と比較すること、及び前記QPCTLタンパク質の酵素活性を低減させない化合物を選択することを含む、前記方法を提供する。

【0157】

有用なQCの阻害剤は、QPCTLの阻害剤としても有用であり得るし、特に阻害剤の構造、及びこれらの產生に関してその全体が本明細書に組み込まれるWO2004/098625、WO2004/098591、WO2005/039548、及びWO2005/075436に記述されている。

40

【0158】

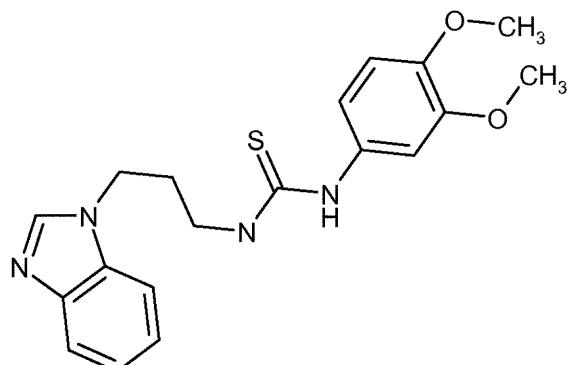
（QPCTL-阻害剤の例）

本発明に従った使用、及び方法のために適した潜在的QPCTL-阻害剤は、QC-阻害剤の構造、合成、及び使用方法に関してその全体が本明細書に組み込まれるWO2005/075436に開示されている。

【0159】

特に：適切な化合物は、式1*

【化8】



10

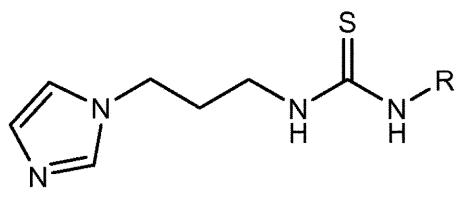
式1*

のものである。

【0160】

更なる実施態様において、QPCTLの阻害剤は、式1aのものであってもよい：

【化9】



20

(1a)

式中、Rは、実施例1～53において定義してある。

【表5】

実施例	R	ESI-MS (M+H)
1	メチル	199.3
2	<i>tert</i> -ブチル	241.4
3	ベンジル	275.4
4	フェニル	261.4
5	4-(フルオロ)-フェニル	279.35
6	4-(クロロ)-フェニル	295.80
7	4-(エチル)-フェニル	289.41
8	4-(トリフルオロメチル)-フェニル	329.4

30

40

実施例	R	ESI-MS (M+H)
9	4-(メトキシ-カルボニル)-フェニル	319.4
10	4-(アセチル)-フェニル	303.4
11	4-(メトキシ)-フェニル	291.4
12	ビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-2-イル	277.5
13	3, 4-(ジメトキシ)-フェニル	321.5
14	2, 4-(ジメトキシ)-フェニル	321.5
15	3, 5-(ジメトキシ)-フェニル	321.5
16	2-(メトキシ-カルボニル)-フェニル	319.4
17	4-(オキサゾール-5-イル)-フェニル	328.5
18	4-(ピラゾール-1-イル)-フェニル	327.4
19	4-(イソプロピル)-フェニル	303.5
20	4-(ピペリジン-1-スルホニル)-フェニル	408.6
21	4-(モルフォリン-4-イル)-フェニル	346.5
22	4-(シアノ)-フェニル	286.4
23	2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ジオキシン-6-イル	319.4
24	ベンゾ[1, 3]ジオキソール-5-イル	305.4
25	3, 4, 5 (トリメトキシ)-フェニル	351.5
26	3-(メトキシ)-フェニル	291.4
27	4-(エトキシ)-フェニル	305.5
28	4-(ベンジルオキシ)-フェニル	367.5
29	4-(メトキシ)-ベンジル	305.5
30	3, 4-(ジメトキシ)-ベンジル	335.5
31	2-(メトキシ-カルボニル)-チオフェン-3-イル	325.5

10

20

30

40

実施例	R	ESI-MS (M+H)
32	3-(エトキシカルボニル)- 4, 5, 6, 7- テトラヒドロベンゾ[b] チオフェン-イル	392.6
33	2-(メトキシカルボニル)-4- (メチル)-チオフェン-3-イル	339.5
34	ベンゾ[c] [1, 2, 5] チアゾール-4-イル	319.5
35	ベンゾ[c] [1, 2, 5] チアゾール-5-イル	319.5
36	5-(メチル)-3-(フェニル)- イソオキサゾール-4-イル	342.5
37	3, 5-(ジメチル)- イソオキサゾール-4-イル	280.4
38	4-(ヨード)-フェニル	387.3
39	4-(ブロモ)-フェニル	340.3
40	4-(メチル)-フェニル	275.4
41	ナフタレン-1-イル	311.5
42	4-(ニトロ)-フェニル	306.4
43	ブチル	241.4
44	シクロオクチル	295.5
45	フラン-2-イルメチル	265.4
46	テトラヒドロフラン-2-イルメチル	269.4
47	ベンゾ[1, 3] ジオキソール-5- イルメチル	319.4
48	2-(モルフォリン-4-イル)-エチル	298.5
49	4-(メチルスルフィニル)-フェニル	307.5
50	4-(ジメチルアミノ)-フェニル	304.5
51	4-(トリフルオロメトキシ)-フェニル	345.4

10

20

30

40

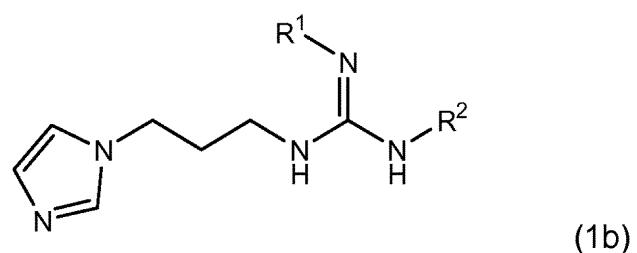
実施例	R	ESI-MS (M+H)
52	ベンゾイル	288.3
53	ピリジン-4-イル	261.1

【 0 1 6 1 】

QPCTLの更なる適切な阻害剤は、式1bのものであってもよい：

【化 1 0 】

10

式中、R¹、及びR²は、実施例54～95において定義してある。

20

【表6】

実施例	R ¹	R ²
54	シアノ	メチル
55	シアノ	3, 4-(ジメトキシ)-フェニル
56	シアノ	2, 4-(ジメトキシ)-フェニル
57	シアノ	3, 5-(ジメトキシ)-フェニル
58	シアノ	2, 3- ジヒドロベンゾ[b] [1, 4] ジオキシン-7-イル
59	シアノ	ベンゾ[d] [1, 3] ジオキソール-6-イル
60	シアノ	3, 4, 5-(トリメトキシ)-フェニル
61	シアノ	3-(メトキシ)-フェニル
62	シアノ	4-(エトキシ)-フェニル
63	シアノ	4-(ベンジルオキシ)-フェニル
64	シアノ	フェニル
65	シアノ	4-(メトキシ)-フェニル
66	シアノ	4-(アセチル)-フェニル
67	シアノ	4-(ニトロ)-フェニル
68	シアノ	ベンジル
69	シアノ	ナフタレン-1-イル

10

20

30

実施例	R ¹	R ²
70	シアノ	4-(フルオロ)-フェニル
71	シアノ	4-(ヨード)-フェニル
72	シアノ	4-(ブロモ)-フェニル
73	シアノ	シクロオクチル
74	シアノ	<i>tert</i> -ブチル
75	シアノ	4-(メチル)-フェニル
76	シアノ	4-(メチルチオ)-フェニル
77	シアノ	4-(エチル)-フェニル
78	シアノ	4-(ジメチルアミノ)-フェニル
79	シアノ	ブチル
80	シアノ	トリチル
81	シアノ	(ベンゾ[d] [1, 3] ジオキソール-6イル) メチル
82	シアノ	(テトラヒドロフラン-2イル) メチル
83	シアノ	4-(トリフルオロメチル)-フェニル
84	シアノ	(フラン-2-イル) メチル
85	シアノ	2-(モルフォリン-4-イル)-エチル
86	シアノ	4-(オキサゾール-5イル)-フェニル
87	シアノ	ピリジン-3-イル
88	シアノ	4-(シアノ)-フェニル
89	シアノ	4-(トリフルオロメトキシ)-フェニル
90	シアノ	4-(ピペリジノスルホニル)-フェニル
91	シアノ	4-(1H-ピラゾール-1-イル) フェニル
92	H	3, 4-(ジメトキシ)-フェニル
93	メチル	3, 4-(ジメトキシ)-フェニル
94	シアノ	2, 3, 4-(トリメトキシ)-フェニル
95	シアノ	シクロヘプチル

10

20

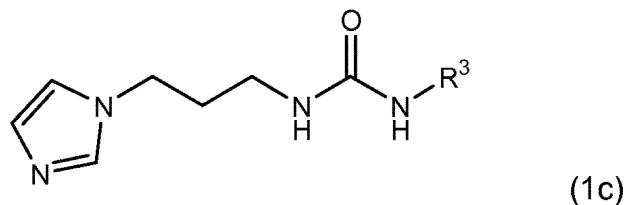
30

40

【0162】

QPCTLの更なる適切な阻害剤は、式1cものであってもよい：

【化11】



式中、R³は、実施例96～102において定義してある。

【表7】

10

実施例	R ³	ESI-MS (M+H)
96	エチル	197.3
97	6-フルオロ-4H-ベンゾ[d][1,3]ジオキシン-8-イル	321.4
98	3-(シクロヘキソキシ)-4-(メトキシ)-フェニル	359.4
99	4-(ヘプチルオキシ)-フェニル	359.5
100	3,4-ジヒドロ-2H-ベンゾ[b][1,4]ジオキセピン-7-イル	317.4
101	4-(ブトキシ)-フェニル	317.4
102	3,4-(ジメトキシ)-フェニル	305.4

20

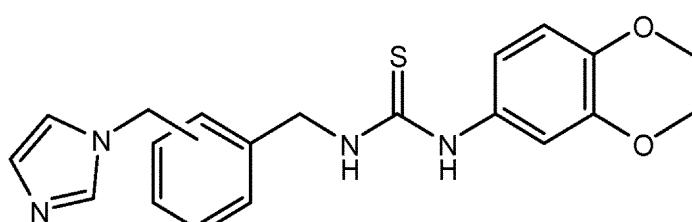
30

【0163】

QPCTLの更なる適切な阻害剤は、1dのものであってもよい：

【化12】

40



(1d)

式中、環上の位置は、実施例103～105において定義してある。

【表 8】

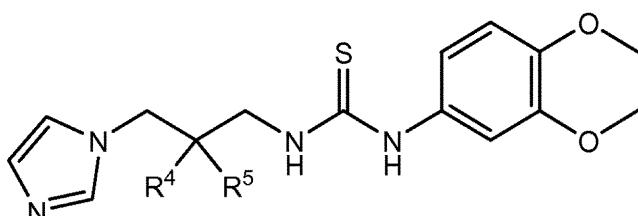
実施例	ベンジル-置換の位置	ESI-MS (M+H)
103	2	383.5
104	3	383.5
105	4	383.5

10

【0 1 6 4】

QPCTLの更なる適切な阻害剤は、式1eのものであってもよい：

【化 1 3】



20

(1e)

式中、R⁴、及びR⁵は、実施例106～109において定義してある。

【表 9】

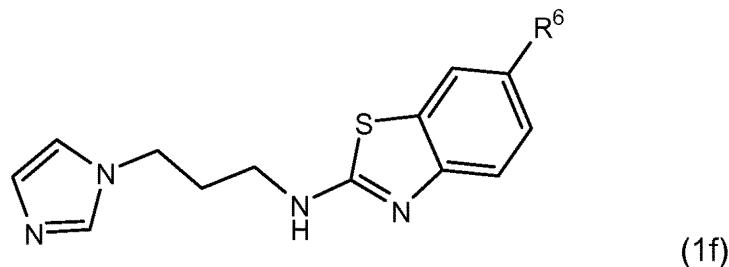
実施例	R ⁴	R ⁵	ESI-MS (M+H)
106(S)	H	メチル	335.5
107(R)	メチル	H	335.5
108	メチル	メチル	349.5
109	-CH ₂ -CH ₂ -		347.5

30

【0 1 6 5】

QPCTLの更なる適切な阻害剤は、式1fのものであってもよい：

【化 1 4】



40

式中、R⁶は、実施例110～112において定義してある。

【表 10】

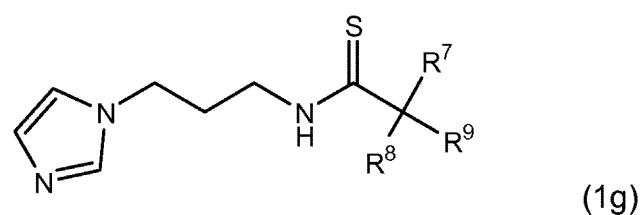
実施例	R ⁶	ESI-MS (M+H)
110	H	259.4
111	クロロ	293.8
112	メトキシ	289.4

10

【0166】

QPCTLの更なる適切な阻害剤は、1gのものであってもよい：

【化15】



20

式中、R⁷、R⁸、及びR⁹は、実施例113～132において定義してある。

【表11】

実施例	R ⁷	R ⁸	R ⁹	ESI-MS (M+H)
113	フェニル	H	H	260.4
114	チオフェン-2-イル	H	H	266.5
115(R)	フェニル	メチル	H	274.5
116(S)	フェニル	H	メチル	274.5
117	フェニル	H	エチル	288.5
118	フェニル	H	フェニル	336.5
119	3, 4-(ジメトキシ)- フェニル	H	H	320.5
120	3, 4-(ジメトキシ)- フェニル	メチル	メチル	347.2
121	4-(クロロ)-フェニル	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -		334.9
122	4-(クロロ)-フェニル	-CH ₂ -C ₂ H ₄ -CH ₂ -		349.0
123	4-(メトキシ)-フェニル	-CH ₂ -C ₃ H ₆ -CH ₂ -		358.6
124	4-(メトキシ)-フェニル	-CH ₂ -CH ₂ -		316.5
125	3, 4-(ジメトキシ)- フェニル	-CH ₂ -CH ₂ -		346.5
126	3, 4, 5-(トリメトキシ)- フェニル	-CH ₂ -CH ₂ -		376.6
127	2, 3, 4-(トリメトキシ)- フェニル	-CH ₂ -CH ₂ -		376.6
128	2-(メトキシ)-フェニル	-CH ₂ -CH ₂ -		316.5
129	3-(メトキシ)-フェニル	-CH ₂ -CH ₂ -		316.5
130	2, 3-(ジメトキシ)- フェニル	-CH ₂ -CH ₂ -		346.5
131	3, 5-(ジメトキシ)- フェニル	-CH ₂ -CH ₂ -		346.5
132	2, 5-(ジメトキシ)- フェニル	-CH ₂ -CH ₂ -		346.5

【0167】

QPCTLの更なる適切な阻害剤は、式1hのものであってもよい：

【化16】



式中、nは、実施例133～135において定義してある。

【表12】

10

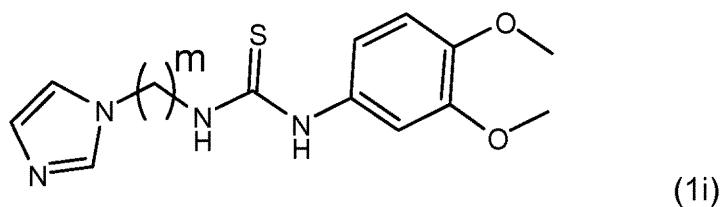
実施例	N	ESI-MS (M+H)
133	3	306.4
134	4	320.5
135	5	334.5

【0168】

QPCTLの更なる適切な阻害剤は、式1iのものであってもよい

20

【化17】



式中、mは、実施例136、及び137において定義してある。

【表13】

30

実施例	m	ESI-MS (M+H)
136	2	307.4
137	4	335.5

【0169】

QPCTLの更なる適切な阻害剤は、式138～141のものであってもよい。

40

【表14】

実施例	構造	ESI-MS (M+H)
138		347.5
139		347.2
140		226.3
141		370.4

10

20

30

40

50

【0170】

本明細書に使用される「アゴニスト」という用語は、QPCTLに結合したときに、QPCTLの効果を増加し、又はQPCTLの効果の期間を延長する分子をいう。アゴニストには、QPCTLに結合し、かつQPCTLの効果を調整するタンパク質、核酸、炭水化物、又はその他の任意の分子を含んでいてもよい。小分子は、有効なQPCTLアゴニストであると判明する可能性はあまりないが、アゴニストとしてQPCTLを結合するこのような小分子を同定するための方法には、QPCTLを結合する小分子の色素生産形態を、QPCTLを発現するベクターで形質転換された細胞内に送達すること、及び分光光度法によって蛍光、又はUV光吸収変化についてアッセイすることを含む。UV吸収、又は蛍光の量の増加により、小分子がQPCTL活性を増加させるアゴニストであることを確立するであろう。

【0171】

使用してもよい薬物スクリーニングのための別の技術は、公開されたPCT出願W084/03564に記載されているように、関心対象のタンパク質に対して適切な結合親和性を有する化合物の高スループットスクリーニングを提供する。この方法では、多数の異なる小さな試験化合物が、プラスチックピン、又はいくつかのその他の表面などの固形基質上で合成される。試験化合物をQPCTLと、又はその断片と反応させて、次いで、洗浄する。次いで、結合したQPCTLを当該技術分野において周知方法によって検出する。また、精製したQPCTLは、上述した薬物をスクリーニング技術に使用するために、プレート上に直接被覆することができる。或いは、非中和性抗体は、ペプチドを捕獲し、及び固体支持体上にそれを固定するために使用することができる。

【0172】

別の実施態様において、特異的にQPCTLを結合することができる中和抗体が、結合するQPCTLについて試験化合物と競合する競合薬スクリーニングアッセイを使用してもよい。このように、抗体は、1つ以上の抗原決定基をQPCTLと共有する任意のペプチドの存在を検出するために使用することができる。

【0173】

上記のように、結合部位を調査することによって、リガンドは、例えばその天然リガンドとするよりもQPCTLとより相互作用するようにデザインしてもよい。このようなアンタゴニストリガンドは、より高い親和性でQPCTLに結合し、競合的リガンドと同様に機能するであろう。或いは、天然のQPCTLのリガンド結合部位に相同意的、若しくは類似する合成、又は組換えタンパク質をデザインしてもよく、QPCTLに対して高親和性を有するその他の分子であってもよい。また、このような分子は、QPCTLに取って代わることができ、及び保護作用をもたらすはずである。

【0174】

上記のように、QPCTLの構造についての知識により、合成結合部位相同体、及び類似体をデザインすることが可能になる。このような分子は、標的の潜在的治療薬に対する結合特性の使用を非常に促進するであろうし、また、潜在的治療薬をスクリーニングするためこれらを使用してもよい。更にまた、これらは、モノクローナル抗体の產生における免疫原として使用してもよく、該抗体は、先に記述したように、それ自体を診断、及び/又は療法に使用してもよい。

10

【0175】

(治療的用途)

アミロイドペプチド、例えばA 1-42 (配列番号23)、及びA 1-40 (配列番号24)が、例えばアミノペプチダーゼ、又はジペプチジルアミノペプチダーゼなどのタンパク質分解酵素によってN-末端で切断されて、A -ペプチド3-42 (配列番号25)、3-40 (配列番号26)、11-42 (配列番号27)、及び11-40 (配列番号28)を生じることは、当該技術分野において公知である。これらの切断されたA -ペプチドは、N末端にてグルタミン酸残基で始まり、従って、QCのための基質 (また、WO2004/09862を参照されたい)、並びにおそらくまた配列番号11~18、21及び22のQPCTL、好ましくは配列番号11、12、21及び22のヒトisoQC、最も好ましくは配列番号11及び12のヒトisoQCのための基質である。生じる配列番号29~32のpGlu-A -ペプチドは、ピログルタミン酸化されていないペプチドよりもずっと疎水性であり、オリゴマー及び原纖維などのA -ペプチド凝集体を形成する傾向がずっとあり、かつ高度に神経毒であることが示された。最後に、配列番号29-32のA -ペプチドは、アルツハイマー病、及びダウント症候群の発症において重要な役割を果たす。

20

【0176】

従って、配列番号11~18、21及び22のQPCTLの阻害剤、好ましくは配列番号11、12、21及び22のヒトisoQC、最も好ましくは配列番号11及び12のヒトisoQCは、アミロイドペプチドに関連した疾患、特に神経変性疾患、特にアルツハイマー病、及びダウント症候群の治療のために使用してもよい。

30

【0177】

哺乳類におけるQPCTLのその他の潜在的な生理学的基質は、Glu¹-ABri (配列番号33)、Glu¹-ADan (配列番号34)、及びGln¹-ガストリン (17、及び34) (配列番号35、及び36) からなる群から選択される。これらのピログルタミン酸化された形態 (配列番号37-40) は、ヘリコバクターピロリ (*Helicobacter pylori*) 感染を伴う又は伴わない十二指腸癌、結直腸癌、ゾリンジャー・エリソン症候群、家族性英國認知症 (FBD)、及び家族性デンマーク認知症 (FDD) からなる群から選択されるものなどの病態を生じさせる。従って、QPCTLの阻害剤は、これらの病態を治療するために使用することができる。

40

【0178】

QPCTLの更なる潜在的な生理学的基質を表3に示してある。

【表15】

表3：N末端のグルタミン残基をもつ生理学的に活性なペプチドのアミノ酸配列

ペプチド	アミノ酸配列	機能
ガストリン17 (配列番号35) Swiss-Prot: P01350	QGPWL EEEEEAYGWM DF (アミド)	ガストリンは、胃粘膜を刺激して、塩酸を產生し、及び分泌し、かつ胰臓を刺激して、その消化酵素を分泌する。また、これは、平滑筋収縮を刺激し、かつ胃及び小腸における血液循環及び水分泌を増大する。
ニューロテンシン (配列番号41) Swiss-Prot: P30990	QLYENKPRRP YIL	ニューロテンシンは、脂質代謝の制御において内分泌又はパラクリンの役割を果たす。これは、平滑筋収縮を生じさせる。

10

20

ペプチド	アミノ酸配列	機能
FPP	QEP アミド	甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) に関連したトリペプチドは、精漿において見いだされる。インビトロ及びインビボで得られた最近の証拠は、FPPが精子生殖能力を調節するのに重要な役割を果たすことを示した。
TRH Swiss-Prot: P20396	QHP アミド	TRHは、脳下垂体前葉におけるTSHの生合成の制御因子として、かつ中枢神経系及び末梢神経系における神経伝達物質/神経調節物質として機能する。
GnRH (配列番号42) Swiss-Prot: P01148	QHWSYGL RP(G) アミド	性腺刺激ホルモンの分泌を刺激する；これは、黄体化及び卵胞刺激ホルモンの分泌の両方を刺激する。
CCL16 (小さな誘導性のサイトカイン A16) (配列番号43) Swiss-Prot: O15467	QPKVPEW VNTPSTCCLK YYEKVLPRRL VVGYRKALNC HLPAIIFVTK RNREVCTNPN DDWVQEYIKD PNLLPLPTRN LSTVKIITAK NGQPQLLNSQ	リンパ球及び单球に対して走化性の活性を示すが、好中球に対しては示さない。また、強力な骨髓抑制活性を示して、骨髓球前駆細胞の増殖を抑制する。組換えSCYA16は、单球及びTHP-1单球に対する走化性の活性を示すが、静止リンパ球及び好中球に対しては示さない。RANTESに対する事前の発現によって除感作されたTHP-1細胞におけるカルシウム流量を誘導する。
CCL8 (小さな誘導性のサイトカイン A8) (配列番号44) Swiss-Prot: P80075	QPDSVSI PITCCFNVIN RKIPIQRLES YTRITNIQCP KEAVIFKTKR GKEVCADPKE RWVRDMSMKHL DQIFQNLKP	单球、リンパ球、好塩基球及び好酸球を誘引する走化性因子。新形成及び炎症性宿主反応において役割を果たすであろう。このタンパク質は、ヘパリンを結合することができる。

10

20

30

40

ペプチド	アミノ酸配列	機能
CCL2 (小さな誘導性のサイトカインA2) (配列番号45) Swiss-Prot: P13500	QPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTIV AKEICADPKQ KWVQDSMDHL DKQTQTPKT	単球及び好塩基球を誘引するが、好中球又は好酸球を誘引しない走化性因子。単球抗腫瘍活性を増大する。乾癬様の単球浸潤、リウマチ様関節炎又はアテローム性動脈硬化症によって特徴づけられる疾患の病原に関係していた。アテローム性動脈硬化症の疾患過程の間に動脈壁への単球の補充に関与しているであろう。CCR2及びCCR4に結合する。
CCL18 (小さな誘導性のサイトカインA18) (配列番号46) Swiss-Prot: P55774	QVGTNKELC CLVYTSWQIP QKFIVDYSET SPQCPKPGVI LLTKRGRQIC ADPNKKWVQK YISDLKLNA	リンパ球を誘引するが、単球又は顆粒球を誘引しない走化性因子。リンパ節におけるB細胞小胞へのB細胞遊走に関与しているであろう。リンパ節において樹状細胞及び活性化マクロファージの方へナイーヴTリンパ球を誘引し、ナイーヴT細胞、CD4+及びCD8+ T細胞に対して走化性活性を有し、従って、体液性及び細胞性免疫反応の両方において役割を果たしているであろう。
フラクタルキン(ニューロタクチン) (配列番号47) Swiss-Prot: P78423	QHHGVT KCNITCSKMT SKIPVALLIH YQQQNQASC GK RAIILETRQH RLFCADPKEQ WVKDAMQHLD RQAAALTRNG GTFEKQIGEV KPRTTPAAGG MDESVVL EPE ATGESSSLEP TPSSQEAQRA LGTSP EPLPTG VTGSSGTRLP PTPKAQDGGP VGTELFRVPP VSTAATWQSS APHQPGPSLW AEAKTSEAPS TQDPSTQAST ASSPAPEENA PSEGQRVW GQ GQSPRPENSL EREEMGPVPA HTDAFQDWGP GSMAHVS VVP VSSEGTPSRE PVASGSWTPK AEEPIHATMD PQRLGVLITP VPDAQAATRR	可溶性形態は、T細胞及び単球に対して走化性であるが、好中球に対して走化性ではない。膜結合型形態は、内皮細胞に対するこれらの白血球の接着を促進する。内皮にて白血球接着及び遊走過程を調節するのに役割を果たしているであろう。cx3cr1に結合する。

