

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-531241

(P2004-531241A)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004.10.14)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 25/14	4 C O 8 4
A 6 1 P 25/14	C O 7 K 16/18	4 C O 8 7
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 197 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2002-571545 (P2002-571545)
 (86) (22) 出願日 平成14年3月5日 (2002.3.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年9月4日 (2003.9.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/003241
 (87) 国際公開番号 W02002/072632
 (87) 国際公開日 平成14年9月19日 (2002.9.19)
 (31) 優先権主張番号 60/272,757
 (32) 優先日 平成13年3月5日 (2001.3.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

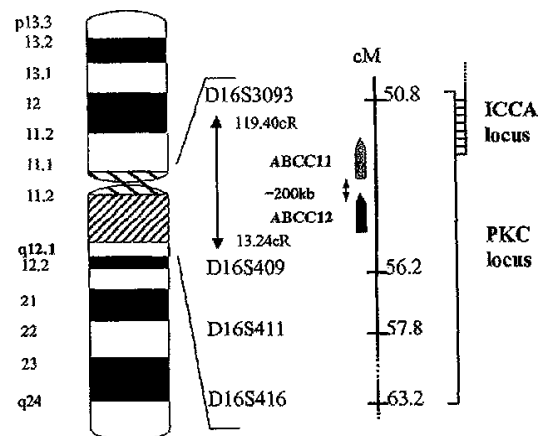
(71) 出願人 598006222
 アベンティス・ファーマ・ソシエテ・アノ
 ニム
 フランス国92160アントニー・アヴェ
 ニュー・レモン・アロン20
 (71) 出願人 503323774
 ザ・ガバメント・オブ・ザ・ユナイテッド
 ・ステイツ・オブ・アメリカ
 アメリカ合衆国ワシントン・ディー・シー
 20201. インディペンデンスアベニュー
 200. ユー・エス・デパートメント・
 オブ・ヘルス・アンド・ヒューマン・サー
 ビシーズ
 (74) 代理人 100091731
 弁理士 高木 千嘉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトABCC11遺伝子の核酸、このような核酸を含むベクター、およびこれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、ABCC11遺伝子の様々なエクソンに対応する核酸、ならびに新規な完全長のABCC11タンパク質をコードするcDNAに関する。本発明は、ABCC11遺伝子中またはABCC11遺伝子の対立遺伝子によって産生される対応するタンパク質中の一般に多型、特に突然変異を検出するための手段にも関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

【請求項 2】

配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも 8 個の連続したヌクレオチドを含む単離された核酸。

【請求項 3】

配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、少なくとも 80 % のヌクレオチドが同一である単離された核酸。

10

【請求項 4】

核酸が、配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、85 %、90 %、95 %、または 98 % のヌクレオチドが同一である、請求項 3 に記載の単離された核酸。

【請求項 5】

配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、厳密性の高い条件下でハイブリッドを形成する単離された核酸。

【請求項 6】

配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つにおいて示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

20

【請求項 7】

配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含む、A B C C 1 1 遺伝子に特異的なヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマー。

【請求項 8】

配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む、A B C C 1 1 遺伝子に特異的なヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマー。

【請求項 9】

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

30

b) 増幅した核酸領域を検出すること

を含む請求項 1 に記載の核酸の領域を増幅する方法。

【請求項 10】

2 つのヌクレオチド・プライマーが、

a) 配列番号 1 ~ 29 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列または相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含むヌクレオチド・プライマー、

b) 請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載のヌクレオチド・プライマー、

40

c) 配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的な配列を有する核酸を含むヌクレオチド・プライマー

からなる群から選択される請求項 1 に記載の核酸の領域を増幅する方法。

【請求項 11】

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

b) 増幅反応に必要な試薬

とを含む請求項 1 に記載の核酸を増幅するためのキット。

【請求項 12】

2 つのヌクレオチド・プライマーが、

50

a) 配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列または相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含むヌクレオチド・プライマー、
b) 請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載のヌクレオチド・プライマー、
c) 配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的な配列を有する核酸を含むヌクレオチド・プライマー
からなる群から選択される請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

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

【請求項 14】

a) 1) 配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含むヌクレオチド・プローブ、
2) 請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載のヌクレオチド・プライマー、
3) 配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含むヌクレオチド・プローブ
からなる群から選択されるヌクレオチド・プローブと核酸を接触させること、および
b) 核酸とプローブで形成される複合体を検出すること
を含む請求項 1 に記載の核酸を検出する方法。

【請求項 15】

プローブが担体上に固定されている、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

a) 1) 配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列または相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含むヌクレオチド・プローブ、
2) 請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載のヌクレオチド・プライマー、
3) 配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含むヌクレオチド・プローブ
からなる群から選択されるヌクレオチド・プローブと、場合により、
b) ハイブリダイゼーション反応に必要な試薬
を含む請求項 1 に記載の核酸を検出するためのキット。

【請求項 17】

プローブが担体上に固定されている、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 18】

請求項 1 に記載の核酸を含む組換えベクター。

【請求項 19】

ベクターがアデノウイルスである、請求項 18 に記載のベクター。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の組換えベクターを含む組換え宿主細胞。

【請求項 21】

請求項 1 に記載の核酸を含む組換え宿主細胞。

【請求項 22】

配列番号 31 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離された核酸。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の核酸を含む組換えベクター。

【請求項 24】

請求項 22 に記載の核酸を含む組換え宿主細胞。

【請求項 25】

請求項 23 に記載の組換えベクターを含む組換え宿主細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 26】

- a) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、
- b) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含むポリペプチド断片またはポリペプチド変異体、および
- c) 配列番号 30 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに相同的なポリペプチドからなる群から選択される単離されたポリペプチド。

【請求項 27】

請求項 26 に記載の単離されたポリペプチドに対する抗体。

【請求項 28】

抗体が検出可能な化合物を含む、請求項 27 に記載の抗体。

10

【請求項 29】

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

【請求項 30】

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

【請求項 31】

請求項 1 に記載の核酸と、生理的に適合する賦形剤とを含む薬剤組成物。

20

【請求項 32】

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

【請求項 33】

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

【請求項 34】

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

【請求項 35】

発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った患者の予防用 / または治療用薬剤を製造するための、配列番号 31 のアミノ酸配列を含む単離された A B C C 1 1 ポリペプチドの使用。

30

【請求項 36】

配列番号 31 のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、生理的に適合する賦形剤とを含む薬剤組成物。

【請求項 37】

発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼの予防用または治療用の活性成分をスクリーニングするための、配列番号 31 のアミノ酸配列を含む単離された A B C C 1 1 ポリペプチドの使用。

【請求項 38】

発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼの予防用または治療用の活性成分をスクリーニングするための、配列番号 31 のアミノ酸配列を含む A B C C 1 1 ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の使用。

40

【請求項 39】

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

50

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

【請求項40】

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

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

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

d)細胞からの標識陰イオンの流出量を測定すること、および

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

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

【請求項41】

請求項24または25に記載の組換え宿主細胞を含む移植片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、A B C C 1 1遺伝子に対応する新規な核酸、および新規なA B C C 1 1タンパク質をコードするcDNAに関する。本発明は、A B C C 1 1遺伝子における、またはA B C C 1 1遺伝子の対立遺伝子形(allelic forms)によって産生される対応するタンパク質における一般には多型を、とりわけ突然変異を検出するための手段にも関する。

【背景技術】

【0002】

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

【0003】

プロトタイプのA B Cタンパク質はA T Pと結合し、A T Pの加水分解エネルギーを使用して様々な分子の細胞膜を通る輸送を駆動している。真核生物に由来するほとんどのA B C機能性タンパク質は、完全輸送体(full-transporter)をコードしており、それぞれが2つのA T P結合領域(ヌクレオチド結合性フィールド、N B F)およ

10

20

30

40

50

び2つの膜貫通(TM)領域からなっている。完全な輸送体のほとんどは、TM-NBF-TM-NBFの形で配列している(Dean等、Curr Opin Genet、1995、5、79~785)。

【0004】

ATP結合領域のアミノ酸配列を解析することによって、ABC遺伝子をサブファミリーに分類できるようになった(Allikmetts等、Hum Mol Genet、1996、5、1649~1655)。現在、最近のHUGOの分類によれば、ヒトゲノムではABC AからABC Gと命名された7つのABC遺伝子サブファミリー、すなわち、ABCA(ABC1サブファミリー)、ABCB(MDR/TAPサブファミリー)、ABCC(CFTR/MRPサブファミリー)、ABCD(ALDサブファミリー)、ABCE(OABPサブファミリー)、ABCF(GCN20サブファミリー)、およびABCG(白色(white)サブファミリー)が記載されている。これらのサブファミリーの大多数は、膜貫通領域の配列中にかなり保存されていることも示す、類似の遺伝子構成(gene organization)を有する遺伝子を含む。しかし、ABCタンパク質は極めて多様な物質を輸送し、いくつかの異なるサブファミリーのメンバー同士が、同じサブファミリー内のタンパク質同士よりも基質の認識において高い類似性を互いに有することが示された。このサブファミリーのうち5つは、酵母のゲノム中にもあることから、これらのグループが真核生物の進化の初期に存在し、維持されてきたことがわかる(Decotignies等、Nat Genet、1997、137~45; Michaelis等、1995、Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

10

20

【0005】

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

【0006】

ヒトABCCサブファミリーは、現在、同定された10種のメンバー(ABCC1~10)を有し、このうち7種は多剤耐性様(multidrug resistance-like)(MRP)サブグループに由来し、2種はスルホニル尿素受容体(SUR)サブグループに由来し、1種はCFTR遺伝子である。MRP様タンパク質は、有機陰イオン輸送体である。すなわち、MRP様タンパク質は、例えばメトトレキサート(MTX)などの陰イオン性薬物、ならびにグルタチオン(GSH)、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドと結合する中性薬物を輸送し、ヌクレオシド・アナログに対する耐性にある役割を果たしている(Cui等、Mol Pharmacol、1999、55、929~37; Kool等、Proc Natl Acad Sci、1999、96、6914~9; Schuetz等、Nat Med、1999、5、1048~51; Wijnholds等、Proc Natl Acad Sci、2000、97、7476~81)。より具体的には、ABCC1、ABCC2、およびABCC3は、GSH、グルクロナート、サルフェート、およびMTXなど他の有機陰イオンに結合する薬物を輸送し、一方、ABCC4およびABCC5タンパク質は、PMEAを含めたヌクレオチド・アナログおよびプリン塩基アナログに対する耐性を付与する。いくつかのABCCサブファミリー・メンバーにおけるいくつかの遺伝的変異は、ヒトの様々な遺伝病に関連することが確認された。例えば、嚢胞性線維症は、ABCC7遺伝子、すなわちCFTR(嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子)遺伝子の突然変異によって引き起こされる(Riordan等、Science、1989、245、1066~73)。ABCCサブファミリーの別のメンバーであるABCC2遺伝子は、デュビン・ジョンソン症候群に関連が

30

40

50

ある (Wada 等、Hum Mol Genet、1998、7、203~7)。また、最近、ABCC サブファミリーに属する別の遺伝子である ABCC6 遺伝子のコード配列における突然変異が、結合組織の遺伝的障害である弾力線維性仮性黄色腫の表現型の原因であることが確認された (Berggen 等、Nat. Genet.、2000、25、228~31; Le Saux 等、Nat Genet、2000、25、223~7)。同様に、スルホニル尿素受容体である ABCC8 すなわち SUR1 は、乳児期の家族性持続性高インシュリン性低血糖症 (familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia) に関与していると考えられる (Thomas 等、Science、1995、268、426~9)。

したがって、ABCC サブファミリーに由来する新しい遺伝子の特徴を決定することによって、トランスロカーゼ活性を有し、ヒトの病理に主要な役割を果たし得る生物学的に重要な輸送体が得られる可能性がある。

10

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0007】**

本出願人は、ABCC タンパク質サブファミリーに属し、ABCC11 と命名された新規な遺伝子を発見しその特徴を明らかにした。また、この新たに発見した遺伝子は、アミノ酸配列、特に膜貫通領域 (TM) および ATP 結合領域 (NBD) 内のアミノ酸配列がかなり保存されており、類似の遺伝子構成を有する。特に、この遺伝子は、ABCC5、ABCC2、および ABCC3 など他の ABCC サブファミリー・メンバーに、具体的には ATP 結合ドメインにおいて、より具体的には C 末端 ATP 結合ドメインにおいて密接に関係していると思われる。ABCC11 タンパク質は、ABCC4 および ABCC5 と同様、他のよく知られたサブグループのメンバーである ABCC1 (MRP1) よりも小さく、余分の N 末端ドメインを欠いていると考えられるが (Borst 等、J Natl Cancer Inst、2000、92、1295~302)、これは輸送機能には不要である (Bakos 等、J. Biol. Chem、1998、273、32167~75)。構造的に類似した ABC タンパク質は、膜を通して類似した物質を輸送することが多いので、ABCC11 タンパク質が ABCC4 遺伝子および / または ABCC5 遺伝子と機能的類似性、すなわち、PMEA などのヌクレオチド・アナログおよびプリン塩基アナログに対する耐性を有すると考えることは理に適っている (Schuetz 等、Nat Med、1999、5、1048~51; Wijnholds 等、Proc Natl Acad Sci、2000、97、7476~81)。

20

30

【0008】

また、本出願人は、新規な遺伝子 ABCC11 を、ヒト 16 番染色体の 16q12 遺伝子座にある領域に位置づけた。この領域は、発作性運動誘発性ジスキネジー (paroxysmal kinesigenic dyskinesia) (PKD)、すなわち発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼ (PKC) (Tomita 等、Am J Hum Genet、1999、65、1688~97; Bennet 等、Neurology、2000、54、125~130)、および発作性舞蹈アテトーゼを伴う乳児けいれん、すなわち ICCA 症候群 (Lee 等、1998、Human Genet、103、608~612) と一般に称される 2 つの遺伝的病理と統計上関連している領域である。これらの結果は、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼおよび / または発作性舞蹈アテトーゼを伴う乳児けいれんなどの発作性障害に対しヒト 16 番染色体上の候補位置に ABCC11 があるという仮説を支持するものである。

40

【0009】

発作性ジスキネジーの中で最も多いタイプである発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼ (PKC) は、突然の随意運動、ストレス、または興奮によって誘発される、舞蹈病および筋緊張異常を含めた反復性で頻繁な不随意運動および不随意姿勢の発作によって特徴づけられる障害である (Swoboda 等、Neurology、2000、55、224~30)。その発症は小児期または青年期初期であり、その頻度と重症度は年齢とともに減弱し

50

、抗けいれん薬を用いた治療が効く。PKCは、家族性で散発的に起こり、女性よりも男性で多く発症する。これは、大部分の家族において、不完全浸透度の常染色体優性形質として遺伝する。この遺伝子座は、ヒト染色体16q11~q12に位置づけられている(Tomita等(1999)Am. J. Hum. Genet. 65、1588~1697; Bennett等(2000)Neurology 54、125~130)。

【0010】

重複する遺伝子座は、発作性舞蹈アテトーゼを伴う乳児けいれん(ICCA)の遺伝子を含むと予想されている(Leet等(1998)Hum. Genet. 103、608~612)。ICCA症候群は、ヒト16番染色体の動原体周囲領域に関連する神経性の症候群であり、自発的に起こるか様々な刺激によって誘発される不随意運動障害および発作を特徴とする。

10

さらに、本出願人は、ABCC11遺伝子の発現パターンをPCRおよびESTデータベース・マイニングによって決定した。それによれば、ABCC11遺伝子は、PKCの病因に関わっている可能性があるCNSや筋肉などの組織中で発現することが示唆される。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、システニル・ロイコトリエンなどの有機陰イオン輸送体、メトトレキサートなどの陰イオン性薬物、ならびにグルタチオン(GSH)、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合する中性薬物の輸送に、あるいはその染色体候補領域が16番染色体、より正確には16q腕、さらに正確には発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに対する16q12遺伝子座に位置する病理に関与している可能性が高いヒトABCC11遺伝子の核酸に関する。

20

したがって、本発明の第1の主題は、配列番号1~30のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸である。

本発明は、配列番号1~30のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも8個の連続したヌクレオチドを含む核酸にも関する。

本発明は、配列番号1~30のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、少なくとも80%のヌクレオチドが同一である核酸にも関する。

30

本発明は、配列番号1~30のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは98%のヌクレオチドが同一である核酸にも関する。

本発明は、配列番号1~30のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列と、厳密性の高い条件下でハイブリッド形成する核酸にも関する。

【0012】

本発明は、完全長ヒトABCC11タンパク質をコードする核酸、特にcDNA分子にも関する。したがって、本発明は、配列番号1のヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸に関する。

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

40

本発明によれば、配列番号31のアミノ酸配列を含む1382アミノ酸の完全長ABCC11ポリペプチドをコードする配列番号1のヌクレオチド配列を含む核酸が見出された。したがって、本発明は、配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸にも関する。

したがって、本発明は、配列番号30のアミノ酸配列を含むポリペプチドにも関する。

本発明は、配列番号31のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドにも関する。

【0013】

本発明は、ABCC11遺伝子における、またはこれらの遺伝子の対立遺伝子によって産

50

生される対応するタンパク質における一般には多型、とりわけ突然変異を検出するための手段にも関する。

本発明は、別の一態様によれば、例えば1個または複数のヌクレオチドの置換、付加、欠失など少なくとも1つの二多型性 (b i a l l e l i c p o l y m o r p h i s m) を含む A B C C 1 1 遺伝子のヌクレオチド配列にも関する。

【 0 0 1 4 】

A B C C 1 1 核酸領域に位置する核酸配列、特に突然変異または多型のいずれか1つを含む核酸配列とハイブリッドを形成するヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマー (ゲノム D N A 、 メッセンジャー R N A 、 c D N A) が見出された。

【 0 0 1 5 】

本発明によるヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマーは、配列番号 1 ~ 3 0 のいずれか1つを含む核酸またはその相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも8個の連続したヌクレオチドを含む。

本発明によるヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマーは、本発明による核酸、特に配列番号 1 ~ 3 0 のいずれか1つを含む核酸またはその相補的なヌクレオチド配列の 1 0 、 1 2 、 1 5 、 1 8 または 2 0 ~ 2 5 、 3 5 、 4 0 、 5 0 、 7 0 、 8 0 、 1 0 0 、 2 0 0 、 5 0 0 、 1 0 0 0 、 1 5 0 0 の連続したヌクレオチド長を有することが好ましい。

あるいは、本発明によるヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマーは、本発明による核酸、特に配列番号 1 ~ 3 0 のいずれか1つを含む核酸またはその相補的なヌクレオチド配列の 1 2 、 1 5 、 1 8 、 2 0 、 2 5 、 3 5 、 4 0 、 5 0 、 1 0 0 、 2 0 0 、 5 0 0 、 1 0 0 0 、 1 5 0 0 の連続したヌクレオチド長を含む断片からなりかつ / またはこれらを含む。

したがって、本発明によるヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマーの定義は、先に定義した厳密性の高いハイブリダイゼーション条件下で、配列番号 1 ~ 3 0 のいずれか1つを含む核酸またはその相補的なヌクレオチド配列とハイブリッドを形成するオリゴヌクレオチドを包含するものである。

【 0 0 1 6 】

本発明によるヌクレオチド・プライマーは、本発明による核酸、より具体的には配列番号 1 ~ 3 0 のいずれか1つのヌクレオチド配列を含む核酸またはその相補的なヌクレオチド配列を増幅するために使用することができる。

【 0 0 1 7 】

本発明の別の一主題は、試料に含まれる本発明による核酸、より具体的には配列番号 1 ~ 3 0 のいずれか1つを含む核酸、その相補的なヌクレオチド配列、配列番号 1 ~ 3 0 のいずれか1つで示される核酸またはその相補的なヌクレオチド配列を増幅するための方法に関する。この方法は、以下のステップ、すなわち、

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

b) 増幅した核酸を検出することを含む。

【 0 0 1 8 】

本発明は、配列番号 1 ~ 3 0 のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸、配列番号 1 ~ 3 0 のいずれか1つまたはその相補的なヌクレオチド配列の核酸断片または変異体が、試料中に存在するかどうかを検出する方法にも関する。この方法は、以下のステップ、すなわち

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

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

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

10

20

30

40

50

別の態様によれば、オリゴヌクレオチド・プローブは検出可能なマーカを含む。

【0019】

本発明の別の主題は、a) 配列番号1～30のいずれか1つまたはその相補的なヌクレオチド配列、あるいはb) 配列番号1～30のいずれか1つで示される配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸の全部または一部を増幅するためのボックスまたはキットである。このボックスまたはキットは、

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

このような増幅ボックスまたは増幅キットは、好ましくは、上述の少なくとも一对のヌクレオチド・プライマーを含む。 10

【0020】

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

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

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

上述の検出キットの特定の実施形態によれば、このようなキットは、対象とする標的核酸を検出するために、あるいは本発明による核酸のコード領域または非コード領域における突然変異を検出するために使用できる、本発明による複数のオリゴヌクレオチド・プローブおよび/またはプライマーを含む。本発明の好ましい実施形態によれば、標的核酸は、配列番号1～30のいずれか1つのヌクレオチド配列または相補的な核酸配列を含む。あるいは、標的核酸は、配列番号1～30のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸の核酸断片または変異体である。 20

【0021】

別の好ましい実施形態によれば、本発明によるプライマーは、一般に、配列番号1～30のいずれか1つまたはその相補的な配列の全部または一部を含む。

本発明は、本発明による核酸を含む組換えベクターにも関する。このような組換えベクターは、 30

a) 配列番号1～30のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸、

b) 配列番号1～30のいずれか1つで示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸、

c) 配列番号1～30のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸のうち、少なくとも8個の連続したヌクレオチドを有する核酸、

d) 配列番号1～30のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、少なくとも80%のヌクレオチドが同一である核酸、

e) 配列番号1～30のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、85%、90%、95%、または98%のヌクレオチドが同一である核酸、 40

f) 厳密性の高いハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1～30のいずれか1つのヌクレオチド配列または相補的なヌクレオチド配列を含む核酸とハイブリッド形成する核酸、および

g) 配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸からなる群から選択される核酸を含むことが好ましい。

【0022】

第1の実施形態によれば、所望とする宿主細胞の形質転換または形質移入後に、本発明による組換えベクターを使用してそのベクター中に挿入した核酸を増幅する。 50

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

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

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

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

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

10

【0023】

本発明は、様々な物質の輸送に関与し、また、16番染色体、より正確には16q腕、さらに正確には発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに対する16q12遺伝子座にその染色体候補領域が位置する病理に関わるABCC11ポリペプチドをコードするcDNA核酸を含む組換え欠損ウイルスにも関する。

本発明の別の好ましい一実施形態では、この組換え欠損ウイルスは発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに関わるABCC11ポリペプチドをコードするgDNA核酸を含む。ABCC11ポリペプチドは配列番号31のアミノ酸配列を含むことが好ましい。

20

本発明は、別の好ましい一実施形態では、RSV-LTRまたはCMV初期プロモーターから選択されるプロモーターの制御下にあるABCC11ポリペプチドをコードする核酸を含む組換え欠損ウイルスに関する。

【0024】

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

本発明の特定の一実施形態によれば、ABCC11タンパク質をインビボで産生するための組成物が提供される。この組成物は、生理的に許容されるビヒクルおよび/または賦形剤中にある溶液状態の、適切な調節配列の制御下に置かれてABCC11ポリペプチドをコードする核酸を含む。

30

したがって、本発明は、適切な調節エレメントの制御下に置かれて配列番号30のアミノ酸配列を含むABCC11ポリペプチドをコードする核酸を含む組成物にも関する。

したがって、本発明は、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った患者または対象の予防用または治療用の、ABCC11タンパク質をコードする核酸を含む薬剤組成物と1個または複数の生理的に適合する賦形剤との組合せにも関する。

このような組成物は、適切な調節エレメントまたはシグナルの制御下に置かれて配列番号1~30のいずれか1つのヌクレオチド配列を含む核酸を含むことが好ましい。

40

【0025】

また、本発明は、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼなどの染色体16q12上に位置する病理の影響を受けている患者または対象の予防用または治療用の、本発明による組換えベクターを含む薬剤組成物と1個または複数の生理的に適合する賦形剤との組合せを対象とする。

本発明は、染色体遺伝子座16q12上に位置する病理の予防用の、あるいはより具体的には発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った対象の治療用の薬剤を製造するための、ABCC11タンパク質をコードする本発明による核酸の使用にも関する。

本発明は、染色体遺伝子座16q12上に位置する病理の予防用の、あるいはより具体的には発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った対象の治療用の薬剤を製造するための、A

50

B C C 1 1 タンパク質をコードする核酸を含む本発明による組換えベクターの使用にも関する。

したがって、本発明の別の主題は、A B C C 1 1 タンパク質、すなわち発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに関わるポリペプチドをコードする本発明による核酸を含む組換えベクターである。

【0026】

本発明は、A B C C 1 1 遺伝子の欠損に伴う、または染色体遺伝子座 1 6 q 1 2 上に位置する病理に伴う疾患や病状の治療用および / または予防用の薬剤組成物を調製するためのこのような組換えベクターの使用にも関する。

本発明は、任意の一生物活性 A B C C 1 1 ポリペプチドを長期にわたり効果的にインビボで発現させるための、本発明によるこのような組換えベクターを用いてエキスピボで遺伝子改変し体内に移植する細胞の使用、または体内に移植する組換えベクター産生細胞の使用にも関する。

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

本発明は、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った対象の予防用および / または治療用の薬剤を製造するための、本発明による A B C C 1 1 ポリペプチドをコードする核酸を含む本発明による組換えベクターの使用にも関する。

【0027】

本発明は、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った対象の予防用および / または治療用の薬剤を製造するための、本発明による A B C C 1 1 ポリペプチドをコードする核酸を含む本発明による組換え宿主細胞の使用にも関する。

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

本発明は、P K C など染色体遺伝子座 1 6 q 1 2 上に位置する病理の治療用および / または予防用の薬剤組成物を調製するための、このような組換えベクターまたは組換え欠損ウイルスの使用に関する。したがって、本発明は、本発明による 1 種または複数の組換えベクターまたは組換え欠損ウイルスを含む薬剤組成物にも関する。

【0028】

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

本発明は、本発明による A B C C 1 1 ポリペプチドをコードする核酸をウイルス・ベクター中に取り込むことができ、これらのベクターが生物活性な成熟ポリペプチドの効果的な発現を可能にすることを示す。より具体的には、本発明は、A B C C 1 1 タンパク質のインビボでの発現を、アデノウイルスの直接投与、あるいは産生細胞またはこのような核酸を取り込むアデノウイルスまたはレトロウイルスで遺伝子改変した細胞の移植によって得ることができることを示す。

【0029】

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

【0030】

本発明の別の主題は、1 種または複数の本発明による組換え欠損ウイルスに感染した哺乳

乳動物細胞または組換えウイルス産生細胞、および細胞外マトリックスを含む移植片に関する。本発明による移植片は、 $10^5 \sim 10^{10}$ 細胞を含むことが好ましい。これらの移植片は $10^6 \sim 10^8$ 細胞を含むことがより好ましい。

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

【0031】

本発明は、本発明の核酸、より具体的には、配列番号1～30のいずれか1つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換え宿主細胞にも関する。

本発明は、本発明の核酸、より具体的には、配列番号1～30のいずれか1つで示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換え宿主細胞にも関する。

