

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4194664号
(P4194664)

(45) 発行日 平成20年12月10日(2008.12.10)

(24) 登録日 平成20年10月3日(2008.10.3)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 K 67/027 (2006.01)

A O 1 K 67/027

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 25/28 (2006.01)

A 6 1 P 25/28

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 23 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-537813
 (86) (22) 出願日 平成10年2月26日(1998.2.26)
 (65) 公表番号 特表2001-513777(P2001-513777A)
 (43) 公表日 平成13年9月4日(2001.9.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/003685
 (87) 国際公開番号 WO1998/038204
 (87) 国際公開日 平成10年9月3日(1998.9.3)
 審査請求日 平成17年2月28日(2005.2.28)
 (31) 優先権主張番号 60/038,908
 (32) 優先日 平成9年2月26日(1997.2.26)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC ATCC 69257
 微生物の受託番号 ATCC ATCC 69258
 微生物の受託番号 ATCC ATCC 69259
 微生物の受託番号 ATCC ATCC 69260

(73) 特許権者

ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ
 ション
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 1 1 4, ボストン, フルート ストリート
 (番地なし)

(74) 代理人

弁理士 鈴江 武彦

(74) 代理人

弁理士 村松 貞男

(74) 代理人

弁理士 橋本 良郎

(74) 代理人

弁理士 白根 俊郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病の処置または予防のために効果的な薬物をスクリーニングするためのトランス
 ジェニック動物および細胞株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のDNA分子もしくはこれに少なくとも90%相同であるDNA分子、またはそれらの
 フラグメントを含むDNA構築物であって、ここで、該DNA分子が異種性の神経特異的プロモ
 ーターの制御下にあり、それによって前記DNA分子、またはそれらのフラグメントの宿主
 細胞内における発現が、以下の少なくとも 1 つを誘導する、DNA構築物：

(a) 神経突起の出芽；

(b) 神経細胞死；

(c) ニューロンの変性；

(d) 神経原線維変化；または

(e) 該宿主における不規則的な腫脹した神経突起および軸索。

【請求項 2】

ベクター内に含まれる、請求項 1 に記載のDNA構築物。

【請求項 3】

ビリオンにより含まれる、請求項 1 に記載のDNA構築物。

【請求項 4】

前記DNA分子が配列番号 1 を有する、請求項 1 に記載のDNA構築物。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のDNA構築物で形質転換された、宿主細胞。

【請求項 6】

ニューロン細胞である、請求項 5 に記載の宿主細胞株。

【請求項 7】

その生殖細胞および体細胞の全てが、配列番号 1 の DNA 分子またはこれに少なくとも 90% 相同な DNA 分子を含む、トランスジェニック非ヒト動物であって、それによって配列番号 1 の前記 DNA 分子もしくはこれに少なくとも 90% 相同である前記 DNA 分子の発現が、以下の少なくとも 1 つを誘導する、トランスジェニック非ヒト動物：

(a) 神経突起の出芽；

(b) 神経細胞死；

(c) ニューロンの変性；

(d) 神経原線維変化；または

(e) 不規則的な腫脹した神経突起および軸索。

10

【請求項 8】

それぞれの生殖細胞および体細胞に含まれる前記 DNA 分子が配列番号 1 を有する、請求項 7 に記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 9】

前記 DNA 分子によりコードされるタンパク質が、前記動物の脳において過剰発現される、請求項 7 に記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 10】

アルツハイマー病、神経外胚葉腫瘍、悪性星状細胞腫および膠芽腫の処置または予防のために潜在的に有用である候補薬物をスクリーニングするためのインビトロ方法であって、以下の工程を包含する、方法：

20

(a) 候補薬物と請求項 5 に記載の宿主細胞株とを接触させる工程；および

(b) 該候補薬物と接触させなかったコントロール細胞株と比較して、該候補薬物による、以下のうち少なくとも 1 つを検出する工程：

(i) DNA 構築物によりコードされるタンパク質発現の抑制もしくは防止；

(ii) 該 DNA 構築物によりコードされるタンパク質分解の増加；または

(iii) 神経突起の出芽、神経細胞死、ニューロンの変性、神経原線維変化もしくは該宿主における不規則的な腫脹した神経突起および軸索のうち少なくとも 1 つの頻度の減少。

【請求項 11】

前記タンパク質が配列番号 2 を有する、請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 12】

前記タンパク質が前記宿主細胞により過剰発現される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記細胞がニューロン細胞である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

アルツハイマー病、神経外胚葉腫瘍、悪性星状細胞腫および膠芽腫の処置または予防のための潜在的に有用である候補薬物をスクリーニングするためのインビボ方法であって、以下の工程を包含する、方法：

(a) 候補薬物を請求項 7 に記載のトランスジェニック動物に投与する工程、および

(b) 該候補薬物を受けなかったコントロール動物と比較して、該候補薬物による、以下のうち少なくとも 1 つを検出する工程：

40

(i) 該動物により含まれる DNA 構築物によりコードされるタンパク質発現の抑制もしくは防止；

(ii) 該動物により含まれる該 DNA 構築物によりコードされるタンパク質分解の増加；または

(iii) 神経突起の出芽、神経細胞死、ニューロンの変性、神経原線維変化もしくは宿主における不規則的な腫脹した神経突起および軸索のうち少なくとも 1 つの頻度の減少。

【請求項 15】

前記動物により含まれる前記 DNA 構築物が配列番号 1 を有する、請求項 14 に記載の方法。

50

【請求項 16】

前記動物により含まれる前記DNA構築物によりコードされる前記タンパク質が、該動物の脳において過剰発現される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

配列番号 1 のヌクレオチド 15～1139 に対応する NTP mRNA 配列に相補的である、アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 18】

15～40 マーである、請求項 17 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 19】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 9～11 からなる群から選択される、請求項 17 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 20】

デオキシリボ核酸である、請求項 17 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 21】

デオキシリボ核酸ホスホロチオエートである、請求項 17 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 22】

デオキシリボ核酸またはデオキシリボ核酸ホスホロチオエートの誘導体である、請求項 17 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 23】

請求項 17 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

20

【発明の詳細な説明】

発明の背景

連邦政府から援助を受けた研究および開発の下でなされた発明に対する権利に関する記載
本発明は、国立衛生研究所より与えられた助成金番号 CA-35711、AA-00026 および AA-00216
9 の下で米国政府のサポートを伴ってなされた。米国政府は、本発明に一定の権利を有す
る。

発明の分野

本発明は、遺伝子操作および分子生物学の分野にある。詳細には、本発明は、アルツハイ
マー病、神経外胚葉腫瘍、悪性星状細胞腫および膠芽腫に関連するタンパク質を発現する
トランスジェニック動物およびトランスフェクトされた細胞株に関する。本発明はまた、
アルツハイマー病の処置または予防のための潜在的な薬物候補物をスクリーニングするた
めの、このようなトランスジェニック動物およびトランスフェクトされた細胞株の使用に
関する。本発明はまた、アルツハイマー病の処置または予防のために使用され得る、新た
なアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、三重らせん形成 DNA および外部ガイド
配列に関連する。

30

関連技術

アルツハイマー病 (AD) (Khachaturian, Z.S., 「Diagnosis of Alzheimer's Disease」, Arch. Neurol. 421:1097-1105 (1985)) は、西半球における、最も一般的な神経変性疾
患および痴呆の最もよくある原因である。AD 神経変性は、ニューロンの損失を伴う皮質辺
縁系 (corticolimbic) 構造の顕著な萎縮、神経原線維変化形成、神経突起の異常増殖、
老人斑、および脳における β A4-アミロイド沈着により特徴付けられる (Khachaturian, Z.
S.)。AD のおよそ 90% は散発的に起こる。原因は知られていないが、最も重要な総合的危
険因子は加齢である (Takman, A., 「Epidemiology of Alzheimer's Disease. Issues of
Etiology and Validity」, Acta Neurol. Scand. Suppl. 145: 1-70 (1993))。アポリポタ
ンパク質 ϵ 4 遺伝子型 (Corder, E.H. ら, 「Gene Does of Apolipoprotein E Type 4 Allel
e and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families」, Science 261:921-
923 (1993)) および 21 トリソミーダウン症候群 (Lai, F. および Williams, R.S., 「A Prosp
ective Study of Alzheimer Disease in Down Syndrome」, Arch. Neurol. 46:849-853 (1

40

50

989)) の家族歴は、散発性ADの危険性を増加させるか、または散発性ADの経過を加速させる。家族性型のAD (症例の5~10%を占める) は、第21染色体上に位置する (Robakis, N.K.ら、「Chromosome 21q21 Sublocalization of Gene Encoding Beta-Amyloid Peptide in Cerebral Vessels and Neutritic (Senile) Plaques of People with Alzheimer Disease and Down Syndrome」, *Lancet* 1:384-385 (1987)) アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 遺伝子 (Kennedy, A.M.ら、「Familial Alzheimer's Disease. A Pedigree With a Missense Mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene (Amyloid Precursor Protein 717 Valine-->Glycine)」, *Brain* 309-324 (1993) ; Peacock, M.L.ら、「Novel Amyloid Precursor Protein Gene Mutation (Codon 665 Asp) in a Patient with Late-Onset Alzheimer's Disease」, *Ann. Neurol.* 35:432-438 (1994) ; Tanzi, R.E.ら、「Assessment of Amyloid Beta-Protein Precursor Gene Mutations in a Large Set of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease Cases」, *Am. J. Hum. Genet.* 51: 273-282 (1992)) 、または第1染色体および第14染色体に位置するプレセニリン (presenilin) 遺伝子 (Levy-Lahad, E.ら、「Candidate Gene for the Chromosome 1 Familial Alzheimer's Disease Locus」, *Science* 18: 973-977 (1995)) ; Sorbi, S.ら、「Missense Mutation of S182 Gene in Italian Families With Early Onset Alzheimer's Disease」, *Lancet* 346:439-440 (1995) ; Sherrington, R.ら、「Cloning of a Gene Bearing Missense Mutations in Early-Onset Familial Alzheimer's Disease」, *Nature* 375:754-760 (1995) ; Rogaev, E.I.ら、「Familial Alzheimer's Disease in Kindreds With Missense Mutations in a Gene on Chromosome 1 Related to the Alzheimer's Disease Type 3 Gene」, *Nature* 376:775-778 (1995) ; Barinaga, M.ら、「Candidate Gene for the Chromosome 1 Familial Alzheimer's Disease Locus」, *Science* 269: 973-977 (1995)) における変異に連鎖していた。APPの過剰発現および異常切断は、AD神経変性を促進し得る。なぜなら、40年を超えて生存してきた21トリソミーダウン症候群の全ての個体が広範囲の中樞神経系 (CNS) に β A4-アミロイドの蓄積を伴ってADを発症し (Lai, F. and Williams, R.S., 「A Prospective Study of Alzheimer Disease in Down Syndrome」, *Arch. Neurol.* 46: 849-853 (1989)) 、そして実験的には、 β A4-アミロイドは神経毒性およびアポトーシス発生性 (apoptogenic) である (LaFerla, F.M.ら、「The Alzheimer's A Beta Peptide Induces Neurodegeneration and Apoptotic Cell Death in Transgenic Mice」, *Nat. Genet.* 9:21-30 (1995)) からである。さらに、自然に起こるようなプレセニリン1におけるミスセンス変異は、脳において血管症およびペプチドの大量蓄積を引き起こす (Lemere, C.A.ら、「The E280A Presenilin 1 Alzheimer Mutation Produces Increased $A\beta$ 42 Deposition and Severe Cerebellar Pathology」, *Nature Med.* 2: 1146-1150 (1996) ; Mann, D.M.ら、「Amyloid Beta Protein (A β) Deposition in Chromosome 14-Linked Alzheimer's Disease: Predominance of A β 42 (43)」, *Ann Neurol.* 40: 149-156 (1996)) 。

ADにおいて同定された中樞神経系の生化学的および分子的な異常としては、以下が挙げられる：1) ニューロンにおけるタウタンパク質および他の細胞骨格タンパク質のリン酸化の増加 (Grundke-Iqbal, I.ら、「Abnormal Phosphorylation of the Microtubule-Associated Protein τ (tau) in Alzheimer Cytoskeletal Pathology」, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 4913-4917 (1986)) ; 2) 神経突起の出芽を伴って調節される遺伝子の異常発現 (例えば、増殖関連タンパク質であるGAP-43 (de la Monte, S.M.ら、「Aberrant GAP-43 Gene Expression in Alzheimer's Disease」, *Am. J. Pathol.* 147:934-946 (1995)) 、構成性内皮一酸化窒素シンターゼ (de la Monte, S.M.およびBloch, K.D. 「Aberrant Expression of the Constitutive Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene in Alzheimer's Disease」, *Molecular and Chemical Neuropathy* 29: (in press)) 、トランスフォーミング増殖因子 β (Peress, N.S.およびPerillo, E., 「Differential Expression of TGF-beta 1, 2, and 3 Isotypes in Alzheimer's Disease: a Comparative Immunohistochemical Study With Cerebral Infarction, Aged Human and Mouse Control Brains」, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54: 802-811 (1995)) 、およびメタロチオネイン

-3 (Aschner, M. 「The Functional Significance of Brain Metallothioneins」, *Faseb. J.* 10: 1129-1136 (1996)) ; 3) 神経膠細胞の活性化に関連する遺伝子の発現増加 (例えば、神経膠線維酸性タンパク質 (Goodison, K.L.ら、「Neuronal and Glial Gene Expression in Neocortex of Down's Syndrome」, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 52:192-198 (1993)) および $\alpha 1$ アンチキモトリプシン (Pasternack, J.M.ら、「Astrocytes in Alzheimer's Disease Gray Matter Express Alpha 1-Antichymotrypsin mRNA」, *Am. J. Path.* 135:827-834 (1989))) ; ならびに 4) ニューロンを細胞傷害性細胞死またはプログラム細胞死のいずれかから保護する遺伝子の発現の変化 (この遺伝子には、硫酸化糖タンパク質-2 (May, P.C.ら、「Dynamics of Gene Expression for a Hippocampal Glycoprotein Elevated in Alzheimer's Disease and in Response to Experimental Lesions in Rat」, *Neuron* 5:831-839 (1990)) 、カテプシン D (Cataldo, A.M.ら、「Gene Expression and Cellular Content of Cathepsin D in Alzheimer's Disease Brain: Evidence for Early Up-Regulation of the Endosomal-Lysosomal System」, *Neuron* 14:671-680 (1995)) 、スーパーオキシドジスムターゼ1 (Somerville, M.J.ら、「Localization and Quantitation of 68 kDa Neurofilament and Superoxide Dismutase-1 mRNA in Alzheimer Brains」, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 9:1-8 (1991)) 、ミトコンドリアチトクロムオキシダーゼ (Chandrasekaran, K.ら、「Impairment in Mitochondrial Cytochrome Oxidase Gene Expression In Alzheimer Disease」, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 24:336-340 (1994)) 、補体成分C1q (Fischer, B.ら、「Complement C1q and C3 mRNA Expression in the Frontal Cortex of Alzheimer's Patients」, *J. Mol. Med.* 73:465-471 (1995)) 、カルビンジンD28k (Yamagishi, M.ら、「Ontogenetic Expression of Spot 35 Protein (Calbindin-D28k) in Human Olfactory Receptor Neurons and its Decrease in Alzheimer's Disease Patients」, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 105:132-139 (1996)) 、および bcl-2 (O'Barr, S.ら、「Expression of the Protooncogene bcl-2 in Alzheimer's Disease Brain」, *Neurobiol. Aging* 17: 131-136 (1996)) が含まれる。

以前の研究において、本発明者らは、膵臓タンパク質に対して調製されたポリクローナル抗血清を用いて、AD脳において増加した免疫反応性を示した (Ozturk, M.ら、「Elevated Levels of an Exocrine Pancreatic Secretory Protein in Alzheimer's Disease Brain」, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:419-423 (1989) ; de la Monte, S.M.ら、「Enhanced Expression of an Exocrine Pancreatic Protein in Alzheimer's Disease and the Developing Human Brain」, *J. Clin. Invest.* 86:1004-1013 (1990) ; W090/06993) 。このようなポリクローナル抗体を用いて、本発明者らは、AD脳発現ライブラリーからAD7c-NTP cDNAを単離した (W094/23756) 。W094/23756において、このクローンはまたAD10-7として呼ばれ、これは受託番号69262の下でATCCでDH1細胞において寄託された。このcDNAのヌクレオチド配列は、W094/23756の図16Rに示されている。しかし、この配列は、多数のエラーを含む。これもまた多くのエラーを含む、W096/15272 (配列番号120、168~170頁) をまた参照のこと。結果として、推定アミノ酸配列 (配列番号121; W096/15272) もまた誤っている。

発明の要旨

本発明は、AD7c-NTPを過剰発現するトランジェニック動物および細胞株、ならびにアルツハイマー病、神経外胚葉腫瘍、悪性星状細胞腫および膠芽腫の処置または予防において使用するための候補薬物をスクリーニングするためのそれらの使用に関連する。

詳細には、本発明は、DNA構築物に関連し、ここで上記DNA構築物は、配列番号1を有するDNA分子もしくはそれに少なくとも40%相同的なDNA配列、またはそれらのフラグメントを含む。好ましくは、DNA分子は、異種性の神経特異的プロモーターの制御下にある。

本発明はまた、本発明のDNA構築物を含む細胞株に関連する。

本発明はまた、本発明のDNA構築物を含むトランスジェニック非ヒト動物に関連する。好ましくは、トランスジェニック動物はAD7c-NTPを過剰発現する。

本発明はまた、アルツハイマー病、神経外胚葉腫瘍、悪性星状細胞腫および膠芽腫の処置または予防のための潜在的に有用である候補薬物をスクリーニングするためインビトロ方

10

20

30

40

50

法に関連し、これは以下の工程を包含する

(a) 候補薬物とDNA構築物でトランスフェクトされた宿主とを接触させる工程であって、ここで、DNA構築物は、配列番号1のDNA分子もしくはこれに少なくとも40%相同的なDNA分子、またはそれらのフラグメントを含み、そしてここでこの宿主は、上記DNA分子によりコードされるタンパク質を過剰発現する工程、および

(b) 候補薬物を受けなかったコントロール宿主と比較した候補薬物による、以下の少なくとも1つを検出する工程：

(i) タンパク質発現の抑制もしくは防止；

(ii) タンパク質分解の増加；または

(iii) 神経突起の出芽、神経細胞死、ニューロンの変性、神経原線維変化もしくは宿主における不規則的な腫脹した神経突起および軸索のうち少なくとも1つの頻度の減少。
好ましい実施態様において、宿主はトランスジェニック動物である。別の好ましい実施態様において、宿主はインビトロでの細胞である。

本発明はまた、NTP核酸配列に対して相補的であり、そしてPTP核酸配列に対して非相同的であり、そして過去に不正確に配列決定された領域に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチド、ならびにこのようなオリゴヌクレオチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物に関する。

本発明はまた、NTP配列に対して相補的であり、そしてPTP核酸配列に対して非相同的であり、そして過去に不正確に配列決定された領域に対応する標的配列を含むリボザイム、ならびにこのようなリボザイムおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物に関する。

本発明はまた、PTP核酸配列に対して非相同的であり、そして過去に不正確に配列決定された領域に対応する、AD7c-NTP遺伝子と三重鎖領域を形成するオリゴデオキシヌクレオチド、ならびにこのようなオリゴデオキシヌクレオチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物に関する。

本発明はまた、受容可能なキャリアまたは発現ベクターを介する、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイムおよび三重らせんオリゴヌクレオチドの脳への薬学的送達を達成する方法に関する。

本発明はまた、ニューロンの変性のアルツハイマー型痴呆を改変または改善するため、ならびに神経外胚葉腫瘍、悪性星状細胞腫および膠芽腫の処置または予防のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイムおよび三重らせんオリゴヌクレオチドの治療的使用に関する。

【図面の簡単な説明】

図1は、AD7c-NTP cDNAのヌクレオチドおよび翻訳されるアミノ酸配列（配列番号1および2）を示す。影を付けた領域は、mRNAのRT-PCR分析により、6個のAD脳に検出された核酸配列に対応する。cDNAは、Alu遺伝子、およびハンチントン領域である染色体4q16.3（下線）における未知の遺伝子に対して有意な相同性を示す。オープンリーディングフレームは、最初のメチオニンコドンから始まる。翻訳されるアミノ酸配列は、疎水性リーダー配列（斜体）、続いてミリストイル化モチーフ（太字、斜体）および潜在的なAI切断部位を有する41.3kDのタンパク質をコードする。この同じ領域（斜体、下線）は、インスリン/IGF-Iキメラレセプターと有意な相同性を示す。17個の潜在的なグリコーゲンシンターゼキナーゼ-3、プロテインキナーゼC、またはcAMPもしくはCa依存性キナーゼIIリン酸化モチーフ、および1個のトランスフォーミング増殖因子（tgf）モチーフ（二重下線）が存在する。太字（embolded）のアミノ酸配列は、A4のオルタナティブスプライシングされた変異体形態のNF2、インテグリンのβサブユニット、およびヒト崩壊加速因子2前駆体と有意な相同性を示す。囲みのアミノ酸配列は、ヒト内在性膜タンパク質およびミエリンオリゴ糖タンパク質16と有意な相同性を示す。