10

20

30

40

ペプチド	アミノ酸配列	機能
	QAVGLLAFLG LLFCLGVAMF TYQSLQGCPK KMAGEMAEGL RYIPRSCGSN SYVLVPV	
CCL7 (小さな誘導性のサイトカインA7) (配列番号48) Swiss-Prot: P80098	QPVGINT STTCCYRFIN KKIPKQRLES YRRTTSSHCP REAVIFKTKL DKEICADPTQ KWVQDFMKHL DKKTQTPKL	単球及び好酸球を誘引するが、好中球を誘引しない走化性因子。単球抗腫瘍活性を増大する。また、ゼラチナーゼBの放出を誘導する。このタンパク質は、ヘパリンを結合することができる。CCR1、CCR2及びCCR3に結合する。
オレキシンA (低クレチニン病患者-1) (配列番号49) Swiss-Prot O43612	QPLPDCCRQK TCSCRLYELL HGAGNHAAGI LTL	おそらくこれらの相補恒常性機能の複雑な行動性の、及び生理的な反応を調和させることによって、摂食及び睡眠-覚醒状態の制御において有意な役割を果たす神経ペプチド。また、これは、エネルギー代謝の恒常的制御、自律神経機能、ホルモンバランス及び体液の制御においてより幅広い役割を果たす。オレキシン-Aは、高い親和性でOX1R及びOX2Rに結合する。
サブスタンスP (配列番号50)	RPK PQQFFGLM	タキキニンに属する。タキキニンは、ニューロンを刺激し、行動反応を呼び起こし、強力な血管拡張薬及び分泌促進物質であり、かつ(直接又は間接的に)多くの平滑筋を収縮させる、活性なペプチドである。

10

20

30

40

【0179】

ペプチドGln¹-ガストリン(17及び34アミノ酸長)、Gln¹-ニューロテンシン、及びGln¹-FPPは、QPCTLの新たな生理学的基質として同定された。ガストリン、ニューロテンシン、及びFPPは、これらのN末端の位置にpGlu残基を含む。このN末端のpGlu残基は、全てのペプチドに対するQPCTL触媒作用によってN末端のグルタミンから形成してもよい。その結果、これらのペプチドは、これらの生物学的機能に関して、N末端グルタミン残基のpGluへの変換により活性化される。

50

【0180】

経上皮伝達細胞、特にガストリン（G）細胞は、胃における食物の出現と胃酸分泌を連繋する。最近の研究は、複数の活性産物がガストリン前駆体から產生されること、及びガストリン生合成に複数の制御点があることを示した。生合成の前駆体、及び中間体（プロガストリン、及びGly-ガストリン）は、推定上の成長因子であり；これらの産物であるアミド化されたガストリンは、上皮細胞増殖、酸を產生する壁細胞、及びヒスタミンを分泌する腸クロム親和性細胞様（ECL）細胞の分化、並びにECLにおけるヒスタミン合成及び貯蔵と関連する遺伝子の発現を調節し、並びに酸分泌を急性的に刺激する。また、ガストリンは、上皮細胞成長因子（EGF）ファミリーのメンバーの產生を刺激し、次に壁細胞機能を阻害するが、表面上皮細胞の成長を刺激する。血漿ガストリン濃度は、十二指腸潰瘍疾患、及び胃癌のリスクが増大されたことが知られているヘリコバクターピロリ（*Helicobacter pylori*）を伴う対象において上昇する。（Dockray, G.J.の文献1999 *J Physiol* 515 315-324）。

10

【0181】

洞性（antral）G細胞から放出されるペプチドホルモンガストリンは、CCK-2受容体を介して、酸分泌粘膜におけるECL細胞からのヒスタミンの合成、及び放出を刺激することが知られている。動員されたヒスタミンは、壁細胞上に位置するH(2)受容体に結合することによって酸分泌を誘導する。最近の研究は、ガストリンが、その完全にアミド化された形態、及びあまりプロセスされていない形態（プロガストリン、及びグリシン伸長されたガストリン）の両方において、また、胃腸管のための成長因子であることを示唆する。アミド化されたガストリンの主要な栄養作用は、胃の酸分泌粘膜に対することが確立されており、ここで、これは、胃幹細胞、及びECL細胞の増殖の増加を生じさせて、壁側、及びECL細胞塊の増加を生じる。一方では、よりプロセスされていないガストリン（例えば、グリシン伸長されたガストリン）の主要な栄養標的は、結腸粘膜であると思われる（Koh, T.J. 及びChen, D.の文献 2000 *Regul Pept* 93:37-44）。

20

【0182】

更なる実施態様において、本発明は、活性なpGlu¹-ガストリン（配列番号39、及び40）の濃度を維持し、又は増加させることにより、哺乳類において、胃腸管細胞増殖、特に胃粘膜細胞増殖、上皮細胞増殖、酸を產生する壁細胞、及びヒスタミンを分泌する腸クロム親和性細胞様（ECL）細胞の分化、並びにECL細胞におけるヒスタミン合成及び貯蔵と関連する遺伝子の発現の刺激、並びに急性的酸分泌の刺激のための、QPCTLの活性を増加させるエフェクターの使用を提供する。

30

【0183】

更なる実施態様において、本発明は、不活性Gln¹-ガストリン（配列番号35、及び36）の活性なpGlu¹-ガストリン（配列番号39、及び40）への変換速度を低減させることによって、哺乳類におけるヘリコバクターピロリ（*Helicobacter pylori*）感染を伴う、又は伴わない十二指腸潰瘍疾患、及び胃癌の治療のためのQPCTLの阻害剤の使用を提供する。

【0184】

神経伝達物質系を特異的に調整する統合失調症の病態生理に関係する神経ペプチドであるニューロテンシン（NT）（配列番号41）は、この障害において制御されないことが以前に証明された。脳脊髄液（CSF）NT濃度が測定された臨床研究により、有効な抗精神病薬治療によって回復される、CSF NT濃度の低減した統合失調症患者のサブセットが明らかになった。また、抗精神病薬の作用機序におけるNT系の関与と一致する、かなりの証拠が存在する。中枢に投与されたNTの行動的、及び生化学的な効果は、全身投与された抗精神病薬に著しく似ており、抗精神病薬は、NT神経伝達を増大させる。この知見の連結により、NTが内因性抗精神病薬として機能するという仮説に至った。その上、典型的、及び非典型的な抗精神病薬は、黒質線条体、及び中脳辺縁系のドーパミン末端領域におけるNT神経伝達を差動的に変化させ、これらの効果は、それぞれ副作用の傾向、及び有効性を予測させる（Binder, E. B. らの文献、2001 *Biol Psychiatry* 50 856-872）。

40

【0185】

50

従って、本発明は、抗精神病薬の製造のための、及び／又は哺乳類における統合失調症の治療のための、QPCTLの活性を増加させるエフェクターの使用を提供する。QPCTLのエフェクターは、活性なpGlu¹-ニューロテンシンの濃度を維持し、又は増加させる。

【0186】

受精促進ペプチド(FPP)、すなわち甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)に関連したトリペプチドは、精漿において見いだされる。インビトロ、及びインビボで得られた最近の証拠は、FPPが精子生殖能力を調節するのに重要な役割を果たすことを示した。具体的には、FPPは、最初に非受精(受精能を獲得していない)精子を刺激して「スイッチを入れ」、より迅速に受精能をもつようになるが、しかしぬいで、受精能獲得を停止し、その結果、精子は、自発的な先体喪失を受けず、従って受精能を失わない。これらの反応は、アデニリルシクラーゼ(AC)/cAMPシグナル伝達経路を調節することが知られているアデノシンによって模倣され、かつ実際に増大される。FPP、及びアデノシンは両方とも、受精能を獲得していない細胞においてcAMP産生を刺激するが、受精能獲得細胞では、これを阻害することが示されており、FPP受容体は、どういうわけかアデノシン受容体、及びGタンパク質と相互作用して、ACの制御を達成する。これらのイベントは、種々のタンパク質のチロシンリン酸化状態に影響を及ぼし、一部は、最初の「スイッチを入れる」のに重要であり、その他は、おそらくそれ自身の先体反応に関与する。カルシトニン、及びアンジオテンシンIIは、また精漿においても見いだされ、受精能を獲得していない精子に対してインビトロにおいて同様の効果を有し、FPPに対する反応を増大することができる。これらの分子は、インビボで同様の効果を有し、受精能を刺激し、及び次いで維持することによって生殖能力に影響を及ぼす。FPP、アデノシン、カルシトニン、及びアンジオテンシンIIの利用能の低減、又はこれらの受容体の欠損のいずれも、男性不妊症に寄与する(Fraser, L.R.及びAdeoya-Osiguwa, S. A.の文献2001 Vitam Horm 63, 1-28)。

10

20

30

【0187】

更なる実施態様において、本発明は、受精抑制薬の製造のための、及び／又は哺乳類における生殖能力を低減させるための、QPCTLの阻害剤の使用を提供する。QPCTLの阻害剤は、活性なpGlu¹-FPPの濃度を低減させ、受精能獲得の予防、及び精細胞の非活性化を引き起こす。対照的に、QCの活性を増加させるエフェクターは、男性における生殖能力を刺激して、不妊症を治療することができる事が示され得た。

【0188】

更なる実施態様において、QPCTLの更なる生理学的基質を、本発明の範囲内で同定した。これらは、Gln¹-CCL2(配列番号45)、Gln¹-CCL7(配列番号48)、Gln¹-CCL8(配列番号44)、Gln¹-CCL16(配列番号43)、Gln¹-CCL18(配列番号46)、及びGln¹-フラクタルキン(配列番号47)である。詳細は、表3を参照されたい。これらのポリペプチドは、骨髄球性前駆細胞の増殖の抑制、新形成、炎症性宿主反応、癌、乾癬、リウマチ様関節炎、アテローム性動脈硬化症、体液性及び細胞性免疫反応、白血球接着、並びに内皮における遊走プロセスなどの病態生理学的状態において重要な役割を果たす。

【0189】

B型肝炎、ヒト免疫不全症ウイルス、及びメラノーマに対するいくつかの細胞障害性リンパ球ペプチドに基づいたワクチンが、最近臨床試験において研究された。1つの興味を起こさせるメラノーマワクチン候補は、単独の、又はその他の腫瘍抗原と組み合わせた、デカペプチドELAである。このペプチドは、N末端グルタミン酸をもつMelan-A/MART-1抗原免疫優性ペプチド類似体である。グルタミン酸のアミノ基及びカルボン酸基、並びにグルタミンのアミノ基及び-カルボキサミド基は、容易に縮合してピログルタミン酸の誘導体を形成することが報告された。この安定性問題を解決するために、医薬として関心のもたれるいくつかのペプチドでは、薬理学的性質の損失なしに、N末端グルタミン、又はグルタミン酸の代わりにピログルタミン酸をもつものが開発された。残念ながら、ELAと比較して、ピログルタミン酸誘導体(PyrELA)、更にはN末端のアセチルキャップされた誘導体(AcELA)は、細胞障害性リンパ球(CTL)活性を誘発することができなかった。PyrELA、及びAcELAに導入された見かけの軽微な修飾にもかかわらず、これらの2つの誘導体

40

50

は、特異的クラスI主要組織適合複合体に対しておそらくELAよりも低い親和性を有する。結果的に、ELAの完全な活性を保存するためには、PyrELAの形成を回避されなければならない(Beck A. らの文献、2001、J Pept Res 57 (6) : 528-38)。最近では、また、酵素グルタミルシクラーゼ (QC) がメラノーマにおいて過剰発現されることが見いだされた (Ross D. T らの文献、2000、Nat Genet 24 : 227-35)。

【 0190 】

従って、本発明は、骨髄球前駆細胞の増殖の抑制、新形成、炎症性宿主反応、癌、悪性転移、メラノーマ、乾癬、リウマチ様関節炎、アテローム性動脈硬化症、障害された体液性、及び細胞性免疫反応、白血球接着、並びに内皮における遊走プロセスなどの病態生理学的状態の治療のための医薬の製造のための、QPCTLの阻害剤の使用を提供する。

10

【 0191 】

更にまた、Gln¹-オレキシンA (配列番号49) は、本発明のQPCTLの生理学的な基質として同定された。オレキシンAは、おそらくこれらの相補恒常性機能の複雑な行動性の、及び生理的な反応を調和させることによって、摂食、及び睡眠-覚醒状態の制御において有意な役割を果たす神経ペプチドである。また、これは、エネルギー代謝の恒常的制御、自律神経機能、ホルモンバランス、及び体液の制御においてより幅広い役割を果たす。

【 0192 】

更なる実施態様において、本発明は、摂食、及び睡眠-覚醒状態の障害、エネルギー代謝の恒常性制御の障害、自律神経機能の障害、ホルモンバランスの障害、及び体液の制御の障害の治療のための医薬の製造ための、QPCTLの阻害剤の使用を提供する。

20

【 0193 】

いくつかのタンパク質におけるポリグルタミン膨張は、パーキンソン病、及びケネディ病などの神経変性障害を引き起こす。従って、メカニズムは、大部分、未知のままである。ポリグルタミンリピートの生化学的特性は、1つの説明可能性を示唆する：グルタミル-グルタミル結合における内部溶解性の切断、続くピログルタミン酸形成は、異化安定性、疎水性、アミロイド形成 (amyloidogenicity) 、及びポリグルタミルタンパク質の神経毒性を増大することによって病変形成に寄与し得る (Saido, T の文献 ; Med Hypotheses (2000) Mar ; 54 (3) : 427-9)。従って、本発明は、それゆえ、パーキンソン病、及びハンチントン病の治療のための医薬の製造のための、QPCTLの阻害剤の使用を提供する。

30

【 0194 】

QPCTLの更なる基質は、ペプチドQYNAD (配列番号51) である。そのピログルタミン酸化された形態pGlu-Tyr-Asn-Ala-Asp (pEYNAD) (配列番号52) は、電位開口型ナトリウムチャネルの活性を遮断するのに有効な薬剤である。ナトリウムチャネルは、有髓軸索において高密度に発現され、哺乳動物脳、及び脊髄内で軸索に沿って活動電位を伝導するのに必須の役割を果たす。従って、これらは、多発性硬化症 (MS) 、ギランバレー症候群、及び慢性炎症性脱髓性多発神経根筋障害の病態生理のいくつかの態様に関与すると推測される。

【 0195 】

更なる実施態様において、本発明は、炎症性自己免疫疾患の治療のための、特に多発性硬化症、ギランバレー症候群、及び慢性炎症性脱髓性多発神経根筋障害のための医薬の製造のためのQPCTLの阻害剤の使用であって、電位開口型ナトリウムチャネル遮断するペプチドpEYNADの形成が阻害される、前記使用を提供する。

40

【 0196 】

更にまた、本発明は、QC-阻害剤を含む、診断アッセイを提供する。

【 0197 】

別の実施態様において、本発明は、上述した疾患、及び / 又は状態のいずれか1つを診断する方法であって、以下の工程を含む、方法を提供する；

前記疾患、及び / 又は状態に苦しめられていることが疑われる対象から試料を収集する工程、

50

前記試料をQC-阻害剤と接触する工程、

前記対象が前記疾患、及び／又は状態によって苦しめられているかどうかを決定する工程。

【0198】

好ましくは、前記診断方法における試料は、血液試料、血清試料、脳脊髄液の試料、又は尿試料である。好ましくは、前記診断方法における対象は、ヒトである。好ましくは、前記診断方法におけるQC阻害剤は、選択的QC阻害剤である。選択的QPCTL阻害剤は、前記診断アッセイにおける使用のために好ましい。

【0199】

本発明は、検出手段として上述した診断アッセイ、及び決定手段を含む診断方法を実施するための診断キットに属する。

【実施例】

【0200】

(実施例1：ヒトisoQCの製造)

(株化細胞、及び培地)

アフリカミドリザル腎臓株化細胞COS-7、ヒト神経芽細胞腫株化細胞SH-SY5Y、ヒト星細胞腫株化細胞LN405、ヒトケラチノサイト腫(keratinocytoma)株化細胞HaCaT、及びヒト肝臓癌株化細胞Hep-G2は、適切な細胞培地(Cos-7、SH-SY5Y、LN405、HaCaTのためには、DMEM、10% FBS)(Hep-G2のためには、RPMI1640、10%のFBS)中で、5% CO₂(HaCaT、Hep-G2、COS-7)、又は10% CO₂(SH-SY₅Y、LN405)の加湿された雰囲気において、37にて培養した。

【0201】

(RT-PCRを使用するヒトisoQC発現の解析)

総RNAを、RNeasy Mini Kit (Qiagen)を使用してSH-SY5Y、LN405、HaCaT、及びHep-G2細胞から単離して、SuperScript II (Invitrogen)によって逆転写した。その後、ヒトisoQCを、プライマーisoQCh-1(センス、配列番号：53)、及びisoQCh-2(アンチセンス、配列番号：54)を使用して、Herculase Enhanced DNA-Polymerase (Stratagene)での25 μl反応において、産生されたcDNA産物の1：12,5希釈に対して増幅した。Hep-G2のPCR産物を、Strataprep PCR Purification Kit (Stratagene)を利用して精製し、シーケンシングによって確認した。

【0202】

(結果)

(RT-PCRを使用するヒトisoQC発現の解析)

ヒトisoQCの転写物は、株化細胞SH-SY5Y(図6、レーン1)、LN405(図6、レーン2)、HaCaT(図6、レーン3)、及びHep-G2(図6、レーン4)に存在することが見いだされた。Hep-G2のPCR産物をシーケンシングによって確認した。

【0203】

(ヒトisoQCの単離)

ヒトisoQCの全長cDNAは、RT-PCRを使用してHep-G2細胞から単離した。簡潔には、Hep-G2細胞の総RNAをSuperScript II (Invitrogen)によって逆転写した。その後、ヒトisoQCをプライマーisoQChu-1(センス、配列番号：55)、及びisoQChu-2(アンチセンス、配列番号：56)を使用して、Herculase Enhanced DNA-Polymerase (Stratagene)での25 μl反応において、産生されたcDNA産物の1：12,5希釈に対して増幅した。生じるPCR-産物をベクターpPCRScript CAM SK(+) (Stratagene)にサブクローニングして、シーケンシングによって確認した。

【0204】

(実施例2：哺乳動物細胞培養におけるヒトisoQCの製造、及び発現)

(ヒトisoQC-EGFP融合タンパク質をコードするプラスミドベクターの分子クローニング)

全てのクローニング手順は、標準的な分子生物学技術を適用して行った。ヒト細胞にお

10

20

30

40

50

けるヒトisoQC-EGFP融合タンパク質の発現については、ベクターpEGFP-N3 (Invitrogen)を使用した。メチオニンIにて、又はメチオニンIIにて、いずれかで始まる天然のヒトisoQCのcDNAを、高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP)をコードするプラスミドとインフレームでN-末端に融合した。プライマーisoQC EGFP-1Met I (配列番号:57)、及びisoQC EGFP-3、(配列番号:59)をメチオニンIで始まるヒトisoQCの増幅のために使用し、プライマーisoQC EGFP-2 Met II (配列番号:58)、及びisoQC EGFP-3 (配列番号:59)をメチオニンIIで始まるヒトisoQCの増幅のために使用した。断片を、EcoRI、及びSalIの制限部位を使用して、ベクターpEGFP-N3 (Invitrogen)に挿入し、正確な挿入をシーケンシングによって確認した。その後、ベクターを、EndoFree Maxi Kit (Qiagen)を使用して、細胞培養目的のために単離した。

10

【0205】

(hisQCのN末端の配列のクローニング手順)

加えて、ベクターpEGFP-N3 (Invitrogen)のEGFP配列を、増幅のために、EGFP-1 (センス) (配列番号:85)、及びEGFP-2 (アンチセンス) (配列番号:86)を使用して、ベクターpcDNA 3.1 (Invitrogen)に導入した。断片をpcDNA 3.1のXbaI部位に導入した。メチオニンI、及びIIで始まり、それぞれセリン53にて終わるhisQCのN末端の配列を、メチオニンIで開始するhisQCのN末端の断片については、isoQC EGFP-1 Met I (センス、配列番号:57)、及びhisQC ss EGFP pcDNA as (アンチセンス) (配列番号:87)を使用して、並びにメチオニンIIで開始するhisQCのN末端の断片については、isoQC EGFP-2 Met II (センス、配列番号:58)、及びhisQC ss EGFP pcDNA as (アンチセンス) (配列番号:87)を使用して、ベクターpcDNA 3.1のEGFPとC末端に融合した。断片をベクターpcDNA 3.1のEcoRI、及びNotI制限部位に挿入した。その後、ベクターを、EndoFree Maxi Kit (Qiagen)を使用して、細胞培養目的のために単離した。

20

【0206】

(hisQC、及びhQCの天然の発現のためのクローニング手順)

hQCについてプライマーhQC-1 (センス) (配列番号:82)、及びhQC-2 (アンチセンス) (配列番号:83)を、メチオニンIで開始するhisQCについてisoQC EGFP-1 Met I (センス) (配列番号:57)、及びhisQC pcDNA (アンチセンス) (配列番号:84)を、並びにメチオニンIIで開始するhisQCについてisoQC EGFP-2 Met II (センス) (配列番号:58)、及びhisQC pcDNA as (アンチセンス) (配列番号:84)を利用する増幅後に、天然のhQCは、ベクターpcDNA 3.1 (+) (Invitrogen)のHindIII、及びNotI制限部位に挿入し、天然のhisQCは、EcoRI、及びNotI制限部位に挿入した。

30

【0207】

(FLAGタグを付けたhisQC、及びhQCのためのクローニング手順)

ヒトQCは、プライマーhQC-1 (センス) (配列番号:82)、及びhQC C-フラグpcDNA as (アンチセンス) (配列番号:88)を適用して増幅後に、ベクターpcDNA 3.1のHindIII、及びNotI制限部位に、C末端のFLAG-タグと共にクローニングした。ヒトisoQCは、メチオニンIで開始するhisQCについてプライマーisoQC EGFP-1 Met I (センス) (配列番号:57)、及びhisQC C-フラグpcDNA as (アンチセンス) (配列番号:89)、並びにメチオニン2で開始するhisQCについてプライマーisoQC EGFP-2 Met II (センス) (配列番号:58)、及びhisQC C-フラグpcDNA as (アンチセンス) (配列番号:89)を使用する増幅後に、pcDNA 3.1にC末端のFLAG-タグと共に挿入した。

40

【0208】

(実施例3: 哺乳動物細胞におけるヒトisoQCの免疫組織化学染色)

(COS-7、及びLN405のトランスフェクション、及び組織化学染色)

メチオニンI、又はメチオニンIIのいずれかで始まるヒトisoQC-EGFP融合タンパク質の発現のために、COS-7、及びLN405を、カバーガラスを含む6ウェルディッシュにおいて培養した。細胞は、80%の集密度まで培養して、製造業者のマニュアルに従ってLipofectamine2000 (Invitrogen)を使用してトランスフェクトし、5時間の間トランスフェクション溶液中でインキュベートした。その後、溶液を適切な培養培地に置き換えて、細胞を一晩培

50

養した。

【0209】

その翌日、細胞をD-PBS (Invitrogen) で2回洗浄して、-20 にて10分間、氷冷メタノールを使用して固定し、続いて室温にて10分間D-PBSを使用して3回洗浄した。ゴルジ帯域を染色するために、COS-7、及びLN405を3時間の間ウサギ抗マンノシダーゼIIポリクローナル抗体 (Chemicon) と共に、D-PBS中の1:50希釈抗体でインキュベートした。COS-7、及びLN405におけるミトコンドリアの染色のためには、細胞を室温にて3時間の間、マウス抗ヒトミトコンドリアモノクローナル抗体 (Chemicon) と共に、D-PBS中の1:100希釈抗体でインキュベートした。その後、細胞を10分間D-PBSで3回洗浄した。ゴルジ帯域について染色した細胞をローダミン-RedX (Dianova) と抱合したヤギ抗ウサギIgG二次抗体と共に、暗がりで室温にて45分間インキュベートした。ミトコンドリアについて染色した細胞を、ローダミン-RedX (Dianova) と抱合したヤギ抗マウスIgG二次抗体と共に暗がりで室温にて45分間インキュベートした。その後、細胞を室温で5分間D-PBSで3回洗浄し、少なくとも、カバーガラスをシティフラワー (citiflour) と共に顕微鏡スライド上に乗せた。細胞を蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss) 下で観察した。

10

【0210】

(結果)

(1. LN405のトランスフェクション、及び組織化学染色)

株化細胞LN405におけるメチオニンI、及びメチオニンIIで開始するヒトisoQC-EGFP融合タンパク質の発現 (緑蛍光) は、生じるタンパク質の区画化を引き起こす。マンノシダーゼII抗体 (赤蛍光) を使用するLN405のゴルジ帯域の対比染色、及びその後のマンノシダーゼIIとヒトisoQC-EGFPの重ね合せは、ゴルジコンパートメント内のヒトisoQC-EGFP融合タンパク質の局在化を示唆する (マージされたイメージの黄色の呈色) (図7,9)。これにより、メチオニンIIにて開始するヒトisoQCは、ヒトisoQC融合タンパク質のゴルジ局在化を生じるために十分であることが明らかである。

20

【0211】

メチオニンI、及びII (緑蛍光) で開始するヒトisoQC-EGFP融合タンパク質の発現、及びミトコンドリア (赤蛍光) についての対比染色では、重ね合せ後にマージされたイメージの黄色の呈色の非存在のため、ミトコンドリア内のメチオニンI、又はIIで開始するヒトisoQC-EGFP融合タンパク質の局在化を明らかにしなかった (図8、10)。

30

【0212】

(2. Cos-7のトランスフェクション、及び組織化学染色)