10

【0032】

別の一態様によれば、本発明は、本発明による組換えベクターを含む組換え宿主細胞にも関する。したがって、本発明は、本発明のあらゆる核酸、より具体的には、配列番号1～30のいずれか1つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換えベクターを含む組換え宿主細胞にも関する。

本発明は、具体的には、配列番号1～30のいずれか1つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換えベクターを含む組換え宿主細胞に関する。

本発明は、配列番号1～30のいずれか1つで示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換えベクターを含む組換え宿主細胞にも関する

20

。本発明は、配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸を含む組換えベクターを含む組換え宿主細胞にも関する。

【0033】

本発明は、配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチド、そのペプチド断片、またはその変異体を産生するための方法にも関する。この方法は、以下のステップ、すなわち

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

30

【0034】

配列番号31のアミノ酸配列を有するポリペプチドと「相同」とであると称されるポリペプチドも本発明の一部を成す。このような相同なポリペプチドは、等価なアミノ酸で置換された1個または複数のアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む。

本発明によるABC11ポリペプチドは、特に1)配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチド、2)配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または3)配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチドに「相同」なポリペプチドについてのものである。

40

【0035】

特定の一実施形態では、本発明による抗体は、1)配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチド、2)配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または3)配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチドに「相同」なポリペプチドに対する抗体である。このような抗体は、Kozbor等(Immunology Today (1983) 4: 72)によって記述されたトリオーマ法またはハイブリドーマ法を用いて産生される。

【0036】

50

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

a) 1) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、2) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または 3) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに「相同」なポリペプチドに対する抗体と試験試料とを接触させること、および

b) 形成された抗原 / 抗体複合体を検出することを含む。

【0037】

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

a) 1) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、2) 配列番号 31 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または 3) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに「相同」なポリペプチドに対する抗体と

b) 形成された抗原 / 抗体複合体の検出を可能にする試薬とを含む。

【0038】

本発明は、本発明による核酸を含む薬剤組成物にも関する。

本発明は、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼなど染色体遺伝子座 16 q 12 上に位置する病理の治療のための、本発明による A B C C 1 1 ポリペプチドをコードする核酸を含む薬剤組成物および本発明による A B C C 1 1 ポリペプチドを含む薬剤組成物も提供する。

本発明は、A B C C 1 1 タンパク質をコードする本発明による核酸を移入しインビボで発現させることを含む、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼなど染色体遺伝子座 16 q 12 に位置する病理の治療のための新しい治療手法にも関する。

したがって、本発明は、患者や対象における発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼなど染色体遺伝子座 16 q 12 に位置する病理の治療および / または予防のための新しい手法を提供する。本発明は、具体的には、このような病理を引き起こす遺伝子の欠損を修復または促進する方法を提供する。

したがって、本発明は、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼなど染色体遺伝子座 16 q 12 に位置する遺伝子の機能障害に罹った対象の予防用および / または治療用に、A B C C 1 1 タンパク質をコードする核酸と 1 種または複数の生理的に適合するビヒクルおよび / または賦形剤とを組み合わせる薬剤組成物にも関する。

【0039】

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

したがって、本発明は、適切な調節エレメントの制御下に置かれて配列番号 31 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸を含む組成物にも関する。

このような組成物は、適切な調節エレメントの制御下に置かれて配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含む核酸を含むことが好ましい。

【0040】

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

【0041】

別の態様によれば、本発明の別の主題は、メトトレキセート (MTX) などの陰イオン性薬物、G S H、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送の機能障害によって引き起こされる疾患を治療する予防上または治療上の療法である

10

20

30

40

50

。この療法は、本発明による A B C C 1 1 ポリペプチドをコードする核酸と、1 種または複数の生理的に適切なビヒクルおよび / または賦形剤とを組み合わせる患者に投与することを含む。

本発明は、メトトレキセート (M T X) などの陰イオン性薬物、G S H、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送の機能障害に罹った患者や対象の予防用および / または治療用の、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドと 1 種または複数の生理的に適切なビヒクルおよび / または賦形剤とを治療上有効な量含む薬剤組成物に関する。

本発明は、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドと 1 種または複数の生理的に適切なビヒクルおよび / または賦形剤とを治療上有効な量含む、P K C の予防用および / または治療用の薬剤組成物にも関する。 10

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

【 0 0 4 2 】

特定の一実施形態によれば、少なくとも本発明による核酸を宿主細胞、特に哺乳動物から得られる宿主細胞にインピボで導入する方法は、薬剤として適合するベクターおよび適切な調節配列の制御下に置かれた本発明による「裸の」核酸を含む製剤を、選択した組織、例えば平滑筋組織に局所注射して導入するステップを含み、この「裸の」核酸はこの組織の細胞によって吸収される。 20

【 0 0 4 3 】

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

【 0 0 4 4 】

本発明は、A B C C 1 1 タンパク質に作用する小分子および化合物をスクリーニングして、メトトレキセート (M T X) などの陰イオン性薬物、G S H、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送を修復または改善できるポリペプチドの作用薬および拮抗薬を同定し、その輸送機能障害を効果的に治療およびまたは予防するための方法も提供する。これらの方法は、メトトレキセート (M T X) などの陰イオン性薬物、G S H 複合薬物、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送の欠陥による疾患の治療に使用する小分子および化合物を同定するために有用である。 30

したがって、本発明は、メトトレキセート (M T X) などの陰イオン性薬物、G S H 複合薬物、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送の機能障害に起因する疾患の予防用および / または治療用活性成分をスクリーニングするための、発明による A B C C 1 1 ポリペプチドまたは A B C C 1 1 ポリペプチドを発現する細胞の使用にも関する。 40

【 0 0 4 5 】

本発明は、化合物または小分子、A B C C 1 1 ポリペプチドの作用薬または拮抗薬をスクリーニングする方法にも関する。この方法は、以下のステップ、すなわち

- a) A B C C 1 1 ポリペプチドと検出可能なマーカーを含む脂質基質とを含む膜小胞を調製すること、
- b) ステップ a) で得た小胞を作用薬または拮抗薬の候補化合物とインキュベートすること、
- c) 検出可能なマーカーを含む脂質基質の放出量を定性的かつ / または定量的に測定する 50

こと、および

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

【0046】

第1の特定の実施形態では、A B C C 1 1 ポリペプチドはそれぞれ配列番号31を含む。本発明は、化合物または小分子、A B C C 1 1 ポリペプチドの作用薬または拮抗薬をスクリーニングする方法にも関する。この方法は、以下のステップ、すなわち

a) 対応するA B C C 1 1 ポリペプチドを自然に発現する細胞、またはA B C C 1 1 をコードする核酸を細胞に形質移入した後に対応するA B C C 1 1 ポリペプチドを発現する細胞、例えば細胞系を得ること、

10

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

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

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

e) 標識陰イオンの流出量 (e f f l u x) を測定すること、および

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

20

特定の一実施形態では、A B C C 1 1 ポリペプチドは配列番号30を含む。

【0047】

一般的な定義

本発明は、完全長を含む本発明のA B C C 1 1 ポリペプチド、自然に発生する形のA B C C 1 1、およびこれらの抗原性断片をコードするヒト遺伝子を、あらゆる動物、具体的には哺乳動物またはトリ、より具体的にはヒト源から単離しようとするものである。

【0048】

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

30

40

【0049】

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

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

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

このようなポリヌクレオチドはベクターに入れることができ、かつ/またはこのようなポリヌクレオチドは組成物に含めることができるが、それでもこのベクターまたは組成物は

50

ポリヌクレオチドの自然な環境を構成していないので、依然として単離された状態にある。

【0050】

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

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

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

10

【0051】

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

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

20

【0052】

「ヌクレオチド」という用語は、天然のヌクレオチド(A、T、G、C)、ならびに(1)プリンのアナログ、(2)ピリミジンのアナログ、または(3)糖アナログなどの少なくとも1つの修飾体を含む修飾ヌクレオチドの両方を表し、このような修飾ヌクレオチドの例は、例えば、国際公開第95/04064号に記載されている。

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

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

30

【0053】

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

したがって、「配列類似性」という用語は、そのすべての文法的な形において、核酸間やタンパク質のアミノ酸配列間の同一性または一致の程度を指し、これらは共通の進化の起源を共有していてもしていなくてもよい(Reeck等、同上参照)。しかし、一般的な使用法でも本願でも、「相同」という用語は、「高度に」などの副詞で修飾されるときには、配列類似性を指し共通の進化の起源を指さないことがある。

40

【0054】

特定の一実施形態では、少なくとも約50%(好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約90%または約95%)のヌクレオチドが規定の長さのDNA配列にわたって一致する場合、2つのDNA配列は「実質的に相同」または「実質的に類似」である。実質的に相同な配列は、配列データ・バンクにおいて、または例えばその特定の系に対して規定される厳密な条件下でのサザン・ハイブリダイゼーション実験において、利用可能な標準のソフトウェアを用い、これらの配列を比較することによって確認すること

50

ができる。適切なハイブリダイゼーション条件を規定することは当業者には周知である。例えば、Maniatis等、同上；Glover等（1985、DNA Cloning: A practical approach、I巻およびII巻 oligonucleotide synthesis、MRL Press, Ltd、Oxford、U.K.）；HamesおよびHiggins（1985、Transcription and Translation）を参照されたい。

【0055】

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

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

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

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

【0056】

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

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

【0057】

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

【0058】

本発明によるABCC11ポリペプチドをコードする遺伝子は、ゲノムDNAでもcDNAでも、任意のソース、具体的にはヒトcDNAまたはゲノムのライブラリーから単離することができる。遺伝子を得る方法は、上述の通り当技術分野では周知である（例えば、Sambrook等、1989、Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. Cold Spring Harbor Labo

ratory、Cold spring Harbor、New Yorkを参照)。

【0059】

したがって、ABCC11遺伝子の分子クローニング用核酸源としてあらゆる動物細胞を使用することができる。前記DNAは、クローン化されたDNA(例えば、DNA「ライブラリー」)から当分野で既知の標準操作によって得ることができ、好ましくは、タンパク質および/または転写物を高度に発現する組織から調製したcDNAライブラリーから、化学合成により、cDNAクローニングにより、あるいは所望の細胞から精製したゲノムDNAまたはそれらの断片のクローニングにより得られる(例えば、Sambrook等、1989、Molecular cloning: a laboratory manual, 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory、Cold spring Harbor、New York; Glover、1985、DNA Cloning: A Practical Approach、I巻およびII巻 Oligonucleotide Synthesis、MRL Press, Ltd.、Oxford、U.K.参照)。

10

20

30

40

50

【0060】

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

【0061】

DNA断片が生成した後、所望のABCC11遺伝子を含む特定のDNA断片をいくつかの方法によって同定することができる。例えば、ABCC11遺伝子の一部、その特定のRNA、またはそれらの断片が多量に入手でき、精製でき、標識できる場合、標識プローブとの核酸ハイブリダイゼーションによってその生成したDNA断片をスクリーニングすることができる(BentonおよびDavis、Science(1977)、196:180; Grunstein等、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1975) 72:3961)。例えば、以下の具体例でなされたように、ABCC11タンパク質に対して得られる部分的なコード配列情報に対応するオリゴヌクレオチド・セットを調製し、ABCC11をコードするDNA用プローブとして、または(例えば、RT-PCR用ポリTプライマーと併用して)cDNAまたはmRNA用プライマーとして使用することができる。本発明によるABCC11核酸またはポリペプチドに極めて特異的な断片を選択することが好ましい。このプローブに実質的に相同なDNA断片がハイブリッドを形成する。上述したように、相同性の程度が大きいほど、より厳密なハイブリダイゼーション条件を使用することができる。特定の一実施形態では、様々な厳密性のハイブリダイゼーション条件を使用して相同ABCC11遺伝子を同定する。

【0062】

例えば、遺伝子が、本明細書に示すABCC11タンパク質の等電点電気泳動アミノ酸組成または部分的アミノ酸配列を有するタンパク質産物をコードする場合、その遺伝子の諸特性に基づいてさらに選択を行うことができる。したがって、発現産物の物理的、化学的、または免疫的諸特性に基づいたアッセイによって、その遺伝子の有無を検出することができる。例えば、ABCC11について知られているのと類似または同一の電気泳動、等電点電気泳動すなわち非平衡pHゲル電気泳動挙動、タンパク質分解消化地図、または抗原性の諸性質を示すタンパク質を産生するcDNAクローン、すなわち適切なmRNAをハイブリダイゼーションにより選択するDNAクローンを選択することができる。

【0063】

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

10

【0064】

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

【0065】

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

20

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

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

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

30

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

【0066】

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

40

【0067】

「核酸分子」は、一本鎖の形でも二本鎖ヘリックスでも、リン酸エステル・ポリマーの形のリボヌクレオシド（アデノシン、グアノシン、ウリジン、またはシチジン；「R N A 分子」）、またはデオキシリボヌクレオシド（デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、またはデオキシシチジン；「D N A 分子」）、あるいはこれらのホスホロチオネート、チオエステルなどあらゆるリン酸エステル類似体を指す。二本鎖D N A

50

- DNA、DNA-RNA、およびRNA-RNAヘリックスが可能である。核酸分子という用語は、特にDNA分子またはRNA分子においては、その分子の1次構造および2次構造のみを指し、どんな特定の3次構造にも限定されない。したがって、この用語は、なかでも線状または環状のDNA分子（例えば、制限断片）、プラスミド、および染色体中に見られる二本鎖DNAを含む。特定の二本鎖DNA分子の構造を議論する際には、本明細書では、非転写DNA鎖（すなわち、mRNAと相同な配列を有する鎖）に沿って5'から3'方向への配列のみを示す常法に従って配列を記載することがある。「組換えDNA分子」は、分子生物学的操作を行ったDNA分子である。

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

10

20

30

【0068】

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

【0069】

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

1. 膜競合およびプレハイブリダイゼーション：

- 混合物：40 μ l サケ精子DNA（10 mg/ml）
- + 40 μ l ヒト胎盤DNA（10 mg/ml）
- 96°で5分間変性し、次いでこの混合物を氷中に浸漬する。
- 2×SSCを除去し、ホルムアミド混合物4 mlをこの膜を含むハイブリダイゼーション・チューブ中に注入する。
- 2つの変性DNAの混合物を添加する。
- 回転させながら42°で5～6時間インキュベートする。

40

2. 標識プローブ競合：

- 反復の量に応じ、標識し精製したプローブにCot I DNA 10～50 μ lを加える。
- 95°で7～10分間変性する。

50

- 65 で2～5時間インキュベートする。

3. ハイブリダイゼーション:

- プレハイブリダイゼーション混合物を除去する

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

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

- 回転させながら42 で15～20時間インキュベートする。

4. 洗浄および暴露:

- 2×SSC中室温で1回洗浄し、リンスする。

- 室温2×SSCで、および65 0.1%SDSで5分間2回洗浄

- 65 で15分間、0.1×SSCおよび0.1%SDSで2回洗浄

- 膜を透明プラスチック・ラップに包み、暴露する。

10

【0070】

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

20

【0071】

本明細書で使用する「オリゴヌクレオチド」という用語は、本発明による核酸にハイブリッド可能な通常少なくとも15ヌクレオチドの核酸を指す。オリゴヌクレオチドは、例えば³²P-ヌクレオチドまたはビオチンなどの標識を共有結合したヌクレオチドで標識することができる。一実施形態では、標識オリゴヌクレオチドをプローブとして使用して、本発明によるABCC11ポリペプチドをコードする核酸の存在を検出することができる。別の一実施形態では、オリゴヌクレオチド(その一方または両方を標識することができる)を、ABCC11核酸の完全長または断片をクローニングするために、あるいはABCC11タンパク質をコードする核酸の存在を検出するために、PCRプライマーとして使用することができる。別の一実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、ABCC11 DNA分子と三重らせんを形成することができる。一般に、オリゴヌクレオチドは合成により調製され、好ましくは核酸合成装置で合成される。したがって、オリゴヌクレオチドは、チオエステル結合などの自然には生成しないリン酸エステル類似結合で調製することができる。

30

【0072】

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

40

【0073】

DNA「コード配列」は、適切な調節配列の制御下に置かれたとき、インビトロまたはインビボの細胞内でポリペプチドに転写され翻訳される二本鎖DNA配列である。コード配列の境界は、5' (アミノ) 末端側の開始コドンおよび3' (カルボキシル) 末端側の翻訳停止コドンで決まる。コード配列は、原核生物の配列、真核生物のmRNA由来のcDNA、真核生物の(例えば、哺乳動物の)DNA由来のゲノムDNA配列、さらには合成DNA配列などであるが、これらだけに限定されない。コード配列が真核細胞における発現を意図したものである場合、通常、ポリアダニレーション・シグナルおよび転写終結配列がコード配列の3'側に置かれる。

転写および翻訳制御配列は、宿主細胞でコード配列の発現をもたらす、プロモーター、エ

50

ンハンサー、ターミネーターなどのDNA調節配列である。真核細胞では、ポリアデニレーション・シグナルが制御配列である。

【0074】

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

10

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

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

【0075】

20

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

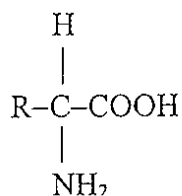
コード配列は、RNAポリメラーゼがコード配列をmRNAに転写するときには、細胞内の転写および翻訳制御配列の「制御下」にあり、次いでmRNAはtrans-RNAでスプライスされ、このコード配列によってコードされるタンパク質に翻訳される。

30

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

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

【化1】



40

【0076】

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

50

【 0 0 7 7 】

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

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

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

【 0 0 7 8 】

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

10

【 0 0 7 9 】

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

20

【 0 0 8 0 】

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

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

30

【 0 0 8 1 】

当業者であれば、単一または複数のアミノ酸の置換、欠失、付加、または交換（*replacements*）を含む変異体を産生することができる。これらの変異体は、とりわけ、（*a*）１つまたは複数のアミノ酸残基が保存的または非保存的アミノ酸で置換された変異体、（*b*）１つまたは複数のアミノ酸がポリペプチドまたはタンパク質に付加した変異体、（*c*）１つまたは複数のアミノ酸が置換基を含む変異体、および（*d*）ポリペプチドまたはタンパク質が血清アルブミンなど別のポリペプチドと融合した変異体を含むことができる。これらの変異体を得るための技術は、遺伝子工学（サプレッション、欠失、変異など）、化学的技術、および酵素技術を含めて、当業者の知るところである。

40

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

【 0 0 8 2 】

「ベクター」は、別の DNA セグメントがそれに結合して、その結合セグメントが複製され得るプラスミド、ウイルス、ファージ、コスミドなどのレプリコンである。「レプリコ

50

ン」は、インピボでのDNA複製の自律的単位として機能する、すなわち、それ自体の制御の下で複製が可能な遺伝因子（例えば、プラスミド、染色体、ウイルス）である。

本発明は、本発明のABCC11ポリペプチドの類似体および誘導体をコードする遺伝子を含むクローニング・ベクターにも関する。ABCC11タンパク質に関係する誘導体および類似体の産生および使用は本発明の範囲に含まれる。特定の一実施形態では、この誘導体または類似体は機能的に活性であり、すなわち、本発明の完全長、野生型ABCC11ポリペプチドに伴う1つまたは複数の機能的活性を示すことができる。

機能的に等価な分子を生成する置換、付加、または欠失によって核酸のコード配列を変えてABCC11誘導体を生成することができる。元のABCC11よりも機能的活性が亢進または増大した誘導体を生成することが好ましい。あるいは、このような誘導体は、本発明のABCC11ポリペプチドの天然リガンドに対し同等またはそれ以上の親和性を有するABCC11細胞外ドメインの可溶性断片をコードすることもできる。このような可溶性誘導体は、ABCC11に結合するリガンドの阻害剤候補でありうる。

10

【0083】

ヌクレオチド・コード配列の縮重のため、ABCC11遺伝子のアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列をコードする他のDNA配列を本発明を実施するのに使用することができる。このDNA配列は、他の種由来の対立遺伝子、相同遺伝子、この配列内の同じアミノ酸残基をコードする異なるコドンで置換して改変し、サイレントな変化を生じさせたABCC11遺伝子の全体または一部を含むヌクレオチド配列を含むが、これらだけに限定されない。同様に、本発明のABCC11誘導体は、ABCC11タンパク質のアミノ酸配列内の残基を機能的に等価なアミノ酸残基で置換して保存的なアミノ酸置換をもたらす改変された配列を含むABCC11タンパク質のアミノ酸配列の全体または一部を含有する配列を、主要なアミノ酸配列として含むABCC11誘導体であるが、これらだけに限定されない。例えば、機能的に等価なものとして働きサイレントな改変をもたらす極性の類似した別のアミノ酸で、この配列内の1つまたは複数のアミノ酸残基を置換することができる。この配列内のアミノ酸を置換するアミノ酸は、配列内のアミノ酸が属するクラスの別のメンバーから選択することができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが挙げられる。芳香族環構造を含むアミノ酸は、フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンである。極性中性アミノ酸としては、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンなどがある。正に帯電した（塩基）アミノ酸としては、アルギニン、ロイシン、ヒスチジンなどがある。負に帯電した（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸などがある。このような改変は、ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動または等電点によって測定される見掛け分子量には影響しないと考えられる。

20

30

【0084】

特に好ましい置換は、

- 正の電荷を保持するような、ArgのLysによる置換、およびその逆の置換、
- 負の電荷を保持するような、AspのGluによる置換、およびその逆の置換、
- 遊離のOHを保持できる、ThrのSerによる置換、および、
- 遊離のCONH₂を保持できる、AsnのGlnによる置換である。

40

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

【0085】

本発明のABCC11誘導体および類似体をコードする遺伝子を、当分野で既知の様々な方法により生成することができる。この遺伝子を生成する操作は、遺伝子またはタンパク

50

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

【0086】

また、A B C C 1 1をコードする核酸は、インビトロまたはインビボで突然変異を起こして、翻訳、開始、および/または停止配列を生成および/または破壊し、あるいはコード領域内に変異を生じ、かつ/または新しい制限エンドヌクレアーゼ部位を形成または既存の制限エンドヌクレアーゼ部位を破壊して、インビトロでの修飾をさらに促進することができる。このような変異は、突然変異したA B C C 1 1遺伝子産物の機能的活性を亢進するものであることが好ましい。なかでもインビトロでの部位特異的な突然変異生成およびT A B (登録商標)リンカー(P h a r m a c i a)の使用を含めた当分野で既知のあらゆる突然変異生成技術を使用することができる(H u t c h i n s o n等、(1978) B i o l . C h e m . 253:6551; Z o l l e rおよびS m i t h、(1984) D N A、3:479~488; O l i p h a n t等、(1986) G e n e 44:177; H u t c h i n s o n等、(1986) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 83:710; H u y g e n等、(1996) N a t u r e M e d i c i n e、2(8):893~898)。PCR技術は、部位特異的な突然変異生成に好ましい(H i g u c h i、1989、P C R T e c h n o l o g y中の「U s i n g P C R t o E n g i n e e r D N A」、: P r i n c i p l e s a n d A p p l i c a t i o n s f o r D N A A m p l i f i c a t i o n、H . E r l i c h編、S t o c k t o n P r e s s、6章、p p . 61~70)。

【0087】

次いで、同定し単離したA B C C 1 1遺伝子を適切なクローニング・ベクターに挿入することができる。当分野で既知の多数のベクター-宿主系を使用することができる。使用可能なベクターとしては、プラスミド、改変されたウイルスなどがあるが、これらだけに限定されない。ただし、ベクター系は使用する宿主細胞に適合したものでなければならない。ベクターの例は、大腸菌(E s c h e r i c h i a c o l i)、ラムダ誘導体などのバクテリオファージ、p B R 3 2 2誘導体またはp U Cプラスミド誘導体などのプラスミド、例えば、p G E Xベクター、p m a l - c、p F L A Gなどであるが、これらだけに限定されない。クローニング・ベクターへの挿入は、例えば、相補的な付着末端を有するクローニング・ベクターにDNA断片を連結することによって行うことができる。しかし、このDNAを断片化するために使用する相補的な制限部位がクローニング・ベクター内に存在しない場合、このDNA分子の末端を酵素で修飾することができる。あるいは、ヌクレオチド配列(リンカー)をDNA末端上に連結することによって任意の所望の部位を作製することができる。なお、これらの連結されたリンカーは、制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする特異的に化学合成されたオリゴヌクレオチドを含むことができる。組換え分子は、形質転換、形質移入、感染、エレクトロポレーションなどによって宿主細胞に導入することができ、その結果多数の遺伝子配列コピーが生成する。クローン化された遺伝子は、シャトル・ベクター・プラスミド上に含めることが好ましい。シャトル・ベクター・プラスミドは、クローニング細胞、例えば大腸菌での増殖をもたらす、望むならば、その後適切な発現細胞系内に挿入するための精製を容易にする。例えば、シャトル・ベクターは、2種以上のタイプの生物内で複製できるベクターであり、大腸菌由来の配列と酵母2 mプラスミド由来の配列とを連結することによって、大腸菌でも酵母(S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e)でも複製されるシャトル・ベクターを調製することができる。

別法では、所望の遺伝子を適切なクローニング・ベクターに「ショット・ガン」法で挿入

した後に、同定し単離することができる。所望の遺伝子を、クローニング・ベクターに挿入する前に、例えばサイズ分画により濃縮することができる。

【0088】

A B C C 1 1 ポリペプチドまたは抗原性断片をコードするヌクレオチド配列、その誘導体または類似体、または機能的に活性な誘導体は、そのキメラ・タンパク質を含めて、適切な発現ベクター、すなわち、挿入するタンパク質コード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含むベクターに挿入することができる。このようなエレメントを、本明細書では「プロモーター」と称する。したがって、本発明の A B C C 1 1 ポリペプチドをコードする核酸は、本発明の発現ベクター中のプロモーターと作用的に関連している。c D N A およびゲノム配列共にこのような調節配列の制御の下でクローン化し発現することができる。発現ベクターは、好ましくは複製開始点も含む。

10

【0089】

必要な転写および翻訳シグナルを、組換え発現ベクター上に設けることができ、あるいは A B C C 1 1 をコードする元の遺伝子および/またはそのフランキング領域により供給することができる。

【0090】

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

20

本発明の組換え A B C C 1 1 タンパク質、またはその機能性の断片、誘導体、キメラ構築物、または類似体は、組換えによってコード配列が組み込まれた後、染色体上で発現することがある。この点で、いくつかの増幅系のうちいずれかを用いて安定な遺伝子発現を高レベルで達成することができる（S a m b r o o k 等、1989、同上を参照）。

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

30

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

【0091】

A B C C 1 1 ポリペプチドの発現は、当分野で既知の任意のプロモーター/エンハンサー・エレメントによって制御され得るが、これらの調節エレメントは、発現用に選択した宿主中で機能しなければならない。A B C C 1 1 遺伝子発現を制御するために使用できるプロモーターとしては、S V 40 初期プロモーター領域（B e n o i s t および C h a m b o n、1981 Nature 290: 304 ~ 310）、ラウス肉腫ウイルスの3'末端反復配列に含まれるプロモーター（Y a m a m o t o 等、1980 Cell 22: 787 ~ 797）、ヘルペス・チミジンキナーゼ・プロモーター（W a g n e r 等、1981 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441 ~ 1445）、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（B r i n s t e r 等、1982 Nature 296: 39 ~ 42）； - ラクタマーゼ・プロモーターなど原核生物の発現ベクター（V i l l a - K a m a r o f f 等、1978 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3727 ~ 3731）、または t a c プロモーター（D e B o e r 等、1983 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 21 ~ 25）； Scientific American、1980、242: 74 ~ 94 の「U s e f u l p r o t e i n s f r o m r e c o m b i n a n t b a c t e r i a」も参