図2A～2Dは、インビトロおよびインビボでのAD7c-NTP発現を示す。（2A）：センス鎖cRNA転写産物を用いるインビトロ翻訳により検出された組換えタンパク質。

（2B）：TagおよびN3I4 AD7c-NTPモノクローナル抗体には特異的免疫反応性があるが、関

10

20

30

40

50

連のないFB50モノクローナル抗体には特異的免疫反応性がないことを示す、精製された組換えタンパク質のウェスタンブロット分析。(2C) : pcDNA3-AD7c-NTPまたはpcDNA3 (空のベクター) で安定にトランスフェクトされたBOSC細胞のウェスタンブロット分析。ブロットは、N3I4 AD7c-NTP抗体を用いてプローブした。(2D) : 年齢の一致したコントロールの前頭葉組織に対して、AD前頭葉において有意に増加したレベルの41~45kDのAD7c-NTPタンパク質。同様の結果が、側頭葉組織についても得られた。(2E) : 初期のあまり症候性ではない(E) ADと比較して、後末期(L) ADにおいて、より高いレベルの41~45kDおよび19~21kDのAD7c-NTPタンパク質。全ての組織サンプルは、前頭葉から採取した。おそらく、異なる程度のリン酸化に対応する、約41kDと約45kDとの間の3または4本のバンドのクラスターに留意されたい。(2F) : N3I4抗体を用いて加齢コントロールサンプルと比較した、ADにおける約41kDのAD7c-NTP分子が高レベルであることを示す、死後の脳室液のウェスタンブロット分析。約28~30kDのバンドは、分解産物を示し得る。ADにおける約19~21kDのN3I4免疫反応性分子の検出にも留意されたい。

10

図3A~3Fは、ADの脳および加齢コントロール脳におけるAD7c-NTP mRNA発現を示す。ADおよび加齢コントロールの前頭葉RNAのノーザンブロット分析により、ADおよびc-NTPのcDNAのサイズに対応する約1.4kBの転写産物が検出された。さらに、異なるcDNAに対応する約0.9kBの転写産物は、全ての脳において検出されたが、他の組織には検出されなかった。オートラジオグラムのデンシトメトリー分析により、AD群(3A)においては種々のレベルのAD7c-NTP mRNA発現が示されたが、加齢コントロール(N=11)群に対して、AD(N=17)においては、1.4kBのAD7c-NTP転写産物の平均レベルは有意に高かった(P<0.01)。(図3Cおよび3D) : アンチセンス(3C)またはセンス(3D; ネガティブコントロール)のジゴキシゲニン標識cRNAプローブを用いたインサイチュハイブリダイゼーションの結果の明視野顕微鏡写真。矢印は、ニューロン、およびポジティブのハイブリダイゼーションシグナルを示す暗色の粒子の例を示す。(図3Eおよび3F) : 前頭葉における加齢コントロール(3F)皮質ニューロン(矢印)に対して、AD(3E)における標識(白色の粒子)がより強いことを示す、インサイチュハイブリダイゼーションの結果の暗視野顕微鏡写真。プローブ標識は、抗ジゴキシゲニンおよびアルカリホスファターゼ基質(下記を参照のこと)を用いて検出された。ニューロン(ピラミッド型)上に凝集した白色のシグナルは、ポジティブの結果を示し、そして黒色の領域は、プローブの結合が存在しないことを示す。

20

図4A~4Hは、N2T8(4Aおよび4B)を用いる免疫組織化学染色による、AD(4A)におけるAD7c-NTP免疫反応性が、加齢コントロール(4B)皮質ニューロンに対して増加したことを示す。細胞学的にインタクトなニューロン(4C)ならびに変性バニューロン(4E)の神経細胞形質における高レベルのAD7c-NTPの発現または蓄積を示す、AD脳(図4C、4E~4H)におけるN2J1免疫反応性。さらに、N2J1抗体は、凝集物(出芽)(4F)において生じる、白質(4G)中に分布する、および不規則な数珠状の軸索(4H)に対応する、異常なジストロフィー細胞突起と免疫反応性であった。図4Dは、関連のない抗体で免疫染色したADの脳皮質を示す。図4Aおよび4Bにおける切片を、ヘマトキシリンで対比染色して、対比バックグラウンドを提供した。

30

図5Aおよび5Bは、pcDNA3-AD7c-NTPでトランスフェクトしたSH-Sy5y細胞において細胞死が増加したことを示すグラフを示す。同調細胞に、10%ウシ胎児血清を含む培地を供給し、そしてDNA合成を、DNAへの³Hチミジン取込みにより評価した(5A)。生存細胞の密度を、各時点で決定した(5A)。DNA合成(5B)のレベルがより高いにもかかわらず、細胞密度は、コントロール(pcDNA3でトランスフェクトした)細胞と比較して、4連のAD7c-NTPでトランスフェクトした培養物において有意に減少した。AD7c-NTPでトランスフェクトした細胞はまた、ニックの入ったDNA(TUNEL)についてのインサイチュアッセイにより、p53免疫反応性の増加および各DNA断片化の増加を示し、このことは、ニューロン細胞におけるAD7c-NTPの過剰発現がアポトーシスを生じることを示す。

40

図6A~6Gは、トランスフェクトされたニューロン細胞におけるAD7c-NTPの過剰発現が、増加した神経突起出芽を生じることを示す。(6A) : pcDNA3 (空のベクター) で安定にトランスフェクトされたSH-Sy5y細胞。(6B~6D) : pcDNA3-AD7c-NTPで安定にトランスフェク

50

トされたSH-Sy5y細胞。また、図6B～6Dにおけるほとんどの細胞上の細かい神経突起の突起（矢印）に留意されたい。図6Aと比較して、図6Dにおいては、細胞密度がより低いことおよび多数の丸型の屈折性死細胞（矢尻）にも留意されたい。（図6E～6G）：N3I4モノクローナル抗体を用いてpcDNA3（6E）またはpcDNA3-AD7c-NTP（6F、6G）で安定にトランスフェクトしたSH-Sy5y細胞の免疫細胞化学染色。6Fにおける神経細胞形質および細胞突起（矢印）の強度の標識、ならびに6Eにおいては標識が存在しないことに留意されたい。

図7A～7Cは、AD7c-NTP発現のIPTG誘導後の遺伝子発現の調節を示す。LacAコントロール細胞（図7A）は、AD7c-NTPを欠き；LacB-B6細胞（図7B）およびLacF-B6細胞（図7C）は、異なるレベルのAD7c-NTP誘導を有する2つの異なるクローンである。誘導24時間後の発現レベルの変化は、AD、神経出芽、およびアポトーシスに關与する遺伝子を示す。

図8A～8Dは、NTP（図A）、タウ（図B）、シナプトフィシン（図C）、およびp53（図D）のタンパク質のレベルにおけるIPTGの用量依存性増加を示す。各タンパク質の量の変化の％を、IPTG濃度（mM）の関数として示す。

図9Aおよび9Bは、代謝（MTT）活性および細胞生存率に対する、CYZニューロン細胞におけるAD7c-NTP発現の効果を示す。LacA-LacFは、6個の異なるクローンを示し、そしてB6は、AD7c-NTP発現を示す。MTT活性（図9A）および細胞生存率（図9B）についての変化の％は、コントロール（LacAコントロール）およびAD7c-NTP発現細胞株について示す。

図10Aおよび10Bは、細胞生存率に対するAD7c-NTP発現の効果を示す。非発現LacAコントロールおよび種々のレベルでAD7c-NTPを発現する細胞株（LacB-B6およびLacF-B6）を、タンパク質発現誘導因子（IPTG）および種々の酸化的ストレス毒素への種々の曝露時間の後に生存性についてアッセイした。

図11は、AD7c-NTP発現のIPTG誘導後のDNA断片化を示し、それにより、アポトーシスの定量的評価を提供する。誘導後に種々のレベルのAD7c-NTPを発現する、安定にトランスフェクトされたCYZニューロン細胞株（LacA、LacB、およびLacF）は、³²dCTP標識の存在下でインキュベートした。コントロール（誘導しない）条件下およびIPTG誘導条件下でそれぞれの細胞株のDNAに取り込まれた放射性同位体の量を示す。

図12は、AD7c-NTPで安定にトランスフェクトされ、そして酸化的ストレスを促進および低減またはブロックする条件下でAD7c-NTPを発現する細胞の生存性の変化の％を示す。酸化的ストレスを促進する薬剤は、以下の通りである：過酸化水素（H₂O₂）、ジエチルジチオカルバミン酸（DDC）、S-ニトロ-N-アセチル-ペニシラミン（SNAP）、およびN-アセチルシステイン；そして酸化的ストレスをブロックまたは低減するために利用された薬剤は、ピグログルタメート（pyroglutamate）（PG）である。

好ましい実施態様の詳細な説明

定義

以下の記載では、組換えDNA技術に用いられる多数の用語は、広範囲に利用される。このような用語が与えられる範囲を含む、明細書および請求の範囲の明確かつ一貫した理解を提供するために、以下の定義を提供する。

クローニングベクター。プラスミドもしくはファージDNA、または宿主細胞において自律的に複製し得、かつ1つまたは少数の制限エンドヌクレアーゼ認識部位（この部位で、このようなDNA配列が、ベクターの必須の生物学的機能を喪失せずに決定可能な様式で切断され得、そしてその複製およびクローニングをもたらしするためにその中にDNAフラグメントがスプライスされ得る）により特徴付けられる、他のDNA配列。クローニングベクターは、クローニングベクターで形質転換された細胞の同定における使用に適切なマーカーをさらに含み得る。例えば、マーカーは、テトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性を提供する。

発現ベクター。クローニングベクターに類似するが、宿主中に形質転換された後に、ベクター中にクローニングされた遺伝子の発現を増強し得る、ベクター。クローニングされた遺伝子は、通常、プロモーター配列のような特定の制御配列の制御下に配置される（すなわち、作動可能に連結される）。プロモーター配列は、構成性または誘導性のいずれかであり得る。

10

20

30

40

50

実質的に純粋。本明細書中で使用される場合、ポリアクリルアミド-ドデシル硫酸ナトリウムゲル電気泳動後の単一のバンドにより証明されるように、所望の精製されたタンパク質が、夾雑細胞成分（この成分は、天然において所望のタンパク質と会合している）を本質的に含まないことを意味する。夾雑細胞成分は、タンパク質様の、炭水化物、または脂質不純物を含み得るがこれらに限定されない。

用語「実質的に純粋」は、さらに、当業者により用いられる1つ以上の純度または均質性の特徴により均質である分子を記載することを意味する。例えば、実質的に純粋なNTPは、以下のようなパラメーターについて標準的な実験偏差内で一定かつ再現性のある特徴を示す：分子量、クロマトグラフィーでの移動、アミノ酸組成、アミノ酸配列、ブロックされたかまたはブロックされていないN末端、HPLC溶出プロファイル、生物学的活性、および他のこのようなパラメーター。しかし、この用語は、この因子と他の化合物との人工的または合成的な混合物を排除することを意味しない。さらに、この用語は、組換え宿主から単離されたNTP融合タンパク質を排除することを意味しない。

組換え宿主。本発明によれば、組換え宿主は、発現ベクターまたはクローニングベクター上に所望のクローニングされた遺伝子を含む、任意の原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞であり得る。この用語はまた、遺伝子操作されて所望の遺伝子をその生物の染色体またはゲノムに含む、原核生物細胞または真核生物細胞を含むことを意味する。このような宿主の例としては、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989) を参照のこと。好ましい組換え宿主は、本発明のDNA構築物で形質転換されたニューロン細胞である。このようなニューロン細胞は、動物の脳または他の利用可能なニューロン細胞株の機械的分離の後に単離された、脳細胞を含む。

組換えベクター。所望のクローニングされた遺伝子を含む、任意のクローニングベクターまたは発現ベクター。

宿主動物。全ての生殖細胞および体細胞が、本発明のDNA構築物を含む、トランスジェニック動物。このようなトランスジェニック動物は、一般に脊椎動物である。好ましい宿主動物は、非ヒト霊長類、マウス、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、モルモット、げっ歯類（例えば、ラット）などのような哺乳動物である。用語宿主動物はまた、胚および胎児の段階を含む、全ての発生段階の動物を含む。

プロモーター。開始コドンの近くに配置される、遺伝子の5'領域として一般的に記載されるDNA配列。隣接する遺伝子の転写は、プロモーター領域で開始される。プロモーターが誘導性プロモーターである場合、転写速度は、誘導因子に応答して増加する。対照的に、転写速度は、プロモーターが構成性プロモーターである場合には誘導因子により調節されない。本発明によれば、好ましいプロモーターは、AD7c-NTP遺伝子に対して異種である、すなわち、プロモーターはヒトにおける遺伝子の発現を駆動しない。このようなプロモーターは、CMVプロモーター（In Vitrogen, San Diego, CA）、SV40、MMTV、およびhMTII aプロモーター（米国特許第5,457,034号）、HSV-1 4/5プロモーター（米国特許第5,501,979号）、および前初期HCMVプロモーター（W092/17581）を含む。また、プロモーターは神経特異的である、すなわち、ニューロン組織において選択的に誘導されることが好ましい。また、ニューロン特異的エンハンサーエレメントが用いられ得る。ニューロン特異的プロモーターの例は、神経フィラメント遺伝子を制御するプロモーター（W091/02788; ByrneおよびRuddle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477 (1989)）、ヒト神経フィラメント軽遺伝子（NFL）のニューロン特異的プロモーター（米国特許第5,569,827号）；ニューロンのニコチン性アセチルコリン受容体のβ2サブユニットのプロモーター（EP 0 171 105; 米国出願第08/358,627号）、hThy-1プロモーター（W095/03397; 米国出願第08/096,944号; Gordon, J.ら, Cell 50:445-452 (1987)）; Tα1 αチューブリンプロモーター（W095/25795; 米国出願第08/215,083号; Glosterら, J. Neurosci. 14:7319-7330 (1994)）、APPプロモーター、ラットニューロン特異的プロモーター、ヒトβアクチン遺伝子プロモーター、ヒト血小板由来増殖因子B（PDGF-B）鎖遺伝子プロモーター、ラットナトリウムチャンネル遺伝子プロモーター、マウスミエリン塩基性タンパク質遺伝子プロ

10

20

30

40

50

ロモーター、ヒト κ -亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子プロモーター、哺乳動物P
OUドメイン調節遺伝子プロモーター（W093/14200；米国出願第07/817,584号および同第07
/915,469号）；ヒト血小板由来増殖因子B（PDGF-B）鎖遺伝子プロモーター（W096/40895
；米国出願第08/486,018号および同第08/486,538号；Sasaharaら、Cell 64:217-227（199
1））；およびニューロン特異的エノラーゼプロモーター（McConlogueら、Aging 15 :S12
（1994）；Higginsら、Ann Neurol. 35:598-607（1995）；Muckeら、Brain Res. 666:151
-167（1994）；Higginsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4402-4406（1995）；W096/4
0896；米国出願第08/480,653号；および米国特許第5,387,742号）；ならびにJCウイルス
の乏突起膠細胞特異的発現、プロテオリピドタンパク質の膠特異的発現、および膠原線維
酸性タンパク質遺伝子（米国特許第5,082,670号）を調節する配列を含むがこれらに限定
されない。他の神経特異的プロモーターは、当業者に容易に明らかである。タンパク質の
リン酸化は、ニューロンの調節に重要である（Kennedy, 「Second Messengers and Neuron
al Function」, An Introduction to Molecular Neurobiology, Hall編, Sinauer Associ
ates, inc.（1992））ので、プロテインキナーゼプロモーター配列は、充分なレベルのNT
P遺伝子発現を達成するために用いられ得る。

遺伝子。ポリペプチドまたはタンパク質を発現するのに必要な情報を含むDNA配列。

構造遺伝子。メッセンジャーRNA（mRNA）へと転写され、次いで特定のポリペプチドのア
ミノ酸特有の配列へと翻訳される、DNA配列。

アンチセンスRNA遺伝子／アンチセンスRNA。真核生物において、mRNAはRNAポリメラーゼI
Iによって転写される。しかし、RNAポリメラーゼIIテンプレート（ここで、特定のmRNAの
配列に相補的な配列を有するRNA配列は転写されるが正常には翻訳されない）を含む遺伝
子を構築し得ることもまた公知である。このような遺伝子構築物は、本明細書中で「アン
チセンスRNA遺伝子」と称し、そしてこのようなRNA転写物を「アンチセンスRNA」と称す
る。アンチセンスRNAは、アンチセンスRNA配列における転写終結コドンの存在に起因して
正常には翻訳され得ない。

アンチセンスオリゴヌクレオチド。特定のmRNAの配列に相補的であるヌクレオチド配列を
含む、DNAまたはRNA分子あるいはDNAまたはRNA分子の誘導体。アンチセンスオリゴヌクレ
オチドは、特定のmRNAにおける相補的な配列に結合し、そしてそのmRNAの翻訳を阻害する
。このようなDNAおよびRNA分子の誘導体は多数公知である。例えば、米国特許第5,602,24
0号、同5,596,091号、同5,506,212号、同5,521,302号、同5,541,307号、同5,510,476号、
同5,514,787号、同5,543,507号、同5,512,438号、同5,510,239号、同5,514,577号、同5,5
19,134号、同5,554,746号、同5,276,019号、同5,286,717号、同5,264,423号、およびW096
/35706、W096/32474、W096/29337（チオトリエステル改変アンチセンスオリゴデオキシ
ヌクレオチドホスホチオエート）、W094/17093（オリゴヌクレオチドアルキルホスホネー
トおよびアルキルホスホロチオエート）、W094/08004（オリゴヌクレオチドホスホチオエ
ート、メチルホスフェート、ホスホルアミデート、ジチオエート、架橋ホスホロチオエー
ト、架橋ホスホルアミデート、スルホン、スルフェート、ケト、リン酸エステル、および
ホスホロブチルアミン（van der Krolら、Biotech 6:958-976（1988）；Uhlmannら、Chem
.Rev. 90:542-585（1990））、W094/02499（オリゴヌクレオチドアルキルホスホノチオエ
ートおよびアリールホスホノチオエート）、およびW092/20697（3'-末端キャップ化オリ
ゴヌクレオチド）を参照のこと。本発明の特定のNTPアンチセンスオリゴヌクレオチド
は、S-オリゴヌクレオチド（ホスホロチオエート誘導体またはS-オリゴ、Jack Cohen
、Oligodeoxynucleotides、Antisense Inhibitors of Gene Expression、CRC Press（198
9）を参照のこと）のような誘導体を含む。S-オリゴ（ヌクレオシドホスホロチオエー
ト）は、オリゴヌクレオチド（O-オリゴ）の等電性アナログであり、ここで、リン酸基
の非架橋性の酸素原子がイオウ原子に置換されている。本発明のS-オリゴは、対応する
O-オリゴを3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン-1,1-ジオキシドでの処理によって調製さ
れ得、これは、イオウ転移試薬である。Iyerら、J.Org.Chem.55:4693-4698（1990）；お
よびIyerら、J.Am.Chem.Soc.112:1253-1254（1990）を参照のこと。

アンチセンス治療。対応するタンパク質の発現を阻害するためにアンチセンスオリゴヌク

10

20

30

40

50

レオチドが患者に投与される処置方法。

相補的DNA (cDNA)。「相補的DNA」または「cDNA」遺伝子は、mRNAの逆転写によって合成され、そしてそこから、介在配列 (イントロン) が除去されている組換え遺伝子を含む。発現。発現は、ポリペプチドが、構造遺伝子から産生されるプロセスである。このプロセスは、遺伝子のmRNAへの転写およびこのようなmRNAのポリペプチドへの翻訳を含む。

相同／非相同。2つの核酸分子は、HASHコードアルゴリズム (Wilber, W.J. および Lipman, D.J., Proc. Natl. Acad. Sci. 80:726-730 (1983)) によって決定される場合にそれらのヌクレオチド配列が40%を超える類似性を共有する場合に「相同」とであるとみなされる。2つの核酸分子は、それらのヌクレオチド配列が40%未満の類似性を共有する場合に、「非相同」とであるとみなされる。