株化細胞LN405におけるメチオニンI、及びメチオニンIIで開始するヒトisoQC-EGFP融合タンパク質の発現に類似して、メチオニンI、及びメチオニンIIで開始するヒトisoQC-EGFP融合タンパク質の発現は、COS-7において、生じるタンパク質の区画化を引き起こす (緑蛍光)。マンノシダーゼII抗体 (赤蛍光) を使用するCOS-7細胞のゴルジ帯域の対比染色、及びその後のマンノシダーゼIIとヒトisoQC-EGFPの重ね合せは、COS-7のゴルジコンパートメント内のヒトisoQC-EGFP融合タンパク質の局在化を示唆する (マージされたイメージの黄色の呈色) (図11,13)。また、COS-7細胞において、メチオニンIIにて開始するヒトisoQC-EGFP融合タンパク質の発現は、ゴルジ局在化を生じさせるために十分である。

40

【0213】

予想通り、COS-7におけるメチオニンI、及びIIで開始するヒトisoQC-EGFP融合タンパク質の発現 (緑蛍光)、及びミトコンドリアについての対比染色 (赤蛍光) では、重ね合せ後にマージされたイメージの黄色の呈色の非存在のため、メチオニンI、又はIIで開始するヒトisoQC-EGFP融合タンパク質の局在化を生じなかった (図12,14)。

【0214】

(実施例4: 大腸菌 (E. coli) におけるヒトisoQCの発現、及び精製)

(宿主株、及び培地)

大腸菌 (Escherichia coli) 株DH5をプラスミドの増殖のために使用し、大腸菌 (E. coli) 株BL21をヒトisoQCの発現のために使用した。大腸菌 (E. coli) 株は、製造業者の説

50

明書 (Qiagen (DH5) Stratagene (BL21)) に従って培養し、形質転換して、解析した。大腸菌 (E. coli) のために必要とされる培地、すなわちルリア・バルダニ (Luria-Bertani) (LB) 培地は、製造業者の推奨に従って製造した。

【0215】

(ヒトQCをコードするプラスミドベクターの分子クローニング)

全てのクローニング手順には、標準的な分子生物学技術を適用した。大腸菌 (E. coli) BL21における発現のためには、ベクター pET41a (Novagen) を使用した。コドン30 (メチオニンIIから計数) で開始する成熟ヒトisoQCのcDNAを、GST-タグをコードするプラスミドとインフレームで融合した。プライマー-hisoQC pET41a-1 (配列番号: 60)、及びhis oQC pET41a-2 (配列番号: 61) (表4) を利用する増幅の後、エンテロキナーゼ、及びC末端 (His)₆-タグのためのN末端のプロテアーゼ切断部位を導入した。サブクローニング後、断片を、Spe I、及びEcoR I制限部位を使用して発現ベクターに挿入した。

10

【0216】

(大腸菌 (E. coli) BL21における発現、及び精製)

ヒトisoQCをコードする構築物をBL21細胞 (Stratagene) に形質転換して、選択的LB寒天板上で37 にて培養した。タンパク質発現は、1%グルコースを含むLB培地において37 にて実施した。およそ0.8のOD₆₀₀に到達後、isoQC発現を20 μM IPTGで37 にて4時間誘導した。細胞を遠心分離 (4000 × g、20分) によって培地から分離して、PBS (140mM NaCl、2,7mM KCl、10mM Na₂HPO₄、1,8mM KH₂PO₄、pH 7,3) に再懸濁して、凍結解凍の1サイクル、続いてフレンチプレスの1サイクルによって溶解した。細胞可溶化物を、リン酸含有緩衝液 (50mM Na₂HPO₄、500mM NaCl pH 7,3) を使用して1.5lの最終容積に希釈して、13.400 × gで4 にて1時間遠心分離した。遠心分離後、生じる上清タンパク質濃度を、プラッドフォード法を使用して決定した。必要に応じて、溶液を再び希釈して、0.6mg/mlの最終的な総タンパク質濃度を得た。GST-isoQC融合タンパク質は、4工程プロトコル (表5) を利用して精製した。精製は、図20におけるSDS-PAGE解析によって例証される。

20

【0217】

(実施例5: グルタミニルシクラーゼ活性についてのアッセイ)

(蛍光定量的アッセイ)

全ての測定は、30 にてマイクロプレート (BMG Labtechnologies) のためのNovoStarリーダーで行った。QC活性は、最終的容積で、H-Gln- NAを使用して蛍光定量的に評価した。試料は、0.2mM 蛍光発生基質、0.05M Tris/HCl、pH 8.0中の0.25Uピログルタミルアミノペプチダーゼ (Qiagen、Hilden、Germany)、及び250 μlのQCの適切に希釈された一定分量からなった。励起波長 / 放出波長は、320/410nmであった。アッセイ反応は、グルタミニルシクラーゼの添加によって開始した。QC活性は、アッセイ条件下での -ナフチルアミンの標準曲線から決定した。1単位は、記述された条件下で1分あたりにH-Gln- NAから1 μ モルpGlu- NAの形成を触媒するQCの量として定義される。

30

【0218】

第2の蛍光定量的アッセイでは、QC活性は、基質としてH-Gln-AMCを使用して決定した。反応は、マイクロプレート (BMG Labtechnologies) のためのNOVOSTarリーダーを利用して30 にて実施した。試料は、250 μlの最終的容積で、様々な濃度の蛍光発生基質、0.05MのTris/HCl、pH 8.0中の0.1Uピログルタミルアミノペプチダーゼ (Qiagen)、及びQCの適切に希釈された一定分量からなった。励起波長 / 放出波長は、380/460nmであった。アッセイ反応は、グルタミニルシクラーゼの添加によって開始した。QC活性は、アッセイ条件下で7-アミノ-4-メチルクマリンの標準曲線から決定した。動力学的データは、GraFitソフトウェアを使用して評価した。

40

【0219】

(isoQCの分光光度アッセイ)

このアッセイを使用して、大部分のQC基質についての動力学的パラメーターを決定した。QC活性は、補助的酵素としてグルタミン酸脱水素酵素を利用する連続法 (Schilling, S. らの文献、2003 Biol Chem 384、1583-1592) を使用して、分光光度的に解析した。試料

50

は、250 μlの最終的な容積で、それぞれのQC基質、0.3mM NADH、14mM -ケトグルタル酸、及び30U/mlグルタミン酸脱水素酵素からなった。反応をQCの添加によって開始して、340nmにて吸光度の低減のモニタリングによって8~15分間追跡した。初速度を評価して、酵素活性をアッセイ条件下でのアンモニアの標準曲線から決定した。全ての試料は、マイクロプレートのためのSunriseリーダーを使用して30 にて測定した。動力学的データは、GraFitソフトウェアを使用して評価した。

【 0 2 2 0 】

(阻害剤アッセイ)

阻害剤試験については、試料組成は、推定上の阻害化合物を添加したこと以外、上記と同じであった。QC-阻害の迅速試験については、試料には、4mMのそれぞれの阻害剤、及び1K_Mの基質濃度を含んだ。阻害の詳細な研究、及びK_i値の決定については、補助的酵素に対する阻害剤の影響を最初に調査した。全ての場合において、検出した酵素のいずれに対しても影響はなく、従って、QC阻害の信頼できる決定が可能であった。阻害定数は、GraFitソフトウェアを使用して、競合阻害についての一般的な方程式に対してプログレス曲線のセットをフィットすることによって評価した。

10

【 0 2 2 1 】

(結果)

様々な異なる基質を、ヒトisoQCによる変換について評価した(表3)。全ての解析した基質は、isoQCによって変換され、ヒトQCと同様の比較的緩い全体的特異性を示した(Schilling, S.らの文献、2003 Biol Chem 384、1583-1592)。ヒトQCについて以前に観察されたように(Schilling, S.らの文献、2003 Biol Chem 384、1583-1592)、最高の特異性定数(k_{cat}/K_M)は、N末端のグルタミニル残基、例えばGln-AMCに隣接する大きな疎水性アミノ酸を有する基質について観察された。対照的に、Gln-Gluについて観察されたように、まさしくその位置における負に荷電した残基は、急激なドロップイン(drop in)特異性を生じ、isoQCの負に荷電した活性部位を示している。ヒトQCと比較して、両方の組換えisoQCは、より低い酵素活性を発揮した(図21)。相違は、1桁までであった。isoQCの特異性によれば、酵素がインビボで異なる基質の変換のための役割を担う、すなわちisoQCが多くの異なる生理学的基質の产生に関与すると仮定することは理にかなっている。

20

【 0 2 2 2 】

ヒトisoQC活性は、イミダゾール誘導体によって競合的に阻害された(表6、図15)。イミダゾール、及びベンズイミダゾールについての阻害定数K_iは、以前にヒトQCについて得られた値と非常に似ていた。しかし、10倍のドロップインK_iが、強力なQC阻害剤P150/03について観察された。従って、キレート部分、すなわちイミダゾール環の結合様式は、非常に似ているものと思われる。おそらく、これは、イミダゾール塩基性窒素によるQC、及びisoQCの活性部位亜鉛イオンの複合体形成によって生じる。P150/03についてのK_i値の相違は、両酵素の活性部位が微妙な相違を示すことを明らかに示す。従って、1つの酵素アソシフォームに対して選択性を発揮する阻害剤を作製することが可能である。選択性的阻害剤は、疾患の治療のために有益である。

30

【 0 2 2 3 】

【表16】

表3：ヒトQC及びヒトisoQCのペプチド基質の動力学的な評価。ヒトisoQCは、大腸菌 (*E. coli*)、BL21 (hisoQCdt)、又は *P. pastoris* (YSShisoQC)において発現した。基質は、アミノ酸の1文字コードで示してある。

基質	K_M (mM) hisoQCdt	K_M (mM) YSShisoQC	k_{cat} (s ⁻¹) hisoQCdt	k_{cat} (s ⁻¹) YSShisoQC	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹) hisoQCdt	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹) YSShisoQC
Q-βNA	0,03±0,002	0,035±0,0005	3,37±0,12	8,16±0,87	93,26±6,68	228,70±22,22
QAMC	0,01±0,0009	0,03±0,0064	1,07±0,03	3,72±0,44	62,57±5,68	102,87±29,22
QQ	0,11±0,027	0,11±0,007	2,72±0,25	6,08±0,17	24,50±4,009	54,32±4,61
QE	0,7±0,13	0,61±0,064	2,64±0,21	5,33±0,43	3,85±0,56	8,75±0,87
QG	0,42±0,04	0,36±0,047	1,65±0,04	3,24±0,18	3,93±0,31	9,01±1,75
QGP	0,21±0,016	0,23±0,02	4,01±0,14	8,98±0,07	18,82±1,26	38,42±3,55
QYA	0,22±0,01	0,08±0,022	7,7±0,4	16,47±0,72	66,48±13,07	206,9±57,54
QFA	0,11±0,016	0,104±0,025	7,49±0,28	11,68±2,39	33,03±2,38	116,99±34,37
QEYF	0,03±0,004	0,04±0,004	3,34±0,15	5,64±0,39	109,57±21,03	122,56±5,6
QEDL	0,63±0,052	0,16±0,01	6,41±0,15	9,24±0,65	10,2±0,84	55,04±5,14

【0 2 2 4】

【表17】

10

20

表4：利用したプライマー

プライマー	配列 5' → 3'	適用
IsoQCh-1 (配列番号 53)	GGTCTACACCATTGGAGCGGGCTGGC	株化細胞 スクリーニング
IsoQCh-2 (配列番号 54)	GGGTTGGAAGTACATCACCTCCTGGGG	株化細胞 スクリーニング
IsoQChu-1 (配列番号 55)	ACCATGCGTCCGGGGCCGCGGG	hisoQCの 単離
IsoQChu-2 (配列番号 56)	ACGCTAGAGCCCCAGGTATTAGCCAG	hisoQCの 単離
IsoQC EGFP-1 Met I (配列番号 57)	ATATATGAATTCATGCGTCCGGGGCCGC	ベクターpEGFP- N3へのヒトisoQC (Met I)の クローニング

30

40

プライマー	配列 5' → 3'	適用
IsoQC EGFP-2 Met II (配列番号 58)	ATATATGAATTCATGGAGCCACTCTTGCCGCCG	ベクターpEGFP-N3へのヒトisoQC (Met II) クローニング
IsoQC EGFP-3 (配列番号 59)	ATATATGTCGACGAGCCCCAGGTATTAGCCAG	ベクターpEGFP-N3へのヒトisoQC (Met I およびMet II) クローニング
HisoQC pET41a-1 (配列番号 60)	ATATACTAGTGATGACGAC GACAAGTTCTACACCATTGGAGCG	ベクターpET41aへのヒトisoQC クローニング
HisoQC pET41a-2 (配列番号 61)	TATAGAATTCCCTAGTGATGGT GATGGTGATGGAGCCCCAGGTATTAGC	ベクターpET41aへのヒトisoQC クローニング
hisoQC HIS C-Term pPICZAA-1 (配列番号 62)	ATA TGA ATT CTT CTA CAC CAT TTG GAG C	ベクターPPICZ αAへのヒトisoQCクローニング
hisoQC HIS N-Term pPICZAA-1 (配列番号 63)	ATA TGA ATT CCA TCA CCA TCA CCA TCA CTT CTA CAC CAT TTG GAG CGG C	ベクターPPICZ αAへのヒトisoQCクローニング
hisoQC HIS N-Term pPICZAA-2 (配列番号 64)	5'- ATA TAT GCG GCC GCC TAG AGC CCC AGG TAT TCA GC-3'	ベクターPPICZ αAへのヒトisoQCクローニング
isoQCm RT s (配列番号 65)	CCA GGA TCC AGG CTA TTG AG	isoQCのリアルタイムPCR解析
hisoQC HIS C-Term pPICZAA-2 (配列番号 66)	ATA TAT GCG GCC GCC TAG TGA TGG TGA TGG TGA TGG AGC CCC AGG TAT TCA GCC AG	ベクターPPICZ αAへのヒトisoQCクローニング
isoQCm RT as (配列番号 67)	TTC CAC AGG GCC GGG GGG C	isoQCのリアルタイムPCR解析
isoQCm MetI s (配列番号 68)	ATG AGT CCC GGG AGC CGC	マウスisoQC cDNAのクローニング

10

20

30

40

プライマー	配列 5' → 3'	適用
isoQCm Met1 as (配列番号 69)	CTA GAG TCC CAG GTA CTC	マウス isoQC cDNAのクローニング
isoQCm kurz s (配列番号 70)	AGT TCC TGC CCC TGC TGC TG	マウス isoQC cDNAのクローニング
mQC RT s (配列番号 71)	ATC AAG AGG CAC CAA CCA AC	mQCのリアルタイムPCR解析
mQC RT as (配列番号 72)	CTG GAT AAT ATT TCC ATA G	mQCのリアルタイムPCR解析
mQC RT N-terminal s (配列番号 73)	ACA GCT GGG AAT CTG AGT C	mQCのリアルタイムPCR解析
mQC RT N-terminal as (配列番号 74)	GAG CAG AAT AGC TTC CGG GCG	mQCのリアルタイムPCR解析
Iso-l55Ns (配列番号 75)	CTG CGG GTC CCA TTG AAC GGA AGC CTC CCC GAA	部位特異的変異誘発 hisoQC l55N
Iso-l55Nas (配列番号 76)	TTC GGG GAG GCT TCC GTT CAA TGG GAC CCG CAG	部位特異的変異誘発 hisoQC l55N
Iso-C351As (配列番号 77)	ACG GTA CAC AAC TTG GCC CGC ATT CTC GCT GTG	部位特異的変異誘発 hisoQC C351A
Iso-C351Aas (配列番号 78)	CAC AGC GAG AAT GCG GGC CAA GTT GTG TAC CGT	部位特異的変異誘発 hisoQC C351A
hQC-1 (配列番号 82)	ATATATAAGCTTATGGCAGGCGGAAGACAC	pcDNA 3.1への天然のhQCの挿入
hQC-2 (配列番号 83)	ATATGCGGCCGCTTACAAATGAAGATATTCC	pcDNA 3.1への天然のhQCの挿入
hisoQC pcDNA as (配列番号 84)	ATATATGCGGCCGCTAGAGCCCCAGGTATTCA	pcDNA 3.1への挿入のための終止コドンを含む hisoQCの増幅

10

20

30

40

プライマー	配列 5' → 3'	適用
EGFP-1 (配列番号85)	ATATCTGAGTCCATGCCACCATGGTGAGC	増幅 EGFP
EGFP-2 (配列番号86)	ATATCTGAGTTACTTGTACA GCTCGTCCAT	増幅 EGFP
hisoQC SS EGFP pcDNA as (配列番号87)	ATATCGGGCCGCATGTCGACGCTCAAATGGTAGAACGC	増幅 hisoQC N末端配列
hQC C-FLAG pcDNA as (配列番号 88)	ATATCGGGCCGCTTACTTGTCAATCGTCATCCTTGTAAATC CAAATGAAGATATTCCAA	増幅 hQC C-FLAG
hisoQC C-FLAG pcDNA as (配列番号 89)	ATATCGGGCCGCCTACTTGTCAATCGTCATCCTTGTAAATC ATCGAGCCCCAGGTATTCAAGC	増幅 h-isoQC C-Flag
Hs_QPCT_1_SG	QuantiTect Primer Assay (200), Qiagen, Hilden	qPCR hQC
Hs_QPCTL_1_SG	QuantiTect Primer Assay (200), Qiagen, Hilden	qPCR h-isoQC
CCL2-F (配列番号 90) CCL2-R (配列番号 91)	GCCTCCAGCATGAAAGTCTC CAGATCTCCTTGGCCACAAT	qPCR CCL2
CCL7-F (配列番号 92) CCL7-R (配列番号 93)	ATGAAAGCCTCTGCAGCACT TGGCTACTGGTGGTCCTTCT	qPCR CCL7
CCL8-F (配列番号 94) CCL8-R (配列番号 95)	TCACCTGCTGCTTAACTGT ATCCCTGACCCATCTCTCCT	qPCR CCL8
CCL13-F (配列番号 96) CCL13-R (配列番号 97)	ATCTCCTTGCAGAGGCTGAA AGAAGAGGAGGCCAGAGGAG	qPCR CCL13
HIF1 α -F (配列番号 98) HIF1 α -R (配列番号 99)	CACAGAAATGGCCTTGTGAA CCAAGCAGGTCAAGGTGGT	qPCR HIF1 α
AIM1-F (配列番号 100)	TCCTTTCATCCTGGAACCTG	qPCR AIM1

10

20

30

40

プライマー	配列 5' → 3'	適用
AIM1-R (配列番号101)	CGCCTCTCTGTTCACCTC	
AIM2-F (配列番号102)	AAGCGCTGTTGCCAGTTAT	qPCR AIM2
AIM2-R (配列番号103)	CACACGTGAGGCCTATTAA	
MAGEA1-F (配列番号104)	GTCAACAGATCCTCCCCAGA	qPCR MAGEA1
MAGEA1-R (配列番号105)	CAGCATTCTGCCTTGTGA	
MAGEA2-F (配列番号106)	AGGTGGAGAGCCTGAGGAAT	qPCR MAGEA2
MAGEA2-R (配列番号107)	CTCGGGTCCTACTTGTCA	
MAGEA10-F (配列番号108)	AAGCGAGGTTCTCGTTCTGA	qPCR
MAGEA10-R (配列番号109)	TGACCTCTTGCTCTCCCTGT	MAGEA10
MAGEB2-F (配列番号110)	CTTCAAGCTCTCCTGCTGCT	qPCR MAGEB2
MAGEB2-R (配列番号111)	CGACCCTGACTTCCTGGTTA	
MART1-F (配列番号112)	GCTCATCGGCTGTTGGTATT	qPCR MART1
MART1-R (配列番号113)	ATAAGCAGGTGGAGCATTGG	
MCL1-F (配列番号114)	ATGCTTCGGAAACTGGACAT	qPCR MCL1
MCL1-R (配列番号115)	ATGGTTCGATGCAGCTTCT	
TYR-F (配列番号116)	TACGGCGTAATCCTGGAAAC	qPCR TYR
TYR-R (配列番号117)	ATTGTGCATGCTGCTTGAG	
TYRP1-F (配列番号118)	CCGAAACACAGTGGAGGTT	qPCR TYRP1
TYRP1-R (配列番号119)	TCTGTGAAGGTGTGCAGGAG	
TYRP2-F (配列番号120)	GGTCCTTCTTCCCTCCAG	qPCR TYRP2
TYRP2-R (配列番号121)	AACCAAAGCCACCAAGTGTTC	

10

20

30

【 0 2 2 5 】

【表18】

表5：大腸菌(*E. Coli*)における発現後のGST-isoQC融合タンパク質の精製。精製した融合タンパク質は、QC活性の決定のために使用した。

精製工程	1	2	3	4
方法	Ni²⁺-IMAC (EBA)	GST-TAG AC	GF (脱塩)	IEX (UNO S)
カラムタイプ (Amersham Biosciences AB, Sweden)	キレート セファロース Fast Flow	グルタチオン セファロース 4 Fast Flow	セファデック SG-25 微細	「連續ベッド」マトリックス BIO-Rad
カラムサイズ	d=2,5cm l=42cm CV=206cm ³	d=1,6cm l=10cm CV=20cm ³	d=2,6cm l=10cm CV=53cm ³	d=1,2cm l=5,3cm CV=6cm ³
平衡化				
緩衝液	PBS	PBS	25mM Mes	25mM Mes
pH 容積	7,3 10CV	7,3 10CV	6,0 10CV	6,0 10CV
中間 (洗浄)				
緩衝液	PBS 0,5mM ヒスチジン	PBS		25mM Mes
pH 容積	7,3 10CV	7,3 10CV		6,0 10CV
溶出				
緩衝液	PBS 100mM ヒスチジン	50mM Tris 10mM グルタチオン (還元)	25mM Mes	25mM Mes 勾配溶出 NaCl
pH 容積	7,3 1,5 CV	8,0 (逆流)	6,0 1 CV	6,0 CV

10

20

30

【0226】

【表19】

表6：イミダゾール誘導体によるヒトQC及びヒトisoQCの競合阻害についてのKi値。ヒトisoQCは、大腸菌 (*E. coli*) BL21 (hisQCdt)、又は *P. pastoris* (YSShisQC) において発現した。

阻害剤	Ki (μM) hisoQCdt	Ki (μM) YSShisQC	Ki (μM) hQC
イミダゾール	220 ± 1	235 ± 13	103 ± 2
ベンズイミダゾール	200 ± 8	250 ± 5	138 ± 4
1-ベンズイミダゾール	7,3 ± 0,5	6,2 ± 0,2	7,1 ± 0,1
1-メチルイミダゾール	80 ± 5	82 ± 3	39,7 ± 0,2
PBD150 1-(3,4-ジメトキシフェニル)-3-(3-イミダゾール-1-イル-プロピル)-チオ尿素	0,48 ± 0,03	0,519 ± 0,001	0,0584 ± 0,0002

10

【0227】

(実施例6：*P. pastoris* (*P. pastoris*) におけるヒトisoQCの発現、及び精製)
(宿主株、及び培地)

20

大腸菌 (*Escherichia coli*) 株DH5をプラスミドの増殖のために使用し、*P. pastoris* (*P. pastoris*) 株X-33を酵母におけるヒトisoQCの発現のために使用した。大腸菌 (*E. coli*)、及び*P. pastoris* (*P. pastoris*) 株は、製造業者の説明書 (Qiagen (DH5) invitrogen (X-33)) に従って培養し、形質転換して、解析した。大腸菌のために必要とされる培地、すなわちLuria-Bertani (LB) 培地は、製造業者の推奨に従って製造した。ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) のために必要とされる培地、すなわちBMMY、BMGY、YPD、YPDS、及び抗生物質、すなわちZeocinの濃度は、ピチアマニュアルに記載されているように製造した (invitrogen、カタログ番号K1740-01)。また、マニュアルには、酵母の取扱いのための全ての関連した記述を含む。

30

【0228】

(ヒトQCをコードするプラスミドベクターの分子クローニング)

全てのクローニング手順には、標準的な分子生物学技術を適用した。ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) X-33における発現のために、pPICZ A (invitrogen) 使用した。コドン30 (メチオニンIIから計数) で開始する成熟ヒトisoQCのcDNAを、分泌経路にタンパク質を向ける - ファクターをコードするプラスミドにインフレームで融合した。センスプライマーとしてプライマー-hisQC HIS C-Term pPICZAA-1 (配列番号：62)、又はhisQC N-Term pPICZAA-1 (配列番号：63)、及びアンチセンスプライマとしてhisQC His、N-Term pPICZAA-2 (配列番号：64)、及びhisQC His C-Term pPICZAA-2 (配列番号：66)を利用する増幅の後、断片を、NotI、及びEcoRIの制限部位を使用して、発現ベクターに挿入した (表4)。構築物に応じて、突然変異をコドン55 (Ile)、及び351 (Cys) に導入した。突然変異誘発は、標準的PCR技術に従って、続いてDpnI (quik-change II部位特異的変異誘発キット、Stratagene、Catalog No.200524) を使用する親DNAの消化によって行った。產生された構築物は、図17に模式的に図示してある。

40

【0229】

(*P. pastoris* (*P. pastoris*)、及びミニスケール発現の形質転換)

1~2 μgのプラスミドDNAを、製造業者 (BioRad) の説明書に従って、電気穿孔法によってコンピテント*P. pastoris* (*P. pastoris*) 細胞の形質転換のために適用した。選択は、100 μg/ml ゼオシンを含むプレートで行った。isoQC発現による組換え酵母クローンを試験するために、組換え体を、2mLのBMGYを含む10mLの円錐チューブにおいて24時間培養し

50

た。その後、酵母を遠心分離して、0.5%のメタノールを含む2mLのBMMY中に再懸濁した。約72時間の間、24時間毎にメタノールを添加することにより、この濃度を維持した。その後、上清中のQC活性を決定した。最高の活性を示したクローンを、更なる実験、及び発酵のために選択した。発現された構築物に応じて、培地におけるisoQC-活性は、異なった(図18)。

【0230】

(P. pastoris (P. pastoris) におけるhisoQCの発現、及び精製)