40

50

照；Gal 4 プロモーターなど酵母または他の菌類由来のプロモーター・エレメント、ADC（アルコール・デヒドロゲナーゼ）プロモーター、PGK（ホスホグリセロール・キナーゼ）プロモーター、アルカリ・ホスファターゼ・プロモーター；および組織特異性を示し、トランスジェニック動物に利用されている動物転写制御領域：すい臓腺房細胞で活性なエラスターゼⅠ遺伝子制御領域（Swift等、1984 Cell 38：639～646；Ornitz等、1986 Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50：399～409；MacDonald、1987）；すい臓β細胞で活性なインシュリン遺伝子制御領域（Hanahan、1985 Nature：315：115～122）、リンパ球細胞で活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedl等、1984 Cell 38：647～658；Adames等、1985 Nature 318：533～538；Alexander等、1987 Mol. Cell. Biol. 7：1436～1444）、精巣、乳房、リンパ球、および肥満細胞で活性なマウス乳癌ウイルス制御領域（Leder等、1986 Cell 45：485～495）、肝臓で活性なアルブミン遺伝子制御領域（Pinkert等、1987 Genes and Devel. 1：268～276）、肝臓で活性なアルファ-フェトタンパク質遺伝子制御領域（Krumlauf等、1985 Mol. Cell. Biol. 5：1639～1648；Hammer等、1987 Science 235：53～58）、肝臓で活性なアルファ1-アンチトリプシン遺伝子制御領域（Kelsey等、1987 Genes and Devel. 1：161～171） 骨髓細胞で活性なβ-グロブリン遺伝子制御領域（Mogram等、1985 Nature 315：338～340；Kollias等、1986 Cell 46：89～94）、脳の希突起細胞で活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域（Readhead等、1987 Cell 48：703～712）、骨格筋で活性なミオシンⅡ鎖-2遺伝子制御領域（Sani、1985 Nature 314：283～286）、および視床下部で活性な性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域（Mason等、1986 Science 234：1372～1378）などがあるが、これらだけに限定されない。

【0092】

本発明のABCC11ポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターは、一般的な5通りの手法で同定することができる：（a）所望のプラスミドDNAまたは特異的mRNAのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、（b）核酸ハイブリダイゼーション、（c）選択マーカー遺伝子機能の有無、（d）適切な制限エンドヌクレアーゼを用いた分析、および（e）挿入された配列の発現。第1の手法では、核酸をPCRで増幅して増幅産物を検出する。第2の手法では、挿入したマーカー遺伝子と相同な配列を含むプローブを用いた核酸ハイブリダイゼーションによって、発現ベクターに挿入した外来遺伝子の存在を検出することができる。第3の手法では、ベクター中の外来遺伝子の挿入により引き起こされる特定の「選択マーカー」遺伝子機能（例えば、b-ガラクトシダーゼ活性、チミジン・キナーゼ活性、抗生物質に対する耐性、形質転換表現型、バキュロウイルス中の閉塞体（occlusion body）の形成など）の有無に基づいて組換えベクター/宿主系を同定および選択することができる。別の例では、ABCC11ポリペプチドをコードする核酸がベクターの「選択マーカー」遺伝子配列内に挿入された場合、ABCC11遺伝子機能が働かないことによってABCC11核酸を含む組換え体を同定することができる。第4の手法では、適切な制限酵素を用いた消化により組換え発現ベクターを同定する。第5の手法では、発現されるタンパク質が機能的に活性なコンホメーションをとる場合、組換えによって発現される遺伝子産物の活性、生化学的諸特性、または免疫学的諸特性を評価することによって、組換え発現ベクターを同定することができる。

【0093】

多種多様な宿主/発現ベクターの組合せを、本発明の核酸を発現させるのに使用することができる。有用な発現ベクターは、例えば、染色体のセグメント、非染色体性DNA配列、および合成DNA配列で構成することができる。適切なベクターには、SV40の誘導

体および既知の細菌プラスミド、例えば、大腸菌プラスミド *col E1*、*pCR1*、*pBR322*、*pMal-C2*、*pET*、*pGEX* (Smith等、1988、Gene 67:31~40)、*pMB9* およびそれらの誘導体、*RP4* などのプラスミド；ファージDNA、例えばファージ1の多数の誘導体、例えば *NM989*、ならびに他のファージDNA、例えば *M13* および繊維状一本鎖ファージDNA；2mプラスミドまたはその誘導体などの酵母プラスミド；昆虫または哺乳動物細胞に有用なベクターなどの真核細胞に有用なベクター；ファージDNAまたは他の発現制御配列を使用するように改変したプラスミドなどプラスミドとファージDNAの組合せから誘導されるベクターなどがある。

【0094】

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

【0095】

本発明での使用が考えられる哺乳動物発現ベクターには、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (*DHFR*) プロモーターなどの誘導性プロモーターを有するベクター、例えば、*DHFR* 発現ベクターを含む任意の発現ベクター、または *pED* (*PstI*、*SalI*、*SbaI*、*SmaI*、および *EcoRI* クローニング部位、クローン化された遺伝子と *DHFR* の両方を発現するベクターを含む；Kaufman、Current Protocols in Molecular Biology、16.12 (1991) 参照) などの *DHFR* /メトトレキセート共増幅 (*co-amplification*) ベクターなどがある。あるいは、*pEE14* (ベクターがグルタミン合成酵素および遺伝子クローンを発現する *HindIII*、*XbaI*、*SmaI*、*SbaI*、*EcoRI*、および *BclI* クローニング部位、；Celltech) などのグルタミン合成酵素/メチオニンスルホキシイミン共増幅ベクターを含む。別の一実施形態では、*pREP4* (*BamH1*、*SfiI*、*XhoI*、*NotI*、*NheI*、*HindIII*、*NheI*、*PvuII*、および *KpnI* クローニング部位、構成的 *RSV-LTR* プロモーター、ハイグロマイシンで選択可能なマーカー；Invitrogen)、*pCEP4* (*BamH1*、*SfiI*、*XhoI*、*NotI*、*NheI*、*HindIII*、*NheI*、*PvuII*、および *KpnI* クローニング部位、構成的 *hCMV* 前初期遺伝子、ハイグロマイシンで選択可能なマーカー；Invitrogen)、*pMEP4* (*KpnI*、*PvuI*、*NheI*、*HindIII*、*NotI*、*XhoI*、*SfiI*、*BamH1* クローニング部位、誘導性メタロチオネインIIa 遺伝子プロモーター、ハイグロマイシンで選択可能なマーカー；Invitrogen)、*pREP8* (*BamH1*、*XhoI*、*NotI*、*HindIII*、*NheI*、および *KpnI* クローニング部位、*RSV-LTR* プロモーター、ヒスチジノールで選択可能なマーカー；Invitrogen)、*pREP9* (*KpnI*、*NheI*、*HindIII*、*NotI*、*Xh*

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

10

【0096】

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

20

【0097】

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

30

【0098】

また、挿入配列の発現を調節し、遺伝子産物を所望の特定の形式で修飾および加工する宿主細胞株を選択することができる。異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳および翻訳後プロセッシング、および修飾（例えばシグナル配列の、例えばグリコシル化、切断）について特徴的で特異的な機序を有する。適切な細胞系または宿主系を選択して、発現した外来タンパク質の所望の修飾およびプロセッシングを確実にすることができる。例えば、細菌系の発現を用いて、非グリコシル化コア・タンパク質産物を産生することができる。しかし、細菌で発現される膜貫通A B C C 1 1タンパク質は、正しく折り畳まれないことがある。酵母での発現は、グリコシル化産物を産生することができる。真核細胞での発現では、異種タンパク質「本来の（n a t i v e）」グリコシル化および折り畳みが起こる可能性を高くすることができる。また、哺乳動物細胞での発現は、A B C C 1 1活性を再構成または構成できるツールを提供するものである。さらに、ベクター／宿主発現系が異なると、タンパク質分解などのプロセッシング反応への影響度が異なることがある。

40

【0099】

ベクターは、所望の宿主細胞に当分野で既知の方法、例えば、形質移入、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合法、D E A E デキストラン法

50

、リン酸カルシウム沈殿法、リポフェクション（リソソーム融合）、遺伝子銃の使用、DNAベクター輸送体（例えば、Wu等、1992、J. Biol. Chem. 267: 963~967; WuおよびWu、1988、J. Biol. Chem. 263: 14621~14624; Hartmut等、カナダ国特許出願第2,012,311号、1990年3月15日出願を参照）によって導入される。

【0100】

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

10

【0101】

内在性膜タンパク質として発現する組換えマーカー・タンパク質を、標準法により単離し精製することができる。一般に、内在性膜タンパク質は、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、Triton X-100ポリオキシエチレン・エステル、Igepal/Nonidet P-40（NP-40）（オクチルフェノキシ）-ポリエトキシエタノール、ジゴキシン、デオキシコール酸ナトリウムなど、それらの混合物を含めて、ただしこれらだけに限定されない界面活性剤で膜を溶解して得ることができる。懸濁液を超音波処理して溶解性を上げることができる。溶解した形のタンパク質は、培養液を回収することによって、または封入体を溶解することによって、例えば、上述のように、界面活性剤で処置することによって、また、必要であれば超音波処理または他の機械的な加工によって得ることができる。可溶性または溶解性タンパク質は、ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動（PAGE）、等電点電気泳動、2次元ゲル電気泳動、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー、免疫親和性、およびサイズ分離用カラム・クロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、免疫沈降、または他の標準のタンパク質精製技術など様々な技術を用いて単離することができる。

20

【0102】

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

30

40

【0103】

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

50

【0104】

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

10

【0105】

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

【0106】

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

20

30

【0107】

したがって、本発明は、治療に有効な量の遺伝子治療用ABCC11ポリペプチドを発現するベクターを送達しようとするものである。「治療に有効な量」という句は、本明細書では、宿主の活性、機能、および応答における臨床的に有意な障害を少なくとも約15パーセント、好ましくは少なくとも50パーセント、より好ましくは少なくとも90パーセント減少させ、さらに好ましくは防止するのに十分な量を意味するのに使用する。あるいは、治療に有効な量は、宿主の臨床的に有意な状態を改善するのに十分な量である。

40

【0108】

ABCC11遺伝子の核酸

本出願人らは、ABCC11と称する新規なヒトABCC様遺伝子を同定した。本出願人らは、この新規な遺伝子が染色体16q12領域（図2）上に位置することも明らかにした。

本出願人らは、ABCC11遺伝子が独特な発現パターンを有することも明らかにし、対応するタンパク質が組織特異的な機能を果たすことができることを示した（実施例5）。実際に、ABCC11遺伝子の発現パターンを、16種の異なるヒト組織のmRNA（Clontech）についてRT-PCRで検討した。発現パターンから、腎臓、ひ臓、お

50

よび結腸を除くすべての組織で、約 5 K b の A B C C 1 1 転写物が発現することが判明した。

本出願人は、さらに、A B C C 1 1 の全コード配列 (C D S) に対応する転写候補配列を決定し、本発明による A B C C 1 1 が 2 9 個のエクソンと 2 8 個のイントロンを含むことを明らかにした。エクソンにはすべて G T および A G ジヌクレオチドが隣接し、真核生物遺伝子のスプライス部位に対するコンセンサス配列と一致した (表 1)。

【 0 1 0 9 】

【 表 1 】

表 1 : A B C C 1 1 のスプライス部位配列およびエクソン・サイズ

ABCC11			
エクソン	サイズ (bp)	スプライスアクセプター	スプライスドナー
1	5'UTR+99	Not determined	ACTTATTTATgtaagtagat
2	137	ctttttccaagAAAACCTATA	CCAAGCCGAGgtgagtcctg
3	159	cctctactagGTTTCCTGCC	ATGTCCAAAGgtgaagctgc
4	148	tctttttcaagGCTTCACCGC	ACTCGGGCCAgttaagtggca
5	234	ttccttgtagATATTGATTA	CTCAGGAGAGgttaagcagct
6	174	tgtcttgcagGCCATCAGCT	CCCCTGGCGgtaatgtcct
7	148	ctgactccagGTATTCATGA	ATCATTGAAGgtatggaaag
8	149	tattttccagACCTAAGAAG	AGCGTCAATGgttaagggttt
9	108	tcttatccagGCCTTCAGCA	GAGGTTCAAGgttaggtcatc
10	252	gtctttacagAAGTTTTTCC	GGTGTCCAAGgttagccttgt
11	72	tggcttgcagGGGATGATGT	CCTGGAGGAGgttaagtgatc
12	125	tctgccgcagATGCACTTGC	ACAAGGCCCGgttaagtcct
13	73	tccttcacagATACCTCCAG	CATGACAGAGgtgagagggga
14	204	ctgtctgcagATTGGAGAGC	CCAGCTGCAGgttagcaccc
15	135	gactgtccagTACTTAGAAT	AGCCACTTCGgtgagtcctg
16	97	ctctccccagGACATGTTGC	GGAAATGCTGgtaatggtgt
17	90	cctgacccagTGCCGGAGCA	GCAGCTGGAGgtacgggtccc
18	104	tccttcccagGTTTACATGGT	GGGCTCGGGGgtgagtgcca
19	198	tttcttgaagACCAATAGCA	CTTCAACAAGgtatgggcct
20	227	gtccctgcagGTTTTCCGCT	TTTATTATATgtgagtaggt
21	138	gtccatgcagGATGTTCAAG	TCATCAGCCAgtagtcctt
22	187	tccttctcagGTTTAAAGAGG	CGTGCTGCAGgtgagggggt
23	90	ttccttctagCTGGCGTCCA	GTACATGAAGgtgggggttca
24	190	caaaaacaagATGTGTGTCT	ACGGGCTCTGgtgagctgag
25	160	tgccccacagGGAAGTCCTC	GAACCATCAGgtgagtgccg
26	79	catatggtagATTCAACCTA	GACCAAGGCCgttaagtagct
27	114	catatcgcagATCTCAAAGT	CAACTCCAAGgtgagggcac
28	165	tattcatcagATCATCCTTA	CAATGGGAAGgtgaaggctg
29	93+3'UTR	taccctccagGTGGTAGAAT	Not determined

【 0 1 1 0 】

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

A B C C 1 1 遺伝子のいくつかのエクソンをそのヌクレオチド配列で特徴づけて表 2 に示した。ヒト A B C C 1 1 遺伝子は、サイズが 7 2 ~ 2 5 2 b p の 2 9 個のエクソンからなる。A B C C 1 1 遺伝子の 2 8 個のイントロンのうち、1 8 個はクラス 0 (スプライスはコドンとコドンの間で起こる)、4 個はクラス 1 (コドンは第 1 と第 2 のヌクレオチド間で中断される)、6 個はクラス 2 (スプライスはコドンの第 2 と第 3 のヌクレオチド間で起こる) である。

【 0 1 1 1 】

【表 2】

表2：ヒトABCC11のエクソンDNAおよびイントロンDNA

配列番号	エクソン またはイ ントロン 番号	mRNA 中のエク ソンの開 始	mRNA中 のエクソ ンの終了	ゲノム断片 中のエク ソンの開始	ゲノム断片 中のエク ソンの終了	エクソン長	断片中のイ ントロンの 開始	断片中のイ ントロンの 終了	イントロン長
2	1	1	5'UTR+ 99	25501	25949		25950	27198	1249
3	2	450	586	27199	27335	137	27336	29807	2472
4	3	587	745	29808	29966	159	29967	33342	3376
5	4	746	893	33343	33490	148	33491	34940	1450
6	5	894	1127	34941	35174	234	35175	41483	6309
7	6	1128	1301	41484	41657	174	41658	42426	769
8	7	1302	1449	42427	42574	148	42575	42741	167
9	8	1450	1598	42742	42890	149	42891	44220	1330
10	9	1599	1706	44221	44328	108	44329	46571	2243
11	10	1707	1958	46572	46823	252	46824	49274	2451
12	11	1959	2030	49275	49346	72	49347	52233	2887
13	12	2031	2155	52234	52358	125	52359	54470	2112
14	13	2156	2228	54471	54543	73	54544	57290	2747
15	14	2229	2432	57291	57494	204	57495	59492	1998
16	15	2433	2567	59493	59627	135	59628	59700	73
17	16	2568	2664	59701	59797	97	59798	61447	1650
18	17	2665	2754	61448	61537	90	61538	63786	2249
19	18	2755	2858	63787	63890	104	63891	65051	1161
20	19	2859	3056	65052	65249	198	65250	70341	5092
21	20	3057	3283	70342	70568	227	70569	70678	110
22	21	3284	3421	70679	70816	138	70817	73142	2326
23	22	3422	3608	73143	73329	187	73330	79082	5753
24	23	3609	3698	79083	79172	90	79173	80655	1483
25	24	3699	3888	80656	80845	190	80846	82351	1506
26	25	3889	4048	82352	82511	160	82512	86801	4290
27	26	4049	4127	86802	86880	79	86881	87550	670
28	27	4128	4241	87551	87664	114	87665	90108	2444
29	28	4242	4406	90109	90273	165	90274	90402	129
30	29	4407	4862	90403	90858	93+3' UTR			

10

20

30

【0112】

したがって、本発明は、配列番号1～30のいずれか1つまたはその相補的な配列を含む核酸にも関する。

本発明は、配列番号1～30のいずれか1つで示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸にも関する。

本発明は、配列番号1～30のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列のうち、少なくとも8個の連続したヌクレオチドを含む核酸にも関する。

また、本発明の主題は、配列番号1～30のいずれか1つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、少なくとも80%のヌクレオチドが同一である核酸である。

本発明は、配列番号1～30のいずれか1つを含む核酸と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは98%のヌクレオチドが同一である核酸にも関する。

本発明は、配列番号1～30のいずれか1つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、厳密性の高い条件下でハイブリッド形成する核酸にも関する。

【0113】

40

50

A B C C 1 1 タンパク質をコードする c D N A 分子

さらに、本出願人は、ヒト A B C C 1 1 遺伝子に対応する c D N A 配列および全コード配列 (C D S) を決定し、完全長ヒト対応タンパク質をコードした (実施例 2) 。

新規なヒト A B C C 1 1 遺伝子の c D N A 分子は、配列番号 1 で示される 4 8 6 2 ヌクレオチドからなり、発作性運動誘発性舞踏アテトーゼの障害に罹っていない対象中で産生される 1 3 8 2 アミノ酸 (a a) の A B C C 1 1 ポリペプチド (配列番号 3 1) に対応する 4 1 8 2 ヌクレオチドのコード配列を含む。配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列を含む新規なヒト A B C C 1 1 遺伝子の c D N A 分子は、位置 3 1 8 のヌクレオチドから位置 4 4 9 9 のヌクレオチド (T A A 停止コドンの塩基 A) までのオープン・リーディング・フレームを含む。本発明によれば、A B C C 1 1 c D N A (配列番号 1) は、配列番号 1 のヌクレオチド 3 5 1 (A T G 翻訳開始コドンの塩基 A) からヌクレオチド 4 4 9 9 までの 4 1 4 9 b p のコード配列を含み、配列番号 3 1 の 1 3 8 2 アミノ酸の完全長 A B C C 1 1 ポリペプチドをコードする。

【 0 1 1 4 】

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

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

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

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

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

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

【 0 1 1 5 】

本発明は、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸にも関する。

本発明は、配列番号 3 1 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸にも関する。

本発明は、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドにも関する。

本発明は、配列番号 3 0 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドにも関する。

本発明は、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのペプチド断片と、少なくとも 8 0 % のアミノ酸が同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドにも関する。

本発明は、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドと少なくとも 8 5 % 、好ましくは 9 0 % 、より好ましくは 9 5 % 、さらに好ましくは 9 8 % のアミノ酸が同一であるポリペプチドにも関する。

本発明によるポリペプチドは、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む本発明によるポリペプチドの 4 、 5 ~ 1 0 、 1 5 、 1 8 または 2 0 ~ 2 5 、 3 5 、 4 0 、 5 0 、 7 0 、 8 0 、 1 0 0 または 2 0 0 の連続したアミノ酸長を有することが好ましい。

【 0 1 1 6 】

ヒドロパシー・プロファイルに基づくトポロジー予測および他の既知の A B C 輸送体との比較から、コードされた A B C C 1 1 タンパク質は、(W a l k e r A および B ドメイン、およびシグネチャー・モチーフ (s i g n a t u r e m o t i f s) を含めた) 2 つの A T P 結合ドメインおよび 2 つの膜貫通ドメインを含む完全 A B C 輸送体であることが示唆された (図 1) 。 A B C C 1 1 のアミノ酸配列は、4 1 % がヒト A B C C 5 タンパク質と同一であり、3 6 % がヒト A B C C 4 、3 2 % がヒト A B C C 2 および A B C C 3 タンパク質と同一である。A B C C 1 1 タンパク質は、A B C C 4 および A B C C 5 タン

バク質同様、サブグループの他の周知のメンバーであるABCC1 (MRP1) よりも小さく、余分なN末端ドメインを欠いていると思われるが (Borst等、J Natl Cancer Inst、2000、92、1295~302)、このN末端ドメインは輸送機能には不要であることが判明している (Bakos等、J. Biol. Chem、1998、273、32167~75)。

【0117】

【表3】

表3：配列全体にわたるABCC11、ABCC12、ABCC5、ABCC4、ABCC1、およびABCA1のアミノ酸配列間の相同性／同一性百分率

全体配列	ABCC11	ABCC12	ABCC5	ABCC4	ABCC1	ABCA1
ABCC11	100/100					
ABCC12	59/49	100/100				
ABCC5	50/41	52/42	100/100			
ABCC4	47/36	50/39	51/41	100/100		
ABCC1	44/33	47/35	47/36	53/44	100/100	
ABCA1	-	-	-	-	-	100/100

10

【0118】

ABCC11、ABCC12、およびABCC5遺伝子のアミノ酸配列の整列から、配列全体にわたり49~41%の同一性が示されている (表3および図1)。

20

【0119】

ABCCサブファミリー・タンパク質の系統学的解析によって、ABCC11遺伝子とABCC5遺伝子の進化上の密接な関係が明らかとなっている (図4)。また、系統樹の解析によって、ABCC8とABCC9遺伝子が最近2組に分岐したこと、一方、ABCC10が共通祖先から最初に分離した遺伝子の1つであることが示唆されている。ABCC1、ABCC2、ABCC3、およびABCC6の各遺伝子は明確に規定されたサブ・クラスターを構成し、一方、ABCC4とCFTR (ABCC7) 遺伝子は明らかに初期に分岐したにもかかわらず別の確実なサブセットを形成している。

30

【0120】

ABCC11遺伝子内の多型性

家族の数人が発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った家族に属する数人のゲノムDNAについて、ABCC11遺伝子の突然変異を分析することができる。本発明に従って、ABCC11ポリペプチドをコードするABCC11遺伝子のコード領域で、単一のヌクレオチド多型を同定した。この変異は、より正確には第1エクソン中に位置し、その中で配列番号1の位置56にあるG (グアニン) はA (アデニン) で置換され、その結果配列配列番号31の位置19でアルギニン (R) はヒスチジン (H) で置換されていた。

【0121】

試料中のABCC11の突然変異配列を検出する手段、特に、ABCC11の突然変異配列と特異的にハイブリッド形成するプローブ、または上記変異を有するABCC11遺伝子の領域を選択的に増幅することを可能にするプライマー対を作製するために、ABCC11の正規の配列を突然変異配列 (ゲノム配列、メッセンジャーRNA、cDNA) から区別することを可能にする構造的特徴を利用することができる。特に、増幅された核酸断片の長さを区別することによって、上記特異的プローブを利用して増幅断片をハイブリダイゼーションにかけることによって、またはこれらの増幅断片を直接配列決定することによって、これらの突然変異の存在を検出することが可能である。

40

【0122】

本発明によるABCC11遺伝子多型の多型塩基の1つを含む所与の対立遺伝子と特異的にハイブリッドを形成するヌクレオチド・プローブまたはヌクレオチド・プライマーを利

50

用して、対象から得たDNAサンプル中のこれらの多型を検出することもできる。

説明のために示すと、適切なヌクレオチド・プライマーは、例えば、その3'末端塩基が前記多型性を有する断片の多型塩基の5'側のすぐ近くに位置する塩基とハイブリッドを形成するプライマーである。特異的なプライマーのハイブリダイゼーション・ステップ後、例えば蛍光によって示差的に標識された、前記多型の多型塩基に相補的な2つのジデオキシヌクレオチドの混合物で伸長させるステップ、次いで得られた蛍光シグナルを検出するステップによって、2つの示差的に標識された蛍光ジデオキシヌクレオチドのどちらが取り込まれたかを決定し、この多型に存在する多型塩基の性質を直接推定することが可能になる。

【0123】

様々な手法を用いて、ジデオキシヌクレオチドを標識し検出することができる。FRET（「蛍光共鳴エネルギー移動」）に基づく均一相での方法が、ChenおよびKwok（1997）によって記述されている。この方法によれば、多型性を含むゲノムDNAの増幅された断片を、5'末端をフルオレセインで標識したプライマーとともに、標識ジデオキシヌクレオチド三リン酸および修飾Taqポリメラーゼの存在下でインキュベートする。相補的なゲノムDNA配列上に存在する対立遺伝子に特異的な標識ジデオキシヌクレオチドの取り込みによって、標識プライマーを1塩基分伸長させる。この遺伝子型決定反応の最後に、分離や精製を行わずに標識ジデオキシヌクレオチドの2つの標識化合物の蛍光強度を直接分析する。これら全ステップを、同じチューブで実施し、実時間でモニターされる蛍光シグナルで修飾して実施することができる。別の一実施形態によれば、伸長されたプライマーを、MALDI-TOF型質量分析法によって分析することができる。多型部位に位置する塩基を、マイクロシーケンシング・プライマーの質量増加を測定して同定する（HaffおよびSmirnov、1997）。

このようなヌクレオチド・プライマーを、例えば担体上に固定することができる。また、各プライマーがそれぞれ本発明によるABCC11遺伝子の多型性の1つを検出するのに適している複数の上記特異的プライマーを、担体上に例えば整然と固定することができる。

【0124】

本発明によるABCC11遺伝子の多型は、対象における所与の対立遺伝子の存在と所与の病理、特に、染色体領域16q12、好ましくはコレステロールの逆輸送の障害に関連する病理とすでに関連付けられている病理の1つに対するこの対象の素因との関連性を研究する際に、特に遺伝マーカーとして有用である。

【0125】

複雑な形質（表現型）の遺伝分析方法には、様々なタイプがある（LanderおよびSchork、1994、Science、265、2037～2048、1994）。一般に、遺伝子型と表現型の統計的に有意な相関を示そうとする現況技術で記載されているいずれの方法においても、本発明による二多型性が有用である。二多型性は、連鎖解析および対立遺伝子共有法で使用することができる。本発明による二多型性を使用して、関連性の研究に使用される、すなわちその形質の作用を受けている家族を利用する必要がなく、さらに複雑かつ散発性の形質に関連する遺伝子の同定を可能にする手法に使用される検出可能な形質（表現型）に関連する遺伝子を同定することが好ましい。

【0126】

本発明による二多型性を使用する他の統計的方法は、例えばForsell等（Biol. Psychiatry、1997、42：898～903）、Xiong等（Am. J. Hum. Genet.、1999、64：629～640）、Horvath等（Am. J. Hum. Genet.、1998、63：1886～1897）、Sham等（Ann. Hum. Genet.、1995、59：323～336）、またはNickerson等（Genomics、1992、12：377～387）によって記述されている方法である。