リボザイム。リボザイムは、触媒中心を含むRNA分子である。この用語は、RNA酵素、自己スプライスRNAおよび自己切断RNAを含む。

リボザイム治療。標的mRNAの翻訳を阻害するためにリボザイムを患者に投与する処置方法。

フラグメント。NTPのような分子の「フラグメント」は、その分子のポリペプチド部分集合のいずれかをいうことが意味される。

機能性誘導体。用語「機能性誘導体」は、その分子の「改変体」「アナログ」または「化学誘導体」を含むことが意図される。NTPのような分子の「改変体」とは、分子全体またはそのフラグメントのいずれかに実質的に類似する天然に存在する分子をいうことが意味される。NTPのような分子の「アナログ」とは、分子全体またはそのフラグメントのいずれかに実質的に類似する非天然の分子をいうことが意味される。

分子は、別の分子と、その両方の分子におけるアミノ酸配列が実質的に同一であり、かつ両方の分子が類似の生物学的活性を有する場合、「実質的に類似する」といわれる。従って、2つの分子が同様の活性を有すれば、それらは、分子の一方が、他方に見い出されないさらなるアミノ酸残基を含んでいる場合でも、またはアミノ酸残基の配列が同一でない場合でさえも、本明細書中でこの用語が使用される場合、改変体であることが意図される。

本明細書中で用いる場合、分子は、その分子が通常はその分子の一部ではないさらなる化学部分を含む場合、別の分子の「化学誘導体」とであるといわれる。このような部分は、分子の可溶性、吸収性、生物学的半減期などを改良し得る。あるいは、この部分は、分子の毒性を低減させ得、分子の所望されない任意の副作用を除去するかまたは減弱し得る、など。このような効果を媒介し得る部分の例は、Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) に開示されており、そして当業者には明らかである。

AD7c-NTP。用語「AD7c-NTP」は、配列番号2を有するタンパク質およびその対立遺伝子変異体をいう。

本発明者らは、AD7c-NTPと称するcDNAを単離した。これは、ニューロンに発現され、ADを伴う脳に過剰発現される。1442ヌクレオチドのAD7c-NTP cDNAは、約41kDの膜貫通タンパク質をコードし、これは、疎水性のリーダー配列およびアミノ末端付近にミリスチル化モチーフを有する。AD7c-NTP cDNAは、選択スプライシングされたA4形態のNF2、インテグリンのβ1サブユニット、ヒト内在性膜タンパク質、ミエリンオリゴ糖タンパク質16前駆体、およびヒト崩壊促進因子2前駆体と有意な相同性を有する3つの領域、ならびに染色体4p16.3上のハンチントン病領域における配列と有意な相同性を有する2つの領域を伴うAlu配列含有遺伝子である。AD7c-NTPの発現は、脳から単離されたRT-PCR産物の核酸配列決定によって確認された。1.4kBおよび0.9kB mRNA転写物とノーザンブロット分析によって、ハイブリダイズしたAD7c-NTP cRNAプローブ、および組換えタンパク質で作製したモノクローナル抗体は、ヒト脳のウェスタンブロット分析によって約39~45kDおよび約19~21kDの分子と免疫反応性であった。17人のADおよび11人の年齢が一致するコントロール脳から得られた定量データによってADに発現する有意に高レベルのAD7c-NTPを示した。インサイチュハイブリダイゼーションおよび免疫染色研究によってAD7c-NTP遺伝子発現はニューロンに局在化することが示され、そしてAD神経変性に関連する過剰発現が確認された。AD

10

20

30

40

50

7c-NTPタンパク質のレベルの増加はまた、ウェスタンブロット分析によって脳脊髄液において検出可能であった。これらの結果によって、AD7c-NTP遺伝子の発現異常がAD神経変性に関連していることが示唆される。従って、AD7c-NTPの異常発現は、アルツハイマー病に関連する表現型である。

AD7c-NTP発現がアルツハイマー病を導くことが確認されたことによって、AD7c-NTPを過剰発現するトランスジェニック動物および細胞株がアルツハイマー病、神経外胚葉腫瘍、悪性星状細胞腫、および膠芽腫の処置または予防に使用するための薬物をスクリーニングするために使用され得ることが導かれた。

本発明は、DNA構築物に関し、ここでこのDNA構築物は、配列番号1のDNA分子またはそのフラグメント、あるいは、それに少なくとも40%相同である、より好ましくはそれに少なくとも85%相同である、最も好ましくはそれに少なくとも90%相同であるDNA分子を含む。好ましくは、このDNA構築物は、配列番号2を有するAD7c-NTPをコードする。好ましくはまた、このDNA配列は、異種性神経特異的プロモーターの制御下にある。宿主細胞におけるAD7c-NTPの発現を駆動するために使用し得るプロモーターの例は、上記に記載される。プロモーターが手に入ったら、配列番号1のDNA分子にそのプロモーターを簡単に連結し得る。DNAフラグメントを連結するための方法は、当業者に周知である。好ましくは、配列番号1を有するDNA分子は、プロモーターを含むプラスミドに連結され、そしてこれによってAD7c-NTP DNA配列に作動可能に連結されているプロモーターがもたらされる。

本発明のDNA分子のフラグメントは、AD7c-NTPの活性を有するタンパク質をコードする。すなわち、このDNAフラグメントは、そのフラグメントを発現する宿主細胞において神経突起出芽、神経細胞死、神経細胞変性、神経原線維変化、および／または不規則に腫脹した神経突起を誘導する。このような宿主は、細胞宿主およびトランスジェニック動物を含む。

配列番号1に対して少なくとも40%、85%、または90%相同であるDNA分子は、当業者に公知の方法に従って、配列番号1のDNA分子に対してストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションによってヒトおよび動物のcDNAライブラリから単離され得る。配列番号1に対して少なくとも40%、85%、または90%の相同性を有するDNA分子について選択するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が使用され、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.1989; およびManiatisら、Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.1985に記載されている。ハイブリダイゼーションは、 $6 \times \text{SSC} / 5 \times \text{デンハートの溶液} / 0.1\% \text{ SDS}$ 中で 65°C で実施され得る。ストリンジェンシーの程度は、洗浄工程において決定される。従って、適切な条件は、 $0.2 \times \text{SSC} / 0.01\% \text{ SDS} / 65^{\circ}\text{C}$ および $0.1 \times \text{SSC} / 0.01\% \text{ SDS} / 65^{\circ}\text{C}$ を含む。

本発明はまた、本発明のDNA構築物を含む細胞に関する。本発明のDNA構築物を含み得る適切な細胞の例は、真核生物細胞および原核生物細胞を含む。真核生物細胞（例えば、脊椎動物に由来する細胞（ヒト細胞、非ヒト霊長類細胞、ブタ細胞、ヒツジ細胞などを含む））が好ましい。さらに、細胞株は、これらの脊椎動物の一つに由来する神経細胞株であり得ることが意図される。このような細胞株の例は、SH-Sy5y、pNET-1、pNET-2、hNTs (Stratagene, Inc.) およびA172 (ATCC) ニューロン細胞を含む。O' Barr, S.ら、Neurobiol. Aging 17:131-136 (1996); Ozturk, M.ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:419-423 (1989); Biedlerら、Cancer Res.33:2643-2652 (1973); およびTheら、Nature Genet. 3:2643-2652 (1993)。

DNA構築物を細胞へインビトロ、インビボ、およびエキソビボで導入するための方法は、当業者に周知である。例えば、米国特許第5,595,899号、同5,521,291号、同5,166,320号、同5,547,932号、同5,354,844号、同5,399,346号、W094/10569、およびCitronら、Nature 360:622-674 (1995)を参照のこと。

本発明はまた、その生殖細胞および体細胞の各々において本発明のDNA構築物を含み、そしてAD7c-NTPを過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物に関する。このようなトランスジェニック動物は、例えば、本発明のDNA構築物を受精卵に注入し、これを成体動物へ

10

20

30

40

50

と発生させることによって得られ得る。トランスジェニック動物を調製するために、数百のDNA分子が受精した1つの細胞卵の前核に注入される。次いで、微量注入された卵は、偽妊娠養母の卵管へと移され、そして発生させる。Brinsterら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:4438-4442 (1985) によって、発生したマウスのうち約25%が1つ以上の微量注入したDNAのコピーを遺伝することが報告されている。あるいは、トランスジェニック動物は、Gosslerら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:9065-9069 (1986) によって記載されるように、組換えES細胞をトランスジーンの生成のために利用することによって得られ得る。子孫は、尾部の組織からゲノムDNAの単離、および従来のDNAハイブリダイゼーション技術 (Southern, J. Mol. Biol. 98:503-517 (1975)) によって同定されたAD7c-NTPをコードするフラグメントによって、トランスジーンの組込みについて分析され得る。AD7c-NTP遺伝子について陽性である動物は、AD7c-NTPマウスのコロニーを拡張するためにさらに交配される。トランスジェニック動物を調製する方法の一般例および特定の例は、米国特許第5,602,299号、同5,366,894号、同5,464,758号、同5,569,827号、W096/40896 (米国出願番号08/480,653) ; W096/40895 (米国出願番号08/486,018および08/486,536) ; W093/14200 (米国出願番号07/817,584および07/915,469) ; W095/03397 (米国出願番号08/096,944) ; W095/25792 (米国出願番号08/215,083) ; EP 0 717 105 (米国出願番号08/358,627) ; および Hoganら、Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1986) ; Hammerら、Cell 63:1099-1112 (1990) に開示されている。

一旦得られると、AD7c-NTPを含むトランスジェニック動物は、AD7c-NTP発現の証拠についておよびアルツハイマー病、神経外胚葉腫瘍、悪性星状細胞腫、および膠芽腫に関連するニューロン異常または神経突起異常の証拠について免疫組織学によって分析され得る。脳の切片は、AD7c-NTPに特異的な抗体 (モノクローナルまたはポリクローナルのいずれか) で染色され得る。

本発明はまた、アルツハイマー病、神経外胚葉腫瘍、悪性星状細胞腫および膠芽腫の処置または予防に潜在的に有用である候補薬物をスクリーニングするためのインビトロの方法に関し、この方法は以下：

(a) DNA構築物でトランスフェクトした宿主と候補薬物とを接触させる工程であって、ここでこのDNA構築物が配列番号1のDNA分子、またはそれに少なくとも90%相同であるDNA分子を含み、そしてこの宿主がこのDNA分子によってコードされるタンパク質を過剰発現する、工程；ならびに

(b) この薬物候補に起因して、以下の少なくとも1つを検出する工程；

(i) このタンパク質の発現の抑制または防止；

(ii) このタンパク質分解の増加；または

(iii) 宿主における神経突起出芽、神経細胞死、ニューロン変性、神経原線維変化、または不規則な腫脹した神経突起および軸索の少なくとも1つの頻度の減少。

好ましい実施態様において、宿主はトランスジェニック動物である。別の好ましい実施態様において、宿主はインビトロの細胞である。AD7c-NTPのようなタンパク質の発現の抑制または防止ならびに変性の増加は、AD7c-NTPに特異的な抗体で検出され得る。AD7c-NTPについて特異的であるモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体ならびにAD7c-NTPの定性的検出および定量的検出のための方法は本明細書中およびW094/23756および米国出願番号08/340,426に記載される。このような試験は、トランスジェニック動物のCSFにおいて、または動物の脳由来の組織切片の免疫組織学化学的染色によって実施され得る。さらに、このような試験は、ウェスタンブロット分析、ELISAまたはRIAによって実施され得る。免疫組織化学染色はまた、動物における神経突起出芽、神経細胞死、変性ニューロン、神経原線維変化、または不規則な腫脹した神経突起および軸索のうち少なくとも1つの頻度を決定するために実施され得る。一般的に、動物は屠殺されなければならない、試験動物のプールおよびコントロールトランスジェニック動物が試験される。屠殺後、神経突起出芽、神経細胞死、変性ニューロン、および神経原線維変化または不規則な腫脹した神経突起および軸索の相対的頻度は、両方の群について決定される。試験群が、神経突起出芽、神経細胞死、変性ニューロン、神経原線維変化または不規則な腫脹した神経突起および軸索

の頻度の減少を示す場合、この薬物は、アルツハイマー病、神経外胚葉腫瘍、悪性星状細胞腫または膠芽腫の処置または予防に見込みがあると考えられ得る。

宿主がトランスジェニック動物である場合、薬物候補の効果はまた、学習および記憶欠失 (deficient) を評価するために設計された行動試験により試験され得る。このような試験の例として、Morris, Learn Motivat. 12:239-260 (1981) およびW096/40895により開示されたMorris water迷路がある。

本発明の方法の実施において、候補薬物は、トランスジェニック動物に投与されるか、またはこの動物に由来する細胞もしくは本発明のDNA構築物でトランスフェクトされた細胞の培養培地に導入される。候補薬物は、ある時間にわたっておよび種々の投薬量で投与され得、そして動物または動物細胞は、AD7-c NTP発現、神経細胞変性または組織病理における変化について試験され得る。トランスジェニック動物の場合において、それらはまた、行動試験における改善について試験され得る。

細胞が、候補薬物の効果に関してインビトロで試験されるべきである場合、細胞は増殖促進培地で増殖され、そしてこの培地は、候補薬物を含む培地で置換される。実際には、任意の細胞型の増殖を促進する広範な種々の培地が、例えば、Life Technologies Inc. (Gaithersburg, MD) から市販される。候補薬物が培地中に溶けにくい場合、ストック溶液がジメチルスルホキシド (DMSO) 中に調製され得る。次いで、DMSO溶液は培地と混合される。好ましくは、培地中のDMSO濃度は、0.5%を超えず、好ましくは0.1%を超えない。次いで、細胞を予め選択した期間 (例えば、2~10時間) にわたって、予め選択した温度で (例えば、約37℃)、薬物含有培地の存在下でインキュベートする。この期間の終了時に、培地は再び除去され得、そして候補薬物を含む新鮮な培地を添加する。次いで、細胞を第2の予め選択された期間 (例えば、2~16時間) にわたってインキュベートする。この手順は、有意な結果を得るために、必要に応じて繰り返され得る。

処理期間の後、細胞は、NTP発現レベルについて試験されるか、ならびに/または細胞が神経細胞である場合、神経突起出芽、神経細胞死、変性ニューロン、神経原線維変化または不規則な腫脹した神経突起および軸索の存在ならびに/もしくは頻度について試験されるかのいずれかである。NTP発現レベルについて試験するために、免疫組織化学染色は、実施例に記載のように実施され得る。あるいは、細胞を含むプレートは、培地からの細胞断片をペレット化するために遠心分離され得、そして培地のサンプルは、NTP濃度について試験され得る。NTP濃度は、NTPに特異的な抗体を用いてELISAによって決定され得る。このようなアッセイを実施する方法は、W094/10569に開示され、そして当業者には周知である。次いで、試験細胞/培地のNTP濃度が、培地が候補薬物を含まない (しかし、同レベルのDMSOを含み得る) ことを除いて、同じ方法で処理されたコントロール細胞の濃度と比較される。ELISAの結果を、標準曲線に当てはめ、ng/ml NTPとして表す。W096/40895を参照のこと。

好ましいインビトロでのモデル系において、AD7c-NTPは、Lac-Switch誘導化系にクローニングされ、ニューロン細胞 (例えば、PNET2 (CYZ)、SH-Sy5yおよびhNT2) に安定にトランスフェクトされる。AD7c-NTPは、全長のcDNAまたはCATレポーター遺伝子構築物であり得る。タンパク質発現は、1~5 mMのIPTGを用いて誘導可能である。培養は、細胞死、細胞突起出芽、およびこれらまたは他のAD関連現象に関連する遺伝子発現に対応する変化について試験され得る。遺伝子発現研究のための分析に利用可能な分析方法は、生存率 (クリスタルバイオレット) および代謝 (MTT) アッセイ、ウェスタンブロットおよび免疫細胞化学的染色、Microtiter ImmunoCytochemical ELISA (MICE) アッセイ、アポトーシスDNAフラグメンテーションアッセイ (ラダー、末端標識、Hoechst染色およびTUNELアッセイ)、およびCATアッセイが挙げられるが、それらに限定されない。

ニューロン細胞に対するNTP毒性に対する候補薬物の効果はまた、W096/40895によって初代ラット皮質細胞培養において、またはヒト胎児脳組織、またはhNT2およびSH-Sy5y細胞株のような分化ニューロン細胞株を用いて決定され得る。あるいは、本明細書中に記載されるようにAD7c-NTPをコードする遺伝子で形質転換されたニューロン細胞およびそれを発現するニューロン細胞を用い得る。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、原核生物細胞（Mizunoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1966-1970 (1984)）および真核生物細胞（Heywood, Nucleic Acids Res. 14:6771-6772 (1986)）の両方における、遺伝子発現の天然に存在する生物学的インヒビターとして記載されている。そしてこれらの配列は、相補的mRNA配列にハイブリダイズすることによっておそらく機能し、ハイブリダイゼーションを生じさせることは、翻訳を停止させる（Patersonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:4370-4374 (1987)）。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定の遺伝子またはRNAメッセージに相補的であるように処方された短い合成DNAまたはRNAヌクレオチド分子である。これらのオリゴマーの標的DNAまたはmRNA配列への結合を介して、遺伝子の転写または翻訳は、選択的にブロックされ得、そしてこの遺伝子によって発生した疾患プロセスは、停止され得る（例えば、Jack Cohen, Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press (1989)を参照のこと）。mRNAの細胞質の位置は、細胞に進入するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドに容易に接近可能であると考えられる標的を提供する；それゆえ、この分野の研究の大部分は、標的としてRNAに集中してきた。今や、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドの使用は、インビトロでのおよび組織培養での遺伝子発現の調節を探索するための有用な道具を提供する（Rothenbergら、J. Natl. Cancer Inst. 81:1539-1544 (1989)）。

アンチセンス治療は、細胞内に位置した標的ポリヌクレオチドに結合する外因性オリゴヌクレオチドの投与である。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、抗癌治療のために全身に投与され得る（WO 90/09180）。AD7c-NTPは、神経外胚葉腫瘍細胞、悪性星状細胞腫細胞、膠芽腫細胞によって、そしてAD患者の脳組織において比較的（すなわち、コントロールと比較して）高濃度で産生される。従って、本発明のAD7c-NTPアンチセンスオリゴヌクレオチドは、AD、ならびに神経外胚葉腫瘍、悪性星状細胞腫、および膠芽腫に対する処置に有効であり得る。

上記のように、本発明はまた、NTPについての修正アミノ酸およびヌクレオチド配列に関する。従って、本発明はまた、配列番号1から転写され得るmRNAに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。ここで、このオリゴヌクレオチドは、WO94/23756およびWO96/15272で間違って配列決定されたNTP遺伝子の領域（例えば、ヌクレオチド150～1139を含む領域中（公開された出願の図16Rのヌクレオチド1～148；本出願の配列番号1のヌクレオチド1～149；正しく配列決定された））に対応する。この間違った配列は、配列番号3および4に存在する。従って、本発明は、配列番号1のヌクレオチド150～1139に対応するNTP mRNA配列に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。好ましくは、このオリゴヌクレオチドは、以下からなる群より選択されるヌクレオチドを含む領域に対応する：配列番号1のヌクレオチド150、194～195、240～241、243、244、255～256、266～267、269～271、276、267、279～280、293～295、338～340、411、459、532～533、591、633～644、795～797、828、853～854、876～877、883、884～885、898、976、979～980、999、1037、1043～1044、1092～1096、1099、および1116～1119。より好ましくは、本発明は、以下からなる群より選択されるアンチセンスオリゴヌクレオチド配列に関する：
5' TTC ATC CTG GGT AAG AGT GGG ACA CCT GTG (配列番号9)；

5' TGG TGC ATG TCT TTG GTC CCA GCT AC (配列番号10)；および

5' ATC AAC CTG GCG AAC ATG GTG AAC CCC ATC (配列番号11)。

また、好ましくは、配列は15～40マーであり、より好ましくは、15～30マーである。また好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエートまたは上記の他のオリゴヌクレオチド誘導体の1つである。NTP核酸配列に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびPTP核酸配列に非相同的なアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた好ましく、これは、過去に間違って配列決定された領域に対応する。ならびにこのようなオリゴヌクレオチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物もまた好ましい。本発明の少なくとも1つの有効量のNTPアンチセンスオリゴヌクレオチドと薬学的に受容可

能なキャリアを組み合わせて含む薬学的組成物もまた、本発明に同様に含まれる。1つの実施態様において、単一のNTPアンチセンスオリゴヌクレオチドが利用される。別の実施態様において、NTP DNAの隣接する領域に相補的な2つのNTPアンチセンスオリゴヌクレオチドが、利用される。DNAの隣接する領域に相補的な2つのNTPアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは対応するmRNAの投与によって、NTPゲノム転写またはmRNA翻訳のより効率的な阻害が可能になり、NTP産生のより有効な阻害を生じ得る。

好ましくは、NTPアンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞によってアンチセンス分子の取り込みを増幅する薬剤とともに同時投与される。例えば、NTPアンチセンスオリゴヌクレオチドは、リポソームの形態にあり得る親油性カチオン性化合物と組み合わせられ得る。細胞にヌクレオチドを導入するためのリポソームの使用は、例えば、米国特許第4,897,355号および同第4,394,488号に教示される。生物学的材料を含むリポソームの一般的調製方法については、米国特許第4,235,871号、同第4,231,877号、同第4,224,179号、同第4,753,788号、4,673,567号、同第4,274,411号、同第4,814,270号もまた参照のこと。