ピチア・パストリス (Pichia pastoris) におけるisoQCの大規模発現のためには、ミニスケール発現に記載したように、条件を保持したが、総容積は、8Lであった。発現は、振盪フラスコにおいて行った。発現の後、細胞を遠心分離 (1500 × g、20分) によって培地から分離して、ペレットを廃棄した。上清のpHを中性に調整して、再び遠心し、最初の精製工程のために適用した。isoQCタンパク質は、3工程プロトコル(表7)を利用して精製した。精製は、図19におけるSDS-PAGE解析によって図示してある。

10

【0231】

【表20】

表7: P. pastoris (P. pastoris) における発現後のhisoQC (YSShisoQCN551C351A C-His) の精製。精製した融合タンパク質は、QC活性、及びpH-依存性の決定のために使用した。

20

精製工程	1	2	3
方法	Ni ²⁺ -IMAC	HIC	GF (Desalting)
カラムタイプ (Amersham Biosciences AB, Sweden)	キレートセファロース Fast Flow	ブチルセファロース 4Fast Flow	セファデックス G-25 微細
カラムサイズ	d=2,5cm l=42cm CV=206cm ³	d=1,6cm l=15,5cm CV=23cm ³	d=2,6cm l=10cm CV=53cm ³
平衡化 緩衝液 pH 容積	50mM NaH ₂ PO ₄ 7,0 10CV	30mM NaH ₂ PO ₄ 1M (NH ₄) ₂ SO ₄ 7,0 10CV	50mM Bis-Tris 100mM NaCl 6,8 10CV
中間(洗浄) 緩衝液 pH 容積	50mM NaH ₂ PO ₄ 0,5mM ヒスチジン 7,0 10CV	30mM NaH ₂ PO ₄ 1M (NH ₄) ₂ SO ₄ 7,0 6CV	-
溶出 緩衝液 pH 容積	50mM NaH ₂ PO ₄ 100mM ヒスチジン 7,0 1,5 CV	30mM NaH ₂ PO ₄ 7,0 5 CV	50mM Bis-Tris 100mM NaCl 6,8 1CV

30

【0232】

(結果)

ヒトisoQCは、メチロトローフの酵母P. pastoris (P. pastoris) において首尾よく発現された。酵母における最高の発現条件を選択するために、いくつかの異なる構築物を產生した(図17)。図18に図示したように、発現され、及び発現する細胞の培地に存在する

40

50

QC活性は、発現された構築物に応じて変化する。グリコシリ化部位の導入により、適切な分泌を生じ、これは、構築物YSShisoQCN551C351A C-His、及びYSShisoQCN551 C-Hisから観察することができる。培地において最高の活性ため、構築物YSShisoQCN551C351A C-Hisを大規模に発現させて、精製した。精製は、表7に記載したように実施し、精製の収率は、59%であった。見かけ上均一なタンパク質は、より低い分子量に異動する変化によって証明されるように(図19)、グリコシリ化された。グリコシリ化は、酵素の触媒活性に影響を及ぼさなかった。

【0233】

(実施例7: hisoQCのpH-依存性)

H-Gln-NAを使用する蛍光定量的アッセイ(実施例5に記述した)を、触媒特異性のpH-依存性を調査するために適用した。反応は、7 μMの基質濃度にて、すなわち[s] << K_Mにて実施した。従って、観察された特異性定数は、基質変換のプログレス曲線の初速度から直接推定することができる。これらの研究では、反応緩衝液は、HCl、又はNaOHを使用して所望のpHに調整した0.075M酢酸、0.075M Mes、及び0.15M Trisからなった。緩衝液は、非常に広いpH範囲にわたって特定のイオン強度を保証する。獲得した酵素動力学的データの評価は、以下の方程式を使用して行った:

$$k_{cat}/K_M(pH) = k_{cat}/K_M(\text{限定}) * 1 / (1 + [H^+] / K_{HS} + K_{E1}/[H^+] + K_{E2}/[H^+] * K_{E2}/[H^+])$$

式中、k_{cat}/K_M(pH)は、pH依存的(観察される)動力学的パラメーターを意味する。k_{cat}/K_M(限定)は、pH非依存的(「限定」)値を意味する。K_{HS}、K_{E1}、及びK_{E2}は、それぞれ酸性pH範囲において解離する基、及び酵素の2つの解離する基の解離定数を意味する。全ての動力学的データの評価は、GraFitソフトウェア(バージョン5.0.4.、ウィンドウズ用、Erithacus software Ltd., Horley, UK)を使用して行った。

【0234】

(結果)

hisoQCは、pH 7~8にて特異性の最適pHを示す。従って、触媒作用の最適pHは、ヒトQCに非常に類似する。3つの解離する基に基づくモデルに従ったデータのフィッティングにより、hisoQC、及びhQCのpH-依存性の満足な解釈を生じた(図22)。従って、両酵素反応の触媒作用は、同様の解離する基による影響を受け、一般に同様の触媒メカニズムを示唆する。

【0235】

決定されたpKa値を表8に示してある。1つのpKaのみが、有意にhisoQCとhQCとの間で異なることが明らかである。hQCでは、pKaが基質の解離定数のpKaに対応する。おそらく、hQCとhisoQCとの間の微妙な相違は、pH-依存性に影響を及ぼす、isoQC触媒作用において生じる構造変化(誘導的適合)によって生じる。

【0236】

(実施例8: グルタミルシクラーゼ活性の研究)

ヒトQCについて、該酵素は、N末端のグルタミン酸のピログルタミン酸への環化を触媒することが記述されている。従って、QCは、pGluで修飾されたアミロイドペプチドの産生に関与する。

【0237】

グルタミン酸の環化を調査するために、ヒトQC、及びヒトisoQCを精製して、A(3-11)からのpGlu修飾されたアミロイド(3-11)[pGlu-A(3-11)]の形成をモニターした。反応は、20 μl基質(A(3-11)、50mM Mes緩衝液(pH 6.5)中の2.5mM保存液)、及び80 μl酵素(50mM Mes pH 6.5中の、0.62 mg/ml hQC保存液；0.61mg/ml hisoQC保存液)から成了。試料(15 μl)を0時間、6時間、24時間、48時間、及び72時間に取り出して、反応を終結させるために5分間煮沸した。基質変換の解析は、Maldi-Tof質量分析によってモニターした。基質、及び産物は、環化の間に放出される水の質量である18Daだけそれらの分子量が異なる。

【0238】

10

20

30

40

50

図23に示したように、ヒトQC、及びヒトisoQC (YSShisQC155NC351A C-His) は、A (3-11) のpGlu-A (3-11) への変換を触媒する。しかし、両試料において同タンパク質濃度に基づいて、hisQCによるN末端のグルタミン酸の変換は、hQCと比較して非常に遅いと結論することができる。従って、グルタミニル基質の変換についてより低い特異性定数が、グルタミル基質でも観察される。不活化酵素では、これらの条件下で環化は観察されなかつた (Schilling, S.らの文献、2004 FEBS Lett. 563、191-196)。

【0239】

(実施例9：マウスisoQCの組織特異性)

マウスQC、及びマウスisoQCの組織分布を、定量的リアルタイムPCR技術を使用して調査した。いくつかの異なる器官、及び組織からのcDNAの解析の前に、マウスisoQCオープンリーディングフレームを、マウスisoQCの染色体のコード領域から推定した特異的プライマー (isoQCm MetI s (配列番号：68)、isoQCm MetIとして (配列番号：69) (表4) を適用して単離した。オープンリーディングフレームをベクターpPCR-Script CAM SK (+) (PCR-Script CAM Cloning Kit, Stratagene) にクローニングして、リアルタイムPCR決定における正の対照として、及びアッセイ条件下での標準曲線の作成のために使用した。isoQC発現の組織特異性の特性付けは、3~6月齢のマウスからのcDNAを適用して達成した。総RNAは、RNA-単離キットII (Macherey、及びNagel) を使用して、30mgの組織から単離した。RNA濃度、及び純度は、ゲル電気泳動 (アガロースゲル) 、及び分光光度法によって評価した。cDNAの合成のためには、1 μgのRNAを使用した。反応は、供給元の推奨に従って逆転写酵素Superscript II RT (Invitrogen) を適用して行い、cDNAは、-80 に貯蔵した。

【0240】

異なる組織における転写物濃度の定量分析は、「QuantiTect SYBR Green PCR」 (Qiagen) を適用して、「Light Cycler」 (Corbett research) を使用して解析した。DNA標準 (クローニングされたcDNAisoQCマウス) を定量化のために使用した。コピー数は、以下の方程式に従って算出した：

$(X^9 / \mu \text{g DNA}) / (\text{bpのプラスミド長} * 660) * 6.022 * 1023 = Y \text{ 分子} / \mu \text{g}$ 。DNA標準には、 $10^7 - 10^1 \text{ 分子} / \mu \text{g}$ 、及び限界濃度 (10^0) の範囲の4つの濃度を含んだ。反応プロトコルを表8に示してある。結果は、図24に示してある。

【0241】

マウスQCの増幅については、プライマーmQC RT N末端s (配列番号：73)、及びmQC RT N末端as (配列番号：74) を適用して、同じプロトコルを使用した。

【0242】

【表21】

表8： Roto-Gene RG 3000 (Corbett Research) を使用する定量的リアルタイム-PCR の反応プロトコル

PCR-Cycles		
工程	°CでのT	秒でのt
0 変性	95	900
1 変性	95	15
2 プライマーアニーリング	55	20
3 伸長	72	20
サイクル	45	

【0243】

(結果)

図24に示したように、マウスQC、及びマウスisoQCは、試験した全ての器官において発現される。マウスQCとは対照的に、異なる器官の間でのマウスisoQCの発現の変動は、より小さく、転写の制御の厳密性が低いことを示している。mQCの発現についてのデータは

10

20

30

40

50

、ノーザンプロットを使用して解析したウシQCの以前の解析に対応する (Pohl, T. らの文献、1991 Proc Natl Acad Sci U S A 88、10059-10063)。QCの最高の発現は、視床、海馬、及び皮質において観察された。従って、QC発現は、主にニューロン組織において検出される。QC発現は、脾臓、及び腎臓としての末梢器官ではほとんど検出されない。また、misoQCもニューロン組織に、しかし m QCと比較して低レベルで発現される。対照的に、末梢器官における発現レベルは、isoQCとQCとの間で非常に類似する。結果として、転写物濃度の結果に基づいて、組み合わさった活性 (isoQC、及びQC) は、脳において最高であるはずである。従って、最高のQCタンパク質レベルは、アルツハイマー病、家族性英国痴呆、及び家族性デンマーク痴呆のようなアミロイド症によって苦しめられる器官に存在する。

10

【0244】

(実施例10：複素環式キレート剤によるヒトisoQCの阻害)

(結果)

1,10-フェナントロリン、及びジピコリン酸などの複素環式キレート剤を使用した、異なる供与源からのQCの時間依存的阻害は、以前に調査されている。類似して、h-isoQCも、複素環式キレート剤1,10-フェナントロリン (図25)、及びジピコリン酸 (図示せず) によって時間依存的に不活性化され、明らかに金属依存的活性を示す。更にまた、EDTAもまたhisoQCを阻害した (図25)。ヒトQCも、ブタQCも、マウスQCも、EDTAによって識別可能な阻害を示さないので、これは、QCとは全く対照的である。しかし、更に強力なEDTAによるhisoQCの阻害は、金属依存的触媒作用を示唆する。

20

【0245】

(実施例11：細胞分画を使用して調査したhisoQCの細胞下局在)

(細胞分画)

トランスフェクション後に、発現するHEK293細胞をD-PBSで洗浄して、4 にて5分間の $500 \times g$ での遠心分離によって収集した。その後に、D-PBSを廃棄して、細胞を1mlの破壊緩衝液 (50mM Tris、50mM KCl、5mM EDTA、2mM MgCl₂、HClでpH 7.6に調整) に再懸濁して、Potter細胞ホモジナイゼイター (homogenisator) において30回の粉碎によって分解した。懸濁液を4 にて10分間 $700 \times g$ で遠心分離した。得られたペレットを300 μ lの破壊緩衝液に再懸濁して、細片画分 (D) と命名した。生じる上清を4 にて30分間 $20.000 \times g$ にて更に遠心分離した。ペレットは、重い膜画分 (HM) を示し、200 μ l破壊緩衝液に再懸濁した。生じる上清を、超遠心機 (Beckmann) を使用して、4 にて1時間 $100.000 \times g$ にて遠心分離した。得られたペレットを200 μ l破壊緩衝液に再懸濁して、軽い膜画分 (LM) と名付けた。上清は、可溶性画分 (S) と命名した。細片、重い膜、及び軽い膜画分を10秒間超音波処理して、全ての画分のタンパク質含有量を、ブラッドフォード法を使用して決定した。その後、画分をQC活性について解析して、ウエスタンプロットを使用してマーカータンパク質を染色した。

30

【0246】

(結果)

更なる確認のために、hisoQC、及びhQC発現に由来するQC活性分布の生化学的解析を行った。メチオニンI、及びIIで開始する天然のhisoQC、並びにhQCを、それぞれHEK293細胞において発現させた。細胞分画の後、それぞれの画分のQC活性を、基質としてH-Gln-NAを適用する蛍光アッセイを使用して決定した。空のベクター (pcDNA) をトランスフェクトした細胞において、特異的なQC活性をほとんど測定することができない。天然のhisoQC (MetI)、及びhisoQC (MetII) を発現するときに、QC活性は、重い膜画分 (MetI : $40 \pm 2 \mu$ モル/分/g ; MetII : $36 \pm 1.5 \mu$ モル/分/g)、及び培地 (MetI : $30 \pm 2 \mu$ モル/分/g ; MetII : $54 \pm 3 \mu$ モル/分/g) において最高の比活性で容易に検出可能であった。対照的に、hQCは、培地 ($1339 \pm 76 \mu$ モル/分/g) 内で、続いて重い膜画分 ($251 \pm 21 \mu$ モル/分/g) で最高の特異的なQC活性を示す (図26A)。

40

【0247】

加えて、絶対活性を算出し、hisoQC (MetI)、及びhisoQC (MetII) の発現は、主に細

50

胞内、すなわち細片 (MetI : 1032 ± 9 nM/分 ; MetII : 1110 ± 10 nM/分)、及び重い膜画分 (MetI : 374 ± 20 nM/分 ; MetII : 281 ± 12 nM/分) 内のQC活性の増大を示すことが導かれた。ほんのわずかなQC活性のみが、培地内で見いだされた (MetI : 27 ± 2 nM/分 ; MetII : 53 ± 3 nM/分)。対照的に、hQC発現によって導き出されるQC活性は、培地 (1138 ± 65 nM/分) 内で、及び細胞内コンパートメント内 (細片 : 1089 ± 14 nM/分 ; 重い膜画分 : 583 ± 38 nM/分) で高活性を示し、組織化学的解析によって示されたとおりのhisoQCのゴルジ局在化を支持する (図26B)。

【0248】

天然の酵素の発現によって得られたデータは、hisoQC (MetI、及びMetII)、及びC末端FLAG-タグを有するhQC (図26C) の発現によって更に支持された。生じるFLAGタグを付けたタンパク質のウエスタンプロット解析により、ゴルジ複合体、及びミトコンドリアのマーカータンパク質と比較して、主に細片、及び重い膜画分内のhisoQC (MetI)、及びhisoQC (MetII) の細胞内局在化が明らかになったが、hQCは、培地内で濃縮されるが、細片、及び重い膜画分内でも見いだされる。ゴルジ複合体 (ST1GAL3)、及びミトコンドリアのマーカータンパク質の可視化により、細片、及び重い膜画分内のこれらのコンパートメントの存在が明らかになった。加えて、65kDaのミトコンドリアタンパク質も、可溶性画分内により小部分で見いだされた。

【0249】

(実施例12 hisoQCのゴルジ保持シグナルについての分析)

明確さのために、予測されるN末端の膜貫通ヘリックスが、ゴルジ複合体内におけるhisoQCの保持の役割を担うかどうか、膜貫通ヘリックスを含むMetI、及びMetIIにて開始するシグナルペプチドを、EGFPとインフレームにクローニングした。生じるベクターhisoQC (MetI) SS EGFP、及びhisoQC (MetII) SS EGFPをLN405細胞に発現させて、共焦点レーザースキャニング顕微鏡を使用して全長hisoQC EGFP融合タンパク質と同様に調べた。hisoQC (MetI) SS EGFPの発現は、全長hisoQC (MetI) EGFP融合タンパク質について観察される同じゴルジ複合体局在化を引き起こした。また、ミトコンドリアに対するhisoQC (MetI) SS EGFPの輸送は、観察されなかった (図27A)。加えて、N末端の切断されたペプチドhisoQC (MetII) SS EGFPの発現は、ゴルジ複合体内的タンパク質の濃縮も引き起こした。hisoQC (MetI) SS EGFPと類似して、ミトコンドリアのEGFP蛍光を記録することができなかった (図27B)。結果的に、hisoQCのN末端配列は、ER膜へのタンパク質の同時翻訳転位位置を、及びゴルジ複合体内的保持を引き起す。更にまた、hisoQC (MetII) SS EGFPの発現により、ゴルジ保持シグナルは、全体的にメチオニン19とセリン53 (MetIにて開始したアミノ酸の計数)との間に存在するようにマップされた。

【0250】

更なる形態解析により、グリコシルトランスフェラーゼに対するhisoQC N末端の機能的相同性に関する可能性が明らかになった。グリコシルトランスフェラーゼは、II型膜貫通タンパク質であり、短い細胞質の配列、続いて膜貫通ヘリックス、及び大きな管腔触媒ドメインを有する。明らかだが、これは、misoQC、及びhisoQCについて見いだされたものと本質的に同じドメイン構造である (図28)。多数のグリコシルトランスフェラーゼについて、ゴルジ保持シグナルは、膜貫通ドメイン内に存在することが同定された。更に、これらのいくつかについては、細胞質配列の酵素切断は、タンパク質の活性、又は局在化に対して影響を有さないことが見いだされた。要約すると、hisoQCは、II型膜貫通タンパク質であり、グリコシルトランスフェラーゼと同様にゴルジ複合体内に保持を示すことの証拠が提供された。

【0251】

(実施例12 異なるヒト癌腫株化細胞及び組織におけるQPCTL mRNAの検出)

(qPCR解析分析)

ヒト癌腫株化細胞におけるヒトQPCTL発現は、本質的に実施例9に記載したように、定量的リアルタイムPCR (qPCR) 技術を使用して行った。QPCTL mRNAを決定するために、ゲノムDNAの同時増幅を排除するためにエキソン/エキソン領域をカバーする、QuantiTect (登

10

20

30

40

50

録商標) プライマーアッセイのプライマーを適用した。QPCRは、製造業者推奨に従って行った。反応混合物は、表9に示してあり、PCRプログラムは、表8に図示してある。

【0252】

【表22】

表9: qPCR混合物成分の組成

成分	μlでの容積
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (2,5 mM MgCl ₂)	7,5
10x QuantiTect プライマーアッセイ	1,5
cDNA (≤100 ng/反応)	1
Aqua bidest.	5

10

20

30

【0253】

異なる組織における転写物濃度の定量分析は、「QuantiTect SYBR Green PCR」(Qiagen)を適用して、「Light Cycler」(Corbett research)を使用して解析した。DNA標準(クローニングされたcDNAisoQCヒト)を定量化のために使用した。コピー数は、以下の方程式に従って算出した： $(X^g / \mu l \text{ DNA}) / (\text{bpのプラスミド長} * 660) * 6.022 * 1023 = Y \text{ 分子} / \mu l$ 。DNA標準には、 10^7 - 10^1 分子/ μl 、及び限界濃度(10^0)の範囲の4つの濃度を含んだ。

qPCRの結果は、ローター-遺伝子オペレーティングソフトウェア(Corbett research)を使用して評価した。

【0254】

(結果)

(異なる癌腫株化細胞におけるQPCTLの発現)

試験した癌株化細胞のなかで、ヒトメラノーマ細胞は、最高のQPCTL転写物の発現(約7000コピー/50ng総RNA)を示すが、ヒト軟部組織肉腫株化細胞は、最低のQPCTLの発現(365コピー/50ng総RNA)を示す。中央値で、膵臓癌腫は、2100コピーを示し、甲状腺癌腫は、3500コピー、及び胃癌腫は、4100コピーを有する(図29)。

【0255】

(異なるメラノーマ株化細胞におけるQPCTLの発現)

最近、メラノーマ細胞が相当する高いQPCT発現を有することが示された(Gillis, J.S.の文献、J. Transl. Med. 4 (2006) 4:27)。従って、異なるメラノーマ株化細胞におけるQPCTL発現を解析した。図30に図示したように、QPCTL発現は、試験した全てのメラノーマ株化細胞において検出された。株化細胞間の変動は、株MeI_ZL_11における2025コピー/50ng総RNA～株MeI_ZL12における18043コピー/50ng総RNAまでで変動した。

【0256】

【表23】

表10：腫瘍関連抗原 (taa) に対するQPCT及びQPCTLの相関、及び互いの間のtaaの相関

相関	有意性	相関	有意性
QPCT - MAGEB2	0,0436	AIM1 - MCL1	0,0163
QPCT - MART1	0,0020	MAGEA1 - MAGEA2	0,00002
QPCT - TYR	0,0023	MAGEA1 - MAGEB2	0,0058
QPCT - MAGEA1	0,0591	TYRP2 - MART1	0,0042
QPCTL - MART1	0,0008	TYR - MART1	0,0335
		TYR - TYRP2	0,0408
AIM1 - AIM2	0,0082	TYR - MCL-1	0,0151

10

20

30

【0257】

更にまた、QPCT、及びQPCTL発現は、腫瘍関連抗原 (taa) の発現に相関した。メラノーマ特異的な腫瘍関連抗原は、データベースマイニング、及び公開された結果によって選択した。とりわけ、AIM1、及びAIM2 (メラノーマに存在しない)、MAGEA1、-A2、-A10、及びMAGEB2 (メラノーマ抗原ファミリーA、及びB)、MART1 (T細胞によって認識されるメラノーマ抗原)、TYR (チロシナーゼ)、TYRP1、及びTYRP2 (チロシナーゼ関連されたタンパク質)、並びにMCL-1 (骨髄性細胞白血病) は、メラノーマにおける腫瘍関連抗原である。データは、SPSS統計ソフトウェアを使用して比較した。QPCTとMAGEB2との間の相関は、有意だった ($p = 0.0436$)。更にまた、QPCTとMART1 ($p = 0.002$)、QPCTLとMART1 ($p = 0.008$)、及びQPCTとTYRとの間の ($p = 0.0023$) 相関も、統計学的に高度に有意であった。相関は、直接の依存性を示し、以下を暗示する：より高いQPCT/QPCTL発現、より高い腫瘍関連抗原の発現。唯一の例外は、間接的な依存性を示すTYRとMCL1との間の相関である。

【0258】

(異なる腫瘍組織におけるQPCT、及びQPCTLの発現)

QPCT、及びQPCTLの発現を軟部組織肉腫、胃癌腫、及び甲状腺癌腫の腫瘍組織において評価した。QPCTの最高の発現は、甲状腺癌腫、続いて胃癌腫、及び軟部組織癌腫において見いだされた (表11)。しかし、同じ順序をQPCTL発現について観察したが、しかし、スチューデントt検定によって明らかのように、QPCTL転写物のコピー数は、QPCT転写物について観察されるよりも常に低かった ($P_{\text{軟部組織癌腫}} = 0.001$; $P_{\text{胃癌腫}} = 4.8E-7$; $P_{\text{甲状腺癌腫}} = 0.04$) (表11；図31)。

30

【0259】

【表24】

表11：異なる腫瘍組織におけるQPCT及びQPCTL発現の比較

	軟部組織肉腫 (119試料)	胃癌腫 (47試料)	甲状腺癌腫 (29試料)
QPCT	1293	2985	8303
QPCTL	170	469	2540

40

【0260】

QPCT、及びQPCTLの発現レベルについての更なる研究により、軟部組織肉腫 ($p = 2E-31$)、及び胃癌腫 ($p = 0.015$) におけるピアソンによる両側性有意な相関が明らかになった。相関は、甲状腺癌腫におけるQPCT、及びQPCTL発現レベルについて観察されなかった ($p = 0.46$)。

【0261】

(胃癌腫における分化の段階に依存的なQPCTLの発現)

50

胃癌腫について、腫瘍分化の異なる段階を表す試料におけるQPCTL発現を調査した。対照は、腫瘍周囲正常組織として役立てた。正常と腫瘍組織との比較により、腫瘍組織における有意に高いQPCTL発現 ($p = 0.04$) が明らかになった。未分化な胃癌腫は、正常組織よりも低いQPCTL発現を示す。低分化、及び十分から適度に分化した胃癌腫は、正常組織と比較して、中央値の相違は示さない(図32)。

【0262】

(甲状腺癌腫の異なる段階におけるQPCT、及びQPCTLの発現)

異なる段階の甲状腺癌腫を、QPCT、及びQPCTL発現に関して調査した。段階は、世界健康組織(WHO)の命名法に従って濾胞性甲状腺癌腫(FTC)、乳頭甲状腺癌腫(PTC)、及び未分化甲状腺癌腫(UTC)として分類した。甲状腺腫を有する患者からの試料を対照として役立てた。

10

【0263】

分化した甲状腺癌腫FTC(6700コピー/50ng総RNA)、及びPTC(16000コピー/50ng総RNA)におけるQPCT mRNAレベル(中央値)は、非腫瘍組織におけるよりも高かった(甲状腺腫:2100コピー/50ng総RNA)。UTCは、5400コピー/50ng総RNAを有し、甲状腺腫において観察されるよりも2.5倍高い。QPCTのmRNAコピー数は、全ての甲状腺腫瘍において甲状腺腫におけるよりも有意に高い($p = 0.04$ 、スクエアーデントt検定)(図33)。

【0264】

甲状腺癌腫におけるQPCTL mRNAレベルは、均一である。FTC(2600コピー/50ng総RNA)、及びUTC(2500コピー/50ng総RNA)からの試料は、甲状腺腫(2500コピー/50ng総RNA)に類似する。PTCにおけるQPCTLの発現は、1900コピー/50ng総RNA(図34)に、わずかに減少する。