【0127】

10

20

30

40

50

ヌクレオチド・プローブおよびプライマー

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

本発明によれば、配列番号1～30のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドから誘導される核酸断片は、試料中のABCC11遺伝子またはその断片またはその（突然変異体または多型を含む）変異体のヌクレオチド配列の少なくとも1コピーの存在を検出するのに有用である。

本発明によるヌクレオチド・プローブまたはプライマーは、配列番号1～30のいずれか1つまたはその相補的なヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を含む。

本発明によるヌクレオチド・プローブまたはプライマーは、配列番号1～30のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸のうち、少なくとも8個の連続したヌクレオチドを含む。

本発明によるヌクレオチド・プローブまたはプライマーは、本発明による核酸、特に配列番号1～30のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸の10、12、15、18または20～25、35、40、50、70、80、100、200、500、1000、1500の連続したヌクレオチド長を有することが好ましい。

あるいは、本発明によるヌクレオチド・プローブまたはプライマーは、本発明による核酸、より具体的には配列番号1～30のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸の12、15、18、20、25、35、40、50、100、200、500、1000、1500の連続したヌクレオチド長を有する断片からなりかつ／またはそれらを含む。

【0128】

したがって、本発明によるヌクレオチド・プローブまたはプライマーの定義は、上で定義した厳密性の高いハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1～30のいずれか1つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸とハイブリッドを形成するオリゴヌクレオチドを包含する。

本発明によるヌクレオチド・プライマーまたはプローブは、クローニングおよび制限酵素作用、あるいはNarang等（1979、Methods Enzymol、68：90～98）またはBrown等（1979、Methods Enzymol、68：109～151）によるリン酸ジエステル法、Beaucage等（1981、Tetrahedron Lett、22：1859～1862）によるジエチルホスホアミダイト法、または欧州特許第0、707、592号に記載の固体担体に関する技術などの技術に従って行う直接的な化学合成を含めて、当業者に周知の任意の適切な方法によって調製することができる。

【0129】

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

【0130】

好ましくは、本発明によるヌクレオチド・プローブおよびプライマーは、Urdea等（1991、Nucleic Acids Symp Ser.、24：197～200）

、あるいは欧州特許第 0,225,807 号 (CHIRON) に記載のプローブなどシグナルの増幅を可能にするタイプの構造的特徴を持つことができる。

【0131】

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

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

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

10

【0132】

したがって、本発明は、試料中の配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列または相補的なヌクレオチド配列を含む核酸、または配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つの核酸断片または変異体または相補的なヌクレオチド配列の存在を検出する方法にも関する。この方法は、以下のステップ、すなわち

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

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

20

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

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

【0133】

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

a) 1 個または複数の上記ヌクレオチド・プローブまたはプライマー、

b) 適切であれば、ハイブリダイゼーション反応に必要な試薬を含む。

【0134】

30

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

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

上記検出キットの特定の一実施形態によれば、このようなキットは、対象とする標的核酸を検出するために、あるいは本発明による核酸、より具体的には配列番号 1 ~ 28 のいずれか 1 つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸のコード領域または非コード領域における突然変異を検出するために使用できる本発明による複数のオリゴヌクレオチド・プローブおよび / またはプライマーを含む。

【0135】

40

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

【0136】

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

本発明によるヌクレオチド・プライマーを使用して、本発明による核酸のいずれか 1 つ、より具体的には配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列または相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を増幅することができる。あるいは、本発明によるヌクレオチド

50

・プライマーを使用して配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つまたは相補的なヌクレオチド配列の核酸断片または変異体を増幅することができる。

【0137】

特定の一実施形態では、本発明によるヌクレオチド・プライマーを使用して、配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つ、配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つで示される、または相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を増幅することができる。

【0138】

本発明の別の一主題は、本発明による核酸、より具体的には試料に含まれる a) 配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つまたは相補的なヌクレオチド配列、b) 配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つで示されるまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を増幅する方法に関する。この方法は、以下のステップ、すなわち、

10

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

b) 増幅した核酸を検出することを含む。

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

【0139】

また、本発明の主題は、本発明による核酸、より具体的には配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つまたは相補的なヌクレオチド配列、または配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つで示されるまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を増幅するためのボックスまたはキットである。このボックスまたはキットは、

20

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

b) 増幅反応に必要な試薬とを含む。

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

【0140】

また、本発明の主題は、配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸の全部または一部を増幅するためのボックスまたはキットである。このボックスまたはキットは、

30

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

2) 増幅反応に必要な試薬とを含む。

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

【0141】

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

a) 本発明による 1 個または複数のヌクレオチド・プローブ、

40

b) 適切であれば、ハイブリダイゼーション反応に必要な試薬を含む。

【0142】

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

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

上記検出キットの特定の一実施形態によれば、このようなキットは、対象とする標的核酸を検出する、あるいは本発明による核酸のコード領域または非コード領域における突然変異を検出するために使用することができる本発明による複数のオリゴヌクレオチド・プローブおよび / またはプライマーを含む。本発明の好ましい一実施形態によれば、標的核酸

50

は、配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列、または相補的な核酸配列を含む。あるいは、標的核酸は、配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つまたは相補的なヌクレオチド配列を含む核酸の核酸断片または変異体である。

【0143】

本発明によるヌクレオチド・プライマーは、対象の遺伝子型を決定する方法、および / または集団の遺伝子型を決定する方法に特に有用であり、特に、対象中の特定の対立遺伝子形または特定の形の対立遺伝子群（ハプロタイプ）と、これら対象中の特定の表現型（形質）、例えば 16 番染色体上、より正確には 16 q 腕上、さらに正確には 16 q 12 遺伝子座にその病理の染色体候補領域が位置する発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼなどの疾患をこれらの対象にもたらす素因の存在との関連性の研究に特に有用である。

10

【0144】

組換えベクター

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

好ましくは、このような組換えベクターは、以下の核酸、すなわち、

- a) 配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸、
- b) 配列番号 1 ~ 29 のいずれか 1 つで示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸
- c) 配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸のうち、少なくとも 8 個の連続したヌクレオチドを含む核酸、
- d) 配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、少なくとも 80 % のヌクレオチドが同一である核酸、
- e) 配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸と、85 %、90 %、95 %、または 98 % のヌクレオチドが同一である核酸、
- f) 厳密性の高いハイブリダイゼーション条件下で、1) 配列番号 1 ~ 30 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸とハイブリッドを形成する核酸、
- g) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸、および
- h) アミノ酸配列配列番号 31 を含むポリペプチドをコードする核酸から選択される核酸を含む。

20

30

【0145】

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

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

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

40

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

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

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

【0146】

また、本発明による組換えベクターは、それらを増幅または発現しようとする宿主細胞の 1 個または複数の複製開始点、マーカーまたは選択可能なマーカーを含むことができる。

50

例として示すと、細菌プロモーターを、LacIまたはLacZプロモーター、T3またはT7バクテリオファージRNAポリメラーゼ・プロモーター、ラムダ・ファージPRまたはPLプロモーターとすることができる。

【0147】

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

【0148】

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

【0149】

ABCC11遺伝子のいずれか1つのゲノム配列を発現させようとするときには、好ましくは、大きな挿入配列を含むことができるベクターを使用する。特定の一実施形態では、好ましくは、Sternberg(1992、Trends Genet., 8: 1~16; 1994、Mamm. Genome, 5: 397~404)によって記述されたベクターp158またはベクターp158/neo8などのP1バクテリオファージ・ベクターなどのバクテリオファージ・ベクターを使用する。

【0150】

本発明による好ましい細菌ベクターは、例えば、ベクターpBR322(ATCC37017)、あるいはpAA223-3(Pharmacia, Uppsala, Sweden)、pGEM1(Promega Biotech, Madison, WI, UNITED STATES)などのベクターである。

ベクターpQE70、pQE60、pQE9(Qiagen)、psiX174、pBluescript SA、pNH8A、pNH16A、pNH18A、pNH46A、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXTI、pSG(Stratagene)などの市販のベクターでもよい。

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

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

【0151】

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

【0152】

本発明によるポリヌクレオチドの発現を可能にするには、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入しなければならない。本発明によるポリヌクレオチドの宿主細胞への導入は、プライマー培養(primer culture)または細胞系の形で細胞を形質転換または形質移入するための当業者に周知の技術によって、インピトロで実施することができる。ABCC11欠損に関連する疾患を予防し治療するために、本発明によるポリヌクレオチドをインピボまたはエクスピボで導入することもできる。

【0153】

10

20

30

40

50

本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを宿主細胞に導入するために、当業者は、好ましくは、リン酸カルシウム沈殿法 (Graham等、1973、Virology、52:456~457; Chen等、1987、Mol. Cell. Biol.、7:2745~2752)、DEAEデキストラン (Gopal、1985、Mol. Cell. Biol.、5:1188~1190)、エレクトロポレーション (Tur-Kaspa、1996、Mol. Cell. Biol.、6:716~718; Potter等、1984、Proc Natl Acad Sci USA、81(22):7161~5)、ダイレクト・マイクロインジェクション (direct microinjection) (Harland等、1985、J. Cell. Biol.、101:1094~1095)、DNAを入れたリポソーム (Nicolaou等、1982、Methods Enzymol.、149:157~76; Fraley等、1979、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、76:3348~3352) など様々な技術を参照することができる。

10

【0154】

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

20

【0155】

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

【0156】

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

30

【0157】

本発明の特定の一実施形態によれば、ABCC11タンパク質をインビボで産生する組成物が提供される。この組成物は、適切な調節配列の制御下に置かれたABCC11ポリペプチドをコードする、生理的に許容されるベクター中の溶液状態のポリヌクレオチドを含む。

【0158】

選択した宿主生物に注射するベクターの量は、注射部位に応じて変わる。一指針として、動物、好ましくはABCC11欠損に関連する疾患を発症しそうな患者の体内に、ABCC11タンパク質をコードするポリヌクレオチド約0.1~約100 μ gを注射することができる。

40

したがって、本発明は、ABCC11タンパク質をコードする核酸と、1つまたは複数の生理的に適合する賦形剤との組合せを含む、ABCC11欠損に罹った患者や対象の予防または治療のための薬剤組成物にも関する。

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

【0159】

本発明の別の主題は、本発明による組換えベクターと、1つまたは複数の生理的に適合する賦形剤との組合せを含む、ABCC11欠損に罹った患者や対象の予防または治療のた

50

めの薬剤組成物である。

本発明は、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った対象の予防用または治療用薬剤を製造するための、A B C C 1 1タンパク質をコードする本発明による核酸の使用に関する。本発明は、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼの予防用薬剤を製造するための、A B C C 1 1タンパク質をコードする核酸を含む本発明による組換えベクターの使用にも関する。さらに、本発明は、メトトレキセート(MTX)などの陰イオン性薬物、GSH、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送機能障害に関連する病理の治療用または/および予防用の薬剤を製造するための、A B C C 1 1タンパク質をコードする核酸を含んだ本発明による組換えベクターの使用にも関する。

【0160】

10

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

したがって、本発明の別の主題は、A B C C 1 1タンパク質またはポリペプチドをコードする本発明による核酸を含む組換えベクターである。

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

【0161】

20

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

【0162】

体細胞遺伝子治療法に有用なベクターおよびこのようなベクターを含む組成物

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

30

【0163】

遺伝子治療は、病気に冒された細胞または器官に遺伝情報を導入することによって、欠損または異常(突然変異、異常発現など)を修正し、治療の対象となるタンパク質の発現を誘発するものである。この遺伝情報を、器官から取り出した細胞中にエクスピボで導入し、次いで修正した細胞を体内に戻すこともできるし、あるいはインビボで適切な組織に直接導入することもできる。後者の場合、様々な技術、なかでもDNAとDEAE-デキストランの複合物(Pagano等、J. Virol. 1(1967)891)、DNAと核タンパク質との複合物(Kaneda等、1989、Science 243:375)、DNAと脂質との複合物(Felgner等、1987、PNAS 84:7413)、リボソームの使用(Fraley等、1980、J. Biol. Chem.、255:10431)などを含めた様々な形質移入技術がある。さらに最近では、遺伝子の移送用ベクターとしてウイルスを使用することが、これら物理的形質移入技術の有望な代案として行われている。これに関連して、様々なウイルスが、特定の細胞集団に感染するそれらの能力について評価されてきた。特に、レトロウイルス(RSV、HMS、MMSなど)、HSVウイルス、アデノ随伴ウイルス、およびアデノウイルス。

40

【0164】

したがって、本発明は、A B C C 1 1をコードする遺伝子を移送しインビボで発現させる

50

、A B C C 1 1 欠損に関連する病理を治療するための新しい治療手法にも関する。特に好ましい様式で、本出願人は、今回、A B C C 1 1 タンパク質をコードする核酸を含む組換えベクターを構築し、これらの組換えベクターをインビボで投与することが可能であり、また、この投与によって、細胞病理作用 (c y t o p a t h o l o g i c a l e f f e c t) を起こすことなく、少なくとも1つの生物活性A B C C 1 1 タンパク質をインビボで安定かつ効果的に発現させることが可能になることを発見した。

【0165】

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

10

したがって、本発明は、A B C C 1 1 欠損を治療し予防するための新しい手法を提供しようとするものである。

したがって、本発明の別の主題は、A B C C 1 1 タンパク質またはポリペプチドをコードする本発明による核酸を含む組換え欠損ウイルスである。

【0166】

本発明は、A B C C 1 1 欠損の治療および/または予防に有用であり得る薬剤組成物を調製するためのこのような組換え欠損ウイルスの使用にも関する。

本発明は、生物活性A B C C 1 1 ポリペプチドを長期にわたり効果的にインビボで発現させるための、本発明によるこのような組換え欠損ウイルスを用いてエクスビボで遺伝子改変し体内に移植する細胞の使用、または体内に移植する組換え欠損ウイルス産生細胞の使用にも関する。

20

本発明は、制御された発現を誘導でき、かつ通常A B C C 1 1 の発現に関与しない器官においてこのタンパク質の有害な効果を及ぼすことがないので特に有益である。特に、本発明のベクターを産生する細胞、または本発明のベクターにエクスビボで感染した細胞の移植によって、かなりの量のA B C C 1 1 タンパク質が放出される。

【0167】

本発明で産生されるA B C C タンパク質輸送体の活性は、ヒトA B C C 1 1 型のもでも動物A B C C 1 1 型のもでもよい。本発明で使用する核酸配列 (n u c l e i c s e q u e n c e) は、c D N A、ゲノムD N A (g D N A)、R N A (レトロウイルスの場合)、または例えば、1つまたは複数のイントロン (g D N A) を挿入したc D N A となるハイブリッド構築体でもよい。これは、合成または半合成配列を含むこともできる。特に有利には、c D N A または g D N A を利用する。特に、g D N A を使用するとヒト細胞での発現性が良くなる。これらを本発明によるウイルス・ベクターに取り込ませるには、好ましくは、例えば部位特異的な突然変異生成、特に適切な制限部位を挿入する突然変異生成によってこれらの配列を修飾する。従来技術に記載されている配列は、本発明による使用向けにはまったく構成されておらず、実質的な発現を得るためには、前もって手直しが必要になることがある。本発明では、ヒトA B C C 1 1 タンパク質をコードする核配列を使用することが好ましい。また、A B C C 1 1 タンパク質の誘導体をコードする構築体を使用することもできる。A B C C 1 1 タンパク質の誘導体は、例えば、本来の配列に対する変異、欠失、および/または付加によって得られる任意の配列、および親油性物質を輸送する活性を有する産物をコードする任意の配列を含む。これらの改変を、当業者に既知の技術を用いて行うことができる (以下の一般的な分子生物学技術を参照されたい)。次いで、このようにして得られた誘導体の生物活性を、特に実施例に示すように、細胞からの物質の流出量を測定して容易に決定することができる。本発明ではこれらの誘導体を、プローブとしてそれらの本来の配列または断片を用いたハイブリダイゼーションによって、核酸ライブラリーから得ることもできる。

30

40

【0168】

これらの誘導体は、特に、それらの結合部位に対して高い親和性を有する分子、プロテア

50

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

【0169】

第1の実施形態では、本発明は、ABCC11ポリペプチドをコードするcDNAを含む組換え欠損ウイルスに関する。本発明の別の好ましい一実施形態では、組換え欠損ウイルスは、ABCC11ポリペプチドをコードするゲノムDNA(gDNA)を含む。このABCC11ポリペプチドはそれぞれ配列番号31のアミノ酸配列を含むことが好ましい。本発明のベクターを、様々なタイプのウイルスから調製することができる。アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ヘルペス・ウイルス(HSV)、またはレトロウイルス由来のベクターを使用することが好ましい。移植しようとする細胞の直接投与、またはエクスビボでの改変にはアデノウイルス、また、産生細胞の移植にはレトロウイルスを使用することが好ましい。

10

【0170】

本発明によるウイルスには欠損があり、すなわち標的細胞中で自己複製できない。したがって、一般に、本発明で使用する欠損ウイルスのゲノムは、感染細胞中でウイルスが複製するのに必要な最低限の配列を欠いている。これらの領域を、(完全にまたは部分的に)除去するか、機能しないようにするか、他の配列、特にABCC11タンパク質をコードする核配列で置換することができる。それでも、欠損ウイルスは、ウイルス粒子のキャプシド形成に必要なゲノム配列を保持していることが好ましい。

20

【0171】

より具体的にアデノウイルスに関しては、構造および諸特性が幾分異なる様々な血清型の特徴が明らかとなっている。これらの血清型の中でも、タイプ2または5のヒト・アデノウイルス(Ad 2またはAd 5)、あるいは動物起源のアデノウイルス(国際公開第94/26914号参照)が、本発明では好ましく使用される。本発明で使用する動物起源のアデノウイルスには、イヌ、ウシ、ネズミ(例: Mav1、Beard等、Virology 75(1990)81)、ヒツジ、ブタ、トリ、またはサル(例: SAV)起源のアデノウイルスなどがある。この動物起源のアデノウイルスは、好ましくはイヌ・アデノウイルス、より好ましくはCAV2アデノウイルス(例えば、ManhattanまたはA26/61株(ATCC VR-800))である。好ましくは、ヒトまたはイヌまたは混合起源のアデノウイルスを本発明では使用する。本発明の欠陥アデノウイルスは、ITR、キャプシド形成を可能にする配列、およびABCC11タンパク質をコードする配列を含むことが好ましい。本発明のアデノウイルスのゲノムでは、少なくともE1領域を機能しなくすることが好ましい。本発明のアデノウイルスのゲノムにおいて、E1遺伝子と、E2、E4、L1~L5遺伝子の少なくとも1つを機能しなくすることがさらに好ましい。当業者に既知の任意の技術によって、特に、対象とする遺伝子における完全な抑圧、置換、部分的欠失、あるいは1つまたは複数の塩基の付加によって、対象とするウイルス遺伝子を機能しなくすることができる。このような改変は、インビトロ(単離されたDNA上で)またはイン・サイチュで、例えば、遺伝子工学技術、変異誘発物質を用いた処置によって行うことができる。他の領域、特にE3(国際公開第95/02697号)、E2(同第94/28938号)、E4(同第94/28152号、同第94/12649号、同第95/02697号)、およびL5(同第95/02697号)領域も改変することができる。好ましい一実施形態によれば、本発明によるアデノウイルスは、E1およびE4領域に欠失があり、不活性化されたE1領域に、ABCC11をコードする配列が挿入されている。別の好ましい一実施形態によれば、E1領域に欠失があり、そこにE4領域およびABCC11タンパク質をコードする配列(フランス国特許出願第94 13355号)が挿入されている。

30

40

【0172】

本発明による組換え欠陥アデノウイルスは、当業者に既知の任意の技術(Levrero等、1991 Gene 101; 欧州特許第185 573号; およびGraham、

50

1984、EMBO J.、3:2917)によって調製することができる。特に、これらの組換え欠損アデノウイルスは、アデノウイルスととりわけABC C11タンパク質をコードする核酸を有するプラスミドとの相同組換えによって調製することができる。この相同組換えを、このアデノウイルスとプラスミドを適切な細胞系に同時形質移入した後に行う。これに使用する細胞系は、好ましくは(i)これらのエレメントによって形質転換可能でなければならず、(ii)欠損アデノウイルス・ゲノム部分を、好ましくは組換えの危険性を避けるために組み込まれた形で補完できる配列を含まなければならない。系の例としては、特にそのゲノム中に組み込まれたAd5アデノウイルスのゲノムの左部分(12%)を含むヒト胚性腎系293(Graham等、1977、J. Gen. Virol.、36:59)、または特に国際公開第94/26914号および同第95/02697号に記載されているE1およびE4機能を補完できる系などがある。

10

【0173】

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

20

【0174】

遺伝子をインビトロおよびインビボで移送するのにAAV由来のベクターを使用することは、文献(特に国際公開第91/18088号;国際公開第93/09239号;米国特許第4,797,368号、同第5,139,941号、欧州特許第488,528号を参照されたい)に記載されている。これらの出願特許は、rep遺伝子および/またはcap遺伝子が欠失し対象とする遺伝子で置換されたAAV由来の様々な構築体、およびインビトロ(培養細胞上で)またはインビボ(直接生体内に)で対象とする前記遺伝子を移送するためのこの構築体の使用について記載している。しかし、これらの文献のうち、ABC C11タンパク質のインビボまたはエクスビボでの移送および発現に組換えAAVを使用すること、あるいはこのような移送の利点について記載または示唆しているものはない。本発明による組換え欠損AAVは、ヒト・ヘルパー・ウイルス(例えば、アデノウイルス)に感染した細胞系に、2つのAAV逆方向反復領域(ITR)が両端についたABC C11タンパク質をコードする配列を含むプラスミドとAAVキャプシド形成遺伝子(rep遺伝子およびcap遺伝子)を有するプラスミドとを同時形質移入して調製することができる。次いで、生成した組換えAAVを常法により精製する。

30

【0175】

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

40

【0176】

特に、レトロウイルスは、分裂中の細胞に感染する組込みウイルス(integrating viruses)である。レトロウイルスのゲノムは、基本的に、2つの長末端反復(LTR)、キャプシド形成配列、および3つのコード領域(gag、polおよびenv)を含む。レトロウイルス由来の組換えベクターでは、gag、polおよびenv各遺伝子は、一般に、完全にまたは部分的に欠失しており、対象とする異種核酸配列で置換されている。これらのベクターは、特にMoMuLV(「ネズミ・モロニー白血病ウイ

50

ルス」；M o M L Vとも呼ばれる）、M S V（「ネズミ・モロニー肉腫ウイルス」）、H a S V（「ハーベイ肉腫ウイルス」）；S N V（「ひ臓壊死ウイルス」）；R S V（「ラウス肉腫ウイルス」）、またはフレンド・ウイルスなどの様々なタイプのレトロウイルスから生成させることができる。

【0177】

本発明によるA B C C 1 1タンパク質をコードする配列を含む組換えレトロウイルスを構築するには、特にL T R、キャプシド形成配列、および前記コード配列を含むプラスミドを一般に構築し、次いでそれを使用して、プラスミドに欠けているレトロウイルス機能を途中で付与できるいわゆるキャプシド形成細胞系（*encapsidation cell line*）を形質移入する。したがって、このキャプシド形成系は、一般にg a g、p o l、およびe n v各遺伝子を発現することができる。このようなキャプシド形成系、特にP A 3 1 7系（米国特許第4,861,719号）、P s i C R I P系（国際公開第90/02806号）、およびG P + e n v A m - 1 2系（国際公開第89/07150号）は従来技術に記載されている。また、組換えレトロウイルスは、転写活性を抑制するためにL T Rに改変を含み、g a g遺伝子の一部を含む拡張キャプシド形成配列を含むことができる（B e n d e r等、1987、J . V i r o l .、61:1639）。次いで、生成した組換えレトロウイルスを常法により精製する。

10

【0178】

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

20

【0179】

本発明の別の特に好ましい実施形態によれば、A B C C 1 1タンパク質をコードする配列を含むレトロウイルス・ベクターを生成する系を、インビボでの移植に使用する。この目的に使用できる系は、本発明によるA B C C 1 1およびA B C C 1 2タンパク質のいずれか1つをコードする核配列を含むレトロウイルスを生成できるように改変された特にP A 3 1 7細胞（米国特許第4,861,719号）、P s i C r i p細胞（国際公開第90/02806号）およびG P + e n v A m - 1 2細胞（米国特許第5,278,056号）である。例えば、血液細胞系の前駆体である全能性幹細胞を対象から収集し単離することができる。次いで、これらの細胞を、培養時、ウイルス・プロモーター、非ウイルス・プロモーター、またはマクロファージに特異的な非ウイルス・プロモーターの制御下またはそれ自身のプロモーターの制御下にあるA B C C 1 1タンパク質をコードする配列を含むレトロウイルス・ベクターで形質移入することができる。次いで、これらの細胞を対象中に戻す。これらの細胞の分化により、A B C C 1 1タンパク質を発現する血球が生成する。

30

【0180】

本発明のベクターにおいては、A B C C 1 1タンパク質をコードする配列を、感染細胞中でその発現を可能にするシグナルの制御下に置くことが好ましい。このシグナルは相同の発現シグナルでも異種の発現シグナル、すなわちA B C C 1 1タンパク質の発現を自然にもたらすシグナルとは異なるシグナルでもよい。このシグナルは、特に他のタンパク質の発現をもたらす配列、または合成配列でもよい。特に、このシグナルは、特異的な形式などで、あるいは誘導的な形式などで遺伝子の転写を刺激または抑制する、真核生物遺伝子配列またはウイルス遺伝子配列または誘導配列（*derived sequences*）でもよい。例として、このシグナルは、感染しようとする細胞のゲノム由来のプロモーター配列、ウイルスのゲノム由来のプロモーター配列、および特にアデノウイルスのE 1 A遺伝子または主要後期プロモーター（*major late promoter*）（M L P）遺伝子のプロモーター、サイトメガロウイルス（C M V）プロモーター、R S V -

40

50

L T Rなどでもよい。真核生物のプロモーターは、ユビキタス・プロモーター（H P R T、ビメンチン、 α -アクチン、チューブリンなど）、中間径フィラメント（デスミン、ニューロフィラメント、ケラチン、G F A Pなど）のプロモーター、（M D R、C F T R、または第VIII因子型などの）治療用遺伝子のプロモーター、組織特異的プロモーター（ピルビン酸キナーゼ、ピリン、腸の脂肪酸結合タンパク質のプロモーター、平滑筋細胞の α -アクチンのプロモーター、肝臓に特異的なプロモーター；A p o A I、A p o A II、ヒト・アルブミンなど）、または（ステロイド・ホルモン受容体、レチノイン酸受容体など）刺激に対応するプロモーターなどでもよい。また、これらの発現配列は、エンハンサーまたは調節配列などを付加して改変することができる。また、挿入遺伝子が発現配列を含まないときには、この挿入遺伝子を欠損ウイルスのゲノムのこのような配列の下流に挿入することができる。

10

【0181】

特定の一実施形態では、本発明は、R S V - L T RまたはC M V初期プロモーターから選択されるプロモーターの制御下にあるA B C C 1 1タンパク質をコードする核酸を含む組換え欠損ウイルスに関する。