あるいは、NTPアンチセンスオリゴヌクレオチドは、コレステロール、コール酸塩、およびデオキシコール酸を含む多くのステロールの任意の1つのような親油性キャリアと組み合わせられ得る。好ましいステロールは、コレステロールである。

さらに、NTPアンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞に摂取されるペプチドに結合され得る。有用なペプチドの例には、ペプチドホルモン、抗原または抗体、およびペプチド毒素があげられる。新生物細胞によって選択的に取り込まれるペプチドを選択することによって、アンチセンス薬剤の特異的送達をもたらされ得る。NTPアンチセンスオリゴヌクレオチドは、活性化されたアミノアルキル誘導体の形成によって5' OH基を介して共有結合され得る。次いで、選択したペプチドは、アミノおよびスルフィドリル反応性ヘテロ二機能性薬剤を介して活性化されたNTPアンチセンスオリゴヌクレオチドに共有結合され得る。後者は、ペプチドに存在するシステイン残基に結合される。細胞をペプチドに結合したNTPアンチセンスオリゴヌクレオチドに曝露する際に、ペプチジルアンチセンス薬剤は、エンドサイトーシスを受けて、そしてNTPアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的NTP mRNAに結合して、翻訳を阻害する (Haralambidら、WO 8903849; Lebleuら、EP 0263740)

本発明のNTPアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび薬学的組成物は、それらの意図された目的を達成する任意の手段によって投与され得る。例えば、投与は、非経口的、皮下的、静脈内、筋肉内、腹腔内、経皮的、くも膜下腔内、または頭蓋内経路により得る。投与される投薬量は、レシピエントの年齢、健康状態、および体重、(あるとすれば)併用する処置の種類、処置の頻度、および所望される効果の種類に依存する。

本発明の範囲内の組成物は、NTPアンチセンスオリゴヌクレオチドが、目的のガン細胞の増殖の阻害を達成するおよび/もしくは分化を刺激する、または、ADを緩和するのに有効量で含まれる全ての組成物を含む。個人の要求は変化する一方、各成分の有効量の最適範囲の決定は、当該技術内である。代表的には、NTPアンチセンスオリゴヌクレオチドは、哺乳動物、例えばヒトに0.005~1mg/kg/日(処置される哺乳動物の体重の1日あたり)の用量で、または薬学的に受容可能なその塩の等価な量で投与され得る。

二重鎖DNA(イントロン、エキソン、またはその両方を含む)の転写された領域に結合し、そして三重らせんを形成することによってNTP遺伝子の転写を妨げるように設計されるアンチセンスオリゴヌクレオチドが調製され得る(米国特許第5,594,121号、同第5,591,607号、WO96/35706、WO96/32474、WO94/17091、WO94/01550、WO91/06626、WO92/10590)。

三重らせんを形成するための好ましいオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド(Id.)の少なくとも2つの領域について極性が逆になったオリゴヌクレオチドである。このようなオリゴヌクレオチドは、例えば、3' ---5' -L-5' ---3' または5' ---3' -L-3' ---5' のような反対の極性のタンデムな配列を含む。ここで、Lは、オリゴヌクレオチド間の0~10塩基のオリゴヌクレオチド連結を表す。逆極性形態は、エキソヌクレアーゼ分解に対して一本鎖オリゴヌクレオチドを安定化する(Froehlerら、前出)。好ましいオリゴヌクレオチドは、PTP核酸配列に非相同的であり、そして過去に間違って配列決定された領域

に対応する。本発明は、このようなオリゴヌクレオチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物にも関する。

治療適用において、三重らせん形成オリゴヌクレオチドは、上記のように、種々の投与様式（全身的または局所的投与を含む）のために薬学的調製物中に処方され得る。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび三重らせん形成オリゴヌクレオチドは、当業者に周知の任意の方法（固相合成法および本明細書中に引用される刊行物、特許および特許出願に開示されたような他の方法を含む）に従って調製され得る。

本発明はまた、過去に間違っ て配列決定された領域に対応する、配列番号1のNTP配列に相補的であり、そしてPTP核酸配列に非相同的な標的配列を含むリボザイム、ならびにこのよう なリボザイムおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物に関する。

リボザイムは、mRNA機能を阻害するための代替方法を提供する。リボザイムは、RNA酵素であり得、RNAを自己スプライスし、そしてRNAを自己切断し得る（Cechら、*Journal of Biological Chemistry* 267:17479-17482（1992））。特定の標的配列にトランスに指向されたエンドヌクレアーゼ活性を有する新規なリボザイムを構築することが可能である。これらのリボザイムは、種々の配列に作用し得るので、リボザイムは、実質的に任意のRNA基質について設計され得る。従って、リボザイムは、特定の遺伝子の発現を阻害するために非常に柔軟な道具であり得、そしてアンチセンス構築物に対して代替方法を提供する。クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼmRNAに対するリボザイムは、首尾よく構築されている（Haseloffら、*Nature* 334: 585-591（1988）；Uhlenbeckら、*Nature* 328: 596-600（1987））。リボザイムは3つの構造的ドメイン：1）切断部位に5'方向で隣接するヌクレオチドの高度に保存された領域；2）リボザイムの天然に存在する切断ドメイン中に含まれる、塩基対合したステムを形成している高度に保存された配列；および3）両側の切断部位に隣接する領域を含み、そして切断部位および基質と酵素との結合に関連するリボザイムの正確な配置を確実にしている。このモデルに従って構築されるRNA酵素は、RNA配列の特異的切断のためにインビトロで適切であることがすでに証明されている（Haseloffら、前出）。このような領域の例は、上記のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

あるいは、活性部位がタバコリングススポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖由来であるヘアピンリボザイムが、使用され得る（Hampelら、*Biochemistry* 28: 4929-4933（1989））。最近、ヒト免疫不全ウイルス1型RNAを切断するヘアピンリボザイムが設計された（Ojwang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10802-10806（1992））。他の自己切断RNA活性は、肝炎デルタウイルスと関連する（Kuoら、*J. Virol.* 62: 4429-4444（1988））。またリボザイムの調製方法および使用方法については、米国特許第5,574,143号を参照のこと。好ましくは、本発明のNTPリボザイム分子は、上記のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼリボザイムまたはヘアピンリボザイムに基づく。あるいは、NTPリボザイム分子は、触媒活性リボザイム構築（化学分解および酵素分解に対して増加した安定性を有し、従って治療薬剤として有用である）を開示するEcksteinら（国際特許出願番号WO92/07065）によって記載されるように設計される。

代替りのアプローチにおいて、外部ガイド配列（EGS）は、細胞内NTPmRNA（これは、その後、細胞リボザイムによって切断される）に対して内因性リボザイム、RNasePを指向するために構築され得る（Altmanら、米国特許第5,168,053号）。好ましくは、NTP EGSは、AD7c-NTP mRNA（ミス配列化領域に対応する）および3'-NCCAヌクレオチド配列（ここで、Nは好ましくはプリン（同上）である）に相補的な10~15個のヌクレオチド配列を含む。以下に記載されるように、NTP EGS分子は細胞へ送達された後に、この分子はNTP mRNAとそれに相補的なNTP EGS配列との間で塩基対を形成することによって、標的化NTP mRNA種に結合し、従って塩基対形成した領域（同上）の5'側のヌクレオチドで、RNasePによってNTP mRNAの切断を促進する。

このような外部ガイド配列の例は、以下の通りである：

CAC TGC ACT TNC CA (配列番号12)

CCA GGT GTA GNC CA (配列番号13)

CAA GGT CCA GNC CA (配列番号14)

有効量の本発明の少なくとも1つのNTPアンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、NTPリボザイムまたはNTP EGSを薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせて含む薬学的組成物が、本発明中において同様に含まれる。好ましくは、NTPアンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、NTPリボザイムまたはNTP EGSが、細胞によるNTPアンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、リボザイムまたはNTP EGS分子の取り込みを増強する薬剤と同時に投与される。例えば、NTPアンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、NTPリボザイムまたはNTP EGSは、親油性カチオン化合物（上記に記載されるように、リポソームの形態において存在し得る）と組み合わせられ得る。あるいは、NTPアンチセンスオリゴヌクレオチド、NTP三重らせん形成オリゴヌクレオチド、NTPリボザイムまたはNTP EGSは、親油性キャリアー（例えば、コレステロール、コール酸、デオキシコール酸を含む多数のステロールの任意の1つ）と組み合わせられ得る。好ましいステロールは、コレステロールである。

NTPアンチセンスオリゴヌクレオチド、NTP三重らせん形成オリゴヌクレオチド、NTPリボザイムまたはNTP EGS、および本発明の薬学的組成物は、それらの意図される目的を達成する任意の手段によって投与され得る。例えば、非経口的経路、皮下経路、静脈経路、筋肉内経路、腹腔内経路、経皮経路、くも膜下経路、または頭蓋内経路によって投与され得る。投与される用量は、レシピエントの年齢、健康、および体重、もしあれば併用処置の種類、処置の頻度、および所望の効果の性質に依存する。例えば、700ミリグラムものアンチセンスオリゴヌクレオチドが、毒性の兆候なく10日間の経過にわたって（すなわち、0.05mg/kg/時間）患者に静脈内投与される（Sterling, 「Systemic Antisense Treatment Reported」、Genetic Engineering News 12 (12) : 1, 28 (1992)）。

本発明の範囲内の組成物は、すべての組成物NTPアンチセンスオリゴヌクレオチド、NTP三重らせん形成オリゴヌクレオチド、NTPリボザイムまたはNTP EGSが、被検体癌細胞の増殖の阻害を達成するため、および/または分化を刺激するため、またはADを軽減するために有効な量で含まれる。個々の必要性は様々であるが、各々の成分の有効量の最適範囲の決定は、当業者の技術範囲内である。

NTPアンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、リボザイムまたはNTP EGSを溶液中での未加工化学物質として投与することに加えて、治療用分子は、賦形剤および補助剤（薬学的に使用され得る調製物へのNTPアンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、リボザイムまたはNTP EGSの加工を容易にする）を含む適切な薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的調製物の一部として投与され得る。非経口的投与のための適切な処方物は、水溶性形態（例えば、水溶性塩）のNTPアンチセンスオリゴヌクレオチド、NTP三重らせん形成オリゴヌクレオチド、NTPリボザイム、NTP EGSの水溶液を含む。さらに、適切な油性注射懸濁液としての活性化合物の懸濁液が投与され得る。適切な親油性溶媒またはビヒクルは、脂肪油（例えば、ゴマ油）、または合成脂肪酸エステル（例えば、オレイン酸エチルまたはトリグリセライド）を含む。水溶性注射懸濁液は、例えば、カルボキシメチルナトリウムセルロース、ソルビトール、および/またはデキストランを含む懸濁液の粘性を増加させる物質を含み得る。必要に応じて、懸濁液もまた安定化剤を含み得る。

あるいは、NTPアンチセンスオリゴヌクレオチド、NTP三重らせん形成オリゴヌクレオチド、NTPリボザイムおよびNTP EGSは、ビリオンの形態（好ましくは、インビボで複製不能である）で投与されるDNA構築体によってコードされ得る（例えば、Taylor, WO 92/06693を参照のこと）。例えば、このようなDNA構築物は、ヘルペススペースのウイルスを使用して投与され得る（Gageら、米国特許第5,082,670号）。あるいは、NTPアンチセンスオリゴヌ

10

20

30

40

50

クレオチド、NTP三重らせん形成オリゴヌクレオチド、NTPリボザイム、およびNTP EGSは、ビリオンの形態（例えば、レトロウイルス）で投与されるRNA構築物によってコードされ得る。レトロウイルスベクターの調製は、当該分野で周知である（例えば、Brownら、「Retroviral Vectors,」 DNA Cloning: A Practical Approach, 第3巻, IRL Press, Washington, D.C. (1987) を参照のこと）。

本発明に従って、遺伝子治療は、NTPの特定の形態の不適切な発現を阻害することによってADを低減するために使用され得る。さらに、遺伝子治療は、適切な発現レベルの特定の形態のNTPを提供することによって、ADを低減するために使用され得る。この場合、特定のNTP核酸配列は、上記のように、ウイルスの形態で投与されるDNAまたはRNA構築物によってコードされ得る。あるいは、「ドナー」細胞は、NTP配列を含むウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターを使用して、または細胞へ外来DNAを導入する他の周知の技術を使用してインビトロで改変され得る（例えば、Sambrookら、前出、を参照のこと）。このようなドナー細胞は、繊維芽細胞、ニューロン細胞、膠細胞、および結合組織細胞（Gageら、前出）を含む。遺伝子操作の後で、ドナー細胞は中枢神経系に移植され、従って、遺伝子改変細胞は、治療形態のNTP（前掲）を提供する。

さらに、このようなビリオンは、脳への送達のために血流中に導入され得る。これは、ビリオンの投与前の血液脳関門の浸透圧分配を通して達成される（例えば、Neuwelt, 米国特許第4,866,042号を参照のこと）。血液脳関門は、薬学的有効な、非毒性の高張溶液（例えば、マンニトール、アラビノース、またはグリセロール）の投与によって破壊され得る（前掲）。

本発明を、ここまで一般的に記載したが、本発明は、例示のために提供され、そして特に指示されない限り、本発明を限定することを意図されない以下の実施例を参照することによってより容易に理解される。

実施例

実施例 1 AD7c-NTP cDNAの単離

cDNAライブラリーを、末期ADの個体の側頭葉から抽出したRNAを使用して商業的（Invitrogen Corp., San Diego, CA）に調製した。ライブラリーをpcDNA2ベクター（Invitrogen）中に連結した。AD7c-NTP遺伝子を単離するために、約 5×10^5 の形質質転換E.coliクローンおよびIPTG誘導（Sambrook J.ら、「Molecular Cloning. A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.）E.coliクローンを、ヒトPTP（Gross, J.ら、「Isolation, Characterization, and Distribution of an Unusual Pancreatic Human Secretory Protein」, J. Clin. Invest. 76: 2115-2126 (1985)）に対するポリクローナル抗体、続いて放射標識した抗ヒトIgG（Amersham, Arlington Heights, IL）（Sambrook, J. ら（1989）；およびAusubel, F. M.ら、「Current Protocols in Molecular Biology」, New York, NY, John Wiley & Sons (1988)）を使用してスクリーニングした。AD7c-NTPの制限エンドヌクレアーゼフラグメント（XhoI-PstI; PstI-PvuII; PvuII-HindIII）を、pGem7（Promega Corp., Madison, WI）へサブクローン化し、両方の鎖のヌクレオチド配列を、T7 DNAポリメラーゼ（Ausubel, F.M.ら（1988））を使用してジデオキシ鎖終結方法によって決定した。さらなる遺伝子特異的プライマーをフラグメントが重なる配列を生成するように生成した。DNA配列をMacVector Softwareバージョン4.5を用いて構築し、そしてMicro Vax IIコンピューターに装備したGenetics Computer Groupバージョン7.3の配列分析ソフトウェアを使用して分析した。データベース検索を、生物学情報のための国際センターのBLASTネットワークサービスを使用して実施した。

AD脳ライブラリーから単離されたAD7c-NTP cDNAの特徴付け

AD7c-NTP cDNAは1442ヌクレオチドを含み、オリゴ-dTトラックで始まる。ヌクレオチド配列は、最初のAUGコドンで始まる1125ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含み、AATAAAポリアデニル化シグナルを含む302ヌクレオチドの非翻訳配列を含む（図1）。ベストフィット（Bestfit）分析およびギャップ（GAP）分析は、オープンリーディングフレームに埋め込まれた4つのAlu型配列、（ヌクレオチド1~170、423~593、595~765、および898~1068）、およびヌクレオチド898で始まる最初の450ヌクレオチドの近似複

製 (near-duplication) (85%同一性) の存在を明らかにした。BLASTデータベース比較は、Huntington病領域である染色体4p16.3 (Gusella, J.F.ら「A Polymorphic DNA Marker Genetically Linked to Huntingdon's Disease,」Nature 306: 24-238 (1983)) (図1) に対する有意な (67-89%) 相同性を有する3つの領域を開示したが、Huntington病 (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 「A Novel Gene Containing a Trinucleotide Repeat that is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes,」Cell 72:971-983 (1993)) を有する個体において正常な (CAG)_n 反復より長い反復を含むIT15 Huntington cDNAのアラインメントを開示しなかった。

翻訳された375アミノ酸配列は、予測された分子量41,718、および見積もられたpI9.89を有し、そしてSer残基 (11.7%) およびPro残基 (8.8%) に富む。Kyte-DoolittleおよびChou-Fasman親水性およびHoop-Woods表面確率プロフィールは、15アミノ酸の疎水性リーダー配列、および7つの膜貫通領域を予測する。cDNAの構成と対応して、タンパク質のその後の分析は、9アミノ酸鎖長と23アミノ酸鎖長との間の、4つの83%~91%の同一性反復化 (1回または2回) 抗原性ドメインを明らかにした (図1)。タンパク質のその後の分析は、21のcAMP、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII、タンパク質キナーゼC、またはグリコーゲンシンターゼキナーゼ3リン酸化部位、および1つのミリスチル化部位を示した。さらに、単一のtgfモチーフ (残基番号44~53) を検出した。ジーンバンクデータベースとのAD7c-NTPアミノ酸配列の比較は、インテグリンのβサブユニットに対する有意な相同性 (72%~80%)、オルタナティブスプライシングされたA4形態の神経線維腫症2遺伝子に対する有意な相同性 (72%~81%)、ミエリン突起細胞グリコタンパク質-16前駆体タンパク質に対する有意な相同性 (70%~76%)、ヒト内在性膜タンパク質に対する有意な相同性 (55%~85%)、およびヒト崩壊促進因子2前駆体に対する有意な相同性 (62%~68%) を有する4つの領域、およびc-relプロトオンコジーン形質転換タンパク質に対する相同性 (残基56~84: 65%; 残基287~295: 88%) を有する2つの領域を明らかにした (図1)。残基5~24は、IGF/インシュリンレセプターハイブリッドの領域に75%同一であり、そして残基4~24、47~79、109~132、227~261、および227~360は、ヒト形質転換関連タンパク質と57%から76%の同一性を示す。さらに、2つのセリン/スレオニンキナーゼタンパク質ドメイン (残基6~48、および272~294) を同定した。

金属キレートクロマトグラフィーによって精製され、そして融合パートナーから切断されたインビトロ翻訳タンパク質およびpTrcHis-AD7c-NTP組換えタンパク質は、SDS-PAGE分析またはウエスタンブロット分析によって、約39~42kDaの分子量を有した (図2)。さらに、pcDNA3ベクター (Invitrogen, San Diego, CA) へ連結されたAD7c-NTP cDNAでトランスフェクトしたBosc細胞において、単一の約39~42kDタンパク質をN314モノクローナル抗体を使用してウエスタンブロット分析によって検出した。2部位免疫放射線測定法および免疫ブロット研究において、AD7c-NTP組換えタンパク質は、精製されたpTrcHis-AD7c-NTP組換えタンパク質を用いて産生した、全てのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体と特異的な免疫反応性結合を示した。AD7c-NTPとの免疫活性は、免疫前ウサギ血清、GAP-43に対する非関連性ウサギポリクローナル抗体、またはDengueウイルスもしくはFB50に対する非関連性モノクローナル抗体を使用して検出されなかった (図2)。

実施例2 AD7c-NTPのインビトロ発現

アンチセンスcRNAおよびセンスcRNAを、それぞれKpnIおよびXhoIを有するAD7c-NTP cDNAプラスミドから転写した。cRNA転写産物は、[³⁵S]メチオニン (Dupont-New England Nuclear, Boston, MA) の存在下でウサギ網状赤血球溶解産物系 (Stratagene, La Jolla, CA) において翻訳され、そしてインビトロ翻訳の産物を、SDS-PAGEおよびオートラジオグラフィーによって分析した。AD7c-NTP cDNAを、pTrcHis発現ベクター (Invitrogen Corp., San Diego, CA) に連結した。このベクターは、金属キレートクロマトグラフィーによって融合タンパク質を単離するために使用される5N 6-His Tag配列をコードする。形質転換E. coliにおける組換え融合タンパク質の誘導を、対数増殖期の間に1mM IPTGを添加することによって達成した。融合タンパク質を、ProBond樹脂 (Invitrogen Corp., San Diego, CA) を用いてアフィニティー精製し (Ausubel, F.M.ら、(1988))、そしてT7-タグ融

10

20

30

40

50

合パートナーの役割を果たす抗体 (Novogen) を用いる、ウェスタンブロット分析 (Harlow, E. および Lane, D., 「Antibodies: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)) によって検出した。次いで、タグをエンテロキナーゼで切断し、AD7c-NTPタンパク質を得た (Ausubel, R.M. ら (編)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., 1994)。