20

【0265】

結論として、QPCT、及びQPCTLは、甲状腺腫において同程度に発現される。しかし、腫瘍組織では、QPCTの発現が増加するが、QPCTLの発現は、安定なままである。

【0266】

(実施例13 異なる刺激と共にインキュベーション後のヒト株化細胞におけるQPCT、及びQPCTL発現についての調査)

(株化細胞、及び培地)

刺激実験は、ヒト胚性腎臓株化細胞HEK293、ヒト急性単球性白血病株化細胞THP-1、及び濾胞性甲状腺癌腫株化細胞FTC-133を使用して行った。細胞は、37 $^{\circ}$ C、及び5%のCO₂に加湿された雰囲気において、適切な培地(HEK293についてDMEM、10% FBS、THP-1についてRPMI1640、10% FBS、及びFTC-133についてDMEM/F12、10% FBS)中で培養した。

30

【0267】

(生理活性ペプチド、化学物質、又はLPSを使用する刺激)

HEK293、及びFTC-133細胞は、接着培養として培養し、THP-1細胞は、懸濁液中で培養した。刺激アッセイのためには、 2×10^5 細胞のFTC-133、及びHEK293細胞を24ウェルプレートに移した。HEK293の場合には、適当な接着を保証するために、プレートをコラーゲンIで被覆した。加えて、 2×10^6 細胞のTHP-1を24ウェル懸濁液プレートで培養した。全ての刺激実験は、無血清条件下で適用した。FTC-133は、一晩培養した。その後、細胞を更に24時間無血清の培地に適応させ、条件培地を新鮮な無血清培地によって置換することによって刺激を開始した。HEK293細胞を一晩培養し、その後、24時間を超えるの間の無血清条件下でのHEK293の培養の場合における形態学的变化のため、それぞれの薬剤を使用する刺激を無血清条件へ適応させることなく開始した。THP-1細胞は、それぞれの薬剤と共に無血清培地中のプレートにまいた。適用した刺激、及び終濃度は、表12に収載してある。

40

【0268】

【表25】

表12：ヒト株化細胞におけるhQC 及びhisQCの制御についての研究のための刺激

名称	終濃度
酪酸 (BA)	2 mM
肝細胞増殖因子 (HGF)	10 ng/ml
リポ多糖 (LPS)	1, 10 μ g/ml
トランスフォーミング成長因子(TGF β)	10, 100 ng/ml
腫瘍壞死因子 α (TNF α)	10, 100 ng/ml

10

【0269】

細胞をそれぞれの刺激と共に24時間インキュベートした。その後、細胞からの総RNAをNucleo-Spin (登録商標) RNA II Kit (Macherey-Nagel) を使用して単離して、qPCRアッセイまで貯蔵した。

【0270】

(低酸素を使用する刺激)

THP-1、HEK293、及びFTC-133細胞をそれぞれ2つの25cm²組織培養瓶にプレートにまいた。これにより、それぞれの株化細胞の1つのフラスコを負の対照として役立てて、通常の増殖条件下で24時間培養した。他方のフラスコは、嫌気的試薬 (Anaerocult (登録商標) P, Merck)、及びインジケータと共に嫌気的バッグに置いた。バッグは、気密状態を保証するために封着した。また、細胞を24時間培養して、その後、総RNAをNucleo-Spin (登録商標) RNA II Kit (Macherey-Nagel) を使用して単離して、qPCRアッセイまで貯蔵した。

20

【0271】

(結果)

(HEK293、FTC-133、及びTHP-1におけるQPCT、及びQPCTLの基礎発現)

使用した株化細胞HEK293、FTC-133、及びTHP-1における基礎発現を、以下の刺激実験について評価した。QPCT、及びQPCTL転写物のコピー数を表13に要約してある。

30

【0272】

【表26】

表13：種々の株化細胞におけるQPCT、及びQPCTLの基礎発現

株化細胞	50ng総RNAあたりの絶対mRNAコピー数	
	QPCT	QPCTL
HEK-293 (8 試料)	37196 \pm 18928	3206 \pm 855
FTC-133 (8 試料)	24790 \pm 7605	10262 \pm 1899
THP-1 (8 試料)	3588 \pm 853	6725 \pm 1763

40

【0273】

(QPCT、及びQPCTLの発現に対する選択した刺激の影響)

QPCT、及びQPCTLのプロモーターの制御性結合部位、並びにこれらの制御を引き起こすシグナル伝達経路は、今までに記述されていない。従って、種々の株化細胞を使用する刺激実験、及び刺激を行った。HEK293細胞におけるQPCT mRNAレベルは、TNF- α 、HGF、及び酪酸を使用する刺激によって増加した。加えて、QPCT/QPCTL基質としてのCCL2の制御を調査した。TNF- α 、及び酪酸は、HEK293におけるCCL2転写物の量を増加させた。HGFは、CCL2発現に影響を有さなかった。対照的に、QPCTLは、TNF- α 、HGF、及び酪酸によって調節

50

されなかった(図35)。

【0274】

加えて、FTC-133は、LPS、及びTGF- β を使用して刺激して、QPCT、QPCTL、及びCCL2の制御をモニターした。FTC-133では、LPS、及びTGF- β がQPCT mRNAの発現を刺激したが、QPCTL、及びCCL2発現を誘導することができなかった(図36)。

【0275】

この実験は、LPS(1 μ g/ml)、LPS(10 μ g/ml)、TGF- β 、及びTNF- α を使用するTHP-1細胞の刺激によって更に実証された。FTC-133、及びHEK293について観察されたように、QPCT発現は、異なる刺激を使用して誘導することができる。加えてCCL2発現は、LPS、及びTNF- α を使用して誘導された。また、QPCTL mRNAの誘導、又は抑制は、観察することができなかった(図37)。

10

【0276】

結論として、実験により、QPCTは、種々の株化細胞における刺激(LPS、TNF- α 、HGF、酪酸、その他)のセットによって調節することができ明らかになった。対照的に、QPCTLは、試験した刺激によって刺激することも、また抑制することもできず、QPCTLのハウスキーピング機能を示唆する。

【0277】

(QPCTのその基質の発現に対する選択した刺激の影響)

QPCT発現は、多数の刺激によって誘導されたので、QPCT誘導が、QPCT基質CCL2、CCL7、CCL8、及びCCL13の誘導と組み合わせて生じるかどうかの問題が生じた。従って、LPS(1 μ g/ml)、LPS(10 μ g/ml)、TGF- β (100ng/ml)、及びTNF- α (100ng/ml)をそれぞれ使用する刺激を、THP-1単球を使用して行った。THP-1は、刺激された細胞と負の対照との比較のために重要である全てのケモカインを基礎レベルにて発現する。

20

【0278】

LPS、及びTNF- α は、THP-1細胞において、全ての試験したケモカイン、及びQPCTの信頼できる誘導を引き起こした。TGF- β は、刺激としてあまり有効ではなく、最大2倍のQPCT、CCL2、CCL7、及びCCL8の発現を誘導した。CCL13は、TGF- β 刺激によって抑制された(図38)。

【0279】

(低酸素によるQPCT、及びQPCTL発現の刺激)

30

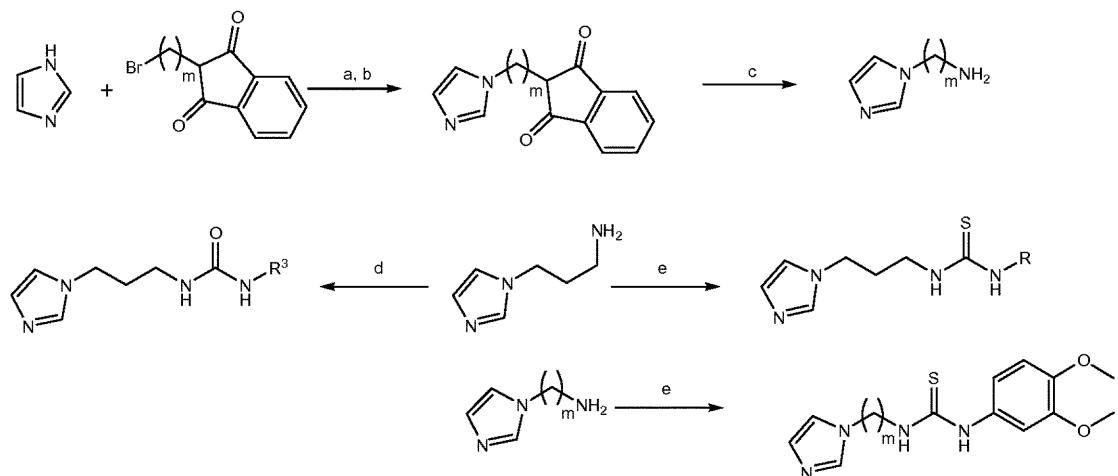
QPCTL発現は、化学剤、生物活性、ペプチド、又はLPSによって調節することができなかった。従って、本発明者らはQPCTL発現が低酸素によって調節されるかどうかを試験した。図39に要約したとおり。低酸素は、選択的にQPCTLの発現を誘導したが、QPCTの発現を誘導しなかった。比較として、低酸素誘導因子1a(HIF1a)は、15%(図39A)、及び45%(図39C)まで抑制された。データは、低酸素に対するQPCTLの関連を示唆する。

【0280】

(阻害剤の合成)

合成スキーム1: 実施例1~53、96~102、136~137の合成

【化18】



10

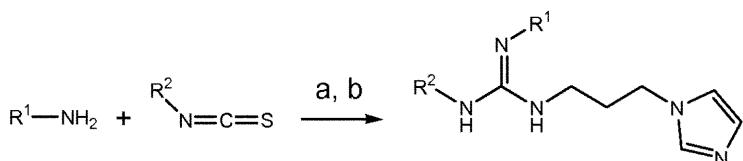
試薬、及び条件：(a) NaH、DMF、4時間、室温；(b) 8時間、100℃；(c) $\text{H}_2\text{N-NH}_2$ 、EtOH、8時間還流、次いで4N HCl、6時間、還流；(d) $\text{R}^3\text{-NCO}$ 、EtOH、6時間、還流；(e) 3,4ジメトキシ-フェニル-イソチオシアナート。

【0281】

合成スキーム2：実施例54～95の合成

20

【化19】



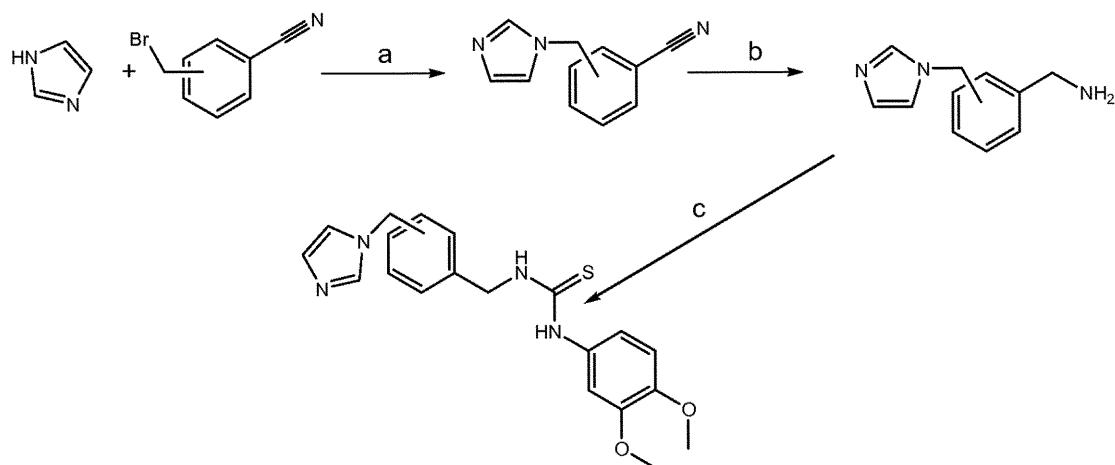
30

試薬、及び条件：(a) R-NCS、EtOH、6時間、還流；(b) WSCD、1H-イミダゾール-1-プロパンアミン、DMF、2時間、室温。

【0282】

合成スキーム3：実施例103～105の合成

【化20】



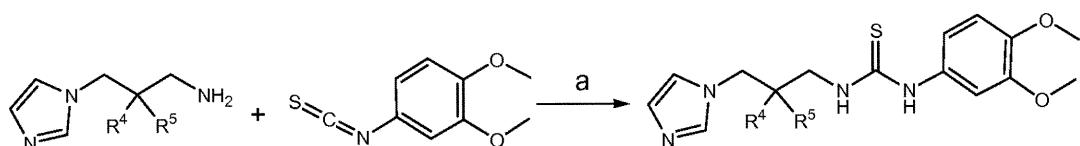
40

試薬、及び条件：(a) NaH、DMF、室温、3時間；(b) LiAlH4、ジオキサン、還流、1時間；(c) R-NCS、EtOH、還流、6時間。

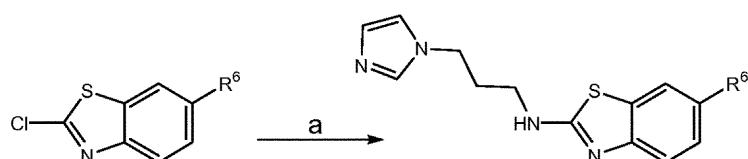
【0283】

50

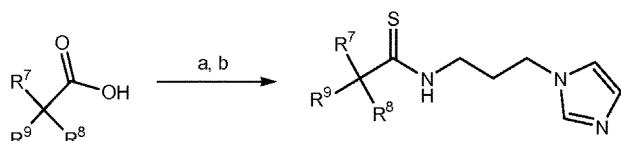
合成スキーム4：例106～109の合成
【化21】



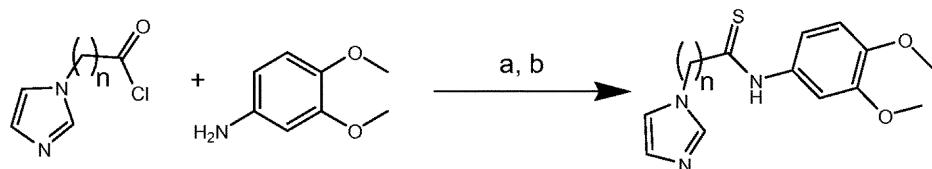
【0284】
合成スキーム5：実施例110～112の合成
【化22】



【0285】
合成スキーム6：実施例113～132の合成
【化23】

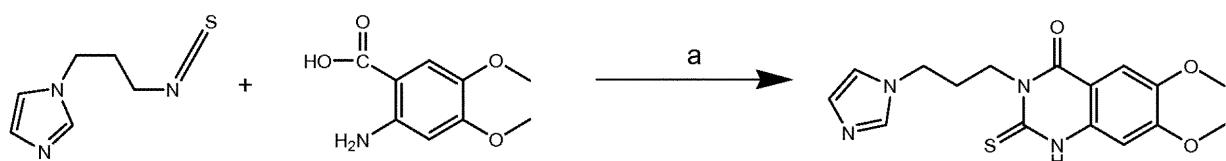


【0286】
合成スキーム7：実施例133～135の合成
【化24】



【0287】
合成スキーム8：実施例138の合成

【化25】



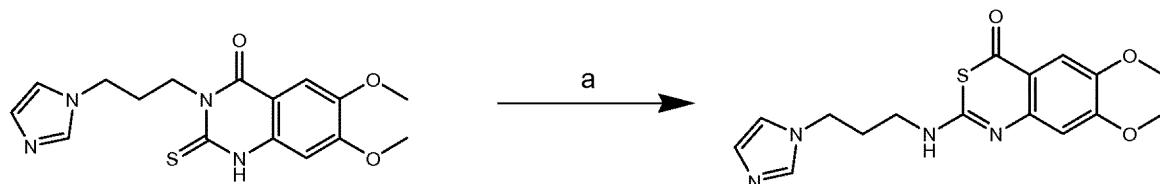
試薬、及び条件：(a) EtOH、還流、8時間。

【0288】

10

合成スキーム9：実施例139の合成

【化26】

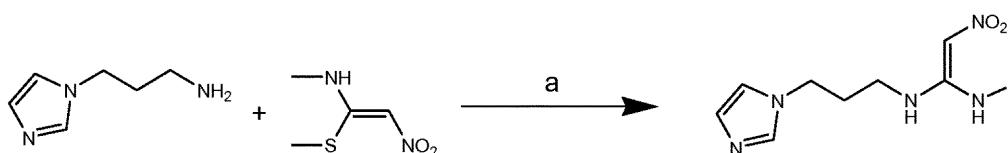
試薬、及び条件：(a) 75%濃H₂SO₄、4時間。

20

【0289】

合成スキーム10：実施例140の合成

【化27】



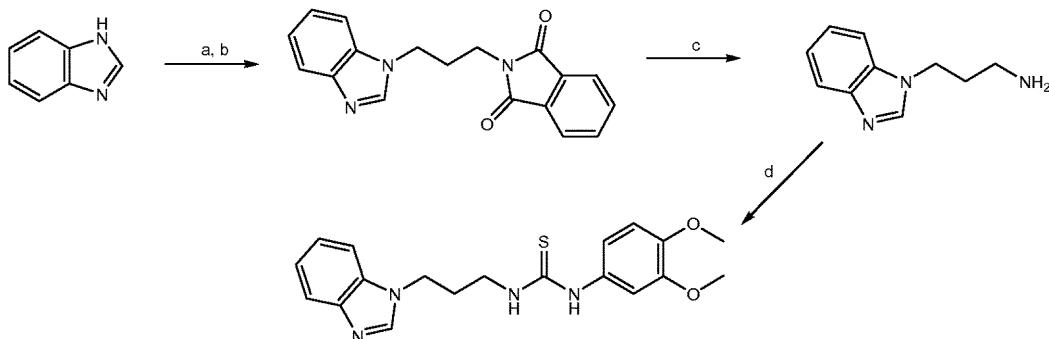
試薬、及び条件：(a) アセトニトリル、還流2時間。

30

【0290】

合成スキーム11：実施例141の合成

【化28】



40

試薬、及び条件：(a) NaH、DMF、4時間、室温；(b) 8時間、100°C；(c) H₂N-NH₂、EtOH、8時間、還流、次いで4N HCl、6時間、還流；(d) 3,4ジメトキシ-フェニル-イソチオシアナート、EtOH、6時間、還流。

【0291】

(解析条件)

ESI-Massスペクトルは、SCIEX API 365分光計 (Perkin Elmer) で得た。¹H-NMR (500MHz)

50

z) データは、溶媒としてDMSO-D₆を使用してBRUKER AC 500で記録した。化学シフトは、テトラメチルシランからのppm低磁場として表してある。分割パターンは、以下の通りに示した：s(一重項)、d(二重項)、dd(二重項の二重項)、t(三重項)、m(多重項)及びbr(広域シグナル)。

【0292】

(詳細な合成記述)

実施例1~12、及び14~53

1H-イミダゾール-1-プロパンアミンを、対応するイソチオシアナートのエタノール溶液と還流下で8時間反応させた。その後、溶媒を除去して、残りの油を塩化メチレンに溶解した。有機層をNaHCO₃の飽和溶液で2回、続いてNaHSO₄、及び鹹水で洗浄し、乾燥させ、次いで蒸発させた。残りの固体を酢酸エチルから再結晶して、80~98%の収率で実施例チオ尿素を得た。

10

【0293】

実施例13

1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(3,4-ジメトキシフェニル)チオ尿素

4.0mmolの3,4-ジメトキシフェニルイソチオシアナート、及び4.0mmolの3-(1H-イミダゾール-1-イル)アルキル-1-アミンを10mLの無水エタノールに溶解した。還流下で2時間攪拌した後、溶媒を蒸発させて、生じた固体をエタノールから再結晶した。

収率：0.66 g (51.3%) ; mp : 160.0~161.0

20

¹H NMR 1.8~2.0 (m, 2H), 3.4~3.5 (m, 2H), 3.75 (s, 6H), 3.9~4.0 (m, 2H), 6.7~6.8 (m, 1H), 6.9 (br m, 2H), 6.95 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.55 (br s, 1H), 7.6 (s, 1H), 9.3 (s, 1H); MS m/z 321.2 (M+H), 253.3 (M-C₃H₃N₂·)

【0294】

実施例96~102

1H-イミダゾール-1-プロパンアミンを対応するイソシアネートのエタノール溶液と還流下で8時間反応させた。その後、溶媒を除去して、残りの油を塩化メチレンに溶解した。有機層をNaHCO₃の飽和溶液で2回、続いてNaHSO₄、及び鹹水で洗浄し、乾燥させて、次いで蒸発させた。残りの固体を酢酸エチルから再結晶し、85~90%の収率で実施例尿素を得た。

30

【0295】

実施例136、137

1H-イミダゾール-1-アルキルアミンは、文献に従って、-臭素アルキルタルイミド、及びイミダゾリウム塩、及びその後のヒドラジン分解により製造した。生じた精製物を実施例1~53に従ってチオ尿素に変換し、88% (実施例136) の、及び95% (実施例137) の収率を示す。

30

【0296】

実施例54~95

全ての実施例は、対応するチオ尿素から、水溶性カルボジイミド (WSCD)、及び1H-イミダゾール-1-プロパンアミンと、乾燥ジメチル型アミド中で室温にて2時間反応させることによって作製され、40~87%収率で三置換のグアニジンを与える。

40

【0297】

実施例103~105

イミダゾールを、対応する臭素メチルフェニルシアニドのDMF溶液と、1当量のNaHを利用して室温下で3時間反応させ、1H-イミダゾール-1-メチルフェニルシアニドを与えた。溶媒を除去して、生じた油をジオキサンに再融解した。シアニドを、1当量のLiAlH₄を使用して対応するアミンに変換した。KHSO₄の飽和溶液を添加した後、ジオキサンを蒸発させて、水層をCHCl₃によって抽出した。有機層を真空中で濃縮して、アミンを実施例1~53に従って、対応するチオ尿素に変換し、78% (実施例103)、及び65% (実施例104)、及び81% (実施例105) を与えた。

50

【0298】

実施例106～109

対応するメタンスルホナート-2-メチルプロピル-フタルイミドから開始して、アミンを実施例136～137においてアミンについて記述したように合成した。生じた生成物を実施例1～53に従ってチオ尿素に変換し、25～30%の全収率で実施例106～109を与えた。

【0299】

実施例110～112

1H-イミダゾール-1-プロパンアミンを、対応する2-クロロベンゾ[d]チアゾールのトルオール溶液と130℃の温度にて24時間反応させた。溶媒の除去、及びメタノールから再結晶後、実施例110～112を55～65%の量で得た。

【0300】

実施例113～118、120～124、及び126～132

1H-イミダゾール-1-プロパンアミンを0℃の温度にて1当量のCAIBE、及びN-メチルモルホリンを添加することによって、対応する2-フェニル酢酸の乾燥ジオキサン溶液と反応させた。2時間後、混合物を室温に温めて、混合物を12時間攪拌した。溶媒を除去後、生じた油を塩化メチレンに再融解し、有機層をNaHCO₃の水溶液、及び水によって洗浄し、乾燥させて、溶媒を蒸発させた。残りの油をジオキサンに溶解してLaweson試薬を添加した。12時間攪拌後、NaHCO₃の飽和溶液を添加した。ジオキサンを蒸発させて、水層を酢酸エチルによって抽出した。有機層を分離し、乾燥させて、溶媒を蒸発させた。残りの固体をアセチルアセテート/エーテルから結晶化し、62～85%の全収率で113～118、120～124、及び126～132を与えた。

【0301】

実施例119

N-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-2-(3,4-ジメトキシフェニル)エタンチオアミド

4.0mmolのトリエチルアミン、及び4.0mmolの3-(1H-イミダゾール-1-イル)アルキル-1-アミンの混合物、20mLのジオキサンを、氷冷した4.0mmolの2-(3,4-ジメトキシフェニル)アセチルクロライドの30mLのジオキサン中の攪拌溶液に滴加した。混合物を室温に温て、次いで、1時間攪拌した。減圧によって溶媒を除去後、残渣を50mLのジクロロメタンに再融解した。有機層を30mLのNaHCO₃の飽和水溶液、及び水によって洗浄した。濾過して、有機溶液を乾燥させて、溶媒を減圧下で除去した。50mLの乾燥ジオキサンに再融解後、2.2mmolのLawesson試薬を添加して、混合物を90℃まで加熱して、8時間攪拌した。溶媒を減圧によって除去して、残渣を50mLのジクロロメタンに再融解した。有機層をNaHCO₃の飽和水溶液によって3回洗浄し、水によって3回を行い、乾燥させて、濾過し、次いで、有機溶媒を除去した。化合物を、2mmの層の厚さのシリカプレート、及び溶出系としてCHCl₃/MeOH勾配を利用する遠心-クロマトグラフィー装置(Harrison Research Ltd.)を使用するクロマトグラフィーによって精製した。

収率：0.14g(10.6%)；融点：148.0-150.0

¹H NMR 2.0 - 2.15 (br m, 2H), 3.4 - 3.5 (m, 2H), 3.7 (s, 6H), 6.75 - 6.8 (m, 2H), 4.1 - 4.2 (m, 2H), 6.8 - 6.9 (m, 2H), 6.95 - 7.0 (m, 1H), 7.4 (s, 1H), 7.75 - 7.85 (br m, 1H), 8.6 (s, 1H), 10.2 (s, 1H); MS m/z 320.2 (M+H), 252.2 (M-C₃H₃N₂·)。

【0302】

実施例125

N-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)シクロプロパンカルボチオアミド

11.06mmolの3,4-ジメトキシフェニルアセトニトリル、34.8mmolの2-ブロモ-1-クロロエタノール、及び1.16mmolの塩酸トリエチルベンジルアンモニウムを、10mLのKOH(60%)の水溶液に溶解した。混合物を超音波浴に移して、室温で3時間勢いよく攪拌した。生じた懸濁液を40mLの水で希釈して、20mLのジクロロメタンによって3回抽出した。合わせた有機層を、ここで塩酸(1N)の水溶液によって洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥させて、溶媒を減圧