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

【0182】

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

20

【0183】

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

30

【0184】

レトロウイルスに関して、本発明による組成物は、移植の目的で産生細胞をじかに含む。この点で、本発明の別の一主題は、本発明による1つまたは複数の組換え欠損ウイルスに感染した任意の哺乳動物細胞に関する。より具体的には、本発明は、このようなウイルスに感染した任意のヒト細胞集団に関する。これらは、特に血液に由来する細胞（全能性幹細胞または前駆体）、線維芽細胞、筋芽細胞、肝細胞、ケラチノサイト、平滑筋および内皮細胞、グリア細胞などとして行うことができる。

40

【0185】

本発明による細胞は、初代培養に由来するものでもよい。これらの細胞は、当業者に既知の任意の技術で収集し、次いで、これらの増殖を可能とする条件下で培養することができる。より具体的に線維芽細胞の場合は、生検、例えばH a m (1 9 8 0)により記述された技術によってこれらの細胞を容易に得ることができる。これらの細胞は、そのまま使用してウイルスに感染させることができ、あるいは後で使用するために例えば凍結させて貯蔵して自己のライブラリーを樹立することもできる。本発明による細胞は、例えばすでに樹立されているライブラリーから得て、二次培養することができる（例えば、欧州特許第

50

228458号、同第289034号、同第400047号、同第456640号を参照されたい)。

【0186】

次いで、生物活性ABC11タンパク質を産生する能力を培養中の細胞に付与するために、これらの細胞を本発明による組換えウイルスで感染させる。感染は、当業者に既知の技術に従ってインビトロで行われる。特に、使用する細胞のタイプおよび細胞当たりの所望のウイルス・コピー数に応じて、当業者は、感染多重度および、場合によっては、生成する感染サイクル数を調節することができる。これらの細胞をインビボで投与しようとするときには、これらのステップを適切な無菌条件下で実施しなければならないことは容易に理解されよう。これらの細胞を感染するのに使用する組換えウイルスの用量は、当業者が所望の目的に従って調節することができる。上述のインビボでの投与条件は、インビトロでの感染にも適用することができる。レトロウイルスでの感染の場合、本発明による組換えレトロウイルス産生細胞に感染する細胞を同時培養することもできる。これにより、レトロウイルスの精製が不要になる。

10

【0187】

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

より具体的には、本発明の移植片中の細胞外マトリックスは、ゲル化化合物および、場合によっては、細胞の固定を可能とする担体を含む。

20

【0188】

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

【0189】

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

30

したがって、本発明は、親油性物質の輸送に関連した病理を治療または予防するための極めて有効な手段を提供するものである。

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

40

【0190】

組換え宿主細胞

本発明は、本発明の核酸、より具体的には、配列番号1~30から選択されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換え宿主細胞に関する。本発明は、本発明の核酸、およびより具体的には、配列番号1~30で示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換え宿主細胞にも関する。

【0191】

別の態様によれば、本発明は、本発明による組換えベクターを含む組換え宿主細胞にも関する。したがって、本発明は、本発明の核酸のいずれか、より具体的には、配列番号1

50

～ 30 から選択されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換えベクターを含む組換え宿主細胞にも関する。

本発明は、配列番号 1 ～ 30 のいずれか 1 つで示されるヌクレオチド配列またはその相補的なヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換えベクターを含む組換え宿主細胞にも関する。

【0192】

本発明による好ましい宿主細胞は、例えば以下の

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

b) 真核生物の宿主細胞：HeLa細胞 (ATCC 番号 CCL2)、Cv 1細胞 (ATCC 番号 CCL70)、COS細胞 (ATCC 番号 CRL 1650)、Sf-9細胞 (ATCC 番号 CRL 1711)、CHO細胞 (ATCC 番号 CCL-61)、3T3細胞 (ATCC 番号 CRL-6361)、またはヒト赤白血病 K562 (ATCC 番号 CCL-243) である。

【0193】

ABCC11ポリペプチドを産生するための方法

本発明は、配列番号 31 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを産生するための方法にも関し、この方法は以下のステップ、すなわち、

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

【0194】

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

【0195】

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

【0196】

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

【0197】

配列番号 31 から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドに「相同」なポリペプチ

ドも本発明の一部を成す。このような相同ポリペプチドは、配列番号 30 の等価なアミノ酸で置換された 1 個または複数のアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む。

本発明による「等価なアミノ酸」は、例えば D 型残基による L 型残基の置換、または当業者に周知の技術によるピログルタミン酸でのグルタミン酸 (E) の置換を意味すると理解される。説明のために示すと、少なくとも 1 つの D 型残基を含むペプチドの合成が Koch (1977) によって記述されている。別の一態様によれば、同一クラスに属する 2 つのアミノ酸、すなわち非荷電極性と非極性、塩基性と酸性アミノ酸の 2 つも等価なアミノ酸とみなせる。

【0198】

レトロ-インバース結合 (NHCO)、カルバ (carba) 結合 (CH₂CH₂)、または 10
はケトメチレン結合 (CO-CH₂) など少なくとも 1 つの非ペプチド結合を含むポリペプチドも本発明の一部を成す。

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

【0199】

抗体

本発明による ABC C 11 ポリペプチド、特に 1) 配列番号 31 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチド、2) 配列番号 30 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または 3) 配列番号 31 から選択されるア 20
ミノ酸配列を含むポリペプチドに「相同」なポリペプチドを、抗体、特に患者の正常型または改変型 ABC C 11 ポリペプチドの産生を検出するための抗体の調製に使用することができる。

【0200】

配列番号 31 から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと「相同」なポリペプチドに対する抗体も本発明の一部を成す。このような抗体は、配列番号 31 の等価なアミノ酸で置換された 1 個または複数のアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む相同ポリペプチドを対象とする。

本発明での「抗体」は、特にポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体または断片 (例えば、F(ab)'₂断片および Fab 断片) または本発明の標的ポリペプチドまたは標 30
的ポリペプチド断片を認識する一次抗体のドメインを含むあらゆるポリペプチドを意味すると理解される。

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

【0201】

本発明によれば、組換え産生または化学合成によって産生したポリペプチド、その断片またはその他の誘導体またはその類似体は、融合タンパク質を含めて、免疫原として使用して本発明によるポリペプチドを認識する抗体を産生することができる。このような抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、一本鎖、Fab 断片、および Fab 発 40
現ライブラリーなどがあるが、これらだけに限定されない。本発明の抗 ABC C 5 抗体、抗 ABC C 4 抗体、または抗 ABC C 1 抗体は交差反応性であってもよく、例えば、異なる種由来の対応する ABC C 11 ポリペプチドを認識することもできる。ポリクローナル抗体は交差反応性である可能性がより高い。あるいは、本発明の抗体は、ABC C 11 の単一の型に対して特異的であってもよい。このような抗体は、ヒト ABC C 11 に特異的であることが好ましい。

【0202】

当分野で既知の様々な手順を、ABC C 11 ポリペプチドまたはその誘導体またはその類似体に対するポリクローナル抗体の産生に使用することができる。抗体を産生する場合、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどを含めて、ただしこれらだけに限定されない 50

様々な宿主動物を、A B C C 1 1 ポリペプチド、またはその誘導体（例えば、断片または融合タンパク質）を注射して免疫することができる。一実施形態では、A B C C 1 1 ポリペプチドまたはその断片を、免疫原性の担体、例えば、ウシ血清アルブミン（B S A）またはキーホール・リンペット・ヘモシニアン（K L H）と複合することができる。フロインド・アジュバント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムなどの無機質ゲル、リゾレシチン、p l u r o n i c ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キーホール・リンペット・ヘモシニアン、ジニトロフェノールなどの界面活性物質、および B C G（カルメット・ゲラン菌（b a c i l l e C a l m e t t e - G u e r i n））、コリネバクテリウム・パルヴム（C o r y n e b a c t e r i u m p a r v u m）などの潜在的に有用なヒト・アジュバントを含めて、ただしこれらだけに限らない様々なアジュバントを宿主種に応じて使用して免疫応答を増大させることができる。

10

【0203】

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

20

30

【0204】

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

40

【0205】

抗体分子のイディオタイプを含む抗体断片を既知の技術により生成することができる。例えば、このような断片は、抗体分子をペプシン消化して産生することができる F (a b ')₂断片、F (a b ')₂断片のジスルフィド架橋を還元して生成することができる F a b ' 断片、およびこの抗体分子をパパインおよび還元剤で処置して生成することができる F a b 断片などであるが、これらだけに限定されない。

【0206】

抗体の産生においては、所望の抗体のスクリーニングを、当分野で既知の技術、例えば、放射性免疫測定法、E L I S A（酵素結合免疫吸着測定法）、「サンドイッチ」免疫測定

50

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

【0207】

前記抗体を、上記任意の検出技術または当分野で既知の技術を用いて、A B C C 1 1ポリペプチドの局在化および活性に関係する当分野で既知の方法に使用することができ、例えば、ウェスタン・ブロット法の場合、適切な生理的試料などにおけるイン・サイチュでのA B C C 1 1ポリペプチドの測定レベルに使用することができる。特定の実施形態では、A B C C 1 1ポリペプチド活性に作用し（agonize）または拮抗する抗体を生成することができる。このような抗体を、リガンドを同定する下記アッセイを用いて試験することができる。

本発明は、1) 配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチド、2) 配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または3) 配列番号31から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに「相同」なポリペプチドに対する抗体に関する。これは、本発明の一部を成し、Kozbor等（1983、Hybridoma、2（1）：7～16）によって記述されたトリオーマ技術またはハイブリドーマ技術で産生される。

【0208】

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

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

【0209】

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

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

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

a) 1) 配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチド、2) 配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または3) 配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチドと「相同」なポリペプチドに対する抗体と試験試料とを接触させること、および

b) 形成された抗原 / 抗体複合体を検出することを含む。

【0210】

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

a) 1) 配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチド、2) 配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチドのポリペプチド断片または変異体、または3) 配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチドと「相同」なポリペプチドに対する抗体と、

b) 形成された抗原 / 抗体複合体の検出を可能にする試薬とを含む。

【0211】

薬剤組成物および治療方法

本発明は、A B C C 1 1 機能性ポリペプチド、特に配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチドの有効量を産生することができる治療上有効な量のポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、コレステロールまたは炎症性脂質の輸送欠陥を予防および / または治療するための薬剤組成物にも関する。

本発明は、本発明によるA B C C 1 1 ポリペプチドのいずれか1つをコードする核酸を含む薬剤組成物、および染色体遺伝子座16q12上に位置する疾患を予防および / または治療するための本発明によるA B C C 1 1 ポリペプチドを含む薬剤組成物も提供する。

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

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

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

【0212】

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

したがって、本発明は、配列番号31のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、適切な調節エレメントの制御下に置かれた核酸を含む組成物にも関する。

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

【0213】

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

【0214】

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

【0215】

特定の一実施形態によれば、本発明による核酸を宿主細胞、特に哺乳動物から得られる宿主細胞にインビボで導入する方法は、適切な調節配列の制御下に置かれた本発明による薬剤として適合するベクターおよび「裸の」核酸を含む製剤を、選択した組織、例えば平滑

10

20

30

40

50

筋組織に局所注射して導入するステップを含み、この「裸の」核酸はこの組織の細胞によって吸収される。

【0216】

本発明は、予防用および/または治療用の様々な形態の薬剤、より具体的には発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った対象の治療用薬剤を製造するための、A B C C 1 1タンパク質をコードする本発明による核酸の使用にも関する。

本発明は、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに罹った対象の予防用および/または治療用薬剤を製造するための、A B C C 1 1タンパク質をコードする核酸を含む本発明による組換えベクターの使用にも関する。

本発明は、予防用および/または治療用の様々な形態の薬剤、より具体的にはメトトレキサート(MTX)などの陰イオン性薬物、GSH複合薬物、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送障害に罹った対象の治療用薬剤を製造するための、A B C C 1 1タンパク質をコードする本発明による核酸の使用にも関する。 10

【0217】

本発明は、メトトレキサート(MTX)などの陰イオン性薬物、GSH複合薬物、グルクロナート、サルフェートなど酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送欠陥の予防用および/または治療用薬剤を製造するための、A B C C 1 1タンパク質をコードする核酸を含む本発明による組換えベクターの使用にも関する。

【0218】

本発明は、上記の通り、発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼに関連した病理の治療および/または予防用薬剤組成物を調製するための、本発明による組換え欠損ウイルスの使用にも関する。 20

本発明は、メトトレキサート(MTX)などの陰イオン性薬物、GSH複合薬物、グルクロナート複合薬物、サルフェート複合薬物など酸性リガンドに結合した中性薬物の輸送に関連する欠陥の治療用および/または予防用の薬剤組成物を調製するための組換え欠損ウイルスの使用に関する。したがって、本発明は、本発明による1つまたは複数の組換え欠損ウイルスを含む薬剤組成物にも関する。

本発明は、体内に移植され、生物活性A B C C 1 1ポリペプチドを長期にわたり効果的にインビボで発現することができる、本発明によるウイルスによりエクスピボで遺伝子改変された細胞、またはウイルスなどの産生細胞の使用にも関する。 30

【0219】

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

【0220】

本発明の薬剤組成物は、注射剤、特に例えば患者の門脈中などへの静脈内注射用の、薬剤として許容されるビヒクルまたは生理的に適合する賦形剤を含むことが好ましい。これらのビヒクルまたは賦形剤は、特に滅菌等張液または乾燥した、特に凍結乾燥した組成物に類するものであり、滅菌水か生理食塩水かによるが、これらを添加すると注射溶液の調製が可能になる。患者の門脈中に直接注射することが好ましい。というのは、これにより肝臓での感染を標的とし、したがってこの器官に治療効果を集中することができるからである。 40

【0221】

「薬剤として許容されるビヒクルまたは賦形剤」としては、投薬方法として薬剤的に許容され、無菌であり、また、適切な分散剤、湿潤剤、および懸濁剤を用いて配合される水性懸濁液または油性懸濁液でもよい希釈剤およびフィラーが挙げられる。個々の薬剤として許容される担体および活性化合物と担体の比は、組成物の溶解性および化学的諸性質、個 50

々の投与形態、および標準の製剤上の実務で決まる。

【0222】

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

10

【0223】

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

【0224】

別の態様によれば、本発明の別の主題は、コレステロールまたは炎症性脂質の輸送欠陥によって引き起こされる疾患を治療する予防的および/または治療的治療法であり、ABCC11ポリペプチドをコードする核酸を患者または対象に投与することを含む。この核酸は1つまたは複数の生理的に適合するビヒクルおよび/または賦形剤と組み合わせられている。

20

【0225】

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

30

【0226】

別の態様では、本発明による核酸で形質転換され、本発明によるABCC11ポリペプチドを高いレベルで発現する組換え細胞を、ABCC11ポリペプチドを必要とする対象に移植することができる。本発明による核酸をコードするABCC11で形質転換された自己細胞を移植して拒絶反応を防止することが好ましい。あるいは、免疫認識および免疫拒否を防止するポリマー・マトリックス内の可溶性因子を産生する非自己細胞を遮蔽する技術を利用できる。

40

【0227】

本発明による核酸、ポリペプチド、組換えベクター、組換え宿主細胞、および組成物の投与対象は、好ましくはヒトであるが、あらゆる動物とすることもできる。したがって、当業者に容易に理解されるように、本発明の方法および薬剤組成物は、あらゆる動物、特に、ネコまたはイヌなどの家で飼う動物、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、およびブタなどの家畜、(自然状態または動物園内の)野生動物、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコなどの研究動物、ニワトリ、シチメンチョウ、鳴きん類などのトリを含

50

めて、ただしこれらだけには限定されない哺乳動物に投与するのに、すなわち、獣医用に特に適している。

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

【0228】

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

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

【0229】

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

【0230】

A B C C 1 1 中和性競合抗体 (neutralizing competition antibodies)、A B C C 1 1 タンパク質、およびA B C C 1 1 タンパク質と結合可能な産物を用いた産物スクリーニング方法を実施することも可能である。このように、これらの抗体を使用して、A B C C 1 1 ポリペプチドまたはタンパク質を含む共通抗原単位を有するペプチドの存在を検出することができる。

【0231】

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

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

【0232】

また、多数の輸送体が破損することが記載されている (van den Hazel 等、1999、J. Biol. Chem、274:1934~41) ことから、特徴的な表現型を有する細胞の突然変異体を使用することを考え、A B C C 1 1 タンパク質でその機能を補完し、これら全部をスクリーニングの目的で使用する事が可能である。

【0233】

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

のステップ、すなわち、

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

【 0 2 3 4 】

10

A B C C 1 1 ポリペプチドは配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む。

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

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

【 0 2 3 5 】

20

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

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

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

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

第 7 の態様によれば、標識基質および A B C C 1 1 ポリペプチドを含む膜小胞を、ステップ b) の前に固体担体表面に固定する。 30

第 8 の態様によれば、小胞によって放出される蛍光または放射能の測定は、A B C C 1 1 ポリペプチドによる基質輸送の活性を直接反映するものである。

【 0 2 3 6 】

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

- a) A B C C 1 1 ポリペプチドを自然に発現する細胞、または A B C C 1 1 をコードする核酸を細胞に形質移入した後に A B C C 1 1 ポリペプチドを発現する細胞、例えば細胞系を得ること、
- b) 検出可能なマーカーで標識した陰イオンの存在下で、ステップ a) の細胞をインキュベートすること、
- c) これらの細胞に侵入していない過剰の標識陰イオンを除去するためにステップ b) の細胞を洗浄すること、
- d) ステップ c) で得た細胞を A B C C 1 1 ポリペプチドの作用薬または拮抗薬の候補化合物とともにインキュベートすること、
- e) 標識陰イオンの流出量を測定すること、および
- f) ステップ e) で測定した標識陰イオンの流出量の値を、A B C C 1 1 ポリペプチドの作用薬または拮抗薬の候補化合物の存在下でまだインキュベートしていない細胞で測定した標識陰イオンの流出量の値と比較することを含む。

40

50

【0237】

第1の特定の実施形態では、A B C C 1 1ポリペプチドは配列番号31のアミノ酸配列を含む。

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

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

10

【0238】

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

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

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

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

20

【0239】

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

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

【実施例1】

【0240】

ゲノム・データベース中のヒトA B C C 1 1遺伝子の検索

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

30

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

発現された配列タグ(EST)クローン配列および遺伝子の5'領域および3'領域から予想されたcDNA配列からプライマーを設計した。A B C C 1 1 cDNA配列を、精巢または肝臓のcDNA(Clontech)のPCR増幅によって確認した。A B I 3 7 7シーケンサーを用いて製造者(Perkin Elmer)の手順に従い配列を決定した。ゲノム配列(BAC A C 0 0 7 6 0 0)とcDNA配列を比較して、イントロンの位置を決定した。

40

【実施例2】

【0241】

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

GeneBridge4放射線ハイブリッド・パネル(radiation hybrid panel)(Research Genetics)を用い製造者の手順に従いマ

50

ッピングして、染色体上のヒト A B C C 1 1 遺伝子の位置を決定した。

放射線ハイブリッド・マッピングによれば、A B C C 1 1 はヒト染色体 1 6 の動原体領域に位置し、マーカー D 1 6 S 3 0 9 3 および D 1 6 S 4 0 9 が隣接していた (図 2)。この領域は 5.4 c M または 1 3 2.5 c R を含んでおり、この領域には組換えマーカーおよび / またはマップされた多型マーカーが存在しないことからさらに範囲を限定することはできなかった。A B C C 1 1 遺伝子は、1 6 p マーカー D 1 6 S 3 0 9 3 (1 1 9.4 0 c R) よりも 1 6 q マーカー D 1 6 S 4 0 9 (1 3.2 4 c R) の近くに位置づけられるので (図 2)、染色体 1 6 q 1 2.1 上に位置している可能性が最も高い。A B C C 1 2 は、同じ遺伝子座に位置し、A B C C 1 1 からは約 2 0 0 k b 離れている。A B C C 1 1 と A B C C 1 2 は直列に並び、それらの 5' 末端は動原体に面している。2 つの別の A B C C サブファミリー遺伝子 A B C C 1 および A B C C 6 は、同じ染色体の短腕 1 6 p 1 3.1 (C o l l e 等 (1 9 9 2) S c i e n c e 2 5 8、1 6 5 0 ~ 1 6 5 4 ; A l l i k m e t s 等 (1 9 9 6) H u m a n M o l . G e n e t . 5、1 6 4 9 ~ 1 6 5 5) に位置づけられた。A B C C 1 および A B C C 6 の各 3' 末端は、互いにわずか約 9 k b しか離れておらず、そのためこれらの遺伝子は反対方向を向いている (C a i 等、J M o l M e d、2 0 0 0、7 8、3 6 ~ 4 6)。

10

【 0 2 4 2 】

発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (P K C) の遺伝子座は、マーカー D 1 6 S 3 0 9 3 とマーカー D 1 6 S 4 1 6 との間の 1 6 p 1 1.2 ~ q 1 2.1 に割り当てられた (T o m i t a 等、A m J H u m G e n e t、1 9 9 9、6 5、1 6 8 8 ~ 9 7 ; B e n n e t t 等、N e u r o l o g y、2 0 0 0、5 4、1 2 5 ~ 3 0 ; 図 2)。重複する遺伝子座は、発作性舞踏アテトーゼを伴う乳児けいれん (I C C A ; L e e 等、H u m G e n e t、1 9 9 8、1 0 3、6 0 8 ~ 1 2) の遺伝子を含むと予想されている。染色体 1 6 上の新規なイオン・チャネル遺伝子中の突然変異は、P K C および / または I C C A をもたらす恐れがあることが示唆された (B e n n e t t 等、N e u r o l o g y、2 0 0 0、5 4、1 2 5 ~ 3 0)。A B C C サブファミリーの別のメンバーである嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (C F T R) は、サイクリック A M P によって制御されるチャネルとして、また、他のイオン・チャネルおよび輸送体の制御因子として機能するので (K l e i z e n 等、J C e l l B i o l、2 0 0 0、7 9、5 4 4 ~ 5 6)、この遺伝子がイオン・チャネル (または制御因子) として機能し得ること、およびこれらの突然変異が疾患の表現型をもたらす恐れがあることはもっともなことである。A B C C 1 1 の発現の分析から、この遺伝子が筋や脳組織で発現し、骨格筋や脳に関係する P K C の病因の作業仮説を支持するものであることが示されている。要約すると、染色体上の位置、考えられる機能、および発現プロファイルから、この遺伝子は P K C / I C C A に対する有望な候補である。

20

30

【 実施例 3 】

【 0 2 4 3 】

系統学的解析 (図 5)

A B C C サブファミリー・タンパク質の系統学的解析によって、A B C C 1 1 遺伝子と A B C C 1 2 遺伝子が比較的最近 2 組に分岐したことが明白である (図 5)。この得られた隣接合流樹 (n e i g h b o r - j o i n i n g t r e e) によって、A B C C 1 1 / A B C C 1 2 のクラスターと A B C C 5 遺伝子の進化上の密接な関係が最大の信頼度 (1 0 0 レベルのブートストラップ (b o o t s t r a p) 支持) で示されている (図 5)。また、この近隣結合樹の解析によって、A B C C 8 遺伝子と A B C C 9 遺伝子が最近 2 組に分岐し、一方、A B C C 1 0 が共通祖先から分離した最初の遺伝子の 1 つであると考えられることが示唆された。A B C C 1、A B C C 2、A B C C 3、および A B C C 6 の各遺伝子は明確に規定されたサブ・クラスターを構成し、一方、A B C C 4 と C F T R (A B C C 7) の各遺伝子は明らかに初期に分岐したにもかかわらず別の確実なサブセットを形成している。

40

【 実施例 4 】

50

【0244】

細胞系

ヒト赤白血病K562細胞を、アメリカ組織培養コレクション(American Tissue Culture Collection)(Rockville MD)から入手して、10%ウシ胎児血清、2-グルタミン2mMを補充したRPMI-1640培地中で培養した。9-(2-ホスホニルメトキシエチル)アデニン(PMEA)に耐性のある細胞K562/PMEAを、Hatsue等(Mol Pharmacol、1996、50、1231~42)によって記述されたようにして誘導した。T-リンパ芽球細胞系CEMおよび(-)2',3'-ジデオキシ-3'-チアシチジン(3TC)に耐性のあるCEM-3TC細胞を選択した。細胞系CEMssおよびCEM-r1は、Robbins等(Mol Pharmacol、1995、47、391~7)によって記述された。CEM-r1は、ABCC4を過剰発現するので、PMEAに対して高い耐性がある(Schuetz等、Nat Med、1999、5、1048~51)。これら6個の細胞系(野生型と耐性細胞系の3組)由来のRNAすべてを、TRIZOL(GIBCO BRL)を用いて単離し、図3に示したサイクル数とオリゴヌクレオチド・プライマーを変えてRT-PCRを実施した。PCR産物をサブクローニングし、配列を直接決定して確認した。

10

【0245】

逆転写

全容積11.5μl中で、オリゴdT500ngと混合したmRNA poly(A) + (Clontech)500ngを70℃で10分間変性し、次いで氷上で冷却した。RNAasin10単位、DTT10mM、dNTP0.5mM、Superscript第1鎖(first strand)緩衝液、およびSuperscript II(Life Technologies)200単位を添加後、反応物を42℃で45分間インキュベートした。

20

【0246】

PCR

各ポリメラーゼ連鎖反応は、各dNTP400μM、Thermus aquaticus(Taq)DNAポリメラーゼ(Ampli Taq Gold;Perkin Elmer)2単位、各プライマー0.5μM、MgCl₂2.5mM、PCR緩衝液、およびDNA50ng、またはcDNA約25ng、または初期PCR混合物1/50eを含んでいた。Perkin Elmer 9700サーマル・サイクラー中、96ウェル・マイクロタイター・プレート中で反応を30サイクル実施した。94℃10分間の最初の変性後、各サイクルは、30秒(94℃)の変性ステップ、30秒(64℃2サイクル、61℃2サイクル、58℃2サイクル、および55℃28サイクル)のハイブリダイゼーション・ステップ、および1分/kb(72℃)の伸長ステップからなった。最後に72℃7分間伸長させてPCRを終了した。RT-PCRの場合、逆転写酵素のない対照反応およびcDNAの代わりに水を含んだ反応をサンプルごとに実施した。

30

【0247】

DNA配列決定

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

40

【0248】

50

プライマー

G C G パッケージの Prime ソフトウェア、またはオリゴ4 (National Biosciences, Inc.) ソフトウェアを用いて、オリゴヌクレオチドを選択した。プライマーを Life Technologies, Ltd から取り寄せ、精製せずに使用した。

【実施例 5】

【0249】

ヒト組織およびヌクレオチド耐性細胞系における ABC C 1 1 の発現

ABC C 1 1 遺伝子の発現パターンを、PCR により多重組織発現アレイ (multiple tissue expression arrays) (Clontech) 上で遺伝子特異的プライマーを用いて検討し、約 500 bp の PCR 断片を得た (図 3)。約 5000 bp の mRNA 種がノーザン・ブロットによって観測された。発現実験に使用したプライマーは、エクソン 7 からエクソン 10 までの ABC C 1 1 cDNA を増幅し、527 pb の PCR 断片が得られた (図 3)。肺の場合、これよりも小さな (419 pb) 断片も検出された (図 3)。この PCR 産物の配列を直接決定して、短い方の PCR 産物が ABC C 1 1 遺伝子のエクソン 9 を欠いていることが判明した。これらの結果は繰返し実験で確認されたことから、ABC C 1 1 エクソン 9 の読み飛ばしがインビボで頻繁に起きているのかもしれない。エクソンの読み飛ばし現象および選択的スプライシング現象は、Rickers 等 (Human Genet. (1994) 94, 311~313) および Bellincampi 等 (Biochem. Biophys. Res. Comm. (2001) 283, 590~597) によっていくつかの ABC 遺伝子で記述されている。