実施例 3 組換えAD7c-NTPに対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の産生
ポリクローナル抗体を、アフィニティー精製した組換えAD7c-NTPタンパク質で免疫したウサギにおいて産生した。モノクローナル抗体を、完全フロイントアジュバントにおいて乳
10
10
20
化した、50 µgの精製した組換えAD7c-NTPタンパク質を腹腔内免疫したBalb/cマウスにおいて産生した (Harlow, E. および Lane, D. (1988) ; ならびに Wands, J.R. および Zurawski, V.R., Jr., 「High Affinity Monoclonal Antibodies to Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) produced by Somatic Cell Hybrids」、Gastroenterology 80I: 225-232 (1981)) 。 6 ~ 10週間後、マウスに、10 µgのAD7c-NTPを尾静脈注射によって追加免疫した。脾臓細胞を、SP-0ミエローマ細胞と融合させた (Harlow, E. および Lane, D. (1988) 、ならびに Wands, J.R. および Zurawski, V.R., Jr. (1981)) 。細胞をHAT培地において増殖させ、そして抗AD7c-NTP抗体を産生するハイブリドーマを、固相イムノアッセイによって同定した (Bellet, D.H. ら、 「Sensitive and Specific Assay for Human Chorionic Gonadotropin Based on Anti-Peptide and Anti-Glycoprotein Monoclonal Antibodies: Construction and Clinical Implications」、J. Clin. Endocrinol. Metabol. 63: 1319-1327 (1988)) 。ポリクローナル免疫血清の免疫グロブリン画分およびハイブリドーマ上清の結合特異性を、組換えAD7c-NTPを用いたラジオイムノアッセイ (RIA) およびウェスタンブロット分析によって、ならびにADおよび加齢コントロール脳のウェスタンブロット分析および免疫組織化学的染色によって確認した。25個のハイブリドーマのパネルにおいて、3個のMoAbは、精製した天然のPTPおよび組換えAD7c-NTPと類似のレベルの免疫反応性を示し、従ってさらに特徴付けられた (表1) 。

表1 AD7c-NTPモノクローナル抗体によって示される免疫反応性のプロフィール				
抗体	ウェスタンブロット	ICC*	AD特異的**	AD脳における標識の分布
N2B10	確認：還元	ネガティブ	適用せず	なし
N2I5	確認：還元	ネガティブ	適用せず	なし
N2J1	確認	++	特異的	ニューロピル系、不規則な神経突起、軸索
N2R1	未確認	ネガティブ	適用せず	なし
N2S6	確認：還元	++++	特異的	ニューロン
N2T8	確認：還元	++++	特異的	変性ニューロン、NFT、不規則な神経突起
N2U6	確認	++++	特異的	ニューロピル系(thread)、NFT
N3A13	未確認	+	特異的でない	なし
N3C11	未確認	++	特異的でない	なし
N3D12	未確認	+	特異的でない	なし
N3I4	確認：非還元	ネガティブ	適用せず	なし
N2-36	未確認	+	特異的	NFT、腫脹した神経突起
N2-22-11	未確認	ネガティブ	適用せず	なし
ポリクローナル	確認	++++	特異的 +	変性ニューロン、不規則な神経突起

* ICC=免疫細胞化学；NFT=神経原線維変化；** AD特異的=AD組織切片(N2S6)における組織学的に正常なニューロンおよび線維において、またはADにおいて検出される変性ニューロン細胞体およびプロセスにおいてのみ検出される免疫反応性。+=ギ酸処理後のみ。

MoAbsで示されるAD7c-NTP免疫反応性のプロフィール（表1）：以下に要約される知見は、6個の末期のADおよび5個の加齢コントロール脳においてなされた観察を示す。25個のAD7c-NTP MoAbsを、免疫細胞化学的染色によって特徴付けた。表1は、13個のAD7c-NTP MoAbsの特徴を詳述する。他の12個のMoAbsは、リストから除去した。なぜなら、それらは

10

20

30

40

50

、低レベルの結合 (N=9) に起因して免疫細胞化学的染色およびウェスタンブロット研究に適切でなかったか、または脾臓系状タンパク質 (N=3) と交差免疫反応性を示したかのいずれかのためである。さらに特徴付けた13個のAD7c-NTP MoAbsのうち8個のみが、神経細胞形質 (perikarya)、ニューロピル線維 (neuropil fiber)、白質線維 (white matter fibers) (軸索)、またはAD神経変性病巣において免疫反応性を示した。他の5個は、組織学的切片において非免疫反応性であった。

表1において、AD特異的結合は、変性ニューロン、神経原線維変化、不規則な腫脹した神経突起および軸索の検出、またはコントロール脳においてではなくADにおける組織学的にインタクトなニューロンにおける免疫反応性をいう。4個のAD7c-NTP MoAbs (N2-36、N3-C11、N2S6、N2-T8) は、皮質ニューロン、特に第3層および第5層における錐体細胞における強力な程度の免疫細胞化学的染色を示した。2個のMoAbs (N2-U6、N2-S6) は、ニューロピルおよび白質線維 (軸索) を顕著に標識し、そして5個 (N2-U6、N3-C11、N2-S6、N2-T8、N2-J1) は、大脳皮質および白質におけるA2B5+およびGFAP+原形質 (2型) 星状細胞を検出した。2個のAD7c-NTP MoAbs (N2-U6およびN2-T8) は、ADにおいて、皮質ニューロン、および腫脹性不規則 (ジストロフィー) ニューロピル神経突起の強烈な標識を示したが、加齢コントロール脳においては低レベルの標識を示すか、または標識を示さなかった。N2-36、N2-T8、N2-U6 MoAbsを用いて、AD関連神経変性病巣において観察される免疫反応性が最も顕著であった。N2-T8は、細胞内神経原線維変化、ならびに神経原線維変化を有さない変性したニューロンを検出し; N3-D12、N2-T8、およびN2-J1は、腫脹性ジストロフィー軸索および細かな神経プロセスを、特に大脳皮質の浅層において標識し; そしてN2-U6およびN2-J1は、AD脳においてのみ観察される波形の不規則な糸状構造を標識した。N2J1は、不規則な糸状構造、ジストロフィー神経突起、および腫脹した軸索を非常に顕著に標識したが、神経細胞形質またはグリア細胞の最小の標識を示した。B型肝炎ウイルスに対するネガティブコントロール5C3 MoAbsは、同じ脳の隣接する切片と免疫反応性ではなかった。

以下の実施例において、ポリクローナル、ならびにN3I4、N2J1、およびN2U6モノクローナルAD7c-NTP抗体を使用した。

実施例4 ヒト脳組織

ヒト脳組織を、Massachusetts General HospitalのAlzheimer's Disease Research Center脳バンク (MGH-ADRC) から得た。すべての脳を、死後12時間以内に収集し、そしてCERAD判定基準 (Mirra, S.S.ら、「The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). II. Standardization of the Neuropathological assessment of Alzheimer's Disease」、Neurology 41: 479-486 (1991)) を用いてADの組織病理学的診断を行った。AD群 (N=17) は、平均年齢 76.3 ± 8.8 歳、平均脳重量 1117 ± 101 グラム、および平均死後時間 7.3 ± 3.9 時間を有した。コントロール群 (N=11) は、平均年齢 78.0 ± 6.2 歳、平均脳重量 1274 ± 115 グラム、および平均死後時間 8.3 ± 3.6 時間を有した。さらに、認識の衰えおよび中程度のAD組織病理学的病巣を有する早期のADと疑われる4症例、ならびに散在性 (diffuse) レーヴィ体病 (Kosaka, K. 「Dementia and Neuropathology in Lewy Body Disease」、Adv. Neurol. 60: 456-463 (1993)) (DLBD: AD関連CNS神経変性疾患) の2症例を研究した。新鮮な凍結した前頭葉組織および側頭葉組織を、ノーザンブロット分析およびウェスタンブロット分析のために使用した。死後の脳脊髄液 (CSF) サンプル (8個のAD; 7個のコントロール; 2個のDLBD) を、ウェスタンブロット分析によってAD7c-NTPを検出するために使用した。パラフィン包埋組織学的切片を、インサイチュハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学的染色によってAD7c-NTP遺伝子発現を位置決めするために使用した。

実施例5 AD7c-NTP mRNA発現のノーザン分析

ADおよび加齢コントロールの前頭葉組織 (Brodmann Area 11)、ならびに正常な成人のヒト腎臓、肝臓、脾臓、胃腸管、卵巣、ファローピウス管、子宮、甲状腺、肺、骨格筋、および脾臓から単離された総RNAのサンプル (Ausubel, F.M.ら (1988)) ($15 \mu\text{g}$) を、ランダムヘキサマー法 (Ausubel, F.M.ら、(1988)) によって生成される $2 \times 10^6 \text{dpm/ml}$ の

10

20

30

40

50

[α ^{32} P]dCTP標識AD7c-NTP cDNAプローブ（比活性、約 10^8 dpm/ μ g DNA）を用いるノーザンハイブリダイゼーション分析に供した。続いて、プロットを、0.5% SDSを含む $5 \times$ SSC（ $1 \times$ SSCは、0.15M NaCl+0.015M クエン酸ナトリウムである）の段階希釈で（Sambrook, J.ら、（1989）；Ausubel, F.M.ら（1988））、そして最終的に $0.1 \times$ SSC/0.5% SDSにて 5°C で洗浄した。RNAローディングを評価するために、プロットをプローブから剥ぎ、そして18s リボソームRNAに対応する10倍過剰モル濃度の[γ ^{32} P]ATP標識合成30マーとともに再ハイブリダイズした（de la Monte, S.M.およびBloch, K.D.（1996））。結果を、オートラジオグラフィーおよびデンストメトリー（ImageQuant, Molecular Dynamics, Inc.）によって分析した。

結果：ADおよび加齢コントロール脳におけるAD7c-NTP mRNA発現

10

ノーザンプロットハイブリダイゼーション研究において、成人ヒトの膵臓、腎臓、肝臓、脾臓、胃腸管（種々の領域）、卵巣、ファローピウス管、子宮、甲状腺、肺、骨格筋、精巣、および胸腺においてではなく、前頭葉組織および側頭葉組織においてAD7c-NTP cDNAプローブで検出された1.4kB mRNA転写産物および0.9kB mRNA転写産物はネガティブであった。1.4kB AD7c-NTP mRNA転写産物および0.9kB AD7c-NTP mRNA転写産物の両方がADおよび加齢コントロール脳において検出されたが、発現レベルはADにおいて増加した。ローディングおよび非特異的分解における差異を修正するために、18S RNAシグナルに対して標準化した値によって、非飽和オートラジオグラムの濃度測定分析は、正常な加齢コントロール脳と比較して、ADにおいて1.4kB ($P < 0.01$) AD7c-NTP転写産物および0.9kB ($P < 0.05$) AD7c-NTP転写産物の両方の有意に高い平均レベルを示した。

20

実施例6 逆転写酵素ーポリメラーゼ連鎖反応増幅（RT-PCR）研究

ヒト脳、PNET1およびPNET2ヒトCNSニューロン細胞株（The, I.ら、「Neurofibromatosis type 1 Gene Mutations in Neuroblastoma」、Nature Genet. 3: 62-66（1993））（ポジティブコントロール）、SH-Sy5yヒト神経芽腫細胞（Biedler, J.L.ら、「Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture」、Cancer Res. 33: 2643-2652（1973））、ならびにヒト膵臓および肝臓（ネガティブコントロール）から単離した総RNAサンプル（ 2μ g）を、ランダムヘキサマープライマー（Ausubel, F.M.（1988））およびSuperscriptTM逆転写酵素（Gibco-BRL, Grand Island, NY）を用いて逆転写した。cDNA産物（10%）を、以下のプライマーを用いてAD7c-NTP配列を検出するためにPCR増幅に供した：（459～480）5' TGTCCCACTCTTACCCAG GATG（配列番号5）、および（849～826）5' AAGCAGGCAGATCACAAGGTCCAG（配列番号6）。 β -アクチンコントロールプライマー（Dallman M.J. およびPorter, A.C.G., 「Semi-Quantitative PCR for the Analysis of Gene Expression」、PCR A Practical Approach, M.J. McPhersonら（編）、IRL Oxford University Press, Oxford, 215-224頁（1991））（5' AATGGATGACGATATCGCTG（配列番号7）；5' -ATGAGGTAGTCTGTCAGGT（配列番号8））を、すべての研究に援用した。PCR増幅の各サイクルは、 95°C で30秒間の変性、 60°C で30秒間のアニーリング、および 72°C で1分間の伸長からなった。30サイクルおよび最終の 72°C で10分間の伸長後、約10%のPCR産物を、アガロースゲル電気泳動、およびAD7c-NTP cDNAのヌクレオチド702～720に対応する[γ ^{32} P]dATP標識オリゴヌクレオチドプローブを用いるサザンハイブリダイゼーションによって分析した。残りのPCR産物を、電気泳動によって分画し、そしてPCR II TAクローニングベクター（Invitrogen Corp, San Diego, CA）に連結した。6個の脳サンプルから単離されたクロンのヌクレオチド配列を、ジデオキシチェーンターミネーション法（Sambrook, J.ら（1989）；Ausubel, F.M.（1988））によって決定した。

30

40

ヒト脳におけるAD7c-NTP mRNAの発現を、6個のADおよび5個の加齢コントロール脳（前頭葉）から単離したRNAのRT-PCR増幅によって確認した。予測される390ヌクレオチドのPCR産物を、すべてのサンプルから得た。PCR産物の特異性を、内部配列に対応する[^{32} P]標識オリゴヌクレオチドプローブを用いるサザンプロットによって、および5個のAD脳からクローニングした390ヌクレオチドPCR産物の核酸配列が図1で下線を付した配列と同一であることを決定することによって実証した。RT-PCR増幅研究において、AD7c-NTP PCR産物

50

もまた、PNET1、PNET2、およびSH-Sy5yニューロン細胞から単離されたRNAを用いて検出されたが、ヒト脾臓または肝臓では検出されなかった。分析したすべてのサンプルから、 β -アクチンプライマーを用いてポジティブのRT-PCR産物を生成した。

実施例7 インサイチュハイブリダイゼーション

ADおよびコントロール脳のパラフィン切片（10 μ mの厚さ）を、KpnIまたはXhoIで線状化したcDNAテンプレートから生成し、そしてSP6～T7 DNA依存性RNAポリメラーゼを用いて[11-ジゴキシゲニン]UTPで標識した、アンチセンスおよびセンス（ネガティブコントロール）のAD7c-NTP cRNAプローブ（de la Monte S.M.ら、（1995）；de la Monte, S.M. およびBloch, K.D.（1996））とハイブリダイズさせた（Melton, D.A.ら、「Efficient in Vitro Synthesis of Biologically Active RNA and RNA Hybridization Probes from Plasmids Containing a Bacteriophage SP6 Promoter」、Nucl. Acids Res. 12: 7035-7056（1984））。特異的に結合したプローブを、アルカリホスファターゼ結合ヒツジF(ab')₂抗ジゴキシゲニン（Boehringer-Mannheim Inc.）およびX-ホスフェート/5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-ホスフェート/ニトロブルー-テトラゾリウムクロリド（de la Monte, S.M.およびBloch, K.D.（1996））で検出した。プローブ特異性を、[α ³²P]UTPで標識した同一のcRNAプローブを用いて、脳のノーザンブロット分析によって確認した。

結果：ヒト脳におけるAD7c-NTP mRNAの細胞局在

[11-ジゴキシゲニン]UTP標識アンチセンスcRNAプローブを用いるインサイチュハイブリダイゼーション研究は、AD（N=6）および加齢コントロール（N=4）脳の両方で前頭部（Brodman Area 11）皮質ニューロンおよび側頭部（Brodman Area 21）皮質ニューロン中のAD7c-NTP関連mRNA転写産物を実証した（図3）。しかし、暗視野顕微鏡では、加齢コントロール脳と比較してADにおいて、ノーザンブロット分析の結果に対応する、側頭部皮質ニューロンおよび前頭部皮質ニューロンの両方でAD7c-NTP mRNA発現の驚くほど上昇したレベルを示した。低レベルのAD7c-NTP mRNA転写産物はまた、ADにおいて皮質および白質グリア細胞において検出された。AD7c-NTP mRNA転写産物は大脳血管において検出されず、そして特定のハイブリダイゼーションシグナルは、ジゴキシゲニン標識センス鎖cRNAプローブとハイブリダイズしたいずれの標本においても観察されなかった。

実施例7 AD7c-NTP発現の免疫検出

ウェスタンイムノブロッティング研究（Harlow, E.およびLane, D.（1988））を、RIPA緩衝液（Ausubel, F.M.ら（1988））中でホモジナイズした、前頭葉および側頭葉の剖検組織および種々の非CNS組織から作製したタンパク質抽出物（60 μ gサンプル）を使用して実施した。さらに、死亡後または死亡前の脳脊髄液の40 μ lサンプルを、ウェスタンブロット分析により評価した。ブロットを、ウサギポリクローナル（1:800）、またはN3I4、N2U6、もしくはN2J1マウスモノクローナル（5 μ g/ml）抗AD7c-NTPを使用して、プローブした。抗体結合を、1:25,000希釈の西洋ワサビペルオキシダーゼ結合二次抗体（Pierce）およびスーパーシグナル（Supersignal）化学発光増強試薬（Pierce）を使用して検出した。AD7c-NTP発現のレベルを、オートラジオグラムの体積密度スキャンにより定量した（ImageQuant；Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA）。AD7c-NTP免疫反応性の細胞位置を、AD脳および年齢適合コントロール脳からの前頭葉（ブロードマンの第11野）および側頭葉（ブロードマンの第21野）のパラフィン包埋組織切片において示した。切片を、N2J1およびN2U6 AD7c-NTPモノクローナル抗体を使用する、アビジン-ビオチン西洋ワサビペルオキシダーゼ複合法（de la Monte, S.M.ら（1995）；ならびにde la Monte, S.M.およびBloch, K.D.（1996））により免疫染色した。隣接切片を、ポジティブコントロールとしてのグリア線維性酸性タンパク質に対するモノクローナル抗体、およびネガティブコントロールとしてのデングウイルスに対するモノクローナル抗体を用いて免疫染色した。

結果：ウェスタンブロット分析によるAD7c-NTP抗体結合の特徴付け

ヒト前頭葉および側頭葉の組織から抽出したタンパク質のウェスタン免疫ブロッティング研究において、約39～45kDの広域バンドのAD7c-NTP免疫反応性を、ポリクローナル抗体および25中11のモノクローナル抗体で検出した。タンパク質を15%Laemmliゲル中で電気泳

動的に分画し、そしてN3I4、N2U6、もしくはN2J1モノクローナル抗体でプローブした場合、約39～45kDのAD7c-NTP免疫反応性分子は、3または4の密にクラスター化したバンドに分離された(図2E)。これは、おそらく、異なる程度のAD7c-NTPリン酸化を表す。さらに、ポリクローナル抗体および4つのモノクローナル抗体は、脳内の18～21kDのAD7c-NTP免疫反応性タンパク質を検出した(図2E)。非CNS組織のウェスタンブロット分析は、AD7c-NTP抗体との特異的結合を全く明らかにしなかった。

実施例8 インビトロ発現研究

AD7c-NTP cDNAを、CMVプロモーターを含むpcDNA3哺乳動物発現ベクター(InVitrogen, San Diego, CA)に連結した。SH-Sy5y細胞を、pcDNA3-AD7c-NTPまたはpcDNA3(空のベクター、ネガティブコントロール)のいずれかでトランスフェクトし、そしてG418で選択した。安定にトランスフェクトした細胞株を、増殖特性、形態、およびAD7c-NTP発現について検査した。細胞増殖を、DNAへの $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みを測定し、そして培養物中の生存細胞の密度を決定することによって、評価した。チャンバースライドにおける細胞増殖を、N3I4モノクローナル抗体を使用して免疫染色した。AD7c-NTP発現もまた、N3I4抗体でのウェスタンブロット分析により評価した。