10

20

30

40

50

下で除去した。残りの油をシリカゲル、及び溶出系として酢酸エチル/ヘプタンを使用するフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、0.81g (34.4%) の1-(3,4-ジメトキシフェニル)シクロプロパンカルボニトリルを生じて、3.9mmolの1-(3,4-ジメトキシフェニル)シクロプロパンカルボニトリル、及び11.2mmolのKOHを80mLのエチレングリコールに懸濁した。混合物を還流下で12時間攪拌した。次いで、80mLの水を添加して、水層をエーテルで2回抽出した。HCl (1N) を使用してpH = 4~5の値にpH調整後、水層をエーテルによって3回抽出し、次いで合わせた有機層をNa₂SO₄上で乾燥させて、溶媒を除去し、0.81g (93.5%) の1-(3,4-ジメトキシフェニル)シクロプロパンカルボン酸を生じた。

【0303】

3.44mmolの1-(3,4-ジメトキシフェニル)シクロプロパンカルボン酸、3.5mmolのNメチルモルホリン、及び3.5mmolのイソブチルクロロホルマート (chloroformiat) を、乾燥テトラヒドロフランに溶解して、-15 °C にて15分間攪拌した。次いで、3.5mmolの3-(1H-イミダゾール-1-イル)アルキル-1-アミンを添加して、混合物を0 °C に温めて、12時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去して、残りの油をクロロホルムに再融解した。次いで、有機層をNaHCO₃の飽和水溶液によって2回洗浄し、次いでNa₂SO₄上で乾燥させて、溶媒を除去した。精製は、2mmの層の厚さのシリカプレート、及び溶出系としてCHCl₃/MeOH勾配を利用するクロマトトロン (登録商標) 装置 (Harrison Research Ltd.) を使用する、遠心による強制的クロマトグラフィーによって行い、0.671g (59.3%) のN-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)シクロプロパン-カルボキサミドを生じた。

【0304】

30mLの乾燥ジオキサンに再融解後、1.43mmolのLawesson試薬を添加して、混合物を90 °C まで加熱して、8時間攪拌した。溶媒を減圧によって除去して、残渣を残して、50mLのジクロロメタンに溶解した。有機層をNaHCO₃の飽和水溶液によって3回洗浄し、水によって3回行い、乾燥させて、濾過した。次いで、有機溶媒を除去した。化合物を、2mmの層の厚さのシリカプレート、及び溶出系としてCHCl₃/MeOH勾配を利用する遠心力-クロマトグラフィー装置 (Harrison Research Ltd.) を使用するクロマトグラフィーによって精製した。

収率 : 0.33 g (46.2%) ; 融点 : 127.0 ~ 127.5

¹H NMR 1.1 ~ 1.2 (t, 2H), 1.55 ~ 1.6 (t, 2H), 2.0 ~ 2.1 (m, 2H), 3.5 ~ 3.6 (m, 2H), 3.7 ~ 3.8 (s, 6H), 4.1 ~ 4.2 (t, 2H), 6.8 ~ 6.9 (m, 3H), 7.65 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 8.8 (m, 1H), 9.05 (s, 1H); MS m/z 346.0 (M+H), 278.2 (M-C₃H₃N₂•), 177.1 (M-C₆H₈N₃S•)

【0305】

実施例133~135

1当量のトリエチルアミン、及び3,4-ジメトキシアニリンのジオキサン中の混合物を、対応する-ブロモアルキ酸性塩化物の攪拌溶液に0 °C の温度にて添加した。溶液を室温に温めて、2時間攪拌した。溶媒を蒸発させて、残りの油をジクロロメタンに再融解した。有機層を水によって洗浄して、乾燥させて、濾過して、溶媒を減圧下で除去した。

【0306】

イミダゾール、及び水素化ナトリウムを懸濁して、混合物を室温にて3時間不活性条件下で攪拌した。-ブロモ-N-(3,4-ジメトキシフェニル)アルキルアミドを添加して、混合物を100 °C まで加熱して、8時間攪拌した。その後、溶媒を蒸発させ、熱いトルエンを添加して、溶液を濾過した。次いで、溶媒を減圧下で除去した。チオアミドへの変換は、実施例113~132について記述したとおりに、Laweson試薬によって行って、13~20%の全収率で133~135を与えた。

【0307】

上に記述した一般的な合成スキームに従って合成した更なる実施例についての解析データは、以下の通りである：

【0308】

実施例1: 1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-メチルチオ尿素

10

20

30

40

50

融点 : 122 ~ 122.5

¹H NMR 1.85 - 1.95 (m, 2H), 2.8 (s, 3H), 3.2 - 3.5 (br d, 2H), 3.8 - 3.9 (m, 2H), 6.85 (d, 1H), 7.15 (d, 1H), 7.3 - 7.5 (br d, 2H), 7.65 (s, 1H); MS m/z 199.1 (M+H), 221.3 (M+Na), 131.0 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0309】

実施例2: 1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-tert-ブチルチオ尿素

融点 : 147.0-147.5

¹H NMR 1.3 - 1.4 (s, 9H), 1.85 - 1.95 (m, 2H), 3.5 (t, 2H), 3.8 (t, 2H), 6.85 (d, 1H), 7.15 (d, 1H), 7.3 - 7.5 (br d, 2H), 7.65 (s, 1H); MS m/z 241.1 (M+H), 173.1 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0310】

実施例3: 1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-ベンジルチオ尿素

融点 : 127.0 - 128.0

¹H NMR 1.85 - 1.95 (m, 2H), 3.2 - 3.5 (br d, 2H), 3.8 - 3.9 (m, 2H), 4.6 (s, 2H), 6.8 (d, 1H), 7.15 (d, 1H), 7.19 - 7.35 (m, 5H), 7.5 - 7.6 (br d, 2H), 7.85 (s, 1H); MS m/z 275.3 (M+H), 207.1 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0311】

実施例5: 1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-フェニルチオ尿素

融点 : 166.5 - 167.0

¹H NMR 1.95 - 2.05 (m, 2H), 3.3 - 3.5 (br d, 2H), 3.9 - 4.0 (m, 2H), 6.85 (d, 1H), 7.05 (m, 1H), 7.15 (d, 1H), 7.25 (m, 2H), 7.35 (m, 2H), 7.6 (s, 1H), 7.8 (br s, 1H), 9.5 (br s, 1H); MS m/z 261.1 (M+H), 193.2 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0312】

実施例6: 1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(4-フルオロフェニル)チオ尿素

融点 : 147.0 - 148.0

¹H NMR 1.95 - 2.05 (m, 2H), 3.3 - 3.5 (br d, 2H), 3.9 - 4.05 (m, 2H), 6.85 (d, 1H), 7.05 - 7.15 (m, 3H), 7.3 - 7.4 (m, 2H), 7.6 (s, 1H), 7.7 - 7.8 (br s, 1H), 9.4 (br s, 1H); MS m/z 279.3 (M+H), 211.2 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0313】

実施例7: 1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(4-エチルフェニル)チオ尿素

融点 : 100.0 - 100.5

¹H NMR 1.15 - 1.2 (t, 3H), 1.9 - 2.0 (m, 2H), 2.5 - 2.6 (m, 2H), 3.3 - 3.5 (br d, 2H), 3.9 - 4.05 (m, 2H), 6.85 (d, 1H), 7.1 - 7.2 (m, 3H), 7.25 - 7.3 (m, 2H), 7.6 (s, 1H), 7.7 - 7.8 (br s, 1H), 9.4 (br s, 1H); MS m/z 289.3 (M+H), 221.1 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0314】

実施例8: 1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(4-(トリフルオロメチル)フェニル)チオ尿素

融点 : 154.5 - 155.0

¹H NMR 1.9 - 2.1 (br m, 2H), 3.4 - 3.6 (br d, 2H), 3.95 - 4.1 (br m, 2H), 6.85 (d, 1H), 7.2 (d, 1H), 7.6 - 7.8 (m, 5H), 8.2 (br s, 1H), 9.9 (br s, 1H); MS m/z 329.3 (M+H), 261.2 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0315】

実施例10: 1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(4-アセチルフェニル)チオ尿素

融点 : 170.0 - 171.0

¹H NMR 1.9 - 2.1 (br m, 2H), 2.4 - 2.5 (s, 3H), 3.2 - 3.5 (br m, 2H), 3.9 - 4.1 (m, 2H), 6.85 (d, 1H), 7.15 (d, 1H), 7.5 - 7.65 (br m, 3H), 7.8 - 7.9 (m, 2H), 8.1 (m, 2H), 9.8 (br s, 1H); MS m/z 303.2 (M+H), 235.1 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0316】

10

20

30

40

50

実施例11：1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(4-メトキシフェニル)チオ尿素

融点：125.0 -125.5

¹H NMR 1.8 - 2.0 (br m, 2H), 3.2 - 3.5 (br m, 2H), 3.7 (s, 3H), 3.9 - 4.0 (m, 2H), 6.7 - 6.9 (m, 3H), 7.1 - 7.2 (m, 3H), 7.5 (s, 1H), 7.6 (s, 1H), 9.2 (s, 1H); MS m/z 291.1 (M+H), 223.2 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0317】

実施例14：1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(2,4-ジメトキシフェニル)チオ尿素

融点：120.0 -120.5

¹H NMR 1.8 - 2.0 (br m, 2H), 3.4 - 3.5 (br m, 2H), 3.75 (s, 6H), 3.9 - 4.0 (m, 2H), 6.5 (d, 1H), 6.6 (s, 1H), 6.9 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.3 (d, 1H), 7.5 (br s, 1H), 7.6 (s, 1H), 9.75 (s, 1H); MS m/z 321.2 (M+H), 253.3 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0318】

実施例15：1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(3,5-ジメトキシフェニル)チオ尿素

融点：142.0 -143.0

¹H NMR 1.8 - 2.0 (br m, 2H), 3.4 - 3.5 (br m, 2H), 3.6 (s, 6H), 3.95 - 4.0 (m, 2H), 6.25 (m, 1H), 6.6 (m, 2H), 6.9 (s, 1H), 7.2 (s, 1H), 7.6 (s, 1H), 7.8 (s, 1H), 9.5 (s, 1H); MS m/z 321.2 (M+H), 253.3 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0319】

実施例23：1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(2,3-ジヒドロベンゾ[b][1,4]ジオキシン-7-イル)-チオ尿素

融点：103.0 -103.5

¹H NMR 1.9 - 2.0 (br m, 2H), 3.3 - 3.5 (br d, 2H), 3.9 - 4.0 (m, 2H), 4.2 - 4.3 (m, 4H), 6.7 (m, 1H), 6.8 - 6.8 (m, 1H), 6.9 (m, 2H), 7.2 (s, 1H), 7.6 (m, 2H), 9.3 (s, 1H); MS m/z 319.3 (M+H), 251.3 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0320】

実施例24：1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-6-イル)チオ尿素

融点：115.0 -115.6

¹H NMR 1.9 - 2.1 (br m, 2H), 3.4 - 3.5 (br d, 2H), 4.05 - 4.15 (m, 2H), 6.0 (s, 2H), 6.7 (m, 1H), 6.8 - 6.85 (m, 1H), 6.95 (d, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.7 (br s, 1H), 8.5 (br s, 1H), 9.4 (br s, 1H); MS m/z 305.2 (M+H), 237.2 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0321】

実施例25：1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(3,4,5-トリメトキシフェニル)チオ尿素

融点：124.5 -125.5

¹H NMR 1.8 - 2.0 (m, 2H), 3.4 - 3.5 (br m, 2H), 3.6 (s, 3H), 3.7 (s, 6H), 3.9 - 4.0 (m, 2H), 6.65 (m, 2H), 6.85 (s, 1H), 7.2 (s, 1H), 7.6 (s, 1H), 7.7 (br s, 1H), 9.4 (s, 1H); MS m/z 351.3 (M+H), 283.2 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0322】

実施例26：1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(3-メトキシフェニル)チオ尿素

融点：89.5 -90.0

¹H NMR 1.9 - 2.1 (br m, 2H), 3.4 - 3.5 (br m, 2H), 3.7 (s, 3H), 3.9 - 4.0 (m, 2H), 6.6 - 6.7 (m, 1H), 6.8 - 6.9 (m, 2H), 7.1 (m, 2H), 7.15 - 7.25 (br m, 1H), 7.6 (s, 1H), 7.8 (br s, 1H), 9.5 (s, 1H); MS m/z 291.1 (M+H), 223.2 (M-C₃H₃N₂ ·)。

10

20

30

40

50

【0323】

実施例27: 1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(4-エトキシフェニル)チオ尿素
融点: 126.0 - 126.5

¹H NMR 1.5 (br m, 3H), 1.9 - 2.0 (br m, 2H), 3.4 - 3.5 (br m, 2H), 3.9 - 4.0 (br m, 4H), 6.8 - 6.9 (m, 2H), 6.95 (s, 1H), 7.15 - 7.2 (m, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.55 - 7.6 (br s, 1H), 7.8 (s, 1H), 9.3 (s, 1H); MS m/z 305.2 (M+H), 237.2 (M-C₃H₃N₂•)。

【0324】

実施例-33: 1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(4-(メチルチオ)フェニル)チオ尿素

融点: 140.0 - 140.5

¹H NMR 1.8 - 2.05 (br m, 2H), 2.5 (s, 3H), 3.3 - 3.5 (br m, 2H), 3.9 - 4.1 (m, 2H), 6.9 (m, 1H), 7.1 - 7.3 (br m, 5H), 7.6 (s, 1H), 7.75 (br s, 1H), 9.4 (s, 1H); MS m/z 307.2 (M+H), 239.2 (M-C₃H₃N₂•)。

10

【0325】

実施例42: 1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(4-ニトロフェニル)チオ尿素
融点: 165.0 - 166.0

¹H NMR 1.9 - 2.05 (m, 2H), 3.3 - 3.5 (br d, 2H), 3.95 - 4.05 (m, 2H), 6.85 (d, 1H), 7.15 (d, 1H), 7.6 (d, 1H), 7.7 (m, 2H), 8.1 (m, 2H), 8.3 (br s, 1H), 10.1 (br s, 1H); MS m/z 306.2 (M+H), 237.9 (M-C₃H₃N₂•)。

20

【0326】

実施例50: 1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(4-(ジメチルアミノ)フェニル)チオ尿素

融点: 146.5 - 147.0

¹H NMR 1.9 - 2.0 (m, 2H), 2.9 (s, 6H), 3.4 (m, 2H), 3.9 - 4.0 (m, 2H), 6.7 (m, 2H), 6.9 (s, 1H), 7.05 - 7.1 (m, 2H), 7.15 (s, 1H), 7.4 (br s, 1H), 7.6 (s, 1H), 9.2 (s, 1H); MS m/z 304.2 (M+H), 236.0 (M-C₃H₃N₂•)。

30

【0327】

実施例102: 1-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-3-(3,4-ジメトキシフェニル)尿素

融点: 114.5 - 115.0

¹H NMR 1.7 - 1.9 (m, 2H), 2.9 - 3.1 (m, 2H), 3.7 (2s, 6H), 3.9 - 4.0 (m, 2H), 6.1 (t, 1H), 6.7 (s, 2H), 6.8 (s, 1H), 7.15 (d, 2H), 7.6 (s, 1H), 8.2 (s, 1H); MS m/z 321.2 (M+H), 253.3 (M-C₃H₃N₂•)。

30

【0328】

実施例106: 1-((S)-3-(1H-イミダゾール-1-イル)-2-メチルプロピル)-3-(3,4-ジメトキシフェニル)-チオ尿素

融点: 150.5 - 151.5

¹H NMR 0.9 (d, 3H), 2.3 - 2.4 (m, 2H), 2.5 (s, 1H), 3.7 (d, 6H), 4.0 - 4.1 (br m, 1H), 4.15 - 4.25 (br m, 1H), 6.75 - 6.8 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.9 - 7.0 (m, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.75 (s, 2H), 9.1 (s, 1H), 9.5 (s, 1H); MS m/z 335.6 (M+H), 267.1 (M-C₃H₃N₂•)。

40

【0329】

実施例107: 1-((R)-3-(1H-イミダゾール-1-イル)-2-メチルプロピル)-3-(3,4-ジメトキシフェニル)-チオ尿素

融点: 155.0 ~ 157.5

¹H NMR 0.9 (d, 3H), 2.3 - 2.4 (m, 2H), 2.5 (s, 1H), 3.7 (d, 6H), 4.0 - 4.1 (br m, 1H), 4.15 - 4.25 (br m, 1H), 6.75 - 6.8 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.9 - 7.0 (m, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.75 (s, 2H), 9.1 (s, 1H), 9.5 (s, 1H); MS m/z 335.4 (M+H), 267.2 (M-C₃H₃N₂•)。

50

【0330】

実施例109：1-((1-((1H-イミダゾール-1-イル)メチル)シクロプロピル)メチル)-3-(3,4-ジメトキシ-フェニル)チオ尿素

融点：166.5 -168.5

¹H NMR 0.7 - 0.8 (br m, 2H), 1.85 - 1.9 (m, 1H), 2.15 - 2.2 (m, 1H), 2.2 - 2.3 (m, 1H), 3.4 - 3.5 (m, 1H), 3.7 (d, 6H), 4.2 (s, 1H), 4.95 (s, 1H), 6.75 - 6.8 (br m, 1H), 6.85 - 6.9 (br m, 1H), 7.0 (s, 1H), 7.5 (m, 1H), 7.6 (m, 1H), 7.7 (s, 0.5H), 7.8 (s, 0.5H), 8.85 (s, 0.5H), 9.1 (s, 0.5H), 9.35 (s, 0.5H), 9.45 (s, 0.5H); MS m/z 347.2 (M+H), 279.2 (M-C₃H₃N₂•), 137.5 (M-C₉H₁₃N₄S•)。

【0331】

実施例110：N-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)ベンゾ[d]チアゾール-2-アミン

¹H NMR 1.95 - 2.15 (m, 2H), 3.25 - 3.35 (m, 2H), 4.0 - 4.1 (t, 2H), 6.9 (s, 1H), 6.95 - 7.05 (t, 1H), 7.15 - 7.2 (m, 2H), 7.35 - 7.4 (d, 1H), 7.60 - 7.70 (m, 2H), 8.0 - 8.1 (br s, 1H); MS m/z 259.4 (M+H), 191.3 (M-C₃H₃N₂•)。

【0332】

実施例111：N-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-6-クロロベンゾ[d]チアゾール-2-アミン

¹H NMR 1.95 - 2.15 (m, 2H), 3.25 - 3.35 (m, 2H), 4.0 - 4.1 (t, 2H), 6.9 (s, 1H), 7.1 - 7.2 (d, 2H), 7.3 - 7.4 (d, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.8 (s, 1H), 8.2 (s, 1H); MS m/z 293.3 (M+H), 225.3 (M-C₃H₃N₂•)。

【0333】

実施例112：N-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-6-メトキシベンゾ[d]チアゾール-2-アミン

¹H NMR 1.9 - 2.05 (m, 2H), 3.2 - 3.3 (m, 2H), 3.7 (s, 3H), 4.0 - 4.1 (t, 2H), 6.7 - 6.8 (d, 1H), 6.9 (s, 1H), 7.15 - 7.2 (s, 1H), 7.2 - 7.3 (m, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.8 (s, 1H); MS m/z 289.1 (M+H), 221.4 (M-C₃H₃N₂•)。

【0334】

実施例115：(R)-N-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-2-フェニルプロパンチオアミド

融点：82.0 -82.5

¹H NMR 1.4 - 1.55 (d, 3H), 1.9 - 2.0 (m, 2H), 3.4 - 3.5 (m, 2H), 3.85 - 3.95 (m, 2H), 4.0 - 4.1 (q, 1H), 6.8 - 6.9 (s, 1H), 7.1 (s, 1H), 7.15 - 7.2 (m, 1H), 7.2 - 7.3 (m, 2H), 7.35 - 7.4 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 10.1 (s, 1H); MS m/z 274.4 (M+H), 206.3 (M-C₃H₃N₂•)。

【0335】

実施例116：(S)-N-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-2-フェニルプロパンチオアミド

融点：82.5 -83.5

¹H NMR 1.4 - 1.55 (d, 3H), 1.9 - 2.0 (m, 2H), 3.4 - 3.5 (m, 2H), 3.85 - 3.95 (m, 2H), 4.0 - 4.1 (q, 1H), 6.8 - 6.9 (s, 1H), 7.1 (s, 1H), 7.15 - 7.2 (m, 1H), 7.2 - 7.3 (m, 2H), 7.35 - 7.4 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 10.1 (s, 1H); MS m/z 274.4 (M+H), 206.3 (M-C₃H₃N₂•)。

【0336】

実施例121：N-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-1-(4-クロロフェニル)シクロプロパンカルボチオアミド

融点：137.5 -139.0

¹H NMR 1.55 - 1.75 (br m, 2H), 1.85 - 1.95 (br m, 2H), 2.4 - 2.5 (br m, 2H), 2.7 - 2.85 (br m, 2H), 3.3 - 3.5 (br m, 2H), 3.8 (m, 2H), 6.9 (s, 1H), 7.0 (s, 1H), 7.3 (m, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.5 (m, 2H), 9.6 (t, 1H); MS m/z 334.3 (M+H), 266.1 (M-C₃H₃N₂•)。

10

20

30

40

50

【0337】

実施例122：N-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-1-(4-クロロフェニル)シクロペンタノカルボチオアミド

融点：140.0 -141.0

¹H NMR 1.5 - 1.65 (br m, 4H), 1.8 - 1.9 (m, 2H), 2.0 - 2.1 (m, 2H), 2.6 (m, 2H), 3.4 - 3.5 (m, 2H), 3.7 - 3.8 (m, 2H), 6.85 (s, 1H), 7.0 (s, 1H), 7.35 (m, 2H), 7.4 (m, 2H), 7.5 (s, 1H), 9.4 (t, 1H); MS m/z 348.2 (M+H), 280.2 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0338】

実施例123：N-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-1-(4-メトキシフェニル)シクロヘキサンカルボチオアミド

融点：162.5 -164.0

¹H NMR 1.2 - 1.3 (m, 1H), 1.35 - 1.5 (br m, 5H), 1.85 - 2.0 (br m, 4H), 2.4 - 2.6 (br m, 2H), 3.4 - 3.5 (m, 2H), 3.7 (s, 3H), 3.8 (m, 2H), 6.8 (m, 3H), 7.0 (s, 1H), 7.3 (m, 2H), 7.5 (s, 1H), 9.2 (t, 1H); MS m/z 358.3 (M+H), 290.3 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0339】

実施例124：N-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-1-(4-メトキシフェニル)シクロプロパンカルボチオアミド

融点：129.0 -129.5

¹H NMR 1.0 - 1.1 (m, 2H), 1.5 - 1.6 (m, 2H), 1.9 - 2.0 (br m, 2H), 3.4 - 3.5 (m, 2H), 3.7 (s, 3H), 3.9 (m, 2H), 6.9 (m, 3H), 7.1 (s, 1H), 7.2 - 7.3 (m, 2H), 7.6 (s, 1H), 8.9 (br s, 1H); MS m/z 316.0 (M+H), 248.4 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0340】

実施例134：5-(1H-イミダゾール-1-イル)-N-(3,4-ジメトキシフェニル)ペンタノチオアミド

融点：128.0 ~ 128.5

¹H NMR 1.65 - 1.70 (m, 2H), 1.75 - 1.80 (m, 2H), 2.7 - 2.75 (m, 2H), 3.7 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 4.0 - 4.05 (t, 2H), 6.9 - 7.0 (m, 2H), 7.2 (s, 1H), 7.3 (d, 1H), 7.5 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 11.0 (s, 1H); MS m/z 320.2 (M+H), 252.2 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0341】

実施例136：1-(2-(1H-イミダゾール-1-イル)エチル)-3-(3,4-ジメトキシフェニル)チオ尿素

融点：157.5 -159.0

¹H NMR 3.7 (2s, 6H), 3.8 (m, 2H), 4.2 (m, 2H), 6.7 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.9 (m, 2H), 7.15 (s, 1H), 7.5 (br s, 1H), 7.6 (s, 1H), 9.5 (s, 1H); MS m/z 307.2 (M+H), 239.1 (M-C₃H₃N₂ ·)。

【0342】

10

20

30

【表 27】

略語

℃	摂氏度	
A、Ala	アラニン	
$\text{A}\beta$	アミロイド- β ペプチド	
ABri	家族性英国痴呆におけるアミロイドペプチド	
AC	アデニリルシクラーゼ	10
ADan	家族性デンマーク痴呆におけるアミロイドペプチド	
AIM	メラノーマに存在しない	
AMC	アミノメチルクマリン	
as	アンチセンス	
Asp	アスパラギン酸	
β NA	β -ナフチルアミン	
BA	酪酸	20
bp	塩基対	
BSA	ウシ血清アルブミン	
C	システィン	
CAT	クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ	
cAMP	環状アデノシン一リン酸	
CCL2	MCP-1、单球化学誘引物質タンパク質1	
CCL7	MCP-3、单球化学誘引物質タンパク質3	30
CCL8	MCP-2、单球化学誘引物質タンパク質2	
CCL13	MCP-4、单球化学誘引物質タンパク質4	
cDNA	コピーDNA	
C-His	C末端ヒスチジンタグ	
CIDP	慢性炎症性脱髓性多発根神経炎	
C1	塩素	
CSF	脳脊髄液 (脳脊髄液)	40
C 末端	カルボキシ末端	
CTL	細胞障害性Tリンパ球	
CV	カラム床体積	
d	直径	
Da	ダルトン	