ABC C 1 1 EST の組織源 (tissue source) を dbEST 公開データベースおよび Incyte LifeSeq Gold 商用 (proprietary) データベースで系統的に解析して、その大部分が乳癌組織 (17) 由来である 29 個の EST を得た。これ以外の EST は、前立腺 (5 クローン)、精巣 (3)、CNS (2)、および結腸 (2) 由来であった。筋ライブラリー由来の EST はなかった。

【0250】

この新しい遺伝子が ABC C 5 に対して幅広い (および ABC C 4 に対してある程度の) 構造的類似性を示したので、K562 と K562 - PME A、CEM ss と CEM - r 1、CEM と CEM - 3 TC の 3 組の細胞系における発現も評価した。PME A に対する耐性により K562 - PME A 系と CEM - r 1 系を選択し、シチジン・ヌクレオシド類似体 3 TC に対する耐性により CEM - 3 TC を選択した。親細胞系と PME A 耐性細胞系では ABC C 1 1 の発現レベルに差は認められなかった。これとは対照的に、CEM - 3 TC 細胞系は、親細胞系 CEM に比べて ABC C 1 1 の発現が 2 ~ 3 倍再現性良く増大した。ABC C 1 1 と ABC C 5 (図 1 および図 5) の進化上の密接な関係を考慮し、ABC C 5 によるヌクレオチド類似体の選択的な輸送を実証した最近の研究 (Wijnholds 等、Proc Natl Acad Sci, 2000, 97, 7476~81) とさらに照らし合わせると、これは興味深い知見となる可能性がある。また、CEM - 3 TC の流出量耐性表現型は、ABC C 4 の過剰発現では部分的にしか説明されず、これらの細胞において ABC C 1 1 がより多く発現することから、さらなる検討が必要である。

【実施例 6】

【0251】

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

ABC C 1 1 遺伝子は、哺乳動物細胞中で発現することがある。一般的な真核生物の発現ベクターは、mRNA の転写開始を可能にするプロモーター、タンパク質をコードする配列、転写終結に必要なシグナル、および転写物のポリアダニレーションに必要なシグナルを含む。発現ベクターは、エンハンサー、コザック配列、mRNA のスプライシングに必要な配列などのさらに別のシグナルも含む。SV40 ウイルス・プロモーターの初期要素 (early element) および後期要素 (late element)、レトロ

ウイルスLTR、またはCMVウイルス初期プロモーターを用いて有効な転写が得られる。一方、アクチン・プロモーターなどの細胞要素も使用することができる。本発明を実施するために多数の発現ベクターを使用することができる。このようなベクターの一例はpcDNA3 (Invitrogen)である。

【実施例7】

【0252】

正常なABCC11ポリペプチドおよび突然変異ABCC11ポリペプチドの産生
実施例2にその単離について記載した対応する完全なcDNAによってコードされる正常なABCC11ポリペプチド、または実施例2に記載した技術に従ってその完全なcDNAを得ることもできる突然変異ABCC11ポリペプチドは、細菌または昆虫細胞の各発現系においてバキュロウイルス・ベクターを用いて、あるいはワクシニア・ウイルス・ベクターを含む哺乳動物細胞やそれを含まない哺乳動物細胞において容易に産生することができる。これらの方法はすべて、現在広範に記載されており、当業者には既知である。その詳細な記述の1つが、例えばF. Ausubel等(1989、Current Protocols in Molecular Biology、Green Publishing Associates and Wiley Interscience、N.Y.)にある。

【実施例8】

【0253】

突然変異ABCC11ポリペプチドに対する抗体の産生
本発明における抗体を、様々な方法によって調製することができる(Frederick M. Ausubel、Roger Brent、Robert E. Kingston、David D. Moore、J. G. Seidman、John A. Smith、Kevin Struhl - Massachusetts General Hospital Harvard Medical School編、Current Protocols In Molecular Biology 1巻、11章、1989)。例えば、本発明のポリペプチドを発現する細胞を動物に注射して抗体を含む血清の産生を誘導する。記載された方法の1つでは、タンパク質を調製し、汚染を避けるために精製する。次いで、このような製剤を、より高い活性を有するポリクローナル抗血清を産生する目的で動物に導入する。

【0254】

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

【0255】

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

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

【 0 2 5 6 】

本明細書に記載する方法に従い、本発明の抗体の F a b 断片、F (a b ')₂ 断片、および他の断片を使用することが好ましい。このような断片は、一般には、(F a b 断片を産生するために) パパイン、(F (a b ')₂ 断片を産生するために) ペプシンなどの酵素を利用したタンパク質分解性の切断によって産生される。あるいは、組換え DNA 技術または合成化学技術を適用して、このタンパク質を認識する分泌断片を産生することができる。抗体をヒトにインビボで使用する場合、「ヒト化」キメラ・モノクローナル抗体を使用することが好ましい。このような抗体を、上記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞由来の遺伝子構築体 (g e n e t i c c o n s t r u c t s) を用いて産生することができる。キメラ抗体を産生する方法は、当業者には既知である (総説として M o r r i s o n (1 9 8 5 , S c i e n c e 2 2 9 : 1 2 0 2) ; O i 等 (1 9 8 6 , B i o t e c h n i q u e , 4 : 2 1 4) ; C a b i l l y 他、米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号 ; T a n i g u c h i 他、欧州特許第 1 7 1 4 9 6 号 ; M o r r i s o n 他、欧州特許第 1 7 3 4 9 4 号 ; N e u b e r g e r 等、国際公開第 8 6 0 1 5 3 3 号 ; R o b i n s o n 等、国際公開第 8 7 0 2 6 7 1 号 ; B o u l i a n n e 等 ; (1 9 8 4 , N a t u r e , 3 1 2 : 6 4 3) ; および N e u b e r g e r 等 (1 9 8 5 , N a t u r e , 3 1 4 : 2 6 8) を参照されたい) 。

【 実施例 9 】

【 0 2 5 7 】

A B C C 1 1 遺伝子における多型性 / 突然変異の決定

A B C C 1 1 遺伝子転写物配列中またはゲノム配列中の多型性または突然変異の検出を、様々な手順に従い実施することができる。好ましい方法は、配列を直接決定することである。

m R N A 調製物を得ることができる患者の場合、好ましい方法は、c D N A を調製しそれらの配列を直接決定することである。DNA しか入手できない患者の場合、および対応する遺伝子の構造が未知か部分的にしかわからない転写物の場合、そのイントロン - エクソン構造ならびに対応する遺伝子のゲノム配列を正確に決定する必要がある。したがって、これには、第一に、検討する転写物に対応するゲノム DNA B A C クローンまたはコスミド・クローンを単離し、対応するクローンの挿入断片の配列を決定し、c D N A 配列と得られるゲノム DNA の配列とを比較してイントロン - エクソン構造を決定する必要がある。

【 0 2 5 8 】

直接配列決定による突然変異の検出技術は、疾患に対するホモ接合体から、または少なくとも 8 個体 (検討対象の病理に罹った 4 個体および罹患していない 4 個体) から、または検討対象集団の少なくとも 3 2 の血縁でない個体から得られる A B C C 1 1 遺伝子のゲノム配列を比較することからなる。この配列の相違が多型性を形成する。野生型タンパク質のアミノ酸配列を改変する多型性はすべて、前記タンパク質の機能に影響を及ぼし得る突然変異でもよく、系統中の (遺伝型 - 表現型の相関を示す) 突然変異および疾患の同時分離 (c o s e g r e g a t i o n) の研究に対し、あるいは薬理ゲノム研究における治療に使用する分子に対する薬理応答 (p h a r m a c o l o g i c a l r e s p o n s e) の研究に対し、あるいは散发性症例の解析のための症例と調節との関連性の研究におい

10

20

30

40

50

てより具体的に考えることが好ましい。

【実施例 10】

【0259】

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

実施例 9 に記載の方法に従って同定される突然変異のうち、疾患の表現型に関連する突然変異はすべて原因となり得る。これらの結果は、罹患した個体およびその親類すべての遺伝子配列を決定することによって確認される。

また、実施例 4 に記載の方法に従い、罹患または非罹患個体に特異的な RNA を用いたノーザン・ブロットまたは RT-PCR 分析によって、検討対象の遺伝子の発現レベルにおける注目すべき変化を、特に遺伝子が転写されない状況で検出することが可能になる。

【実施例 11】

【0260】

ABC C 11 タンパク質をコードする核酸を含む組換えベクターの構築

ヒト ABC C 11 タンパク質をコードする核酸の合成：

ヒト細胞（例えば、胎盤組織、Clontech、Palo Alto、CA、USA、または THP 1 細胞）から単離した RNA (500 ng) すべてを、ヒト ABC C 11 遺伝子の cDNA を合成する原料として用いることができる。mRNA を cDNA に逆転写する方法は当分野では周知である。例えば、「Superscript one step RT-PCR」(Life Technologies、Gaithersburg、MD、USA) システムを使用することができる。

ABC C 11 cDNA に特異的なオリゴヌクレオチド・プライマーをこの目的に使用することができる。これらのオリゴヌクレオチド・プライマーを、ABI 394 型の DNA 合成装置 (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA) を用いてホスホアミダイト法により合成することができる。

前記ジデオキシヌクレオチド dATP、dCTP、dTTP、および dGTP 各 200 μM、ならびにパイロコッカス・フリオース (Pyrococcus furiosus) DNA ポリメラーゼ (Stratagene, Inc. La Jolla、CA、USA) の存在下で、テンプレートとしてヒト ABC C 11 cDNA 50 ng、および制限酵素 Not I (5' - GCGGCCGC - 3') によって認識される部位をその 5' 末端に含む先に使用した ABC C 11 特異的オリゴヌクレオチド・プライマー 0.25 μM を用いて、第 2 の増幅ステップで組換えベクター中に挿入しようとする cDNA 領域の両側に配置されるように、制限酵素 Not I によって認識される部位を増幅した ABC C 11 cDNA 中に組み入れることができる。

PCR 反応を PCR 用サーモサイクラー装置 (Cetus Perkin Elmer Norwalk、CT、USA) 中で 30 サイクルを超えて実施することができ、各サイクルは 95 1 分間の変性ステップ、50 1 分間の再生ステップ、および 72 2 分間の伸長ステップを含む。

【0261】

発現ベクター中へのヒト ABC C 11 遺伝子 cDNA のクローニング：

次いで、発現ベクター、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) 初期プロモーター配列、エンハンサー配列、および SV 40 ポリアデニレーション・シグナル (Beg 等、1990、PNAS、87:3473; Applebaum-Boden、1996、JCI 97) を含む pCMV ベクターの Not I 制限部位内にヒト ABC C 11 cDNA 挿入断片をクローン化して、pABC C 11 と命名される発現ベクターを産生することができる。

クローン化した cDNA の配列は、(Applied Biosystems、Foster City、CA、USA によって市販されている) 反応セット「ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing ready」を用いて、ABI 310 型キャピラリー・シーケンサー (Applied

Biosystems、Foster City、CA、USA) 中で2本の鎖上の配列を決定して確認することができる。

【0262】

ヒトABCC11遺伝子cDNAを含む組換えアデノウイルス・ベクターの構築：

発現ベクターpCMV - の改変：

発現ベクターpCMV - (Clontech、Palo Alto、CA、USA、Gene Bank受託番号U02451) の - ガラクトシダーゼcDNAを、制限エンドヌクレアーゼNotIで消化して除去し、5'末端から3'末端までに以下の部位、すなわちNotI、AscI、RsrII、AvrII、SwaI、およびNotIを含むNotI制限部位領域でクローン化されたマルチ・クローニング部位で置き換えることができる。このマルチ・クローニング部位の配列は、
5' - CGGCCCGCGGCGCGGCCCGGACCGCCTAGGATTTAAATC
GCGGCCCGCGG - 3' である。

【0263】

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

【0264】

シャトル・ベクターpXCXIの改変：

5'末端から3'末端までに

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

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

【0265】

シャトル・ベクターpAD12-ABCAの調製：

ヒトABCC11 cDNAを上述のようにRT-PCR反応により得て、ベクターpCMV-12中のNotI部位にクローン化し、ベクターpCMV-ABCC11を得る。

【0266】

ABCC11組換えアデノウイルスの構築：

ヒトABCC11 cDNAを含む組換えアデノウイルスを、McGroory等(1988、Virology、163:614)によって記述された技術に従って構築することができる。

手短に言えば、ベクターpAD12-ABCAに、Chen等(1987、Mol Cell Biol、7:2745~2752)の技術に従ってベクターtGM17を同時形質移入する。

同様に、ベクターpAD12-ルシフェラーゼを構築し、ベクターpJM17を同時形質移入した。

組換えアデノウイルスをPCR増幅によって確認し、ヒト胎生腎細胞系HEK 293 (American Type Culture Collection、Rockvil

le、MD、USA) 中で大規模に増幅する前に、2つの精製サイクルにかける。

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

【0267】

この粗製溶解物をFreon (Halocarbhone 113、Matheson Product、Scaucus、N.J. USA) を利用して抽出し、0.2%ネズミ・アルブミン (Sigma Chemical Co.、St Louis、MO、USA) を補充した塩化セシウム中で2回沈降させ、NaCl 150 mM、Hepes (pH 7.4) 10 mM、KCl 5 mM、MgCl₂ 1 mM、およびCaCl₂ 1 mMからなる緩衝液で徹底した透析を行う。

10

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

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

【0268】

ヒトABCC11 cDNAの発現の確認：

配列番号30で示されるアミノ酸配列の全部または一部を含むABCC11タンパク質由来の合成ポリペプチド断片を注射することによって、ウサギおよびニワトリ中で上述のようにしてヒトABCC11ポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体を調製することができる。これらのポリクローナル抗体を使用して、細胞モデルおよび動物モデルにおけるヒトABCC11遺伝子の発現を免疫ブロット法および/または免疫検出法によって検出および/または定量する。

20

【0269】

細胞中のヒトABCC11 cDNAのインビトロでの発現：

HEK293系およびCOS-7系の各細胞 (American Tissue Culture Collection、Bethesda、MD、USA)、ならびにタンジール病患者または低リポタンパク血症に罹った患者由来の初代培養物中の線維芽細胞に、リボフェクトアミン (BRL、Gaithersburg、MD、USA) を用いて、あるいは塩化カルシウムを利用した共沈殿 (Chen等、1987、Mol Cell Biol.、7: 2745~2752) によって発現ベクターpCMV-ABCC11 (5~25 μg) を形質移入する。

30

これらの細胞をベクターpABCC11-AdV (感染の指数 (Index of infection)、MOI = 10) で感染させることもできる。

ヒトABCC11の発現は、形質移入された細胞および/または感染細胞を用いて、免疫ブロット法ならびにapoA-1により誘導されるコレステロールの流出量の定量によってモニターすることができる。

【0270】

様々な動物モデルにおけるABCC11遺伝子のインビボでの発現：

実験0日目に、10⁸~10⁹溶解プラーク形成単位 (pfu) を含む精製組換えアデノウイルス (pABCA-AdVまたはpLucif-AdV) を含有する適切な量 (100~300 μl) の培地を、マウス (C57BL/6、対照マウスおよびトランスジェニック・マウス・モデルまたはノックアウト・マウス・モデル) の伏在静脈中に注入する。コレステロールまたは炎症性脂質の輸送におけるABCC11タンパク質の生理上の役割を、アデノウイルスの投与前 (0日) と投与後 (2、4、7、10、14日) のコレステロールまたは適切な炎症性脂質の総量を測定することによって評価する。

コレステロールおよび炎症性脂質の輸送に対するABCC11遺伝子発現の効果を評価するために、放射性標識された産物を利用した動力学的研究を、ベクターrLucif-AdVおよびrABCA-AdVの投与から5日後に実施する。

また、Vaisman (1995) およびHoeg (1996) の教示に従い、ABCC

50

11、CMV、またはapoEなど内在性プロモーターの制御下にあるヒトABCC11 cDNAを含む構築体を用いて、ABCC11遺伝子を過剰発現するトランスジェニック・マウスおよびトランスジェニック・ウサギを生産することができる。

【0271】

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

【図面の簡単な説明】

【0272】

【図1】ABCC11、ABCC12、およびABCC5タンパク質の配列を示す図である。同一アミノ酸を影付きで、ギャップをピリオドで示す。Walker AおよびBモチーフ、およびABC輸送体ファミリー・シグネチャ配列(signature sequence)Cは、下線を引きそれぞれの文字で標識してある。Genetics Computer Group Package中のPILEUPプログラムを用いてアミノ酸配列を並べた。膜貫通セグメント候補を太字で示す。

【図2】16番染色体の物理地図、ならびにヒトABCC11遺伝子およびABCC12遺伝子の局在化を示す図である。マーカーD16S3093とD16S409が隣接したヒトABCC11遺伝子とABCC12遺伝子は約200kb離れており、頭-尾形式で構成され、これらの5'末端は動原体に面している。ICCA遺伝子座、PKC遺伝子座、およびそれらの重複する遺伝子座を角括弧で示す。ABCC11遺伝子およびABCC12遺伝子をそれぞれ灰色および黒の矢印で示す。

【図3】ヒトABCC11遺伝子のヒトMultiple Tissue cDNA(MTC(商標)、Clontech)上でのPCRによる発現プロファイルを示す図である。各レーンは、16個のヒト組織/細胞からの正規化された第一鎖(first-strand) cDNAを含む。すなわち、レーン1~16は、それぞれ心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、筋、腎臓、すい臓、ひ臓、胸腺、精巣、卵巣、腸、結腸、白血球、および前立腺のcDNAである。Nは負の対照であり、Mはマーカー(1kb Plus DNA Ladder)のレーンである。以下のプライマー対は特定の遺伝子産物を増幅した：ABCC11：順方向 5'-AGA ATG GCT GTG AAG GCT CAG C AT C-3'、逆方向 5'-GTT CCT CTC CAG CTC CAG T GC-3'。

【図4】ABCC11遺伝子およびABCC12遺伝子のスプライシング・パターンを示す図である。空白の枠はエクソンを示し、縦の線はスプライス部位を示す。各遺伝子のエクソン数を図の上下に示す。塗りつぶした枠は、ABCドメインをコードするエクソンである。

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

10

20

30

40

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 September 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/072632 A2(51) International Patent Classification: C07K 14/705,
C12Q 1/68, C12N 15/63, 15/10, C07K 16/28, A61K
48/00, 39/00, G01N 53/68, 53/53Village Road, MONROE, NY 10950 (US); **DENEFFLE,**
Patrice [FR/FR]; 45 avenue des Fusillés de Chateaubriand,
F-94100 Saint-Maur (FR).

(21) International Application Number: PCT/EP02/03541

(74) Agent: **LECCA, Patrice**; AVENTIS PHARMA S.A.,
Direction brevets, 20 avenue Raymond Aron, F-92165
Antony Cedex (FR).

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

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Date:
60/272,757 5 March 2001 (05.03.2001) (US)(71) Applicants (for all designated States except US): **AVEN-**
TIS PHARMA S.A. [FR/FR]; Direction brevets, 20 av-
enue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR); **THE GOV-**
ERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMER-
ICA [US/US]; US Department of Health and Human Ser-
vices, 200 Independence Avenue, Washington, DC 20201
(US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **ROSIER-MON-**
TIS, Marie [FR/FR]; 21 rue des Baconniers, F-92160
Antony (FR); **PRADES, Catherine** [FR/FR]; 30 av-
enue du Général De Gaulle, F-92430 Trappes (FR);
ARNOLD-REGUIGNE, Isabelle [FR/FR]; 112 rue
de Roy, F-94430 Champs-sur-Marne (FR); **DEAN,**
Michael [US/US]; 1362 Hitchinposi Lane, Frederick, MD
(US); **ALLIEMETS, Rando** [US/US]; 8-J Lamplight(84) Designated States (regionally): ARIP patent (GI, GM,
AL, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
European patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NF, SN, TD, TG).**Published:**
without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette

WO 02/072632 A2

(54) Title: NUCLEIC ACIDS OF THE HUMAN ABCC11 GENE, VECTORS CONTAINING SUCH NUCLEIC ACIDS AND
USES THEREOF(57) Abstract: The present invention relates to nucleic acids corresponding to various exons of the ABCC11 gene as well as the
cDNA encoding the novel full length of ABCC11 protein. The invention also relates to means for the detection of polymorphisms
in general, and of mutation in particular, in the ABCC11 gene or in the corresponding protein produced by the allelic form of the
ABCC11 gene.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

1

**NUCLEIC ACIDS OF THE HUMAN ABCC11 gene, VECTORS CONTAINING
SUCH NUCLEIC ACIDS AND USES THEREOF**

The present invention relates to a novel nucleic acid corresponding to ABCC11
5 gene, and a cDNA encoding the novel ABCC11 protein. The invention also relates to
means for the detection of polymorphisms in general, and mutations in particular in the
ABCC11 gene or corresponding proteins produced by the allelic forms of the ABCC11
gene.

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

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

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

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

2

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

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

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

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

3

regulator) gene (Riordan et al., *Science*, 1989, 245, 1066-73). Another member of the ABCC subfamily, the ABCC2 gene, has been associated with the Dubin-Johnson syndrome (Wada et al., *Hum Mol Genet*, 1998, 7, 203-7). Also, mutations in the coding sequence of another gene belonging to the ABCC subfamily, the ABCC6 gene, have been recently identified as responsible of the phenotype of pseudoxanthoma elasticum (Bergen et al., *Nat. Genet.*, 2000, 25, 228-31 ; Le Saux et al., *Nat Genet*, 2000, 25, 223-7), which is a genetic disorder of the connective tissue. Likewise, a receptor of sulfonylureas, ABCC8 or SUR1, appears to be involved in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy (Thomas et al., *Science*, 1995, 268, 426-9).

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

The applicant have discovered and characterized a novel gene belonging to the ABCC protein sub-family, which has been designated ABCC11. The newly discovered gene also shows considerable conservation of the amino acid sequences, particularly within the transmembrane region (TM) and the ATP-binding regions (NBD), and have a similar gene organization. In particular, this gene appears to be closely related to other ABCC subfamily members such as ABCC5, ABCC2 and ABCC3, particularly in the ATP-binding domain, and more particularly in the C-terminal ATP binding domains. The ABCC11 protein, as well as ABCC4 and ABCC5, is smaller than another well-known member of the subgroup, ABCC1 (MRP1), appearing to lack the extra N-terminal domain (Borst et al., *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92, 1295-302), which is however not required for the transport function (Bakos et al., *J. Biol. Chem*, 1998, 273, 32167-75). Since structurally related ABC proteins often transport similar substrates across the membranes, it would be reasonable to suggest that the ABCC11 protein could share functional similarities with ABCC 4 and/or ABCC5 genes, i.e., the resistance to nucleotide analogs, such as PMEA, and purine base analogs (Schuetz et al., *Nat Med*, 1999 5, 1048-51 ; Wijnholds et al., *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97, 7476-81).

Furthermore, the applicants have mapped the novel gene ABCC11 in a region located in the 16q12 locus of the human chromosome 16, which is a region statistically linked with two genetic pathologies generally designated paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD), i.e., paroxysmal kinesigenic choreoathetosis (PKC) (Tomita et al., *Am J Hum Genet*, 1999, 65, 1688-97; Bennett et al., *Neurology*, 2000, 54, 125-130) and infantile

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

4

convulsions with paroxysmal choreoathetosis or the ICCA syndrome (Lee et al., 1998, *Human Genet.* 103, 608-612). These results support the hypothesis that ABCC11 represents a positional candidate on human chromosome 16 for paroxysmal disorders, such as paroxysmal kinesigenic choreoathetosis and/or infantile convulsions with paroxysmal choreoathetosis.

Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis (PKC), the most frequent type of paroxysmal dyskinesia, is a disorder characterized by recurrent, frequent attacks of involuntary movements and postures, including chorea and dystonia, induced by sudden voluntary movements, stress, or excitement (Swoboda et al., *Neurology*, 2000, 55, 224-30). The onset is in childhood or early adolescence, the frequency and severity diminish with age, and it responds to treatment with anticonvulsants. PKC occurs in familial and sporadic forms and affects more males than females. In most families it is inherited as an autosomal dominant trait with incomplete penetrance. The gene locus has been mapped to human chromosome 16q11-912 (Tomita et al. (1999) *Am. J. Hum. Genet.* 65, 1588-1697; Bennett et al. (2000) *Neurology* 54, 125-130).

An overlapping locus has been predicted to contain the gene for infantile convulsions with paroxysmal choreoathetosis (ICCA) (Lee et al. (1998) *Hum. Genet.* 103, 608-612). The ICCA syndrome is a neurological syndrome linked to the pericentromeric region of human chromosome 16, characterized by involuntary-movements disorder and attacks that occur spontaneously or are induced by a variety of stimuli.

The Applicants have further determined expression pattern of the ABCC11 gene by PCR and by EST database mining that suggests that the ABCC11 gene is expressed in tissues such as CNS and muscle which are potentially involved in the etiology of PKC.

25 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a nucleic acid of the human ABCC11 gene, which is likely to be involved in the transport of organic anion transporters, such as cysteinyl leukotriene, anionic drugs, such as methotrexate, as well as neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as glutathione (GSH), glucuronate, or sulfate, or in the pathology whose candidate chromosomal region is situated on chromosome 16, more precisely on the 16q arm and still more precisely in the 16q12 locus for paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

Thus, a first subject of the invention is a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

5

The invention also relates to a nucleic acid comprising at least 8 consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of a) any one of SEQ ID NOs: 1-30 or a complementary nucleotide sequence thereof.

5 The invention also relates to a nucleic acid having at least 80% nucleotide identity with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

10 The invention also relates to a nucleic acid having at least 85%, preferably 90%, more preferably 95% and still more preferably 98% nucleotide identity with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a nucleic acid hybridizing, under high stringency conditions, with a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

15 The invention also relates to a nucleic acid, particularly a cDNA molecule, which encodes the full length human ABCC11 protein. Thus, the invention relates to a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, or a complementary nucleotide sequence thereof.

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

20 According to the invention, a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, which encodes a full length ABCC11 polypeptide of 1382 amino acids comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 31.

Thus, the invention also relates to a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31.

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

The invention also relates to a polypeptide comprising an amino acid sequence as depicted in any one of SEQ ID NO: 31.

30 The invention also relates to a means for detecting polymorphisms in general, and mutations in particular, in the ABCC11 gene or in the corresponding proteins produced by the allelic form of these genes.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

6

According to another aspect, the invention also relates to the nucleotide sequences of ABCC11 gene comprising at least one biallelic polymorphism such as for example a substitution, addition or deletion of one or more nucleotides.

Nucleotide probes and primers hybridizing with a nucleic acid sequence located in the region of the ABCC11 nucleic acid (genomic DNA, messenger RNA, cDNA), in particular, a nucleic acid sequence comprising any one of the mutations or polymorphisms.