結果：ニューロン細胞におけるAD7c-NTPの過剰発現は、アルツハイマー病の特徴であるアポトーシス、神経突起出芽を導く

pcDNA3-AD7c-NTPで安定にトランスフェクトされたSH-Sy5yニューロン細胞におけるAD7c-NTPの過剰発現は、正常もしくは上昇したレベルのDNA合成にも拘わらず、培養物において有意により低い密度の生存細胞を生じた(図5)。この結果は、他のニューロン細胞株、および他の発現ベクターを使用しても再現可能であった。培養物中の減少した細胞密度は、上昇した細胞死によって引き起こされた。AD7c-NTPトランスフェクト細胞における核性p53発現の付随的な増加は、細胞死がアポトーシスによって仲介されている可能性を示唆する。pcDNA3でトランスフェクトしたSH-Sy5y細胞のサブコンフルエントな培養物は、突起が少ないかまたは全くない、円形もしくは紡錘状の細胞を含んでいた(図6A)。対照的に、pcDNA3-AD7c-NTPでトランスフェクトしたSH-Sy5y細胞は、ほとんどの細胞で検出された互いに連結する細かい突起を有する、夥しい神経突起成長を示した(図6B～6D)。さらにpcDNA3-AD7c-NTPトランスフェクト培養物は、常に、トリパンブルー色素を排除できない、多くの円形の屈折性浮遊細胞(死んでいた)を含んでいた。N3I4モノクローナル抗体を使用する、静止培養物の免疫細胞化学的染色により、pcDNA3-AD7c-NTPでトランスフェクトしたSH-Sy5y細胞の細胞体および細胞突起の強い標識が明らかになり(図6Fおよび6G)、そしてpcDNA3(空のベクター)でトランスフェクトしたSH-Sy5y細胞において免疫反応性がないことが明らかとなった(図6E)。これらの研究は、トランスフェクトしたニューロン細胞におけるAD7c-NTPの過剰発現が、アルツハイマー病の神経変性の主要な特徴の2つである、神経突起出芽および細胞死を促進することを示した。したがって、AD7c-NTPを過剰発現するトランスフェクト細胞株およびトランスジェニック動物は、AD7c-NTP発現を減少すること、およびそれによってアルツハイマー病の発症を処置または予防することにおいて有効であり得る薬物をスクリーニングするために有用である。

実施例9 AD脳および加齢コントロール脳におけるAD7c-NTPタンパク質の発現

AD脳および加齢コントロール脳のウェスタンブロット分析および免疫組織学的染色を、N3I4、N2U6、およびN2J1モノクローナルAD7c-NTP抗体を使用して実施した。AD脳および加齢コントロール脳において、約39～45kDタンパク質が、3つ全てのモノクローナル抗体で検出された。さらに、約18～21kDタンパク質が、N2U6およびN2J1抗体で検出された。オートラジオグラムの密度分析は、加齢コントロール前頭葉組織と比較して、ADにおいて有意に高いレベルの約39～45kD AD7c-NTPを示した(図2D)。さらに、約18～21kDのAD7c-NTP免疫反応性タンパク質の発現はまた、ADにおいて増加したが、研究は、これらの分子が、約39～45kD AD7c-NTPの切断産物を表すのか、または別のcDNAによりコードされる独自のタンパク質を表すのかをまだ決定していない。いくつかにおいて、初期ADと後期ADとの間の比較により、末期疾患を有する脳における、より高いレベルのAD7c-NTP免疫反応性が明らかとなった(図2E)。N3I4抗体を使用して、ウェスタンブロット分析により、死後のCSF

における約39～45kD AD7c-NTP分子の存在が検出され、そして加齢コントロールサンプルと比べて、ADにおいて、より高いレベルが検出された（図2F）。ポリクローナル抗体およびいくつかの脳特異的モノクローナル抗体を用いる免疫組織化学的染色研究により、AD脳およびコントロール脳のニューロン、ニューロピル線維、および白質線維において、AD7c-NTP免疫反応性を位置決めした。免疫組織化学的染色研究において、N2U6およびN2J1抗体は、AD脳のインタクトな皮質ニューロンならびに変性している皮質ニューロンおよび異栄養性神経突起において、強い免疫反応性を示したが、加齢コントロール脳においては、低いレベルかまたは免疫反応性を示さなかった（図4）。一次抗体の省略または組換えAD7c-NTPタンパク質を用いた一次抗体の前吸着あるいは無関係な一次抗体の適用（ネガティブコントロール）もまた、ネガティブな免疫染色の結果を生じた。脳の全ての切片が、グリ

10

ア線維性酸性タンパク質に対するモノクローナル抗体でのポジティブな免疫反応性を示した（ポジティブコントロール）。これらの研究は、インサイチュハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学的染色によって、加齢コントロール脳と比較して、ADにおいて上昇したレベルのAD7c-NTP発現、およびAD脳のニューロンに局在する異常なAD7c-NTP遺伝子発現を示した。2つの異なるmRNA転写物および少なくとも2つの異なるタンパク質種が、脳において検出されたが、AD7c-NTPに対応するmRNAおよびタンパク質のレベルはADにおいて増加した。本発明者らは、小さい方の転写物およびタンパク質種が異なるのか、またはあるいは単一遺伝子のスプライス形態を表すのかを未だ決定していない。cDNAは、単一のAD脳から単離したRNAを用いて調製したライブラリーから単離されたが、RT-PCR研究により、6つの異なるAD脳に同一配列の存在が確認された。AD7c-NTP cDNAは、ヒト臍臓タンパク質（Watanabe,T.ら、「Complete Nucleotide Repeat that is expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes」,Cell 72:971-983 (1993)）との有意な一次配列相同性を示さないで、ポリクローナル抗体とAD7c-NTP分子との交差反応性は、おそらく、立体エピトープにより生じる。AD7c-NTPの増加した発現が、組織学的にインタクトなニューロンおよび変性しているニューロンならびに細胞突起の両方において観察され、そして最近の研究は、AD7c-NTPタンパク質の発現が、AD神経変性において初期に生じることを示唆した。

20

実施例10 インビトロ薬物スクリーニングシステム

AD7c-NTPを、Lac-Switch発現ベクター（Stratgene）にクローニングし、CYZニューロン細胞を、この構築物で安定に形質転換した。IPTGでのタンパク質の発現誘導の後に、AD7c-NTPを種々のレベルで発現するいくつかの細胞株、LacA～LacFを選択した。実験を、AD7c-NTP発現のニューロン細胞に対する効果（例えば、形態の変化、遺伝子発現、生存率など）を決定し、これにより、ADの処置について可能性のある薬理学的因子をインビトロでスクリーニングするのに有用なマーカーを作製するために行った。

30

発現レベルを、Microtiter Immunocytochemical Elisa Assay (MICE) によって決定した。簡潔には、 10^4 細胞/ウェルを、96ウェルプレートに播種し、そして6～18時間の間、AD7c-NTPを発現するよう誘導した；さらに、いくつかの実験において、細胞を、同様の時間、毒素または保護剤に曝した。処置期間の終了時、細胞を固定し、透過化処理し、そしてABS手順に従って適切な抗体で免疫染色した。定量を、細胞を可溶性色原体（chromagen）と共にインキュベートし、反応を2M H_2SO_4 で停止させ、そして自動化ELISA読み取り機において色原体吸光度を決定することによって行った。クーマシーブルーでの染色後、免疫反応性（すなわち、結合型色原体）対クーマシーブルー吸光度の比を決定し（MICE単位）、そして結果をグラフにした。あるいは、免疫反応性はまた、沈澱した色原体（例えば、DAB、TruBlueまたはAEC）を用いて決定され得る。

40

細胞生存率を決定する実験のために、MICEアッセイのような培養および処置の後、培養培地を、クリスタルバイオレット/PBS/ホルマリン溶液と交換した。染色後、細胞を十分にリンスし、そしてPBS/1%SDS溶液で溶解した。そして、吸光度を、自動化ELSAリーダーを用いて決定した。結果を%生存率としてグラフにした。

結果：ニューロン細胞におけるAD7c-NTPの過剰発現は、遺伝子発現、細胞生存率、および毒素過感受性の変化を導く。

50

AD7c-NTPの発現は、AD（タウ、bA4アミロイド）、神経突起出芽（シナプトフィシン）およびアポトーシス（p53、SC95-Fas、NO-Tyr、NOS3）に関連した遺伝子の変化した発現を生じた（図7A～7Cおよび8A～8D）。図7A～7Cにおいて、AD7c-NTP誘導24時間後の発現の変化割合を、示された遺伝子について表示する。AD7c-NTP発現がない場合（図7A）、Lac Aコントロールである非発現細胞において、遺伝子発現の変化はほとんどもしくは全く観察されない。しかし、異なるレベルのAD7c-NTP（B6）を発現するように誘導されたLac B細胞（図7B）およびLac F細胞（図7C）を用いて行った同様な実験は、遺伝子発現の顕著な変化を示した。例えば、NOS3は、LacAコントロール細胞（図7A）よりLacB-B6実験（図7B）において、正常レベルのほとんど2倍のレベルで発現される。

図8A～8Dは、改変した遺伝子発現が、AD7c-NTP誘導のレベルに依存することを示す。NTP遺伝子（図8A）、シナプトフィシン（Synaptophysin）遺伝子（図8B）、タウ遺伝子（図8C）およびp53遺伝子（図8D）についての結果を、安定にトランスフェクトしたCYZニューロン細胞におけるAD7c-NTP発現のIPTG誘導の関数として、発現の変化の割合として表示する。LacB細胞（黒四角）およびLacF細胞（白丸）を、示された量のIPTG（1～5 mM）に24時間曝した。これらのデータは、増加した濃度のIPTGが、検査した全ての遺伝子のアップレギュレーションを導くことを示す。

2つのアッセイを使用して、CYZニューロン細胞中のAD7c-NTP発現の効果を評価した。代謝活性をMTTアッセイにより測定し（図9A）、そして細胞死をCV生存率アッセイにより測定した（図9B）。結果を、IPTG誘導の24時間後に、無処置の並行コントロール培養物と比較して、MTT活性または細胞生存率の変化割合として表した。6つの異なるクローンLacA～LacFを、IPTG誘導（B6）後にアッセイし、そしてAD7c-NTPを欠くLacAコントロール細胞と比較した。検査した6つ全てのクローンについて、AD7c-NTP発現の刺激は、コントロール細胞と比較して、実質的に減少した代謝活性を生じた（図9A）。細胞死は、LacB-B6細胞およびLacF細胞において誘導され、そして減少した細胞生存率が、LacA-B6クローンおよびLacE-B6クローンにおいて観察された。

AD7c-NTPを発現する細胞の減少した細胞生存率は、酸化ストレスによって悪化した。LacB細胞およびLacF細胞を、3 mM IPTG（B6）を用いて、24時間または48時間誘導し、そして酸化ストレスを増加させる毒素に6時間または24時間曝した場合（それぞれ、図10Aおよび10B）、細胞生存率は、LacAコントロールの非発現細胞と比較して、顕著に減少した。図10Aおよび10Bに示される結果は、より長くAD7c-NTP誘導した発現、ならびに過酸化水素（ H_2O_2 ）およびジエチルジチオカルバミン酸（DDC）へのより長い曝露の両方が、それぞれ、減少した細胞生存率および増加した過感受性を導くことを立証する。

減少した細胞生存率の理由を決定するために、安定にトランスフェクトした、AD7c-NTPを発現するCYZニューロン細胞におけるアポトーシスを定量的に測定する実験を行った；結果を図11に示す。 $^{32}dCTP$ の存在下で細胞をインキュベートして、細胞死のアポトーシス機構の特徴である、フラグメント化DNA中へのテンプレート非依存性の標識組込みを測定することによって、アポトーシスの程度を決定した。コントロール（非誘導、トランスフェクト細胞）と、3 mM誘導（B6によって示される）LacA細胞、LacB細胞、およびLacF細胞との比較により、AD7c-NTPの発現は、細胞性DNAへの $^{32}dCTP$ 標識の増加した取り込み（増加したアポトーシス）を導くことが明確に示される。IPTG誘導細胞株間での標識組込みの変動は、AD7c-NTP発現のレベルの差に起因する。

確立したインビトロシステムは、AD7c-NTP発現を通じて達成される変化、および表向きは、ADプロセスを調整または相殺する薬理学的因子をスクリーニングするための手段を提供する。AD7c-NTP発現は、一酸化窒素シンターゼのアップレギュレーションを導き、一酸化窒素シンターゼは、いくつかのニューロン細胞において酸素フリーラジカルの形成を引き起こす。図12に示された実験は、AD7c-NTP誘導された酸化ストレスが、薬理学的因子によって相殺され得ることを立証する。結果を、コントロールの非誘導細胞に対する、実験（AD7c-NTP誘導）についての、生存率の変化割合の比として表す。図12において、AD7c-NTPで安定にトランスフェクトされたCYZ細胞は、AD7c-NTPを発現するように誘導され、そして種々の薬理学的因子に曝されている。過酸化水素（ H_2O_2 ）およびジエチルジチオカルバ

10

20

30

40

50

ミン酸（DDC）は、細胞死を悪化させる一方、ピログルタメート（PG）（およびL-NAMEおよびL-アルギニン）のような薬剤は、AD7c-NTP発現に起因し得る一酸化窒素シンターゼ毒性を阻害するかまたは減少させる。

以上の説明から、当業者は、本発明の本質的な特徴を容易に確かめ、そして本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明の種々の変化および改変を為して、過度の実験を要することなく、種々の用法および条件に適合させ得る。本明細書中で引用した全ての特許、特許出願、および刊行物は、その全体が、参考として援用される。

配列表

(1) 一般的情報：

(i) 出願人：ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイション 10
フルート ストリート
ボストン，マサチューセッツ 02114
アメリカ合衆国

発明者：デ ラ モンテ，スザンヌ
ワズ，ジャック アール。

(ii) 発明の名称：アルツハイマー病の処置または予防のために効果的な薬物をスクリーニングするためのトランスジェニック動物および細胞株

(iii) 配列数：14

(iv) 連絡住所：

(A) 名称：スターン，ケセラー，ゴールドステイン アンド フォックス，ピー．エル 20
．エル．シー．

(B) 番地：ニューヨークアベニュー 1100，スイート600

(C) 市：ワシントン

(D) 州：ディ．シー．

(E) 国：アメリカ合衆国

(F) 郵便番号：20005-3934

(v) コンピューター読み出し形態：

(A) 媒体型：フロッピー ディスク

(B) コンピューター：IBM PC 互換用

(C) OS：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：パテントイン リリース #1.0，バージョン #1.30

(vi) 現在の出願データ：

(A) 出願番号：未定

(B) 出願日：同日

(C) 分類：

(vii) 先願データ：

(A) 出願番号：US 60/038,908

(B) 出願日：1997年2月26日

(viii) 代理人／事務所情報：

(A) 氏名：エスモンド，ロバート ダブリュ． 40

(B) 登録番号：32,893

(C) 照会／記録番号：0609.437PC01

(ix) 電話回線情報：

(A) 電話：202-371-2600

(B) テレファックス：202-371-2540

(2) 配列番号1の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：1442塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

TGC CCA AGC TGG TCT CCT GAG CTC AAG CAG TCC ACC TGC CTC AGC CTC 386
Cys Pro Ser Trp Ser Pro Glu Leu Lys Gln Ser Thr Cys Leu Ser Leu 30
110 115 120

CCA AAG TGC TGG GAT TAC AGG CGT GCA GCC GTG CCT GGC CTT TTT ATT	434	
Pro Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Gly Leu Phe Ile		
125 130 135 140		
TTA TTT TTT TTA AGA CAC AGG TGT CCC ACT CTT ACC CAG GAT GAA GTG	482	
Leu Phe Phe Leu Arg His Arg Cys Pro Thr Leu Thr Gln Asp Glu Val		
145 150 155		
CAG TGG TGT GAT CAC AGC TCA CTG CAG CCT TCA ACT CCT GAG ATC AAG	530	
Gln Trp Cys Asp His Ser Ser Leu Gln Pro Ser Thr Pro Glu Ile Lys		
160 165 170		
CAT CCT CCT GCC TCA GCC TCC CAA GTA GCT GGG ACC AAA GAC ATG CAC	578	10
His Pro Pro Ala Ser Ala Ser Gln Val Ala Gly Thr Lys Asp Met His		
175 180 185		
CAC TAC ACC TGG CTA ATT TTT ATT TTT ATT TTT AAT TTT TTG AGA CAG	626	
His Tyr Thr Trp Leu Ile Phe Ile Phe Ile Phe Asn Phe Leu Arg Gln		
190 195 200		
AGT CTC AAC TCT GTC ACC CAG GCT GGA GTG CAG TGG CGC AAT CTT GGC	674	
Ser Leu Asn Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Arg Asn Leu Gly		
205 210 215 220		
TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG TTC AAG TTA TTC TCC TGC CCC AGC	722	20
Ser Leu Gln Pro Leu Pro Pro Gly Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser		
225 230 235		
CTC CTG AGT AGC TGG GAC TAC AGG CGC CCA CCA CGC CTA GCT AAT TTT	770	
Leu Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe		
240 245 250		
TTT GTA TTT TTA GTA GAG ATG GGG TTC ACC ATG TTC GCC AGG TTG ATC	818	
Phe Val Phe Leu Val Glu Met Gly Phe Thr Met Phe Ala Arg Leu Ile		
255 260 265		
TTG ATC TCT GGA CCT TGT GAT CTG CCT GCC TCG GCC TCC CAA AGT GCT	866	30
Leu Ile Ser Gly Pro Cys Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Gln Ser Ala		
270 275 280		
GGG ATT ACA GGC GTG AGC CAC CAC GCC CGG CTT ATT TTT AAT TTT TGT	914	
Gly Ile Thr Gly Val Ser His His Ala Arg Leu Ile Phe Asn Phe Cys		
285 290 295 300		
TTG TTT GAA ATG GAA TCT CAC TCT GTT ACC CAG GCT GGA GTG CAA TGG	962	
Leu Phe Glu Met Glu Ser His Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp		
305 310 315		
CCA AAT CTC GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG CTC AAG CGA TTC	1010	40
Pro Asn Leu Gly Ser Leu Gln Pro Leu Pro Pro Gly Leu Lys Arg Phe		
320 325 330		
TCC TGT CTC AGC CTC CCA AGC AGC TGG GAT TAC GGG CAC CTG CCA CCA	1058	
Ser Cys Leu Ser Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Gly His Leu Pro Pro		
335 340 345		

CAC CCC GCT AAT TTT TGT ATT TTC ATT AGA GGC GGG GTT TCA CCA TAT	1106
His Pro Ala Asn Phe Cys Ile Phe Ile Arg Gly Gly Val Ser Pro Tyr	
350 355 360	
TTG TCA GGC TGG TCT CAA ACT CCT GAC CTC AGG TGACCCACCT GCCTCAGCCT	1159
Leu Ser Gly Trp Ser Gln Thr Pro Asp Leu Arg	
365 370 375	
TCCAAAGTGC TGGGATTACA GCGGTGAGCC ACCTCACCCA GCCGGCTAAT TTAGATAAAA	1219
AAATATGTAG CAATGGGGGG TCTTGCTATG TTGCCCAGGC TGGTCTCAAA CTTCTGGCTT	1279
CATGCAATCC TTCCAAATGA GCCACAACAC CCAGCCAGTC ACATTTTTTTA AACAGTTACA	1339
TCTTTATTTT AGTATACTAG AAAGTAATAC AATAAACATG TCAAACCTGC AAATTCAGTA	1399
GTAACAGAGT TCTTTTATAA CTTTTAAACA AAGCTTTAGA GCA	1442

(2) 配列番号 2 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 375 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列 : 配列番号 2 :

Met Glu Phe Ser Leu Leu Leu Pro Arg Leu Glu Cys Asn Gly Ala Ile	
1 5 10 15	
Ser Ala His Arg Asn Leu Arg Leu Pro Gly Ser Ser Asp Ser Pro Ala	
20 25 30	
Ser Ala Ser Pro Val Ala Gly Ile Thr Gly Met Cys Thr His Ala Arg	
35 40 45	
Leu Ile Leu Tyr Phe Phe Leu Val Glu Met Glu Phe Leu His Val Gly	
50 55 60	
Gln Ala Gly Leu Glu Leu Pro Thr Ser Asp Asp Pro Ser Val Ser Ala	
65 70 75 80	
Ser Gln Ser Ala Arg Tyr Arg Thr Gly His His Ala Arg Leu Cys Leu	
85 90 95	
Ala Asn Phe Cys Gly Arg Asn Arg Val Ser Leu Met Cys Pro Ser Trp	
100 105 110	
Ser Pro Glu Leu Lys Gln Ser Thr Cys Leu Ser Leu Pro Lys Cys Trp	
115 120 125	
Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Gly Leu Phe Ile Leu Phe Phe Leu	
130 135 140	
Arg His Arg Cys Pro Thr Leu Thr Gln Asp Glu Val Gln Trp Cys Asp	
145 150 155 160	