DMSO	ジメチルスルホキシド	
DNA	デオキシリボ核酸	
E	酵素	
EBV	エブスタイン・バーウイルス	
ECL	腸クロム親和性細胞様	
<i>E. coli</i>	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)	10
EC	グルタミルシクラーゼ	
ED	有効用量	
EGFP	高感度緑色蛍光タンパク質	
ES	酵素 - 基質複合体	
FPP	受精促進ペプチド	
FTC	滤胞性甲状腺癌腫	
g	相対遠心力	20
GBS	ギランバレー症候群	
GF	ゲル濾過	
Gln	グルタミン	
Glu	グルタミン酸	
GnRH	生殖腺刺激ホルモン (ゴナドリベリン)	
GST	グルタチオン S-トランスフェラーゼ	
H	水素	30
h	ヒト、時間	
HGF	肝細胞増殖因子	
HIC	疎水性相互作用クロマトグラフィー	
HIF1a	低酸素誘導因子 1a	
His	ヒスチジン	
HPLC	高速液体クロマトグラフィー	
I	阻害剤、イソロイシン	40
ID	同定	
IMAC	固定された金属アフィニティークロマトグラフィー	
IPTG	イソプロピル-β-D-チオガラクトシド	
K	カリウム	
k	一定	
kDa	キロダルトン	

k_i	阻害剤定数	
KLH	キーホールリンペットヘモシアニン	
l	長さ	
LB	ルリア・バルダニ(Luria-Bertani)	
LD	致死量	
LPS	リポ多糖	
M	モル濃度	10
μ l	マイクロリットル	
μ M	マイクロモル	
MAGEA	メラノーマ抗原ファミリーA	
MAGEB	メラノーマ抗原ファミリーB	
Maldi-tof	マトリックス支援レーザー脱離イオン飛行時間型	
MART1	T細胞によって認識されるメラノーマ抗原	
max	最大	20
MCL-1	骨髓性細胞白血病1	
Met	メチオニン	
min	分	
mM	ミリモル濃度	
MS	多発性硬化症	
mRNA	メッセンジャーRNA	
N	アスパラギン	30
Na	ナトリウム	
NADH	ニコチンアミドアデニジヌクレオチド	
nm	ナノメートル	
NO	数	
NT	ニューロテンシン	
N末端	アミノ末端	
O	酸素	40
OD	光学濃度	
P	生成物、リン光体	
PBS	リン酸塩緩衝食塩水	
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応法	
pGlu	ピログルタミン酸	

pH	水素指数	
Pro	プロリン	
PTC	乳頭甲状腺癌腫	
Pyr	ピログルタミン酸	
QC	グルタミニルシクラーゼ (グルタミニル-ペプチドシクロトランスフェラーゼ)	
qPCR	定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法	10
QPCTL	グルタミニル-ペプチドシクロトランスフェラーゼ様	
RNA	リボ核酸	
RT	逆転写；逆転写酵素	
S	基質	
s	センス	
SAGE	遺伝子発現の経時的解析	
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム	20
SDS-PAGE	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動	
SGAP	ストレプトマイセス・グリセウス (<i>Streptomyces griseus</i>) アミノペプチダーゼ	
SEQ	配列	
SNP	一塩基多型	
taa	腫瘍関連抗原	
TGF- β	トランスフォーミング増殖因子ベータ	
TNF- α	腫瘍壞死因子 α	30
TRH	甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (チレオリベリン (thyreoliberin))	
TSH	甲状腺刺激ホルモン	
TYR	チロシナーゼ	
TYRP	チロシナーゼ関連タンパク質	
U	単位	
UTC	未分化甲状腺癌腫	40
UV	紫外線	
V	速度	
VpAP	ビブリオ・プロテロリチカ (<i>Vibrio proteolytica</i>) アミノペプチダーゼ	
YSS	酵母シグナル配列	
Zn	亜鉛	

【図5】

Figure 5

HQC --> MAGRRHRRVWVGTLLHLLJLVAALP ----- WASRGPVSASANPFRKWHQPAATNS
hisoQC MEPPLLPPKRLRFLPVRLHLLPLLAVALGSAFYTJWSQWHRTEPLGLRGLRVLICSLP

HQC SALRQIACTGSITSMQWQGLPDLIERYRPGPSGQYARQHORIGLWQDQWQHLEWLT
hisoQC AERLRLRQWQGLPDLIERYRPGPSGQYARQHORIGLWQDQWQHLEWLT

HQC SCGTPYGRFSN11STHNPTRKHLVLAUCHDSKFYSHQNNRPPVFCATSDAVNCMML
hisoQC ASTPLGPWFQGVNNATLDFRAARHLTACHYDSKLFPPGS-TPFVCATSDAVNCMML

HQC ARAUDXKLHLLSKYTGSKRPLQHLLFPGDGEFLINNSGRHLAKMAMSTPPR
hisoQC AQAUDLXKLHLLSKYTGSKRPLQHLLFPGDGEFLINNSGRHLAKMAMSTPPR

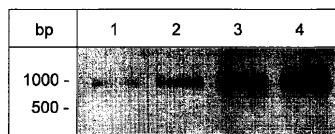
HQC GABRQGQIQLGQNLWLLD1GCPMP7FWMP7FWGQANMTRPQATQEHEWGLGNLHQE
hisoQC -----
HQC GYRQFQSYQVQGDH1PFLPRGCVPU1LQ1PDPPEVNPWQHNEQMSL0STDMLW1
hisoQC VVWVQVSESSGZD1HLLFPLRQWVLL1STPENHVEPQDTHP1VPLVHBL

HQC LOWFVLSYHHL
hisoQC LAVPFLAYLGL

* * * * *

〔 义 6 〕

Figure 6



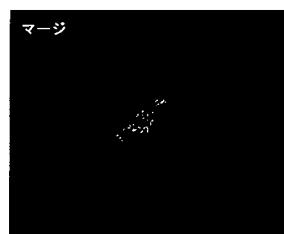
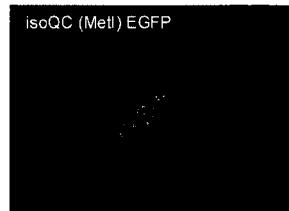
〔圖 8〕

图 8



【 図 7 】

27



マンノシダーゼ |

〔 図 9 〕

図9



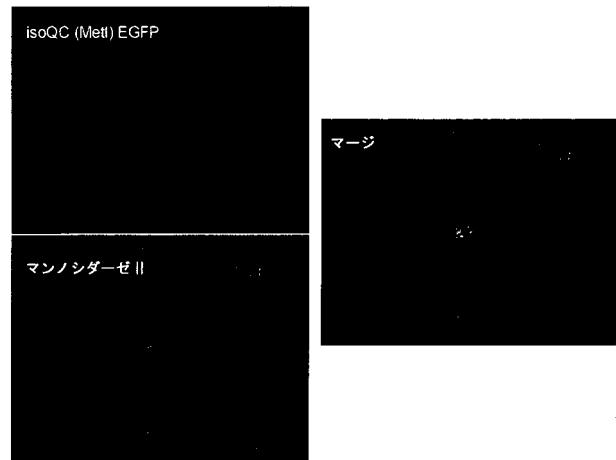
【図10】

図10



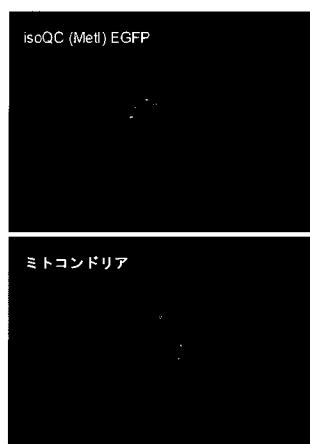
【図11】

図11



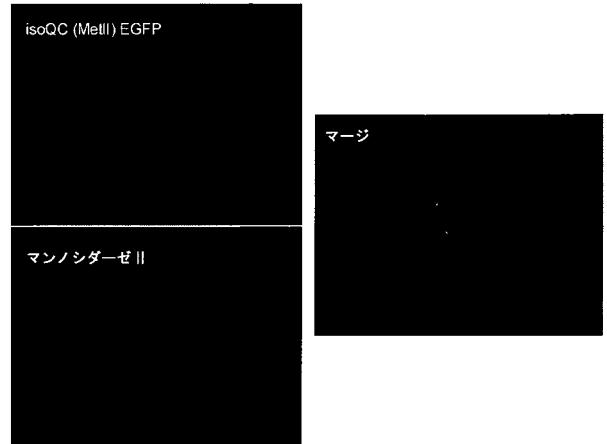
【図12】

図12



【図13】

図13



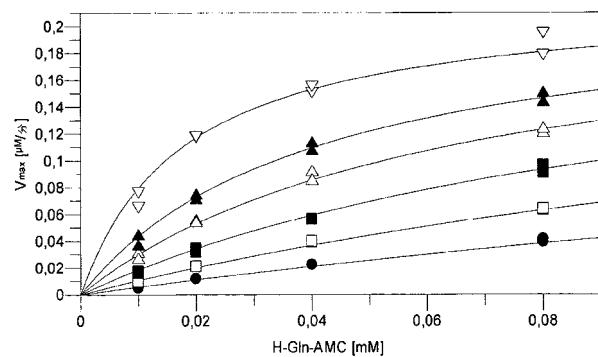
【図14】

図14



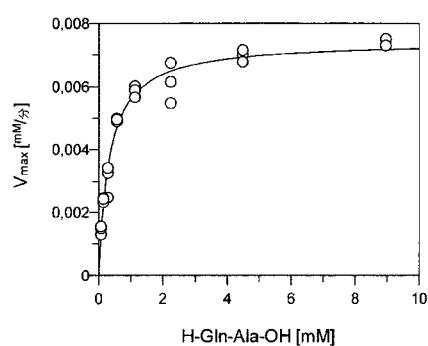
【図15】

図15



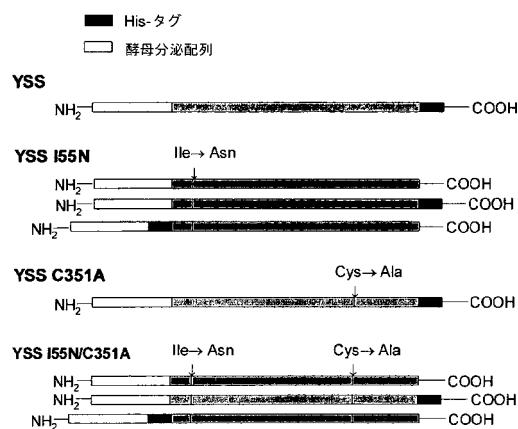
【図16】

図16



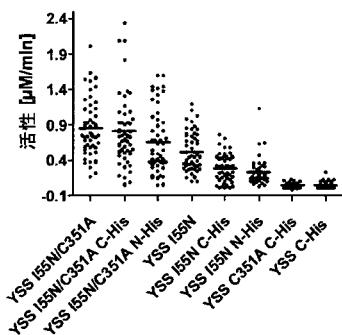
【図17】

図17



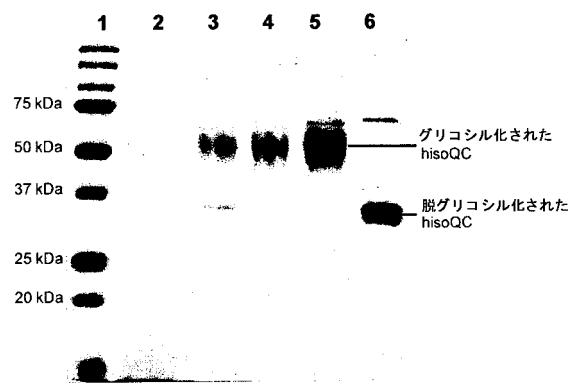
【図18】

図18



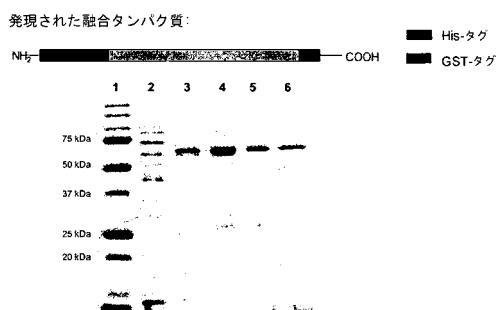
【図19】

図19



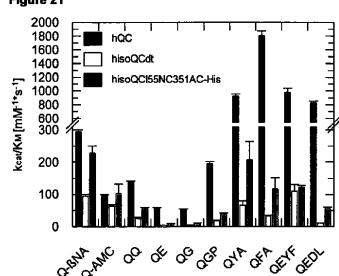
【図20】

図20



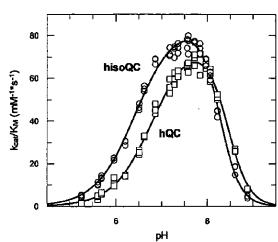
【図21】

Figure 21



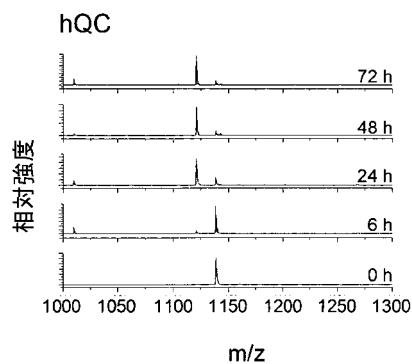
【図22】

Figure 22

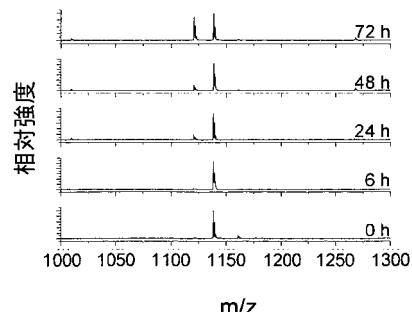


【図23】

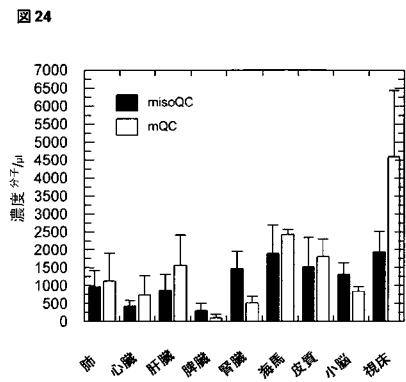
図23



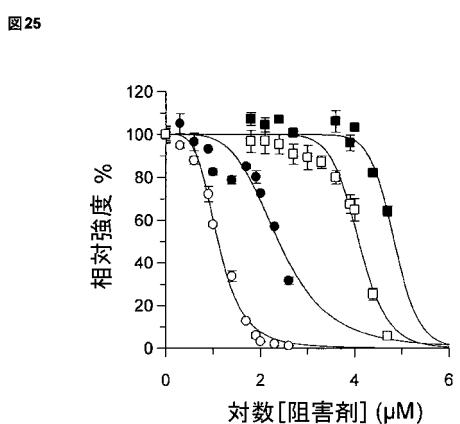
YSShisoQI55NC351AC-His



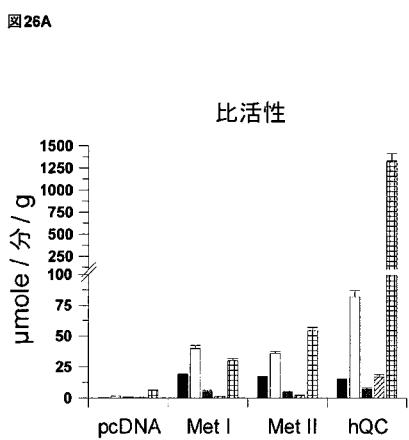
【図24】



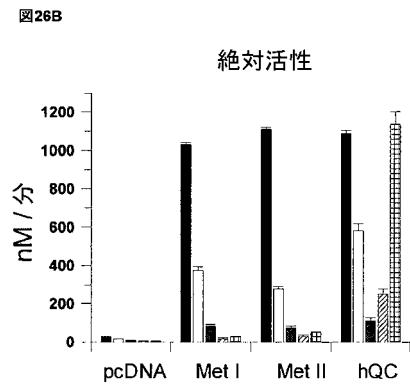
【図25】



【図26A】

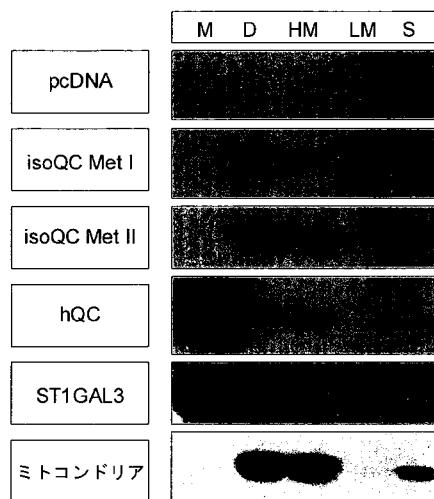


【図26B】

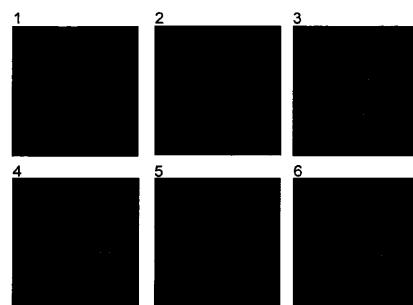


【図 26C】

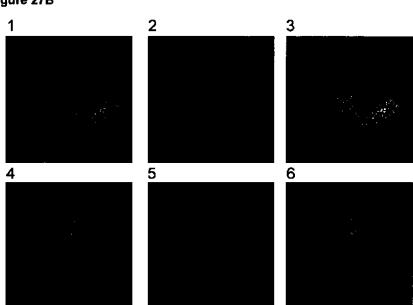
図26C



【図 27A】

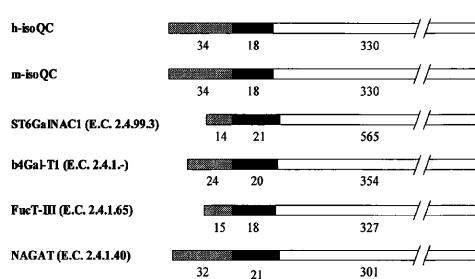


【図 27B】



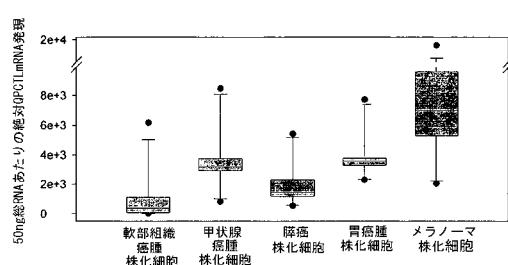
【図 28】

Figure 28



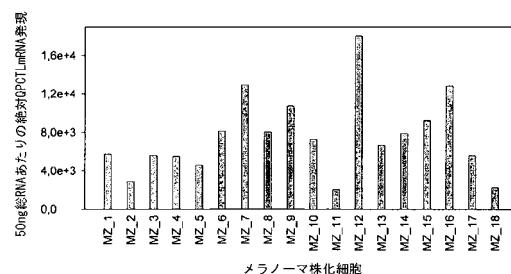
【図 29】

図29



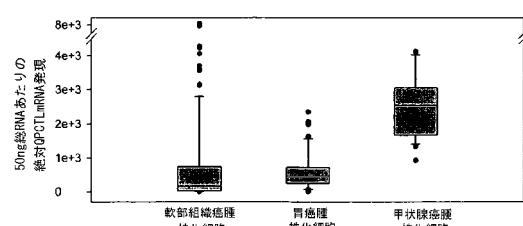
【図 30】

図30



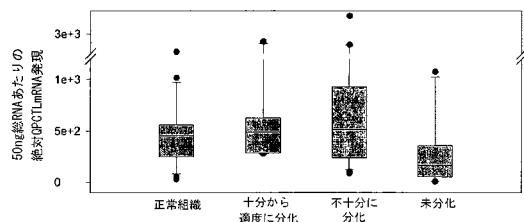
【図 31】

図31



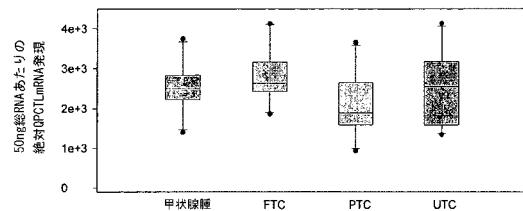
【図32】

図32



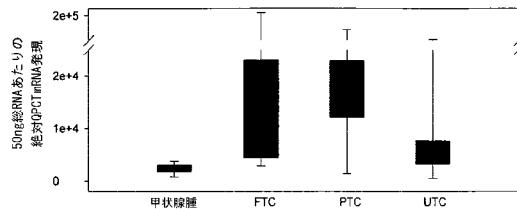
【図34】

図34



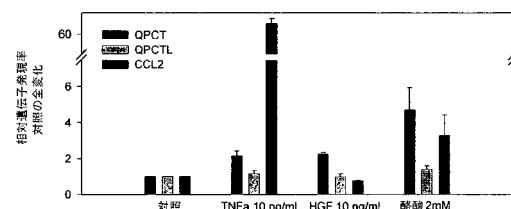
【図33】

図33



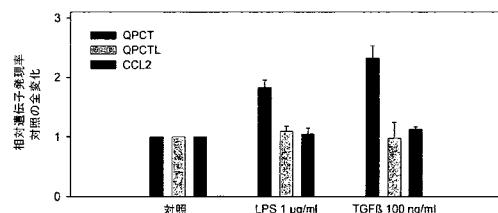
【図35】

図35



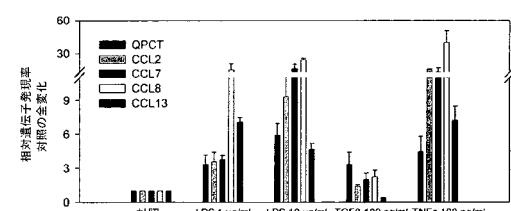
【図36】

図36



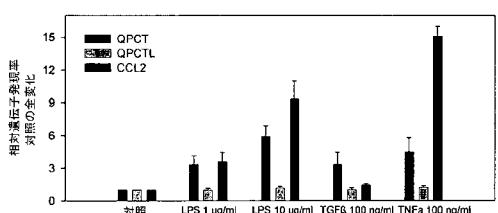
【図38】

図38



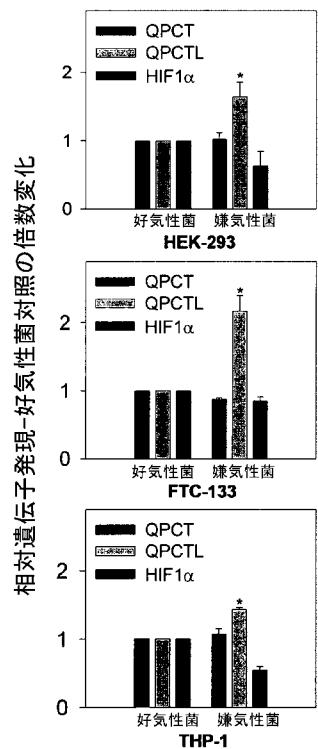
【図37】

図37



【図39】

図39



【配列表】

2010504088000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成21年5月20日(2009.5.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 4】

【図1】ヒトQC (hQC)、ヒトisoQC (hisoQC)、マウスQC (mQC)、及びマウスisoQC (misoQC) の配列整列を示す。複数の配列整列を、PBIL (Pole Bioinformatique Lyonnais) (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) にてClustalWをデフォルト設定で使用して行った。亜鉛イオン結合残基の保存を、ヒトQC (hQC; GenBank X71125、配列番号: 10)、ヒトisoQC (hisoQC; GenBank NM_017659、配列番号: 11)、マウスQC (mQC; GenBank NM_027455、配列番号: 79)、及びマウスisoQC (misoQC; GenBank BC058181、配列番号: 17) について太字体で、かつ下線を引いて示してある。

【図2】ヒト (hisoQC; GenBank NM_017659、配列番号: 11)、カニクイザル (Macaca fascicularis) (M_fascicularis; GenBank AB168255、配列番号: 13)、アカゲザル (Macaca mulatta) (M_mulatta; GenBank XM_001110995、配列番号: 14)、イヌ (Canis familiaris) (C_familiaris; GenBank XM_541552、配列番号: 15)、ラット (Rattus norvegicus) (R_norvegicus; GenBank XM_001066591、配列番号: 16)、マウス (Mus musculus) (M_musculus; GenBank BC058181、配列番号: 17)、及びウシ (Bos taurus) (B_taurus; GenBank BT026254、配列番号: 18) 由来isoQCの配列整列を示す。複数の配列整列を、PBIL (Pole Bioinformatique Lyonnais) (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) にてClustalW

をデフォルト設定で使用して行った。保存された亜鉛イオン結合残基のアミノ酸には、下線を引いてあり、かつ太字体でタイプしてある。

【図3】ヒトQC (hQC、配列番号：10)、及びヒトisoQC (hisoQC、配列番号：12)、及びその他の金属ペプチダーゼClan MHのM28ファミリーメンバーの配列整列を示す。複数の配列整列は、ch.EMBnet.orgにてClustalWを使用してデフォルト設定で行った。ヒトQC (hQC ; Swiss-Prot Q16769、配列番号：10) 内の単一の亜鉛イオンを結合するアミノ酸残基の保存をヒトisoQC (isoQC ; Swiss-Prot Q53HE4、配列番号：12) (残基19-382)、ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) 由来のZn依存的アミノペプチダーゼ (SGAP ; Swiss-Prot P80561、配列番号：80)、及びビブリオ・プロテオリチカス (*Vibrio proteolyticus*) 由来の成熟Zn依存的ロイシル-アミノペプチダーゼ (VpAP ; Swiss-Prot Q01693、配列番号：81) について示してある。それぞれのアミノ酸残基には、下線を引いてあり、かつ太字体でタイプしてある。

【図4】ヒトQC (hQC、配列番号：10)、及びヒトisoQC (hisoQC、配列番号：11) の配列整列を示し、2つの推定上の翻訳開始を示す (メチオニンI-太字体、下線を引いた；メチオニンII-太字体)。複数の配列整列を、PBIL (Pole Bioinformatique Lyonnais) <http://npsa-pbil.ibcp.fr>にてClustalWを使用してデフォルト設定で行った。ヒトisoQCに存在する膜貫通ドメインは、黒いバーによって示してある。

【図5】メチオニンII (太字体) で開始するヒトQC (hQC、配列番号：10)、及びヒトisoQC (hisoQC配列番号：12) の配列整列を示す。複数の配列整列を、ch.EMBnet.orgにてClustalWを使用してデフォルト設定で行った。金属結合に関するアミノ酸には、下線を引いてあり、かつ太字体でタイプしてある。ヒトisoQCに存在する膜貫通ドメインは、黒いバーによって示してある。

【図6】RT-PCRによるisoQC発現の解析を示す。SH-SY5Y、LN405、HaCaT、及びHep-G2における検出。レーン：bp、DNA標準；1、SH-SY5YからのヒトisoQCの増幅されたPCR産物；2、LN405からのヒトisoQCの増幅されたPCR産物；3、HaCaTからのヒトisoQCの増幅されたPCR産物；4、Hep-G2からのヒトisoQCの増幅されたPCR産物。