The nucleotide probes or primers according to the invention comprise at least 8 consecutive nucleotides of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

Preferably, nucleotide probes or primers according to the invention will have a length of 10, 12, 15, 18 or 20 to 25, 35, 40, 50, 70, 80, 100, 200, 500, 1000, 1500 consecutive nucleotides of a nucleic acid according to the invention, in particular of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

Alternatively, a nucleotide probe or primer according to the invention will consist of and/or comprise fragments having a length of 12, 15, 18, 20, 25, 35, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 consecutive nucleotides of a nucleic acid according to the invention, more particularly of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The definition of a nucleotide probe or primer according to the invention therefore covers oligonucleotides which hybridize, under the high stringency hybridization conditions defined above, with a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The nucleotide primers according to the invention may be used to amplify a nucleic acid according to the invention, and more particularly a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

Another subject of the invention relates to a method of amplifying a nucleic acid according to the invention, and more particularly a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, a complementary nucleotide sequence thereof, a nucleic acid as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof, contained in a sample, said method comprising the steps of:

a) bringing the sample in which the presence of the target nucleic acid is suspected into contact with a pair of nucleotide primers whose hybridization position is located respectively

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

7

on the 5' side and on the 3' side of the region of the target nucleic acid whose amplification is sought, in the presence of the reagents necessary for the amplification reaction; and

b) detecting the amplified nucleic acids.

The present invention also relates to a method of detecting the presence of a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof, or a nucleic acid fragment or variant of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof in a sample, said method comprising the steps of:

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

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

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

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

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

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

2) reagents necessary for an amplification reaction.

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

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

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

b) appropriate reagents necessary for a hybridisation reaction.

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

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

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

8

According to a specific embodiment of the detection kit described above, such a kit will comprise a plurality of oligonucleotide probes and/or primers in accordance with the invention which may be used to detect target nucleic acids of interest or alternatively to detect mutations in the coding regions or the non-coding regions of the nucleic acids according to the invention. According to preferred embodiment of the invention, the target nucleic acid comprises a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or of a complementary nucleic acid sequence. Alternatively, the target nucleic acid is a nucleic acid fragment or variant of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or of a complementary nucleotide sequence.

According to another preferred embodiment, a primer according to the invention comprises, generally, all or part of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary sequence thereof.

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

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

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

c) a nucleic acid having at least eight consecutive nucleotides of a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof;

d) a nucleic acid having at least 80% nucleotide identity with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof;

e) a nucleic acid having 85%, 90%, 95%, or 98% nucleotide identity with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof;

f) a nucleic acid hybridizing, under high stringency hybridization conditions, with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence; and

g) a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

9

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

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

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

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

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

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

The present invention also relates to a defective recombinant virus comprising a cDNA nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide involved in the transport of various substances, or in the pathology whose candidate chromosomal region is situated on chromosome 16, more precisely on the 16q arm and still more precisely in the 16q12 locus for paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

In another preferred embodiment of the invention, the defective recombinant virus comprises a gDNA nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide involved in paroxysmal kinesigenic choreoathetosis. Preferably, the ABCC11 polypeptide comprises amino acid sequence of SEQ ID NO: 31.

In another preferred embodiment, the invention relates to a defective recombinant virus comprising a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide under the control of a promoter chosen from RSV-LTR or the CMV early promoter.

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

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

10

example a smooth muscle tissue, the "naked" nucleic acid being absorbed by the cells of this tissue.

According to a specific embodiment of the invention, a composition is provided for the *in vivo* production of the ABCC11 protein. This composition comprises a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide placed under the control of appropriate regulatory sequences, in solution in a physiologically acceptable vehicle and/or excipient.

Therefore, the present invention also relates to a composition comprising a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 30, wherein the nucleic acid is placed under the control of appropriate regulatory elements.

Consequently, the invention also relates to a pharmaceutical composition intended for the prevention of or treatment of a patient or subject affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis comprising a nucleic acid encoding the ABCC11 protein, in combination with one or more physiologically compatible excipients.

Preferably, such a composition will comprise a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOS:1-30, wherein the nucleic acid is placed under the control of an appropriate regulatory element or signal.

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

The invention also relates to the use of a nucleic acid according to the invention encoding the ABCC11 protein for the manufacture of a medicament intended for the prevention of a pathology located on the chromosome locus 16q12, or more particularly for the treatment of subjects affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

The invention also relates to the use of a recombinant vector according to the invention comprising a nucleic acid encoding the ABCC11 protein for the manufacture of a medicament intended for the prevention of a pathology located on the chromosome locus 16q12 or more particularly for the treatment of subjects affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

The subject of the invention is therefore also a recombinant vector comprising a nucleic acid according to the invention that encodes the ABCC11 protein or polypeptide involved in the paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

11

The invention also relates to the use of such a recombinant vector for the preparation of a pharmaceutical composition intended for the treatment and/or for the prevention of diseases or conditions associated with deficiency of the ABCC11 gene and with a pathology located on the chromosome locus 16q12.

5 The present invention also relates to the use of cells genetically modified *ex vivo* with such a recombinant vector according to the invention, or cells producing a recombinant vector, wherein the cells are implanted in the body, to allow a prolonged and effective expression *in vivo* of any one biologically active ABCC11 polypeptide.

10 The invention also relates to the use of a nucleic acid according to the invention encoding the ABCC11 protein for the manufacture of a medicament intended for the prevention and/or the treatment of subjects affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

15 The invention also relates to the use of a recombinant vector according to the invention comprising a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide according to the invention for the manufacture of a medicament intended for the prevention and/or the treatment of subjects affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

20 The invention also relates to the use of a recombinant host cell according to the invention, comprising a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide according to the invention for the manufacture of a medicament intended for the prevention and/or the treatment of subjects affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

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

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

30 The present invention also relates to the use of cells genetically modified *ex vivo* with a virus according to the invention, or the use of cells producing such viruses, implanted in the

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

12

body, allowing a prolonged and effective expression *in vivo* a biologically active ABCC11 protein.

The present invention shows that it is possible to incorporate a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide according to the invention into a viral vector, and that these vectors make it possible to effectively express a biologically active, mature polypeptide. More particularly, the invention shows that the *in vivo* expression of the ABCC11 protein may be obtained by direct administration of an adenovirus or by implantation of a producing cell or of a cell genetically modified by an adenovirus or by a retrovirus incorporating such a nucleic acid.

In this regard, another subject of the invention relates to any mammalian cell infected with one or more defective recombinant viruses according to the invention. More particularly, the invention relates to any population of human cells infected with these viruses. These may be in particular cells of blood origin (totipotent stem cells or precursors), fibroblasts, myoblasts, hepatocytes, keratinocytes, smooth muscle and endothelial cells, glial cells and the like.

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

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

The invention also relates to a recombinant host cell comprising a nucleic acid of the invention, and more particularly, a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NO: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a recombinant host cell comprising a nucleic acid of the invention, and more particularly a nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted in any one SEQ ID NOS: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

According to another aspect, the invention also relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector according to the invention. Therefore, the invention also relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector comprising any of the

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

13

nucleic acids of the invention, and more particularly a nucleic acid comprising any one nucleotide sequence of SEQ ID NOS: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

Specifically, the invention relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector comprising a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOS: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector comprising a nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted in any one of SEQ ID NOS: 1-30, or of a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector comprising a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31.

The invention also relates to a method for the production of a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NOS: 31, or of a peptide fragment or a variant thereof, said method comprising the steps of:

- a) inserting a nucleic acid encoding said polypeptide into an appropriate vector;
- b) culturing, in an appropriate culture medium, a previously transformed host cell or transfecting a host cell with the recombinant vector of step a);
- c) recovering the conditioned culture medium or lysing the host cell, for example by sonication or by osmotic shock;
- d) separating and purifying said polypeptide from said culture medium or alternatively from the cell lysates obtained in step c); and
- e) where appropriate, characterizing the recombinant polypeptide produced.

A polypeptide termed "homologous" to a polypeptide having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31 also forms part of the invention. Such a homologous polypeptide comprises an amino acid sequence possessing one or more substitutions of an amino acid by an equivalent amino acid.

The ABC11 polypeptide according to the invention, in particular 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31, or 3) a polypeptide termed "homologous" to a polypeptide comprising amino acid sequence of SEQ ID NO: 30.

In a specific embodiment, an antibody according to the invention is directed against 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31,

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

14

or 3) a polypeptide termed "homologous" to a polypeptide comprising amino acid sequence of SEQ ID NO: 31. Such antibody is produced by using the trioma technique or the hybridoma technique described by Kozbor et al. (*Immunology Today* (1983) 4:72).

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

a) bringing the sample to be tested into contact with an antibody directed against 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NOs: 31, 3) a
 10 polypeptide termed "homologous" to a polypeptide comprising amino acid sequence of SEQ ID NO: 31, and

b) detecting the antigen/antibody complex formed.

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

15 a) an antibody directed against 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of any one of SEQ ID NOs: 31, or 3) a polypeptide "homologous" to a polypeptide comprising amino acid sequence of SEQ ID NO: 31, and

b) a reagent allowing the detection of the antigen/antibody complexes formed.

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

The invention also provides pharmaceutical compositions comprising a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide according to the invention and pharmaceutical compositions comprising the ABCC11 polypeptide according to the invention intended for the
 25 treatment of a pathology located on the chromosome locus 16q12, such as the paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

The present invention also relates to a new therapeutic approach for the treatment of pathologies located on the chromosome locus 16q12, such as the paroxysmal kinesigenic choreoathetosis, comprising transferring and expressing *in vivo* a nucleic acid encoding the
 30 ABCC11 protein according to the invention.

Thus, the present invention offers a new approach for the treatment and/or prevention of pathologies located on the chromosome locus 16q12, such as the paroxysmal kinesigenic

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

15

choreoathetosis in a patient or subject. Specifically, the present invention provides methods to restore or promote the deficiency of the gene causing such pathology.

Consequently, the invention also relates to a pharmaceutical composition intended for the prevention and/or treatment of subjects affected by, a dysfunction of the gene located on the chromosome locus 16q12, such as paroxysmal kinesigenic choreoathetosis, comprising a nucleic acid encoding the ABCC11 protein, in combination with one or more physiologically compatible vehicle and/or excipient.

According to a specific embodiment of the invention, a composition is provided for the *in vivo* production of the ABCC11 protein. This composition comprises a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide placed under the control of appropriate regulatory sequences, in solution in a physiologically compatible vehicle and/or excipient.

Therefore, the present invention also relates to a composition comprising a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NOs: 31, wherein the nucleic acid is placed under the control of appropriate regulatory elements.

Preferably, such a composition will comprise a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, placed under the control of appropriate regulatory elements.

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

According to another aspect, the subject of the invention is also a preventive or curative therapeutic method of treating diseases caused by a deficiency of the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH, glucuronate, or sulfate, such a method comprising administering to a patient a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide according to the invention, said nucleic acid being combined with one or more physiologically appropriate vehicles and/or excipients.

The invention relates to a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of a patient or subject affected by a dysfunction of the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH, glucuronate, or sulfate comprising a therapeutically effective quantity of a polypeptide having

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

16

an amino acid sequence of SEQ ID NOs: 31, combined with one or more physiologically appropriate vehicles and/or excipients.

The invention also relates to a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of PKC comprising a therapeutically effective quantity of a polypeptide having an amino acid sequence of SEQ ID NOs: 31, combined with one or more physiologically appropriate vehicles and/or excipients.

The invention also relates to a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of PKC, such a method comprising administering to a patient a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide according to the invention, said nucleic acid being combined with one or more physiologically appropriate vehicles and/or excipients.

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

According to yet another aspect, the subject of the invention is also a preventive or curative therapeutic method of treating diseases caused by a deficiency of the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH, glucuronate, or sulfate, such a method comprising administering to a patient a therapeutically effective quantity of the ABCC11 polypeptide according to the invention, said polypeptide being combined with one or more physiologically appropriate vehicles and/or excipients.

The invention also provides methods for screening small molecules and compounds that act on the ABCC11 protein to identify agonists and antagonists of such polypeptides that can restore or promote improved the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH, glucuronate, or sulfate to effectively cure and or prevent dysfunctions thereof. These methods are useful to identify small molecules and compounds for therapeutic use in the treatment of diseases due to a deficiency of the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH conjugated drugs, glucuronate, or sulfate.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

17

Therefore, the invention also relates to the use of the ABCC11 polypeptide or a cell expressing the ABCC11 polypeptide according to the invention, for screening active ingredients for the prevention and/or treatment of diseases resulting from a dysfunction of the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH conjugated drugs, glucuronate, or sulfate.

The invention also relates to a method of screening a compound or small molecule, an agonist or antagonist of the ABCC11 polypeptide, said method comprising the following steps:

- a) preparing a membrane vesicle comprising the ABCC11 polypeptide and a lipid substrate comprising a detectable marker;
- b) incubating the vesicle obtained in step a) with an agonist or antagonist candidate compound;
- c) qualitatively and/or quantitatively measuring release of the lipid substrate comprising a detectable marker; and
- d) comparing the release measurement obtained in step b) with a measurement of release of a labelled lipid substrate by a vesicle that has not been previously incubated with the agonist or antagonist candidate compound.

In a first specific embodiment, the ABCC11 polypeptide comprises SEQ ID NOs: 31, respectively.

The invention also relates to a method of screening a compound or small molecule, an agonist or antagonist of the ABCC11 polypeptide, said method comprising the following steps:

- a) obtaining a cell, for example a cell line, that, either naturally or after transfecting the cell with the ABCC11 encoding nucleic acid, expressing the corresponding ABCC11 polypeptide;
- b) incubating the cell of step a) in the presence of an anion labelled with a detectable marker;
- c) washing the cell of step b) in order to remove the excess of the labelled anion which has not penetrated into these cells;
- d) incubating the cell obtained in step c) with an agonist or antagonist candidate compound for the the ABCC11 polypeptide;
- e) measuring efflux of the labelled anion; and

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

18

f) comparing the value of efflux of the labelled anion determined in step e) with a value of efflux of a labelled anion measured with cell which has not been previously incubated in the presence of the agonist or antagonist candidate compound for the ABCC11 polypeptide.

5 In a specific embodiment, the ABCC11 polypeptide comprises SEQ ID NO: 30.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

10 Figure 1: represents the alignment of ABCC11, ABCC12, and ABCC5 proteins. Identical amino acids are shaded, gaps are indicated by periods. Walker A and B motifs and the ABC transporter family signature sequence C are underlined and labelled with respective letters. Amino acid sequences were aligned with the PILEUP program in the Genetics Computer Group Package. Potential transmembrane spanning segments are given an bold type.

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

25 Figure 3: represents the expression profiling of the human ABCC11 genes by PCR on human Multiple Tissue cDNA (MTC[®], Clontech). Each lane contains normalized, first-strand cDNA from 16 human tissues/cells. Lanes 1-16 thus represent cDNA from heart, brain, placenta, lung, liver, muscle, kidney, pancreas, spleen, thymus, testes, ovary, intestine, colon, leukocyte, and prostate, respectively. N represents the negative control ; M represents the marker lane (1kb Plus DNA Ladder). The following primer pairs amplified specific gene products: ABCC11: forward 5'-AGA ATG GCT GTG AAG GCT CAG CAT C-3', reverse 5'-GTT CCT CTC CAG CTC CAG TGC-3'.

30

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

19

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

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

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

GENERAL DEFINITIONS

The present invention contemplates isolation of a human gene encoding ABCC11 polypeptide of the invention, including a full length, or naturally occurring form of ABCC11 and any antigenic fragments thereof from any animal, particularly mammalian or avian, and more particularly human source.

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

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

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

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

21

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

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

Accordingly, the term "sequence similarity" in all its grammatical forms refers to the degree of identity or correspondence between nucleic acid or amino acid sequences of proteins that may or may not share a common evolutionary origin (see Reeck et al., *supra*). However, in common usage and in the instant application, the term "homologous," when modified with an adverb such as "highly," may refer to sequence similarity and not a common evolutionary origin.

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

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

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

22

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

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

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

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

By way of illustration, it will be possible to produce the percentage sequence identity with the aid of the BLAST software (versions BLAST 1.4.9 of March 1996, BLAST 2.0.4 of
20 February 1998 and BLAST 2.0.6 of September 1998), using exclusively the default parameters (Altschul et al, 1990, . Mol. Biol., 215:403-410; Altschul et al, 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402). Blast searches for sequences similar/homologous to a reference "request" sequence, with the aid of the Altschul et al. algorithm. The request sequence and the databases used may be of the peptide or nucleic types, any combination being possible.

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

A gene encoding the ABCC11 polypeptide of the invention, whether genomic DNA or
30 cDNA, can be isolated from any source, particularly from a human cDNA or genomic library. Methods for obtaining genes are well known in the art, as described above (*see, e.g.*,

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

23

Sambrook et al., 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York).

Accordingly, any animal cell potentially can serve as the nucleic acid source for the molecular cloning of the ABCC11 gene. The DNA may be obtained by standard procedures known in the art from cloned DNA (e.g., a DNA "library"), and preferably is obtained from a cDNA library prepared from tissues with high level expression of the protein and/or the transcripts, by chemical synthesis, by cDNA cloning, or by the cloning of genomic DNA, or fragments thereof, purified from the desired cell (See, for example, Sambrook et al., 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York; Glover, 1985, *DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II Oligonucleotide Synthesis*, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K).

Clones derived from genomic DNA may contain regulatory and intron DNA regions in addition to coding regions; clones derived from cDNA will not contain intron sequences. Whatever the source, the gene should be molecularly cloned into a suitable vector for propagation of the gene.

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

Once the DNA fragments are generated, identification of the specific DNA fragment containing the desired ABCC11 gene may be accomplished in a number of ways. For example, if an amount of a portion of the ABCC11 gene or its specific RNA, or a fragment thereof, is available and can be purified and labelled, the generated DNA fragments may be screened by nucleic acid hybridization to the labelled probe (Benton and Davis, *Science* (1977), 196:180; Grunstein et al., *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1975) 72:3961). For example, a set of oligonucleotides corresponding to the partial coding sequence information obtained for the ABCC11 protein can be prepared and used as probes for DNA encoding the ABCC11, as was done in a specific example, *infra*, or as primers for cDNA or mRNA (e.g., in combination with a poly-T primer for RT-PCR). Preferably, a fragment is selected that is

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

24

highly unique to the ABCC11 nucleic acid or polypeptide of the invention. Those DNA fragments with substantial homology to the probe will hybridize. As noted above, the greater the degree of homology, the more stringent hybridization conditions can be used. In a specific embodiment, various stringency hybridization conditions are used to identify homologous

5 ABCC11 gene.

Further selection can be carried out on the basis of the properties of the gene, *e.g.*, if the gene encodes a protein product having the isoelectric, electrophoretic, amino acid composition, or partial amino acid sequence of the ABCC11 protein as disclosed herein. Thus, the presence of the gene may be detected by assays based on the physical, chemical, or

10 immunological properties of its expressed product. For example, cDNA clones, or DNA clones which hybrid-select the proper mRNAs, can be selected which produce a protein that, *e.g.*, has similar or identical electrophoretic migration, isoelectric focusing or non-equilibrium pH gel electrophoresis behaviour, proteolytic digestion maps, or antigenic properties as known for ABCC11.

15 ABCC11 gene of the invention may also be identified by mRNA selection, *i.e.*, by nucleic acid hybridization followed by *in vitro* translation. According to this procedure, nucleotide fragments are used to isolate complementary mRNAs by hybridization. Such DNA fragments may represent available, purified ABCC11 DNA, or may be synthetic oligonucleotides designed from the partial coding sequence information.

20 Immunoprecipitation analysis or functional assays (*e.g.*, tyrosine phosphatase activity) of the *in vitro* translation products of the products of the isolated mRNAs identifies the mRNA and, therefore, the complementary DNA fragments, that contain the desired sequences. In addition, specific mRNAs may be selected by adsorption of polysomes isolated from cells to immobilized antibodies specifically directed against the ABCC11 polypeptide of the

25 invention.

A radiolabeled ABCC11 cDNA can be synthesized using the selected mRNA (from the adsorbed polysomes) as a template. The radiolabeled mRNA or cDNA may then be used as a probe to identify homologous ABCC11 DNA fragments from among other genomic DNA fragments.

30 "Variant" of a nucleic acid according to the invention will be understood to mean a nucleic acid which differs by one or more bases relative to the reference polynucleotide. A variant nucleic acid may be of natural origin, such as an allelic variant which exists naturally, or it may also be a nonnatural variant obtained, for example, by mutagenic techniques.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

25

In general, the differences between the reference (generally, wild-type) nucleic acid and the variant nucleic acid are small such that the nucleotide sequences of the reference nucleic acid and of the variant nucleic acid are very similar and, in many regions, identical. The nucleotide modifications present in a variant nucleic acid may be silent, which means that they do not alter the amino acid sequences encoded by said variant nucleic acid.

However, the changes in nucleotides in a variant nucleic acid may also result in substitutions, additions or deletions in the polypeptide encoded by the variant nucleic acid in relation to the polypeptides encoded by the reference nucleic acid. In addition, nucleotide modifications in the coding regions may produce conservative or non-conservative substitutions in the amino acid sequence of the polypeptide.

Preferably, the variant nucleic acids according to the invention encode polypeptides which substantially conserve the same function or biological activity as the polypeptide of the reference nucleic acid or alternatively the capacity to be recognized by antibodies directed against the polypeptides encoded by the initial reference nucleic acid.

Some variant nucleic acids will thus encode mutated forms of the polypeptides whose systematic study will make it possible to deduce structure-activity relationships of the proteins in question. Knowledge of those variants in relation to the disease studied is essential since it makes it possible to understand the molecular cause of the pathology.

"Fragment" will be understood to mean a nucleotide sequence of reduced length relative to the reference nucleic acid and comprising, over the common portion, a nucleotide sequence identical to the reference nucleic acid. Such a nucleic acid "fragment" according to the invention may be, where appropriate, included in a larger polynucleotide of which it is a constituent. Such fragments comprise, or alternatively consist of, oligonucleotides ranging in length from 8, 10, 12, 15, 18, 20 to 25, 30, 40, 50, 70, 80, 100, 200, 500, 1000 or 1500 consecutive nucleotides of a nucleic acid according to the invention.

A "nucleic acid molecule" refers to the phosphate ester polymeric form of ribonucleosides (adenosine, guanosine, uridine or cytidine; "RNA molecules") or deoxyribonucleosides (deoxyadenosine, deoxyguanosine, deoxythymidine, or deoxycytidine; "DNA molecules"), or any phosphoester analogs thereof, such as phosphorothioates and thioesters, in either single stranded form, or a double-stranded helix. Double stranded DNA-DNA, DNA-RNA and RNA-RNA helices are possible. The term nucleic acid molecule, and in particular DNA or RNA molecule, refers only to the primary and secondary structure of the molecule, and does not limit it to any particular tertiary forms. Thus, this term includes

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

26

double-stranded DNA found, *inter alia*, in linear or circular DNA molecules (*e.g.*, restriction fragments), plasmids, and chromosomes. In discussing the structure of particular double-stranded DNA molecules, sequences may be described herein according to the normal convention of giving only the sequence in the 5' to 3' direction along the nontranscribed strand of DNA (*i.e.*, the strand having a sequence homologous to the mRNA). A
5 "recombinant DNA molecule" is a DNA molecule that has undergone a molecular biological manipulation.

A nucleic acid molecule is "hybridizable" to another nucleic acid molecule, such as a cDNA, genomic DNA, or RNA, when a single stranded form of the nucleic acid molecule can
10 anneal to the other nucleic acid molecule under the appropriate conditions of temperature and solution ionic strength (*see* Sambrook et al., *supra*). The conditions of temperature and ionic strength determine the "stringency" of the hybridization. For preliminary screening for homologous nucleic acids, low stringency hybridization conditions, corresponding to a T_m of 55°, can be used, *e.g.*, 5x SSC, 0.1% SDS, 0.25% milk, and no formamide; or 30%
15 formamide, 5x SSC, 0.5% SDS. Moderate stringency hybridization conditions correspond to a higher T_m , *e.g.*, 40% formamide, with 5x or 6x SSC. High stringency hybridization conditions correspond to the highest T_m , *e.g.*, 50% formamide, 5x or 6x SSC. Hybridization requires that the two nucleic acids contain complementary sequences, although depending on the stringency of the hybridization, mismatches between bases are possible. The appropriate
20 stringency for hybridizing nucleic acids depends on the length of the nucleic acids and the degree of complementation, variables well known in the art. The greater the degree of similarity or homology between two nucleotide sequences, the greater the value of T_m for hybrids of nucleic acids having those sequences. The relative stability (corresponding to higher T_m) of nucleic acid hybridizations decreases in the following order: RNA:RNA,
25 DNA:RNA, DNA:DNA. For hybrids of greater than 100 nucleotides in length, equations for calculating T_m have been derived (*see* Sambrook et al., *supra*). For hybridization with shorter nucleic acids, *i.e.*, oligonucleotides, the position of mismatches becomes more important, and the length of the oligonucleotide determines its specificity (*see* Sambrook et al., *supra*). Preferably a minimum length for a hybridizable nucleic acid is at least about 10 nucleotides;
30 preferably at least about 15 nucleotides; and more preferably the length is at least about 20 nucleotides.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

27

In a specific embodiment, the term "standard hybridization conditions" refers to a T_m of 55°C, and utilizes conditions as set forth above. In a preferred embodiment, the T_m is 60°C; in a more preferred embodiment, the T_m is 65°C.

"High stringency hybridization conditions" for the purposes of the present invention will be understood to mean the following conditions:

1- Membrane competition and PREHYBRIDIZATION:

- Mix: 40 μ l salmon sperm DNA (10 mg/ml)
- + 40 μ l human placental DNA (10 mg/ml)
- Denature for 5 minutes at 96°C, then immerse the mixture in ice.
- Remove the 2X SSC and pour 4 ml of formamide mix in the hybridization tube containing the membranes.
- Add the mixture of the two denatured DNAs.
- Incubation at 42°C for 5 to 6 hours, with rotation.

2- Labeled probe competition:

- Add to the labeled and purified probe 10 to 50 μ l Cot I DNA, depending on the quantity of repeats.
- Denature for 7 to 10 minutes at 95°C.
- Incubate at 65°C for 2 to 5 hours.

20

3- HYBRIDIZATION:

- Remove the prehybridization mix.
- Mix 40 μ l salmon sperm DNA + 40 μ l human placental DNA; denature for 5 min at 96°C, then immerse in ice.
- Add to the hybridization tube 4 ml of formamide mix, the mixture of the two DNAs and the denatured labeled probe/Cot I DNA.
- Incubate 15 to 20 hours at 42°C, with rotation.

4- Washes and Exposure:

- One wash at room temperature in 2X SSC, to rinse.
- Twice 5 minutes at room temperature 2X SSC and 0.1% SDS at 65°C.
- Twice 15 minutes 0.1X SSC and 0.1% SDS at 65°C.
- Envelope the membranes in clear plastic wrap and expose.

30

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

28

The hybridization conditions described above are adapted to hybridization, under high stringency conditions, of a molecule of nucleic acid of varying length from 20 nucleotides to several hundreds of nucleotides. It goes without saying that the hybridization conditions described above may be adjusted as a function of the length of the nucleic acid whose hybridization is sought or of the type of labeling chosen, according to techniques known to one skilled in the art. Suitable hybridization conditions may, for example, be adjusted according to the teaching contained in the manual by Hames and Higgins (1985, *supra*).