10

20

30

40

His Ser Ser Leu Gln Pro Ser Thr Pro Glu Ile Lys His Pro Pro Ala
 165 170 175
 Ser Ala Ser Gln Val Ala Gly Thr Lys Asp Met His His Tyr Thr Trp
 180 185 190
 Leu Ile Phe Ile Phe Ile Phe Asn Phe Leu Arg Gln Ser Leu Asn Ser
 195 200 205
 Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Arg Asn Leu Gly Ser Leu Gln Pro
 210 215 220
 Leu Pro Pro Gly Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser Leu Leu Ser Ser
 225 230 235 240
 Trp Asp Tyr Arg Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe Phe Val Phe Leu
 245 250 255
 Val Glu Met Gly Phe Thr Met Phe Ala Arg Leu Ile Leu Ile Ser Gly
 260 265 270
 Pro Cys Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Gln Ser Ala Gly Ile Thr Gly
 275 280 285
 Val Ser His His Ala Arg Leu Ile Phe Asn Phe Cys Leu Phe Glu Met
 290 295 300
 Glu Ser His Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Pro Asn Leu Gly
 305 310 315 320
 Ser Leu Gln Pro Leu Pro Pro Gly Leu Lys Arg Phe Ser Cys Leu Ser
 325 330 335
 Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Gly His Leu Pro Pro His Pro Ala Asn
 340 345 350
 Phe Cys Ile Phe Ile Arg Gly Gly Val Ser Pro Tyr Leu Ser Gly Trp
 355 360 365
 Ser Gln Thr Pro Asp Leu Arg
 370 375

10

20

30

(2) 配列番号 3 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1381塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー : 両形態

(ii) 配列の種類 : cDNA

(xi) 配列 : 配列番号 3 :

40

TTTTTTTTTT GAGATGGAGT TTTCGCTCTT GTTGCCCAGG CTGGAGTGCA ATGGCGCAAT	60	
CTCAGCTCAC CGCAACCTCC GCCTCCCGGG TTCAAGCGAT TCTCCTGCCT CAGCCTCCCC	120	
AGTAGCTGGG ATTACAGGCA TGTGCACCAC GCTCGGCTAA TTTTGTATTT TTTTITAGTA	180	
GAGATGGAGT TTAACCTCAT GTTGGTCAGG CTGGTCTCGA ACTCCCGACC TCAGATGATC	240	
TCCCGTCTCG GCCTGCCCAA AGTGCTGAGA TTACAGGCAT GAGCCACCAT GCGCGGCCTC	300	
TGCCTGGCTA ATTTTGTGG TAGAAACAGG GTTCACTGA TGTGCCCCAA GCTGGTCTCC	360	
TGAGCTCAAG CAGTCCACCT GCCTCAGCCT CCCAAAGTGC TGGGATTACA GCGTCAGCC	420	10
GTGCCTGGCC TTTTATTTTT ATTTTITTTA AGACACAGGT GTACCACTCT TACCCAGGAT	480	
GAAGTGAGT GGTGTGATCA CAGCTCACTG CAGCCTTCAA CTCCTGAGAT CAAGCAATCC	540	
TCCTGCCTCA GCCTCCCAAG TAGCTGGGAC CAAAGACATG CACCACTACA CCTGGTAATT	600	
TTTATTTTTA TTTTAAATTT TTTGAGACAG AGTCTCACTC TGTCACCCAG GCTGGAGTGC	660	
AGTGGCGCAA TCTTGGCTCA CTGCAACCTC TGCTCCCGG GTTCAAGTTA TTCTCCTGCC	720	
CCAGCCTCCT GAGTAGCTGG GACTACAGGC GCCCACCACG CCTAGCTAAT TTTTITGTAT	780	20
TTTTAGTAGA GATGGGGTTT CACCATGTTT GCCAGGTTGA TCTTGATCTC TTGACCTTGT	840	
GATCTGCCTG CCTCGGCCTA CCCAAAGTGC TGGGATTACA GGTCGTGACT CCACGCCGGC	900	
CTATTTTAA TTTTGTITG TTTGAAATGG AATCTCACTC TGTTACCCAG GTCGGAGTGC	960	
AATGGCAAAT CTCGGCTACT CGCAACCTCT GCCTCCCGGG TCAAGCGATT CTCCTGTCTC	1020	
AGCCTCCCAA GCAGCTGGGA TTACGGGACC TGCACCACAC CCGCTAATT TTTGTATTTT	1080	
CATTAGAGGC GGGTTTACCA TATTTGTCAG GCTGGGTCTC AAATCCTGA CCTCAGGTGA	1140	
CCCACCTGCC TCAGCCTTCC AAAGTGCTGG GATTACAGGC GTGAGCCACC TCACCCAGCC	1200	30
GGCTAATTTG GAATAAAAAA TATGTAGCAA TGGGGGTCTG CTATGTTGCC CAGGCTGGTC	1260	
TCAAACCTCT GGCTTCAGTC AATCCTTCCA AATGAGCCAC AACACCCAGC CAGTCACATT	1320	
TTTTAACAG TTACATCTTT ATTTTAGTAT ACTAGAAAGT AATACAATAA ACATGTCAAA	1380	
C	1381	

(2) 配列番号4の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 1418塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 両形態

(D) トポロジー: 両形態

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列: 配列番号4:

TTTTTTTTTT GAGATGGAGT TTTCGCTCTT GTTGCCCAGG CTGGAGTGCA ATGGCGCAAT	60	
CTCAGCTCAC CGCAACCTCC GCCTCCCGGG TTCAAGCGAT TCTCCTGCCT CAGCCTCCCC	120	
AGTAGGCTGG GATTACAGGC ATGTGCACCA CGCTCGGCTA ATTTTGTATT TTTTTTAGT	180	
AGAGATGGAG TTTCTCCATG TTGGTCAGGC TGGTCTCGAA CTCCGACCTC AGATGATCCT	240	
CCCGTCTCGG CCTCCCAAAG TGCTAGATAC AGGACTGAGC ACCATGCCCG GCCTCTGCCT	300	
GGCTAATTTT TGTGGTAGAA ACAGGGTTTC ACTGATGTGC CCAAGCTGGT CTCCTGAGCT	360	10
CAAGCAGTCC ACCTGCCTCA GCCTCCCAA GTGCTGGGAT TACAGGCGTG CAGCCGTGCC	420	
TGGCCTTTTT ATTTTATTTT TTTTAAGACA CAGGTGTCCC ACTCTTACCC AGGATGAAGT	480	
GCAGTGGTGT GATCACAGCT CACTGCAGCC TTCAACTCTG AGATCAAGCA TCCTCCTGCC	540	
TCAGCCTCCC AAAGTAGCTG GGACCAAAGA CATGCACCAC TACACCTGGC TAATTTTTAT	600	
TTTTATTTTT AATTTTTTGA GACAGAGTCT CAACTCTGTC ACCCAGGCTG GAGTGCAGTG	660	
GCGCAATCTT GGCTCACTGC AACCTCTGCC TCCCGGGTTC AAGTTATTCT CCTGCCCCAG	720	
CCTCCTGAGT AGCTGGGACT ACAGGCGCCC ACCACGCTA GCTAATTTTT TTGTATTTTT	780	20
AGTAGAGATG GGGTTTCACC ATGTTGCGCA GGTGTATGCT AGATCTCTTG ACCTTGTGAT	840	
CTGCCTGCCT CGGCCTCCCA AAGTGCTGGG ATTACAGGAC GTGACGCCCA CCGCCCGGCC	900	
TATTTTAAAT TTTTGTGTGT TTGAAATGGA ATCTCACTCT GTTACCCAGG CTGGAGTGCA	960	
ATGGCCAAAT CTCGGCTCAC TGCAACCTCT GCCTCCCGGG CTCAAGCGAT TCTCCTGTCT	1020	
CAGCCTCCCA AGCAGCTGGG ATTACGGGCA CCTGCACCAC ACCCGCTAA TTTTTGTATT	1080	
TTCATTAGAG GCGGGGTTTC ACCATATTTG TCAGGCTGGT CTCAAACCTC TGACCTCAGG	1140	30
TGACCCACCT GCCTCAGCCT TCCAAAGTGC TGGGATTACA GGCCTGACGC CTCACCCAGC	1200	
CGGCTAATTT AGATAAAAAA ATATGTAGCA ATGGGGGGTC TTGCTATGTT GCCCAGGCTG	1260	
GTCTCAAAC TCTGGCTTCA TGCAATCCTT CCAAATGAGC CACAACACCC AGCCAGTCAC	1320	
ATTTTAAAC AGTTACATCT TTATTTTAGT ATACTAGAAA GTGATACGAT AACATGGCGG	1380	
AACCTGCAAA TTCGAGTAGT ACAGAGTCTT TTATAACT	1418	

(2) 配列番号5の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 22塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列: 配列番号5:

TGTCCTCACTC TTACCCAGGA TG

22

(2) 配列番号6の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 24塩基対

(B) 型: 核酸

40

50

(C) 鎖の数：一本鎖	
(D) トポロジー：直鎖状	
(ii) 配列の種類：cDNA	
(xi) 配列：配列番号 6：	
AAGCAGGCAG ATCACAAGGT CCAG	24
(2) 配列番号 7 の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 長さ：20塩基対	
(B) 型：核酸	
(C) 鎖の数：一本鎖	10
(D) トポロジー：直鎖状	
(ii) 配列の種類：cDNA	
(xi) 配列：配列番号 7：	
AATGGATGAC GATATCGCTG	20
(2) 配列番号 8 の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 長さ：19塩基対	
(B) 型：核酸	
(C) 鎖の数：一本鎖	
(D) トポロジー：直鎖状	20
(ii) 配列の種類：cDNA	
(xi) 配列：配列番号 8：	
ATGAGGTAGT CTGTCAGGT	19
(2) 配列番号 9 の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 長さ：30塩基対	
(B) 型：核酸	
(C) 鎖の数：一本鎖	
(D) トポロジー：直鎖状	
(ii) 配列の種類：cDNA	30
(xi) 配列：配列番号 9：	
TTCAACCTGG GTAAGAGTGG GACACCTGTG	30
(2) 配列番号10の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 長さ：26塩基対	
(B) 型：核酸	
(C) 鎖の数：一本鎖	
(D) トポロジー：直鎖状	
(ii) 配列の種類：cDNA	
(xi) 配列：配列番号10：	40
TGGTGATGT CTTGGTCCC AGCTAC	26
(2) 配列番号11の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 長さ：30塩基対	
(B) 型：核酸	
(C) 鎖の数：一本鎖	
(D) トポロジー：直鎖状	
(ii) 配列の種類：cDNA	
(xi) 配列：配列番号11：	
ATCAACCTGG CGAACATGGT GAACCCCATC	30 50

(2) 配列番号12の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：14塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列：配列番号12：

CACTGCACTT NCCA

14 10

(2) 配列番号13の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：14塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列：配列番号13：

CCAGGTGTAG NCCA

14 20

(2) 配列番号14の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：14塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列：配列番号14：

CAAGGTCCAG NCCA

14

出願人または代理人のファイル参照番号
0609.437PC01

国際出願番号
PCT/US98/03685

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13規則の2)

A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

5 頁、

11 行、

B. 寄託物の表示

その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 ☐

寄託機関の名称

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

寄託機関の住所（郵便番号および国を含む）

パークローン ドライブ 12301

ロックビル, メリーランド 20852

アメリカ合衆国

寄託日

1993年5月16日

受託番号

69262

C. 追加の表示（なければ空白のまま）

この情報は追付の用紙に続く ☐

Escherichia coli:AD10-7-DH1

D. 表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

E. 別に添付する表示物（なければ空白のまま）

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「受託番号」の特定）

受理官庁記入欄

国際事務局記入欄

☐ この用紙は国際出願とともに受理された

☐ この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された

認定官

認定官

1 tttttttttttgag ATG GAG TTT TGG CTC TTG TGG CCC AGG CTG GAG TGC AAT GGC GCA ATC 62
 1 M E F S L L L P R L E C N G A I 16
 63 TCA GCT CAC CGC AAC CTC GGC CTC CGG GGT TCA AGC GAT TCT CCT GCC TCA GCC TCC CCA 122
 17 S A H R N L R L P G S S D S P A S A S P 36
 123 GTA GCT GGG ATT ACA GGC ATG TGC ACC CAC GCT CGG CTA ATT TTG TAT TTT TTT TTA GTA 182
 37 V A G I T G M C T H A R L I L Y F F L V 56
 183 GAG ATG GAG TTT CTC CAT GTT GGT CAG GCT GGT CTC GAA CTC CGG ACC TCA GAT GAT CCC 242
 57 E M E F L H V G Q A G L E L P T S D D P 76
 243 TCC GTC TGG GGC TCC CAA AGT GCT ACA TAC AGG ACT GGC CAC CAT GCC GGG CTC TGC CTG 302
 77 S V S A S Q S A R Y R T G H A R L C L 96
 303 GCT AAT TTT TGT GGT AGA AAC AGG GTT TCA CTG ATG TGC CCA AGC TGG TCT CCT GAG CTC 362
 97 A N F C G R N R V S L M C P S W S P E L 116
 363 AAG CAG TCC ACC TGC CTC AGC CTC CCA AAG TGC TGG GAT TAC AGG GCT CCA GCC GTG CCT 422
 117 K Q S T C L S L P K C W D Y R R A A V P 136
 423 GGC CTT TTT ATT TTA TTT TTA AGA CAC AGG TGT CCC ACT CTT ACC CAG GAT GAA GTG 482
 137 G L F I L F L R H R C P T L T Q D E V 156

FIG. 1A

483 CAG TGG TGT GAT CAC AGC TCA CTG CAG CCT TCA ACT CCT GAG ATC AGC CAT GCT CCT GGC 542
 157 Q W C D H S S L Q P S T P E I K H P P A 176
 543 TCA GGC TCC CAA GTA GCT GGG ACC AAA CAC ATG CAC CAC TAC ACC TGG CTA ATT TTT ATT 602
 177 S A S Q V A G T K D M H Y T W L I F I 196
 603 TTT ATT TTT AAT TTT TTG AGA CAG AGT CTC AAC TCT GTC ACC CAG GCT GGA GTG CAG TGG 662
 197 F I F N F L R Q S L N S V T Q A G V Q W 216
 663 CCC AAT CTT GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT GGC GGG TTC AGG TTA TTC TCC TCC CCC AGC 722
 217 R N L G S L Q P L P P G F K L F S C P S 236
 723 CTC CTG AGT ACC TGG CAG TAC AGC GGC CCA GCA GGC CTA GCT AAT TTT TTT GTA TTT TTA 782
 237 L L S S W D Y R R P P R L A N F F V F L 256
 783 GTA CAG ATG GGG TTC ACC ATG TTC GGC AGG TTG AIC TTG AIC TCT GGA CCT TGT GAT CTG 842
 257 V E M G F T M F A R L I L I S G P C D L 276
 843 CCT GGC TGG CCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA GGC GTG AGC CAC CAC GGC CGG CTT ATT 902
 277 P A S A S Q S A G I T G V S H A R L I 296
 903 TTT AAT TTT TGT TTG TTT GAA ATG GAA TCT CAC TCT ACC CAG GCT GGA GTG CAA TGG 962
 297 F N F C L F E M E S H S V T Q A G V Q W 316

FIG. 1B

963 CCA AAT CTC GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG CTC AAG CCA TTC TCC TGT CTC AGC 1022
 317 P N L G S L Q P L P P G L K R F S C L S 336
 1023 CTC CCA AGC AGC TGG GAT TAC GGC CAC CTG CCA CAC CCC GCT AAT TTT TGT ATT TTC 1082
 337 L P S S W D Y G H L P P H P A N F C I F 356
 1083 ATT AGA GGC GGG GTT TCA CCA TAT TTG TCA GGC TGG TCT CAA ACT CCT GAC CTC AGG Tgac 1143
 357 I R G G V S P Y L S G W S Q T P D L R 375
 1144 ccacctgcctcagccttcccaagtgctgggalltacaggcgtggccacccctcccccgcggcgaattttagatgataaataat 1223
 1224 atglogcaatgggggggtctgctatgtgcccaggctgggtctcaactcttgccctcctgcaatccttcccaatggagcca 1303
 1304 caaccaccagcgcgtcaaatcttttttaaacagttacatctcttattttagtatctacgagaaglaatacaatlaaacatgcca 1383
 1384 acctgcaallcagtaglaacagcggtctcttlltataaacttttlaaaccaagctttagggcca 1442

FIG. 1C

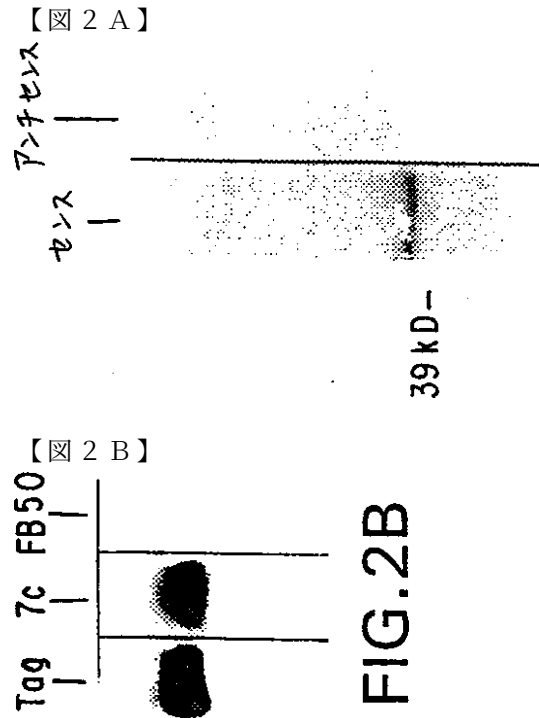
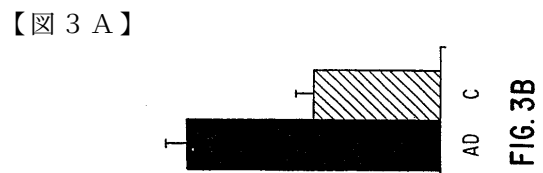
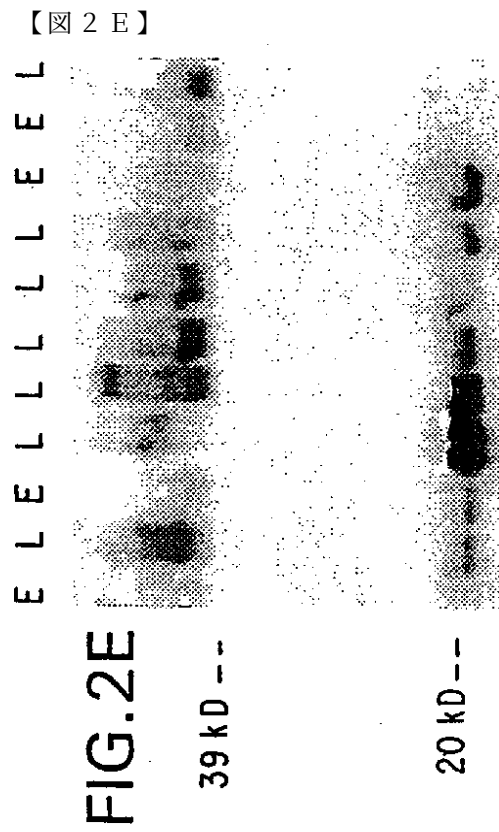
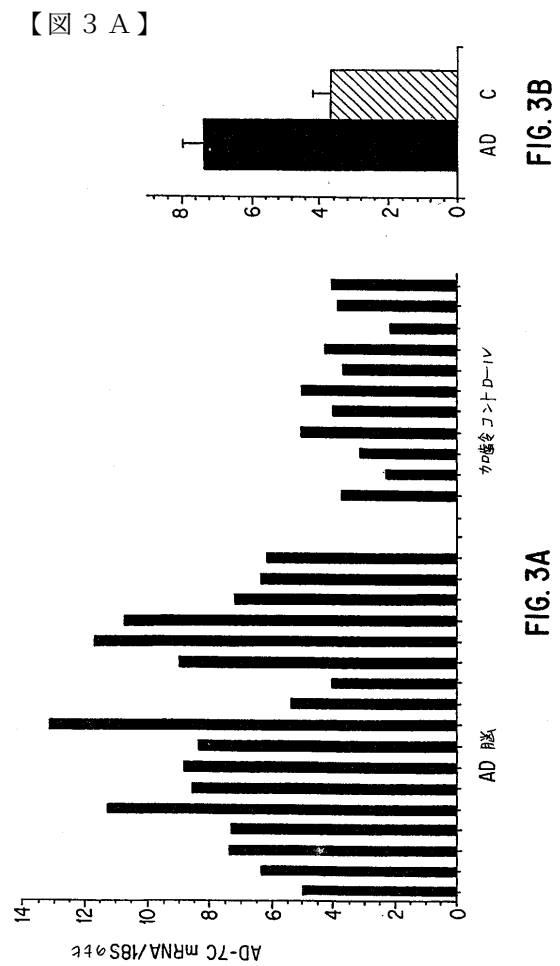
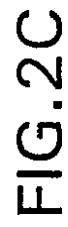
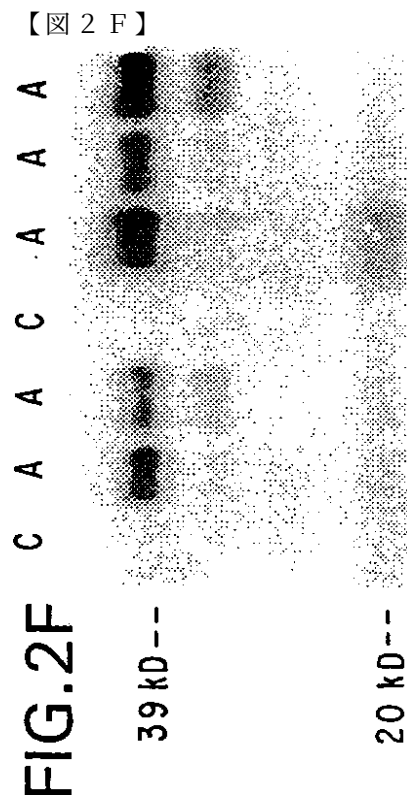