【図7】免疫組織化学によるisoQC (Met I、配列番号：11) 細胞下局在の解析を示す。メチオニンIにて開始するヒトisoQC (図5を参照されたい) は、LN 405においてEGFPとの融合タンパク質 (isoQC (MetI)-EGFP) として発現した。マンノシダーゼII対比染色は、AB3712 (Chemicon) を使用して行った。マージは、isoQC (MetI)-EGFP、及びマンノシダーゼII染色のオーバレイを表す。

【図8】免疫組織化学によるisoQC (Met I、配列番号：11) 細胞下局在の解析を示す。メチオニンIにて開始するヒトisoQCは、LN 405においてEGFPとの融合タンパク質 (isoQC (MetI)-EGFP) として発現した。ミトコンドリアの対比染色は、MAB1273 (Chemicon) を使用して行った。マージは、isoQC (MetI)-EGFP、及びミトコンドリアの染色のオーバレイを表す。

【図9】免疫組織化学によるisoQC (Met II、配列番号：12) 細胞下局在の解析を示す。メチオニンIIにて開始するヒトisoQCは、LN 405においてEGFPとの融合タンパク質 (isoQC (MetII)-EGFP) として発現した。マンノシダーゼII対比染色は、AB3712 (Chemicon) を使用して行った。マージは、isoQC (MetII)-EGFP、及びマンノシダーゼII染色のオーバレイを表す。

【図10】免疫組織化学によるisoQC (Met II、配列番号：12) 細胞下局在の解析を示す。メチオニンIIにて開始するヒトisoQCは、LN 405においてEGFPとの融合タンパク質 (isoQC (MetII)-EGFP) として発現した。ミトコンドリアの対比染色は、MAB1273 (Chemicon) を使用して行った。マージは、isoQC (MetII)-EGFP、及びミトコンドリアの染色のオーバレイを表す。

【図11】免疫組織化学によるisoQC (Met I、配列番号：11) 細胞下局在の解析を示す。メチオニンIにて開始するヒトisoQCは、COS-7においてEGFPとの融合タンパク質 (isoQC (MetI)-EGFP) として発現した。マンノシダーゼII対比染色は、AB3712 (Chemicon) を使用して行った。マージは、isoQC (MetI)-EGFP、及びマンノシダーゼII染色のオーバレイを

表す。

【図12】免疫組織化学によるisoQC (Met I、配列番号：11) 細胞下局在の解析を示す。メチオニンIにて開始するヒトisoQCは、COS-7においてEGFPとの融合タンパク質 (isoQC (MetI)-EGFP) として発現した。ミトコンドリアの対比染色は、MAB1273 (Chemicon) を使用して行った。マージは、isoQC (MetI)-EGFP、及びミトコンドリアの染色のオーバレイを表す。

【図13】免疫組織化学によるisoQC (Met II、配列番号：12) 細胞下局在の解析を示す。メチオニンIIにて開始するヒトisoQCは、COS-7においてEGFPとの融合タンパク質 (isoQC (MetII)-EGFP) として発現した。マンノシダーゼII対比染色は、AB3712 (Chemicon) を使用して行った。マージは、isoQC (MetII)-EGFP、及びマンノシダーゼII染色のオーバレイを表す。

【図14】免疫組織化学によるisoQC (Met III、配列番号：12) 細胞下局在の解析を示す。メチオニンIIIにて開始するヒトisoQCは、COS-7においてEGFPとの融合タンパク質 (isoQC (MetIII)-EGFP) として発現した。ミトコンドリアの対比染色は、MAB1273 (Chemicon) を使用して行った。マージは、isoQC (MetIII)-EGFP、及びミトコンドリアの染色のオーバレイを表す。

【図15】阻害剤P150/03による、ヒトisoQCで触媒されるH-Gln-AMCのpGlu-AMCへの変換の阻害を示す。データは、直線的競合阻害を考慮するミカエリス-メンテン反応速度論モデルに従って評価した。阻害剤濃度は、以下の通りであった：

【表3】

▽	0 μM
▲	0.3125 μM
△	0.625 μM
■	1.25 μM
□	2.5 μM
●	5 μM

決定された K_i -値は、 $240 \pm 8 \text{nM}$ であった。

【図16】分光光度アッセイを使用して決定される、ヒトisoQCで触媒されるH-Gln-Ala-OHのpGlu-Ala-OHへの変換を示す。データは、ミカエリス-メンテン型反応速度論に従って評価した。動力学的パラメーターは、それぞれ K_m 、及び V_{max} 値について、 $324 \pm 28 \mu\text{M}$ 、及び $7.4 \pm 0.2 \text{nM}/\text{分}$ であった。

【図17】酵母P. パストリス (*P. pastoris*) において異種発現されたヒトisoQCタンパク質構築物の概略図を提供する。2つの突然変異を一部のタンパク質に導入して、位置55 (I 55N) にグリコシル化部位、及び位置351 (C351A) に変異されたシステイン残基を生じさせた。発現のために、膜貫通ドメインを含むN末端を酵母 (YSS) の分泌シグナルに置き換えた。N末端分泌シグナルを含む構築物は、培地に効率的に分泌されるはずである。

【図18】発現する酵母細胞の培地において決定したQC活性を示す。膜貫通ドメインのため、天然の構築物は、培地に分泌されなかった (実行されていない)。グリコシル化 (I 55N) に起因して、タンパク質は、最も効率的に分泌される。突然変異C351Aは、培地においてより高いQC活性の検出を生じた。構築物は、図17に記述してある。

【図19】トランスジェニックP. パストリス (*P. pastoris*) 株の培地からの、構築物YSS hisoQC155NC351A C-Hisに基づいた、ヒトisoQCの精製を示す。QCは、IMAC (固定された金属アフィニティークロマトグラフィー、レーン3)、HIC (疎水性相互作用クロマトグラフィー、レーン4)、及び脱塩 (レーン5) の組み合わせによって精製した。酵素のグリコシル化は、タンパク質 (レーン6) の移動の変化を生じる酵素的脱グリコシルによって証明

された。レーン1、タンパク質標準：レーン2、精製前の培地。

【図20】形質転換された大腸菌 (E. coli) の細胞ホモジネートからの、構築物GST-his oQC C-Hisに基づいた、ヒトisoQCの精製を示す。isoQCは、IMAC (固定された金属アフィニティークロマトグラフィー、レーン3、)、GST-親和性 (レーン4)、脱塩 (レーン5)、及びイオン交換クロマトグラフィー (レーン6) の組み合わせによって精製した。レーン1、タンパク質標準：レーン2、精製前の細胞ホモジネート。酵母、及び大腸菌 (E. coli) において発現されたhisQC間の分子量の相違は、N末端GST-タグ融合によって生じる。発現された構築物を図の上部に模式的に提供してある。

【図21】ヒトisoQC (YSShisoQC155NC351A C-His；図17を比較)、GST-hisoQC、及びヒトQCによるジペプチド-代用薬、ジペプチド、及びオリゴペプチドの変換のための、特異性定数を示す。GST-hisoQCの特異性は、最も低く、YSShisoQC155NC351A C-Hisが続いた。最高の特異性は、ヒトQCを示し、より高い全体の酵素活性を示している。

【図22】酵母において発現されたヒトisoQC (hisQC)、及びヒトQC (hQC) で調査した触媒作用のpH-依存を示す。両タンパク質は、pH 7~8の間に最適pHを示す。適合曲線は、1つがpHにて酸性pHにて、2つが塩基性pHにて触媒作用に影響する、3つの解離基に基づく。

【図23】アミロイド- 関連ペプチドA (3-11) のN末端に存在するグルタミン酸の変換の解析を示す。解析は、Maldi-Tof質量分析法を使用して行い、基質、及び生成物は、放出された水の質量である約18Daだけ単一の炭化分子のそれらの分子量/電荷比が異なる。両方の場合において、同じタンパク質濃度が試料に存在し、ヒトisoQCがN末端のグルタミン酸も変換することを明らかに示唆していたが、ヒトQCよりも遅かった。

【図24】リアルタイムPCR使用して解析したマウスQC (mQC、配列番号：79)、及びそのアイソザイムmisoQC (配列番号：17) の組織分布を示す。両酵素は、試験した器官において発現される。しかし、mQCの発現レベルは、末梢器官と比較して脳においてより高かった。対照的に、misoQCは、より類似したレベルで全ての試験した器官、及び組織において発現され、遍在性の「ハウスキーピング」タンパク質を示している。

【図25】金属-キレート化化合物1,10-フェナントロリン (丸)、及びEDTA (四角) によるヒトisoQC (hisQC) の時間依存的阻害を示す。残留するhisQC活性は、30 分で15分間それぞれの試薬と共にhisQCの添加 (黒い記号)、又はブレインキュベーション (白い記号) の後に、直接決定した。

【図26】HEK293細胞における、pcDNA、及び天然酵素hisQC (Met I、配列番号：11)、hisQC (Met II、配列番号：12)、及びhQC、(配列番号：10) の発現の後の、QC活性の細胞下局在の生化学的解析を示す。(A) $\mu\text{mol}/\text{分}/\text{g}$ での細胞分画内の比活性。(B) nM/分での絶対活性。(C) ベクターをトランスフェクトした対照 (pcDNA) と比較した、HEK293における、C末端FLAG-タグを有するh-isoQC (Met I、配列番号：11)、h-isoQC (Met II、配列番号：12)、及びhQC (配列番号：10) の発現、続くFLAG-エピトープ (抗-DYKDDDDK (配列番号122) -抗体、Cell Signaling)、ヒトミトコンドリアの65kDaタンパク質 (抗ヒトミトコンドリア、Chemicon)、又はヒトシアル酸転移酵素ST1GAL3 (Abnova) のいずれかを検出する特異的抗体を適用するウエスタンプロット解析。

【図27】EGFP (1、4) に融合されたヒトisoQC (hisQC) シグナル配列 (27A) メチオニンI-セリン53、及び (27B) メチオニンII-セリン53の細胞下局在を示す。ゴルジ複合体は、抗マンノシダーゼII抗体 (2) を使用して染色され、ミトコンドリアは、ヒトミトコンドリアの65kDaタンパク質を検出する抗体 (5) を使用して染色した。共局在性は、EGFP蛍光、及びRed X蛍光 (3、6) の重ね合せによって示している。

【図28】ヒトグリコシルトランスフェラーゼの公開された配列： -N-アセチルガラクトサミニド -2,6-シアリルトランスフェラーゼ1 (ST6GalNAC1；E.C. 2.4.99.3)； -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ1 (b4Gal-T1、E.C. 2.4.1.-)；ガラクトシド3 (4)-L-フコシル基転移酵素 (FucT-III；E.C. 2.4.1.65)、及び糖タンパク質-フコシルガラクトシド- -N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ (NAGAT、E.C.2.4.1.40)との比較において、ヒトisoQC (hisQC)、及びマウスisoQC (misoQC) のドメイン構造を示

す。列の下に収載されたとおりのアミノ酸の数。サイトゾル部分には、陰影をつけてあり、膜貫通ヘリックスは、黒であり、かつ管腔部分は、白で図示してある。

【図29】異なる癌腫株化細胞におけるヒトisoQC (QPCTL) mRNAの定量化を示す。QPCTL発現は、50ngの総RNAに対して規準化した。ボックスの中の黒いバーは、それぞれの中央値を表す。

【図30】異なるメラノーマ株化細胞におけるヒトisoQC (QPCTL) mRNA発現の定量化を示す。QPCTL発現は、50ngの総RNAに対して規準化した。

【図31】異なる患者からの軟部組織癌腫、胃癌腫、及び甲状腺癌腫由来試料におけるヒトisoQC (QPCTL) mRNA発現の定量化を示す。QPCTL発現は、50ngの総RNAに対して規準化した。ボックスの中の黒いバーは、それぞれの中央値を表す。

【図32】これらの分化段階に対する異なる胃癌腫におけるヒトisoQC (QPCTL) mRNA発現を示す。QPCTL発現は、50ngの総RNAに対して規準化した。ボックスの中の黒いバーは、それぞれの中央値を表す。

【図33】異なる甲状腺癌腫におけるヒトQC (QPCT) mRNA発現の比較を示す。QPCT発現は、50ngの総RNAに対して規準化した。ボックスの中の黒いバーは、それぞれの中央値を表す。(FTC:濾胞性甲状腺癌腫; PTC:乳頭甲状腺癌腫; UTC:未分化甲状腺癌腫)。

【図34】異なる甲状腺癌腫におけるヒトisoQC (QPCTL) mRNA発現の比較を示す。QPCTL発現は、50ngの総RNAに対して規準化した。ボックスの中の黒いバーは、それぞれの中央値を表す。(FTC:濾胞性甲状腺癌腫; PTC:乳頭甲状腺癌腫; UTC:未分化甲状腺癌腫)。

【図35】HEK293細胞におけるヒトQC (QPCT)、ヒトisoQC (QPCTL)、及びCCL2のmRNA発現に対する異なる刺激の影響を示す。転写物の量は、刺激をしていない基礎発現に相対的に示してある。使用した刺激の濃度をx軸図面上に示してある。

【図36】FTC-133細胞におけるヒトQC (QPCT)、ヒトisoQC (QPCTL)、及びCCL2のmRNA発現に対する異なる刺激の影響を示す。転写物の量は、刺激をしていない基礎発現に相対的に示してある。使用した刺激の濃度をx軸図面上に示してある。

【図37】THP-1細胞におけるヒトQC (QPCT)、ヒトisoQC (QPCTL)、及びCCL2のmRNA発現に対する異なる刺激の影響を示す。転写物の量は、刺激をしていない基礎発現に相対的に示してある。使用した刺激の濃度をx軸図面上に示してある。

【図38】THP-1細胞におけるヒトQC (QPCT)、CCL2、CCL7、CCL8、及びCCL13のmRNA発現に対する異なる刺激の影響を示す。転写物の量は、刺激をしていない基礎発現に相対的に示してある。使用した刺激の濃度をx軸図面上に示してある。

【図39】HEK293 (A)、FTC-133 (b)、及びTHP-1 (C)におけるヒトQC (QPCT)、ヒトisoQC (QPCTL)、及びHIF1 のmRNAレベルに対する低酸素の影響を示す。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2010504088000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2007/060013

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C12N15/54 C12N9/10 A61K31/4164 C07D233/54 C07D235/06
 C07D403/12 C07D405/12 C07D417/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBL, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 26 May 2006 (2006-05-26), SUZUKI Y ET AL: "Homo sapiens mRNA for glutaminyl-peptide cyclotransferase-like variant" XP002462494	1-3,5, 9-12,14, 15
Y	Database accession no. AK222636 nucleic acid sequence	4,6,8, 16-18, 23,24
	----- -/-	

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

17 December 2007

11/03/2008

Name and mailing address of the ISA/

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, Josée

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/060013

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt 5 September 2006 (2006-09-05), SUZUKI Y ET AL: "Glutaminyl-peptide cyclotransferase-like variant" XP002462495	19-22
Y	Database accession no. Q53HE4 amino acid sequence	4,6,8, 16-18, 23,24
X	DATABASE GENESEQ 29 July 2004 (2004-07-29), PENN SG ET AL: "Human genome derived single exon probe" XP002462496	1,12
Y	Database accession no. ACH86904 abstract	4
X	WO 2004/098625 A (PROBIODRUG AG [DE]; DEMUTH HANS-ULRICH [DE]; HOFFMANN TORSTEN [DE]; NI) 18 November 2004 (2004-11-18) cited in the application page 40; claims 5-8; figures 10,12,18	28-39
Y	WO 2004/098591 A (PROBIODRUG AG [DE]; DEMUTH HANS-ULRICH [DE]; HEISER ULRICH [DE]; BUCHH) 18 November 2004 (2004-11-18) cited in the application page 40 - page 49; examples 7,8	25-27, 40-44
X	WO 2005/039548 A (PROBIODRUG AG [DE]; SCHILLING STEPHAN [DE]; HOFFMANN TORSTEN [DE]; NIE) 6 May 2005 (2005-05-06) cited in the application page 74 - page 75; figures 18,19; example 12	28-39
Y	WO 2005/075436 A (PROBIODRUG AG [DE]; SCHILLING STEPHAN [DE]; BUCHHOLZ MIRKO [DE]; NIEST) 18 August 2005 (2005-08-18) cited in the application page 22 - page 55	25-27, 40-44
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/060013

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHILLING S ET AL: "Identification of human glutaminyl cyclase as a metalloenzyme. POTENT INHIBITION BY IMIDAZOLE DERIVATIVES AND HETEROCYCLIC CHELATORS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 278, no. 50, 12 December 2003 (2003-12-12), pages 49773-49779, XP002324506 ISSN: 0021-9258 abstract	28-31
Y	BUCHHOLZ MIRKO ET AL: "The first potent inhibitors for human glutaminyl cyclase: Synthesis and structure-activity relationship" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 49, no. 2, January 2006 (2006-01), pages 664-677, XP002462493 ISSN: 0022-2623 the whole document	25-27
X	WO 2005/049025 A (ACRUX DDS PTY LTD [AU]; GONDA IGOR [AU]; MORGAN TIMOTHY MATTHIAS [AU];) 2 June 2005 (2005-06-02) claims 1,13,15	28-31
X	DATABASE CA [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; 2005, OHSUGI, TADANORI ET AL: "Anti-platelet aggregation and anti-blood coagulation activities of dipicolinic acid, a sporal component of <i>Bacillus subtilis natto</i> " XP002462497 retrieved from STN Database accession no. 145:369541 abstract & FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY RESEARCH (2005), 11(3), 308-310 CODEN: FSTRFS; ISSN: 1344-6606, 2005,	25-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/060013

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

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

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

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

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

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

7, 13; in part: 1-6, 8-12, 14-44 (all as far as applicable)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/EP2007 /060013

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 7,13; in part: 1-6, 8-12,14-44 (all as far as applicable)

Nucleic acid relating to human isoQC Met I and II (i.e. SEQ ID NOS 2,3); antisense nucleotide directed against SEQ ID NOS 2,3; nucleic acid encoding SEQ ID NOS 11,12; nucleic acid which is a splice variant and which is relating to SEQ ID NOS 2 and 3 (i.e. SEQ ID NOS 19,20); polypeptide relating to said splice variant (i.e. SEQ ID NOS 21,22); nucleic acid probe (i.e. SEQ ID NOS 53-61); expression vector comprising said nucleic acid; host cell comprising said expression vector; process for producing polypeptide corresponding to SEQ ID NOS 11,12; polypeptide relating to SEQ ID NOS 11,12; antibody recognizing said polypeptide; method of screening for a compound capable of inhibiting the enzymatic activity of said polypeptide; antagonist/ inhibitor of said protein; pharmaceutical composition comprising said antagonist/inhibitor; diagnostic assay/kit comprising said antagonist/inhibitor; method of diagnosing making use of said inhibitor.

2. claims: in part:1-6, 8-12,14-44 (all as far as applicable)

Nucleic acid relating to Macaca QPCTL (i.e. SEQ ID NOS 4,5); antisense directed against SEQ ID NOS 4,5; nucleic acid encoding SEQ ID NOS 13,14; nucleic acid which is a splice variant and which is relating to SEQ ID NOS 4 and 5, polypeptide relating to said splice variant; nucleic acid probe; expression vector comprising said encoding nucleic acid; host cell comprising said expression vector; process for producing polypeptide corresponding to SEQ ID NOS 13,14; polypeptide relating to SEQ ID NOS 13,14; antibody recognizing said polypeptide; method of screening for a compound capable of inhibiting the enzymatic activity of said polypeptide; antagonist/ inhibitor of said protein; pharmaceutical composition comprising said antagonist/inhibitor; diagnostic assay/kit comprising said antagonist/inhibitor; method of diagnosing making use of said inhibitor.

3. claims: in part: 1-6,8-12,14-44 (all as far as applicable)

International Application No. PCT/EP2007/060013

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Nucleic acid relating to canis QPCTL (i.e. SEQ ID NO 6); antisense oligonucleotide directed against SEQ ID NO 6; nucleic acid encoding SEQ ID NO 15; nucleic acid which is a splice variant and which is relating to SEQ ID NO 6; polypeptide relating to said splice variant; nucleic acid probe; expression vector comprising said encoding nucleic acid; host cell comprising said expression vector; process for producing polypeptide corresponding to SEQ ID NO 15; polypeptide relating to SEQ ID NO 15; antibody recognizing said polypeptide; method of screening for a compound capable of inhibiting the enzymatic activity of said polypeptide; antagonist/ inhibitor of said protein; pharmaceutical composition comprising said antagonist/inhibitor; diagnostic assay/kit comprising said antagonist/inhibitor; method of diagnosing making use of said inhibitor.

4. claims: in part: 1-6, 8-12,14-44 (all as far as applicable)

Nucleic acid relating to rat QPCTL (i.e. SEQ ID NO 7); antisense oligonucleotide directed against SEQ ID NO 7; nucleic acid encoding SEQ ID NO 16; nucleic acid which is a splice variant and which is relating to SEQ ID NO 7; polypeptide relating to said splice variant; nucleic acid probe; expression vector comprising said encoding nucleic acid; host cell comprising said expression vector; process for producing polypeptide corresponding to SEQ ID NO 16; polypeptide relating to SEQ ID NO 16; antibody recognizing said polypeptide; method of screening for a compound capable of inhibiting the enzymatic activity of said polypeptide; antagonist/ inhibitor of said protein; pharmaceutical composition comprising said antagonist/inhibitor; diagnostic assay/kit comprising said antagonist/inhibitor; method of diagnosing making use of said inhibitor.

5. claims: in part: 1-6, 8-12,14-44 (all as far as applicable)

Nucleic acid relating to mouse QPCTL (i.e. SEQ ID NO 8); antisense oligonucleotide directed against SEQ ID NO 8; nucleic acid encoding SEQ ID NO 17; nucleic acid which is a splice variant and which is relating to SEQ ID NO 8; polypeptide relating to said splice variant; nucleic acid probe; expression vector comprising said encoding nucleic acid; host cell comprising said expression vector; process for producing polypeptide corresponding to SEQ ID NO 17; polypeptide relating to SEQ ID NO 17; antibody recognizing said polypeptide; method of screening for a compound capable of inhibiting the enzymatic activity of said polypeptide; antagonist/ inhibitor of said protein; pharmaceutical composition comprising said antagonist/inhibitor; diagnostic assay/kit comprising said antagonist/inhibitor; method of diagnosing making use of said inhibitor.

International Application No. PCT/EP2007/060013

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

6. claims: in part: 1-6, 8-12,14-44 (all as far as applicable)

Nucleic acid relating to bovine QPCTL (i.e. SEQ ID NO 9); antisense oligonucleotide directed against SEQ ID NO 9; nucleic acid encoding SEQ ID NO 18; nucleic acid which is a splice variant and which is relating to SEQ ID NO 9; polypeptide relating to said splice variant; nucleic acid probe; expression vector comprising said encoding nucleic acid; host cell comprising said expression vector; process for producing polypeptide corresponding to SEQ ID NO 18; polypeptide relating to SEQ ID NO 18; antibody recognizing said polypeptide; method of screening for a compound capable of inhibiting the enzymatic activity of said polypeptide; antagonist/ inhibitor of said protein; pharmaceutical composition comprising said antagonist/inhibitor; diagnostic assay/kit comprising said antagonist/inhibitor; method of diagnosing making use of said inhibitor.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2007/060013

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 2004098625	A 18-11-2004	AU 2004237408 A1 BR PI0410078 A CA 2524009 A1 EP 1620082 A2 JP 2006525278 T KR 20060009902 A MX PA05011861 A		18-11-2004 16-05-2006 18-11-2004 01-02-2006 09-11-2006 01-02-2006 17-02-2006
WO 2004098591	A 18-11-2004	EP 1620091 A2 JP 2006525276 T		01-02-2006 09-11-2006
WO 2005039548	A 06-05-2005	AU 2004283461 A1 BR PI0415409 A CA 2542419 A1 CN 1867324 A EP 1675578 A2 JP 2007508347 T MX PA06003998 A		06-05-2005 05-12-2006 06-05-2005 22-11-2006 05-07-2006 05-04-2007 27-06-2006
WO 2005075436	A 18-08-2005	AU 2005210004 A1 BR PI0507485 A CA 2554809 A1 EP 1713780 A2 JP 2007520520 T KR 20060125884 A US 2005215573 A1		18-08-2005 10-07-2007 18-08-2005 25-10-2006 26-07-2007 06-12-2006 29-09-2005
WO 2005049025	A 02-06-2005	AU 2004290463 A1 CA 2546396 A1 CN 1882341 A EP 1684760 A1 JP 2007511543 T US 2008027033 A1		02-06-2005 02-06-2005 20-12-2006 02-08-2006 10-05-2007 31-01-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A 4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 25/18 (2006.01)	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 15/08 (2006.01)	A 6 1 P 15/08	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 25/20 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/20	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
	C 1 2 P 21/02	C

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. ウィンドウズ

(72)発明者 ハンス ウルリクフ デムトフ
 ドイツ連邦共和国 0 6 1 2 0 ザールラント州 ハルレ アム ワルドラント 1 3 エー
 F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 DA13 DA36 FB01 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA10 CA01 CA11 DA02 DA06 EA04 GA11
 4B050 CC01 DD07 KK12 KK18 LL03
 4B063 QA01 QA18 QQ26 QQ42 QQ52 QQ95 QR06 QR24 QR32 QR35
 QR40 QR67 QS25 QS34
 4B064 AG26 CA02 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AB01 BA02 CA29 CA44 CA46
 4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 BA18 BA23 BA44 NA14 ZA021 ZA051
 ZA151 ZA161 ZA181 ZA221 ZA241 ZA451 ZA661 ZA811 ZA891 ZB081

ZB111 ZB151 ZB261 ZB351 ZC211
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA05 ZA15 ZA16
ZA18 ZA22 ZA24 ZA45 ZA66 ZA81 ZA89 ZB08 ZB11 ZB15
ZB26 ZB35 ZC21
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 DA76 EA28 EA50 FA74