FIG. 2B

FIG. 2A



【図 3 B】

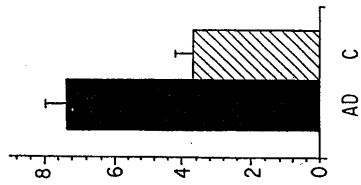


FIG. 3B

【図 3 C】

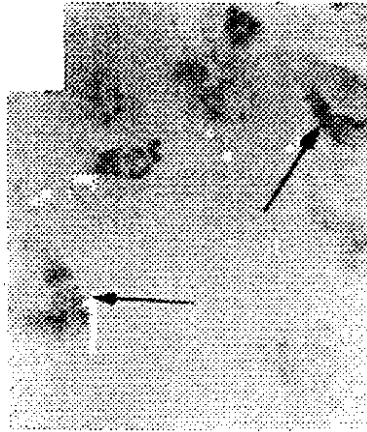


FIG.3C

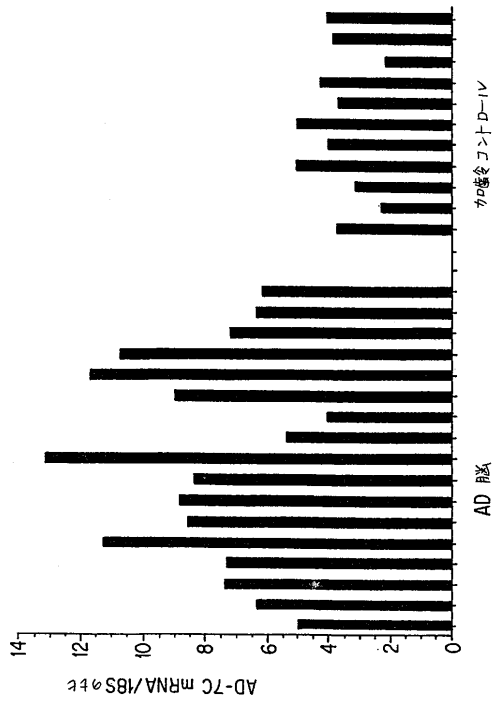


FIG. 3A

【図 3 D】

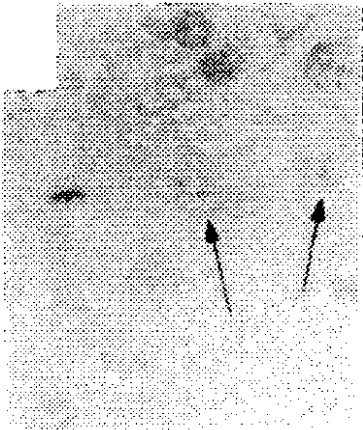


FIG.3D

【図 3 E】



FIG.3E

【図 3 F】



FIG.3F

【図 4 A】

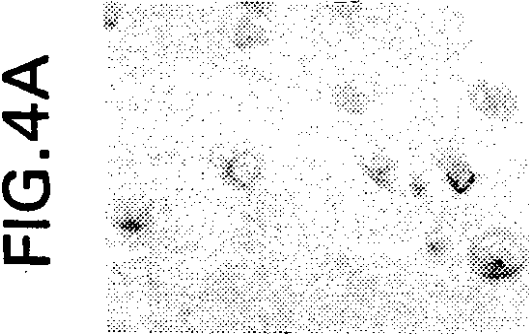


FIG.4A

【図 4 D】



FIG.4D

【図 4 E】

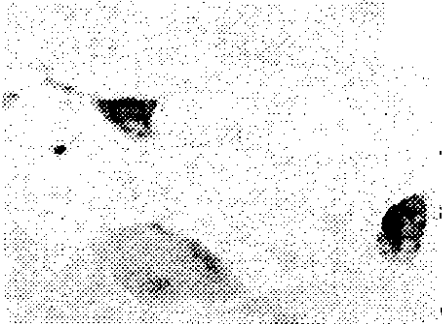


FIG.4E

【図 4 B】

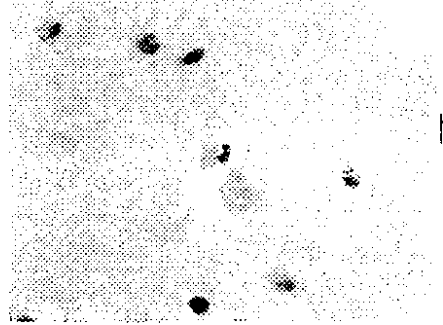


FIG.4B

【図 4 C】

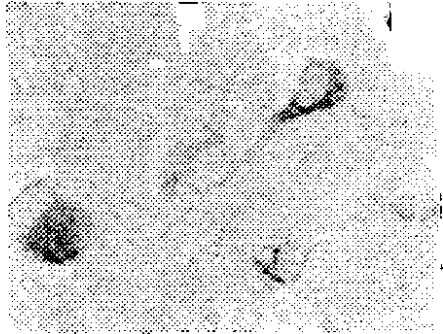


FIG.4C

【図 4 F】

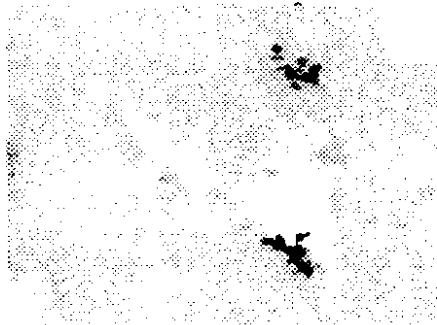


FIG.4F

【図 4 G】

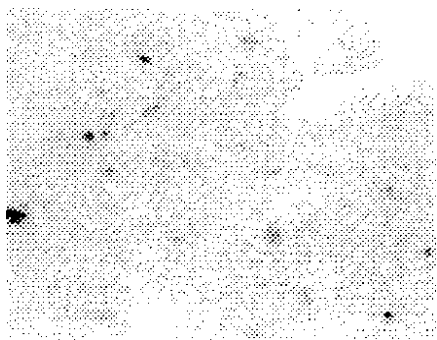


FIG.4G

【図 4 H】

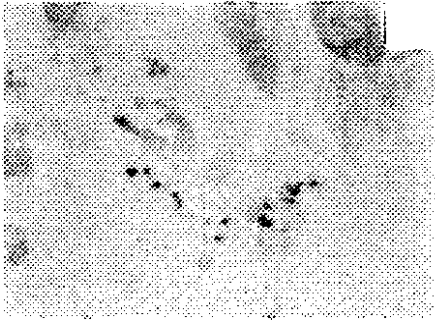


FIG. 4H

【図 5 B】

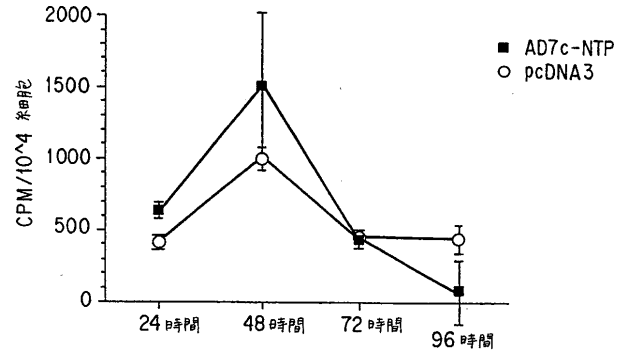


FIG. 5B

【図 5 A】

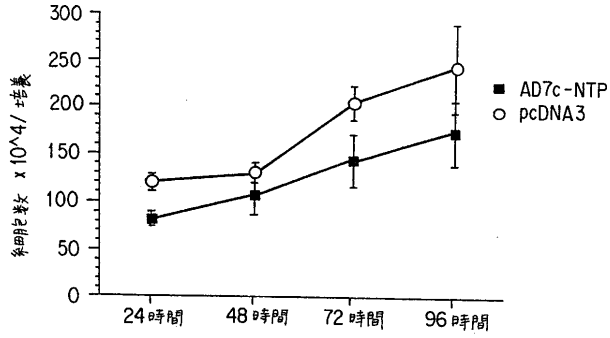


FIG. 5A

【図 6 A】

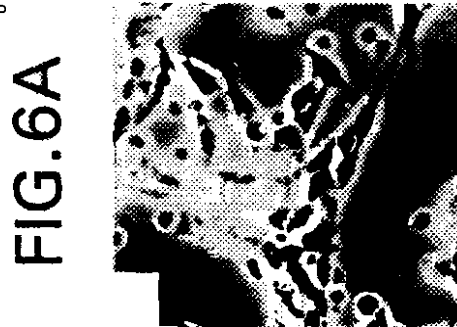


FIG. 6A

【図 6 B】

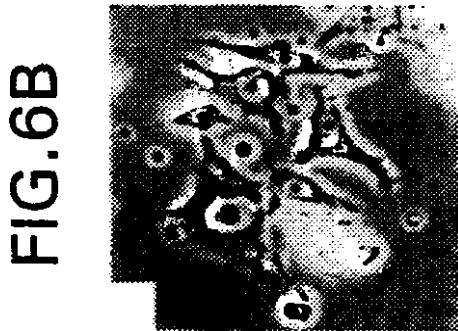


FIG. 6B

【図 6 D】

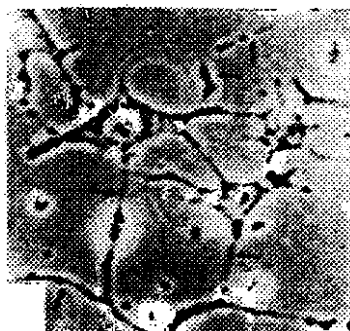


FIG. 6D

【図 6 C】



FIG. 6C

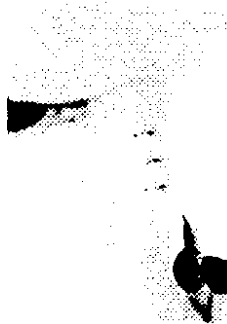
【図 6 E】

FIG. 6E



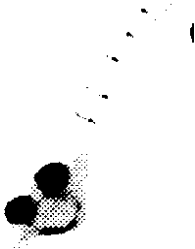
【図 6 F】

FIG. 6F



【図 6 G】

FIG. 6G



【図 7 A】

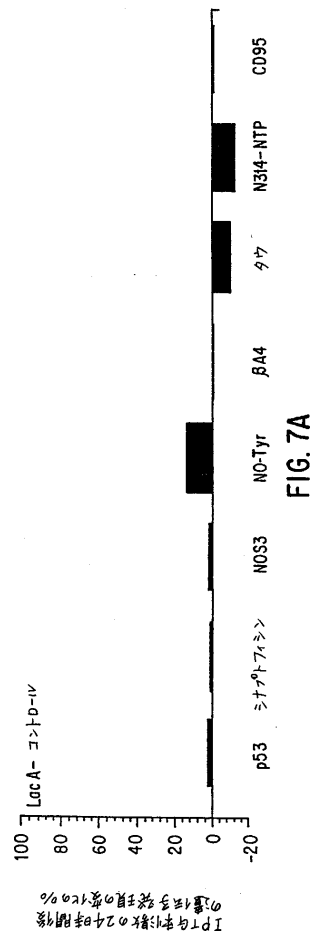
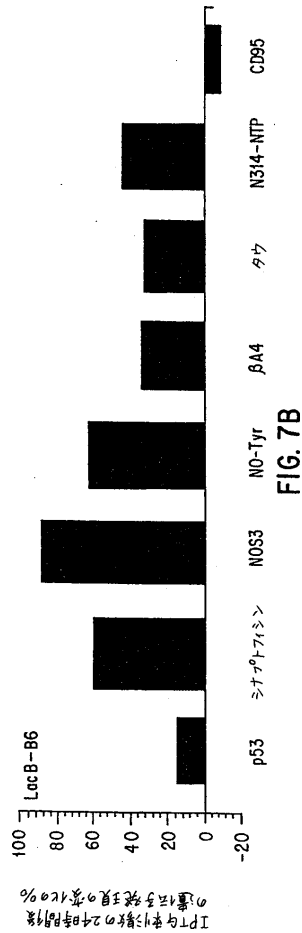
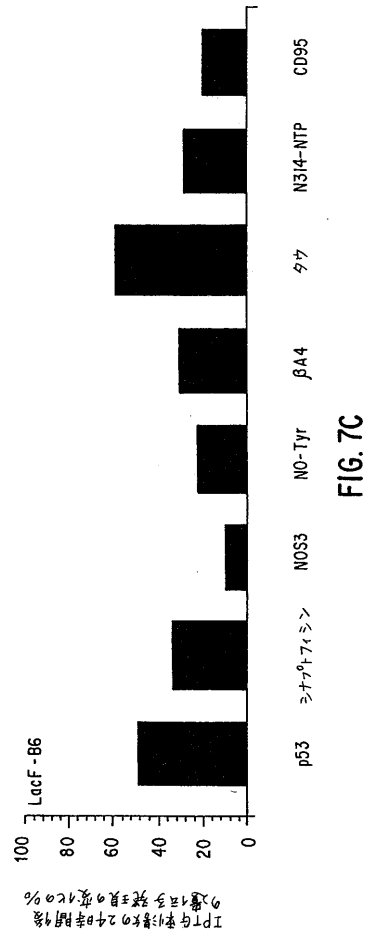


FIG. 7A

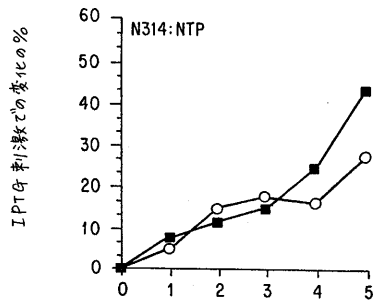
【図 7 B】



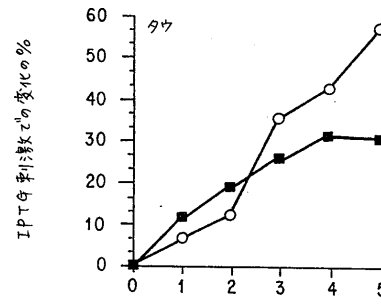
【図 7 C】



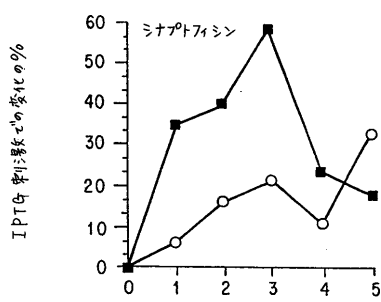
【図 8 A】



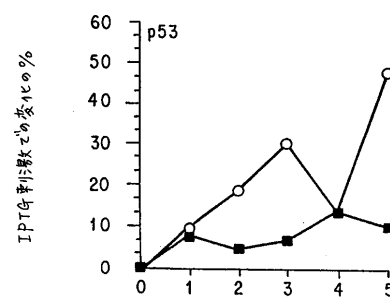
【図 8 C】

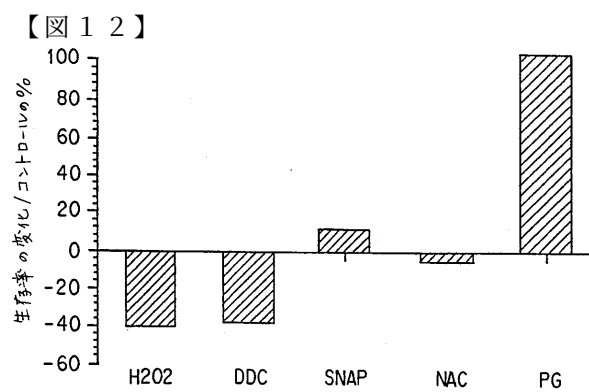
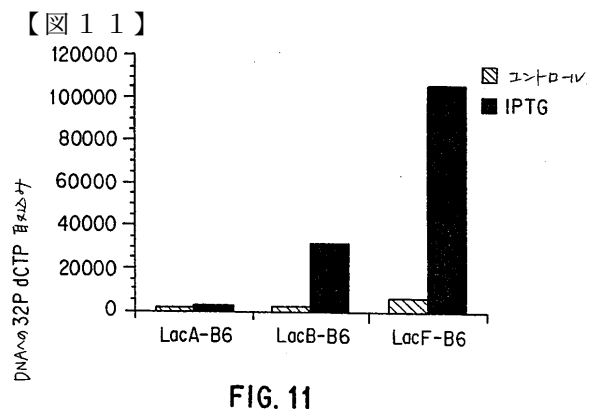
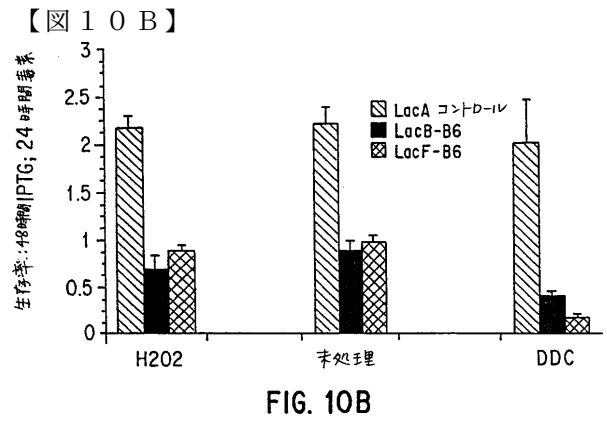
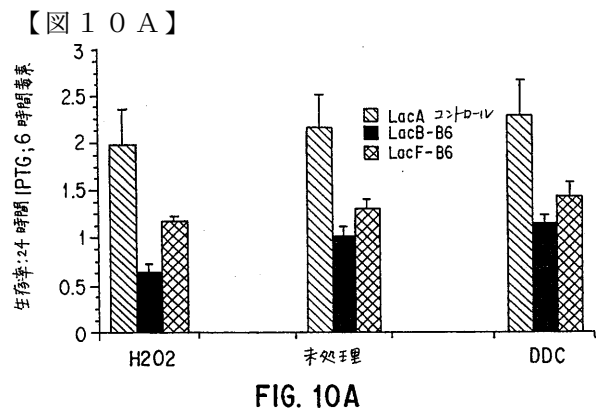
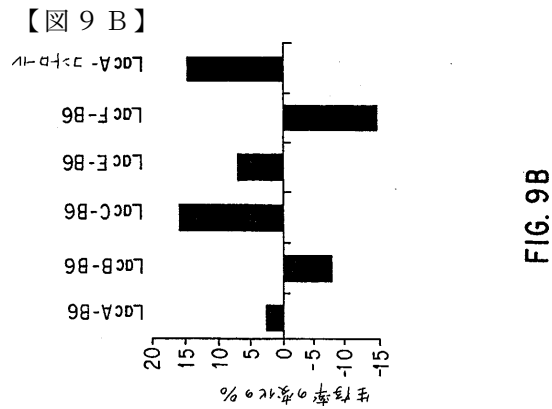
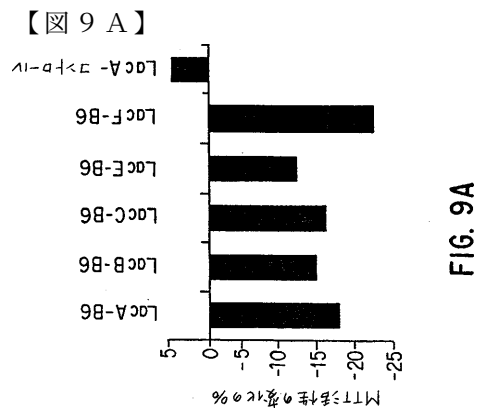


【図 8 B】



【図 8 D】





フロントページの続き

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

微生物の受託番号 ATCC ATCC 69261
微生物の受託番号 ATCC ATCC 69262
微生物の受託番号 ATCC ATCC 69263
微生物の受託番号 ATCC ATCC 69264
微生物の受託番号 ATCC ATCC 69265

(72)発明者 デ ラ モンテ, スザンヌ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ミドルセックス ストリート
4 2

(72)発明者 ワンズ, ジャック アール.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 6 8, ワバン, バリック ロード 2 1 0

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 国際公開第9 6 / 0 1 5 2 7 2 (WO, A 1)
特表平0 8 - 5 0 9 8 0 8 (J P, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C12N 15/00
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)