As used herein, the term "oligonucleotide" refers to a nucleic acid, generally of at least 15 nucleotides, that is hybridizable to a nucleic acid according to the invention. Oligonucleotides can be labelled, e.g., with ^{32}P -nucleotides or nucleotides to which a label, such as biotin, has been covalently conjugated. In one embodiment, a labeled oligonucleotide can be used as a probe to detect the presence of a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide of the invention. In another embodiment, oligonucleotides (one or both of which may be labelled) can be used as PCR primers, either for cloning full lengths or fragments of the ABCC11 nucleic acid, or to detect the presence of a nucleic acid encoding the ABCC11 protein. In a further embodiment, an oligonucleotide of the invention can form a triple helix with the ABCC11 DNA molecule. Generally, oligonucleotides are prepared synthetically, preferably on a nucleic acid synthesizer. Accordingly, oligonucleotides can be prepared with non-naturally occurring phosphoester analog bonds, such as thioester bonds, etc.

"Homologous recombination" refers to the insertion of a foreign DNA sequence of a vector in a chromosome. Preferably, the vector targets a specific chromosomal site for homologous recombination. For specific homologous recombination, the vector will contain sufficiently long regions of homology to sequences of the chromosome to allow complementary binding and incorporation of the vector into the chromosome. Longer regions of homology, and greater degrees of sequence similarity, may increase the efficiency of homologous recombination.

A DNA "coding sequence" is a double-stranded DNA sequence which is transcribed and translated into a polypeptide in a cell *in vitro* or *in vivo* when placed under the control of appropriate regulatory sequences. The boundaries of the coding sequence are determined by a start codon at the 5' (amino) terminus and a translation stop codon at the 3' (carboxyl) terminus. A coding sequence can include, but is not limited to, prokaryotic sequences, cDNA from eukaryotic mRNA, genomic DNA sequences from eukaryotic (e.g., mammalian) DNA, and even synthetic DNA sequences. If the coding sequence is intended for expression in a

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

29

eukaryotic cell, a polyadenylation signal and transcription termination sequence will usually be located 3' to the coding sequence.

Transcriptional and translational control sequences are DNA regulatory sequences, such as promoters, enhancers, terminators, and the like, that provide for the expression of a coding sequence in a host cell. In eukaryotic cells, polyadenylation signals are control sequences.

"Regulatory region" means a nucleic acid sequence which regulates the expression of a nucleic acid. A regulatory region may include sequences which are naturally responsible for expressing a particular nucleic acid (a homologous region) or may include sequences of a different origin (responsible for expressing different proteins or even synthetic proteins). In particular, the sequences can be sequences of eukaryotic or viral genes or derived sequences which stimulate or repress transcription of a gene in a specific or non-specific manner and in an inducible or non-inducible manner. Regulatory regions include origins of replication, RNA splice sites, enhancers, transcriptional termination sequences, signal sequences which direct the polypeptide into the secretory pathways of the target cell, and promoters.

A regulatory region from a "heterologous source" is a regulatory region which is not naturally associated with the expressed nucleic acid. Included among the heterologous regulatory regions are regulatory regions from a different species, regulatory regions from a different gene, hybrid regulatory sequences, and regulatory sequences which do not occur in nature, but which are designed by one having ordinary skill in the art.

A "cassette" refers to a segment of DNA that can be inserted into a vector at specific restriction sites. The segment of DNA encodes a polypeptide of interest, and the cassette and restriction sites are designed to ensure insertion of the cassette in the proper reading frame for transcription and translation.

A "promoter sequence" is a DNA regulatory region capable of binding RNA polymerase in a cell and initiating transcription of a downstream (3' direction) coding sequence. For purposes of defining the present invention, the promoter sequence is bounded at its 3' terminus by the transcription initiation site and extends upstream (5' direction) to include the minimum number of bases or elements necessary to initiate transcription at levels detectable above background. Within the promoter sequence will be found a transcription initiation site (conveniently defined for example, by mapping with nuclease S1), as well as protein binding domains (consensus sequences) responsible for the binding of RNA polymerase.

WO 02/072632

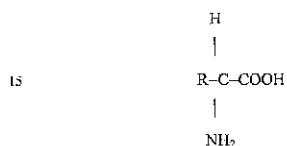
PCT/EP02/03241

30

A coding sequence is "under the control" of transcriptional and translational control sequences in a cell when RNA polymerase transcribes the coding sequence into mRNA, which is then trans-RNA spliced and translated into the protein encoded by the coding sequence.

5 A "signal sequence" is included at the beginning of the coding sequence of a protein to be expressed on the surface of a cell. This sequence encodes a signal peptide, N-terminal to the mature polypeptide, that directs the host cell to translocate the polypeptide. The term "translocation signal sequence" is used herein to refer to this sort of signal sequence. Translocation signal sequences can be found associated with a variety of proteins native to
10 eukaryotes and prokaryotes, and are often functional in both types of organisms.

A "polypeptide" is a polymeric compound comprised of covalently linked amino acid residues. Amino acids have the following general structure:



Amino acids are classified into seven groups on the basis of the side chain R: (1) aliphatic side chains, (2) side chains containing a hydroxylic (OH) group, (3) side chains containing sulfur atoms, (4) side chains containing an acidic or amide group, (5) side chains containing a basic group, (6) side chains containing an aromatic ring, and (7) proline, an imino acid in which the side chain is fused to the amino group.

A "protein" is a polypeptide which plays a structural or functional role in a living cell.

25 The polypeptides and proteins of the invention may be glycosylated or unglycosylated.

"Homology" means similarity of sequence reflecting a common evolutionary origin. Polypeptides or proteins are said to have homology, or similarity, if a substantial number of their amino acids are either (1) identical, or (2) have a chemically similar R side chain. Nucleic acids are said to have homology if a substantial number of their nucleotides are
30 identical.

"Isolated polypeptide" or "isolated protein" is a polypeptide or protein which is substantially free of those compounds that are normally associated therewith in its natural

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

31

state (e.g., other proteins or polypeptides, nucleic acids, carbohydrates, lipids). "Isolated" is not meant to exclude artificial or synthetic mixtures with other compounds, or the presence of impurities which do not interfere with biological activity, and which may be present, for example, due to incomplete purification, addition of stabilizers, or compounding into a pharmaceutically acceptable preparation.

"Fragment" of a polypeptide according to the invention will be understood to mean a polypeptide whose amino acid sequence is shorter than that of the reference polypeptide and which comprises, over the entire portion with those reference polypeptides, an identical amino acid sequence. Such fragments may, where appropriate, be included in a larger polypeptide of which they are a part. Such fragments of a polypeptide according to the invention may have a length of 5, 10, 15, 20, 30 to 40, 50, 100, 200 or 300 amino acids.

"Variant" of a polypeptide according to the invention will be understood to mean mainly a polypeptide whose amino acid sequence contains one or more substitutions, additions or deletions of at least one amino acid residue, relative to the amino acid sequence of the reference polypeptide, it being understood that the amino acid substitutions may be either conservative or nonconservative.

A "variant" of a polypeptide or protein is any analogue, fragment, derivative, or mutant which is derived from a polypeptide or protein and which retains at least one biological property of the polypeptide or protein. Different variants of the polypeptide or protein may exist in nature. These variants may be allelic variations characterized by differences in the nucleotide sequences of the structural gene coding for the protein, or may involve differential splicing or post-translational modification. Variants also include a related protein having substantially the same biological activity, but obtained from a different species.

The skilled artisan can produce variants having single or multiple amino acid substitutions, deletions, additions, or replacements. These variants may include, *inter alia*: (a) variants in which one or more amino acid residues are substituted with conservative or non-conservative amino acids, (b) variants in which one or more amino acids are added to the polypeptide or protein, (c) variants in which one or more of the amino acids includes a substituent group, and (d) variants in which the polypeptide or protein is fused with another polypeptide such as serum albumin. The techniques for obtaining these variants, including genetic (suppressions, deletions, mutations, etc.), chemical, and enzymatic techniques, are known to persons having ordinary skill in the art.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

32

If such allelic variations, analogues, fragments, derivatives, mutants, and modifications, including alternative mRNA splicing forms and alternative post-translational modification forms result in derivatives of the polypeptide which retain any of the biological properties of the polypeptide, they are intended to be included within the scope of this invention.

A "vector" is a replicon, such as plasmid, virus, phage or cosmid, to which another DNA segment may be attached so as to bring about the replication of the attached segment. A "replicon" is any genetic element (e.g., plasmid, chromosome, virus) that functions as an autonomous unit of DNA replication *in vivo*, *i.e.*, capable of replication under its own control.

The present invention also relates to cloning vectors containing a gene encoding analogs and derivatives of the ABCC11 polypeptide of the invention. The production and use of derivatives and analogs related to the ABCC11 protein are within the scope of the present invention. In a specific embodiment, the derivatives or analogs are functionally active, *i.e.*, capable of exhibiting one or more functional activities associated with a full-length, wild-type ABCC11 polypeptide of the invention.

ABCC11 derivatives can be made by altering encoding nucleic acid sequences by substitutions, additions or deletions that provide for functionally equivalent molecules. Preferably, derivatives are made that have enhanced or increased functional activity relative to native ABCC11. Alternatively, such derivatives may encode soluble fragments of the ABCC11 extracellular domains that have the same or greater affinity for the natural ligand of ABCC11 polypeptide of the invention. Such soluble derivatives may be potent inhibitors of ligand binding to ABCC11.

Due to the degeneracy of nucleotide coding sequences, other DNA sequences which encode substantially same amino acid sequences as that of ABCC11 gene may be used in the practice of the present invention. These include but are not limited to allelic genes, homologous genes from other species, and nucleotide sequences comprising all or portions of ABCC11 gene which are altered by the substitution of different codons that encode the same amino acid residue within the sequence, thus producing a silent change. Likewise, the ABCC11 derivatives of the invention include, but are not limited to those containing, as a primary amino acid sequence, all or part of the amino acid sequence of the ABCC11 protein including altered sequences in which functionally equivalent amino acid residues are substituted for residues within the sequence resulting in a conservative amino acid substitution. For example, one or more amino acid residues within the sequence can be

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

33

substituted by another amino acid of a similar polarity, which acts as a functional equivalent, resulting in a silent alteration. Substitutes for an amino acid within the sequence may be selected from other members of the class to which the amino acid belongs. For example, the nonpolar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan and methionine. Amino acids containing aromatic ring structures are phenylalanine, tryptophan, and tyrosine. The polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include arginine, lysine and histidine. The negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid. Such alterations will not be expected to affect apparent molecular weight as determined by polyacrylamide gel electrophoresis, or isoelectric point.

Particularly preferred substitutions are:

- Lys for Arg and vice versa such that a positive charge may be maintained;
- Glu for Asp and vice versa such that a negative charge may be maintained;
- Ser for Thr such that a free -OH can be maintained; and
- Gln for Asn such that a free CONH₂ can be maintained.

Amino acid substitutions may also be introduced to substitute an amino acid with a particularly preferable property. For example, a Cys may be introduced as a potential site for disulfide bridges with another Cys. A His may be introduced as a particularly "catalytic" site (i.e., His can act as an acid or base and is the most common amino acid in biochemical catalysis). Pro may be introduced because of its particularly planar structure, which induces α -turns in the protein's structure.

The genes encoding ABCC11 derivatives and analogs of the invention can be produced by various methods known in the art. The manipulations which result in their production can occur at the gene or protein level. For example, the cloned ABCC11 sequence can be modified by any of numerous strategies known in the art (Sambrook et al., 1989, *supra*). The sequence can be cleaved at appropriate sites with restriction endonuclease(s), followed by further enzymatic modification if desired, isolated, and ligated *in vitro*. Production of a gene encoding a derivative or analog of any one of the ABCC11 and ABCC12, should ensure that the modified gene remains within the same translational reading frame as the ABCC11 gene, uninterrupted by translational stop signals, in the region where the desired activity is encoded.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

34

Additionally, the ABCC11-encoding nucleic acid can be mutated *in vitro* or *in vivo*, to create and/or destroy translation, initiation, and/or termination sequences, or to create variations in coding regions and/or form new restriction endonuclease sites or destroy pre-existing ones, to facilitate further *in vitro* modification. Preferably, such mutations enhance the functional activity of the mutated ABCC11 gene products. Any technique for mutagenesis known in the art may be used, including *inter alia*, *in vitro* site-directed mutagenesis (Hutchinson et al., (1978) Biol. Chem. 253:6551; Zoller and Smith, (1984) DNA, 3:479-488; Oliphant et al., (1986) Gene 44:177; Hutchinson et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:710; Huygen et al., (1996) Nature Medicine, 2(8):893-898) and use of TAB® linkers (Pharmacia). PCR techniques are preferred for site-directed mutagenesis (Higuchi, 1989, "Using PCR to Engineer DNA", in PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Press, Chapter 6, pp. 61-70).

Identified and isolated ABCC11 gene may then be inserted into an appropriate cloning vector. A large number of vector-host systems known in the art may be used. Possible vectors include, but are not limited to, plasmids or modified viruses, but the vector system must be compatible with the host cell used. Examples of vectors include, but are not limited to, *Escherichia coli*, bacteriophages such as lambda derivatives, or plasmids such as pBR322 derivatives or pUC plasmid derivatives, *e.g.*, pGEX vectors, pmal-c, pFLAG, etc. The insertion into a cloning vector can, for example, be accomplished by ligating the DNA fragment into a cloning vector which has complementary cohesive termini. However, if the complementary restriction sites used to fragment the DNA are not present in the cloning vector, the ends of the DNA molecules may be enzymatically modified. Alternatively, any site desired may be produced by ligating nucleotide sequences (linkers) onto the DNA termini; these ligated linkers may comprise specific chemically synthesized oligonucleotides encoding restriction endonuclease recognition sequences. Recombinant molecules can be introduced into host cells via transformation, transfection, infection, electroporation, etc., so that many copies of the gene sequence are generated. Preferably, the cloned gene is contained on a shuttle vector plasmid, which provides for expansion in a cloning cell, *e.g.*, *Escherichia coli*, and facile purification for subsequent insertion into an appropriate expression cell line, if such is desired. For example, a shuttle vector, which is a vector that can replicate in more than one type of organism, can be prepared for replication in both *Escherichia coli* and *Saccharomyces*

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

35

cerevisiae by linking sequences from an *Escherichia coli* plasmid with sequences from the yeast 2 μ plasmid.

In an alternative method, the desired gene may be identified and isolated after insertion into a suitable cloning vector in a "shot gun" approach. Enrichment for the desired gene, for example, by size fractionation, can be done before insertion into the cloning vector.

The nucleotide sequence coding for the ABCC11 polypeptide or antigenic fragments, derivatives or analogs thereof, or functionally active derivatives, including chimeric proteins thereof, may be inserted into an appropriate expression vector, *e.g.*, a vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted protein-coding sequence. Such elements are termed herein a "promoter." Thus, nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide of the invention are operationally associated with a promoter in an expression vector of the invention. Both cDNA and genomic sequences can be cloned and expressed under control of such regulatory sequences. An expression vector also preferably includes a replication origin.

The necessary transcriptional and translational signals can be provided on a recombinant expression vector, or they may be supplied by a native gene encoding ABCC11 and/or its flanking regions.

Potential host-vector systems include but are not limited to mammalian cell systems infected with virus (*e.g.*, vaccinia virus, adenovirus, etc.); insect cell systems infected with virus (*e.g.*, baculovirus); microorganisms such as yeast containing yeast vectors; or bacteria transformed with bacteriophage, DNA, plasmid DNA, or cosmid DNA. The expression elements of vectors vary in their strengths and specificities. Depending on the host-vector system utilized, any one of a number of suitable transcription and translation elements may be used.

A recombinant ABCC11 protein of the invention, or functional fragments, derivatives, chimeric constructs, or analogs thereof, may be expressed chromosomally, after integration of the coding sequence by recombination. In this regard, any of a number of amplification systems may be used to achieve high levels of stable gene expression (*See* Sambrook et al., 1989, *supra*).

The cell into which the recombinant vector comprising the nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide according to the invention is cultured in an appropriate cell culture medium under conditions that provide for expression of the ABCC11 polypeptide by the cell.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

36

Any of the methods previously described for the insertion of DNA fragments into a cloning vector may be used to construct expression vectors containing a gene consisting of appropriate transcriptional/translational control signals and the protein coding sequences. These methods may include *in vitro* recombinant DNA and synthetic techniques and *in vivo* recombination (genetic recombination).

Expression of ABCC11 polypeptide may be controlled by any promoter/enhancer element known in the art, but these regulatory elements must be functional in the host selected for expression. Promoters which may be used to control ABCC11 gene expression include, but are not limited to, the SV40 early promoter region (Benoist and Chambon, 1981 Nature 290:304-310), the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto, et al., 1980 Cell 22:787-797), the herpes thymidine kinase promoter (Wagner et al., 1981 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445), the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster et al., 1982 Nature 296:39-42); prokaryotic expression vectors such as the β -lactamase promoter (Villa-Komaroff, et al., 1978 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731), or the *lac* promoter (DeBoer, et al., 1983 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25); see also "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242:74-94; promoter elements from yeast or other fungi such as the Gal 4 promoter, the ADC (alcohol dehydrogenase) promoter, PGK (phosphoglycerol kinase) promoter, alkaline phosphatase promoter; and the animal transcriptional control regions, which exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals: elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (Swift et al., 1984 Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986 Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987); insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanshan, 1985 Nature: 315:115-122), immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid cells (Grosschedl et al., 1984 Cell 38:647-658; Adames et al., 1985 Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987 Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444), mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Teder et al., 1986 Cell 45:485-495), albumin gene control region which is active in liver (Pinkert et al., 1987 Genes and Devel. 1:268-276), alpha-fetoprotein gene control region which is active in liver (Krumlauf et al., 1985 Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987 Science 235:53-58), alpha 1-antitrypsin gene control region which is active in the liver (Kelsey et al., 1987 Genes and Devel. 1:161-171) beta-globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogam et al., 1985 Nature

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

37

315:338-340; Kollias et al., 1986 Cell 46:89-94), myelin basic protein gene control region which is active in oligodendrocyte cells in the brain (Readhead et al., 1987 Cell 48:703-712), myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, 1985 Nature 314:283-286), and gonadotropic releasing hormone gene control region which is active in the hypothalamus (Mason et al., 1986 Science 234:1372-1378).

Expression vectors containing a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide of the invention can be identified by five general approaches: (a) polymerase chain reaction (PCR) amplification of the desired plasmid DNA or specific mRNA, (b) nucleic acid hybridization, (c) presence or absence of selection marker gene functions, (d) analyses with appropriate restriction endonucleases, and (e) expression of inserted sequences. In the first approach, the nucleic acids can be amplified by PCR to provide for detection of the amplified product. In the second approach, the presence of a foreign gene inserted in an expression vector can be detected by nucleic acid hybridization using probes comprising sequences that are homologous to an inserted marker gene. In the third approach, the recombinant vector/host system can be identified and selected based upon the presence or absence of certain "selection marker" gene functions (e.g., β -galactosidase activity, thymidine kinase activity, resistance to antibiotics, transformation phenotype, occlusion body formation in baculovirus, etc.) caused by the insertion of foreign genes in the vector. In another example, if the nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide is inserted within the "selection marker" gene sequence of the vector, recombinants containing the ABCC11 nucleic acid can be identified by the absence of the ABCC11 gene functions. In the fourth approach, recombinant expression vectors are identified by digestion with appropriate restriction enzymes. In the fifth approach, recombinant expression vectors can be identified by assaying for the activity, biochemical, or immunological characteristics of the gene product expressed by the recombinant, provided that the expressed protein assumes a functionally active conformation.

A wide variety of host/expression vector combinations may be employed in expressing the nucleic acids of this invention. Useful expression vectors, for example, may consist of segments of chromosomal, non-chromosomal and synthetic DNA sequences. Suitable vectors include derivatives of SV40 and known bacterial plasmids, e.g., *Escherichia coli* plasmids col E1, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX (Smith et al., 1988, Gene 67:31-40), pMB9 and their derivatives, plasmids such as RP4; phage DNAs, e.g., the numerous derivatives of phage λ , e.g., NM989, and other phage DNA, e.g., M13 and filamentous single stranded phage DNA; yeast plasmids such as the 2 μ plasmid or derivatives thereof; vectors useful in eukaryotic

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

36

cells, such as vectors useful in insect or mammalian cells; vectors derived from combinations of plasmids and phage DNAs, such as plasmids that have been modified to employ phage DNA or other expression control sequences; and the like.

For example, in a baculovirus expression systems, both non-fusion transfer vectors, such as but not limited to pVL941 (*Bam*HI cloning site; Summers), pVL1393 (*Bam*HI1, *Sma*I, *Xba*I, *Eco*RI, *Not*I, *Xma*III, *Bgl*II, and *Pst*I cloning site; Invitrogen), pVL1392 (*Bgl*II, *Pst*I, *Not*I, *Xma*III, *Eco*RI, *Xba*I, *Sma*I, and *Bam*HI cloning site; Summers and Invitrogen), and pBlueBacIII (*Bam*HI, *Bgl*II, *Pst*I, *Nco*I, and *Hind*III cloning site, with blue/white recombinant screening possible; Invitrogen), and fusion transfer vectors, such as but not limited to pAc700 (*Bam*HI and *Kpn*I cloning site, in which the *Bam*HI recognition site begins with the initiation codon; Summers), pAc701 and pAc702 (same as pAc700, with different reading frames), pAc360 (*Bam*III cloning site 36 base pairs downstream of a polyhedrin initiation codon; Invitrogen(195)), and pBlueBacIIIsA, B, C (three different reading frames, with *Bam*HI, *Bgl*II, *Pst*I, *Nco*I, and *Hind*III cloning site, an N-terminal peptide for ProBond purification, and blue/white recombinant screening of plaques; Invitrogen (220) can be used.

Mammalian expression vectors contemplated for use in the invention include vectors with inducible promoters, such as the dihydrofolate reductase (DHFR) promoter, *e.g.*, any expression vector with a *DHFR* expression vector, or a *DHFR*/methotrexate co-amplification vector, such as pED (*Pst*I, *Sal*I, *Sba*I, *Sma*I, and *Eco*RI cloning site, with the vector expressing both the cloned gene and *DHFR*; See, Kaufman, *Current Protocols in Molecular Biology*, 16.12 (1991). Alternatively, a glutamine synthetase/methionine sulfoximine co-amplification vector, such as pLE14 (*Hind*III, *Xba*I, *Sma*I, *Sba*I, *Eco*RI, and *Bcl*I cloning site, in which the vector expresses glutamine synthase and the cloned gene; Celltech). In another embodiment, a vector that directs episomal expression under control of Epstein Barr Virus (EBV) can be used, such as pREP4 (*Bam*HI, *Sfi*I, *Xho*I, *Not*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *Pvu*II, and *Kpn*I cloning site, constitutive RSV-LTR promoter, hygromycin selectable marker; Invitrogen), pCEP4 (*Bam*HI, *Sfi*I, *Xho*I, *Not*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *Pvu*II, and *Kpn*I cloning site, constitutive hCMV immediate early gene, hygromycin selectable marker; Invitrogen), pMEP4 (*Kpn*I, *Pvu*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Not*I, *Xho*I, *Sfi*I, *Bam*HI cloning site, inducible methallothionein IIa gene promoter, hygromycin selectable marker; Invitrogen), pREPS (*Bam*III, *Xho*I, *Not*I, *Hind*III, *Nhe*I, and *Kpn*I cloning site, RSV-LTR promoter, histidinol selectable marker; Invitrogen), pREP9 (*Kpn*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Not*I, *Xho*I, *Sfi*I, and *Bam*HI cloning site, RSV-LTR promoter, G418 selectable marker; Invitrogen), and pEBVHis (RSV-LTR promoter, hygromycin

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

39

selectable marker, N-terminal peptide purifiable via ProBond resin and cleaved by enterokinase; Invitrogen). Selectable mammalian expression vectors for use in the invention include pRc/CMV (*HindIII*, *BstXI*, *NotI*, *SbaI*, and *Apal* cloning site, G418 selection; Invitrogen), pRc/RSV (*HindIII*, *SpeI*, *BstXI*, *NotI*, *XbaI* cloning site, G418 selection; 5 Invitrogen), and others. Vaccinia virus mammalian expression vectors (see, Kaufman, 1991, *supra*) for use according to the invention include but are not limited to pSC11 (*SmaI* cloning site, TK- and b-gal selection), pMJ601 (*SaII*, *SmaI*, *AflI*, *NarI*, *BspMI*, *BamHI*, *ApaI*, *NheI*, *SacII*, *KpnI*, and *HindIII* cloning site; TK- and b-gal selection), and pTKgptF1S (*EcoRI*, *PstI*, *SaII*, *AclI*, *HindIII*, *SbaI*, *BamHI*, and *HpaI* cloning site, TK or XPRT selection).

10 Yeast expression systems can also be used according to the invention to express the ABCC11 polypeptide. For example, the non-fusion pYES2 vector (*XbaI*, *SphI*, *ShoI*, *NotI*, *GstXI*, *EcoRI*, *BstXI*, *BamHI*, *SacI*, *KpnI*, and *HindIII* cloning site; Invitrogen) or the fusion pYFSHisA, B, C (*XbaI*, *SphI*, *ShoI*, *NotI*, *BstXI*, *EcoRI*, *BamHI*, *SacI*, *KpnI*, and *HindIII* cloning site, N-terminal peptide purified with ProBond resin and cleaved with enterokinase; 15 Invitrogen), to mention just two, can be employed according to the invention.

Once a particular recombinant DNA molecule is identified and isolated, several methods known in the art may be used to propagate it. Once a suitable host system and growth conditions are established, recombinant expression vectors can be propagated and prepared in quantity. As previously explained, the expression vectors which can be used 20 include, but are not limited to, the following vectors or their derivatives: human or animal viruses such as vaccinia virus or adenovirus; insect viruses such as baculovirus; yeast vectors; bacteriophage vectors (e.g., lambda), and plasmid and cosmid DNA vectors, to name but a few.

In addition, a host cell strain may be chosen which modulates the expression of the 25 inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the translational and post-translational processing and modification (e.g., glycosylation, cleavage for example of the signal sequence) of proteins. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the desired modification and processing of the foreign protein expressed. For example, 30 expression in a bacterial system can be used to produce a nonglycosylated core protein product. However, the transmembrane ABCC11 protein expressed in bacteria may not be properly folded. Expression in yeast can produce a glycosylated product. Expression in eukaryotic cells can increase the likelihood of "native" glycosylation and folding of a

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

40

heterologous protein. Moreover, expression in mammalian cells can provide a tool for reconstituting, or constituting, ABC11 activity. Furthermore, different vector/host expression systems may affect processing reactions, such as proteolytic cleavages, to a different extent.

5 Vectors are introduced into the desired host cells by methods known in the art, e.g., transfection, electroporation, microinjection, transduction, cell fusion, DEAE dextran, calcium phosphate precipitation, lipofection (lysosome fusion), use of a gene gun, or a DNA vector transporter (see, e.g., Wu et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:963-967; Wu and Wu, 1988, J. Biol. Chem. 263:14621-14624; Hartmut et al., Canadian Patent Application No. 2,012,311, filed
10 March 15, 1990).

A cell has been "transfected" by exogenous or heterologous DNA when such DNA has been introduced inside the cell. A cell has been "transformed" by exogenous or heterologous DNA when the transfected DNA effects a phenotypic change. Preferably, the transforming DNA should be integrated (covalently linked) into chromosomal DNA making up the genome
15 of the cell.

A recombinant marker protein expressed as an integral membrane protein can be isolated and purified by standard methods. Generally, the integral membrane protein can be obtained by lysing the membrane with detergents, such as but not limited to, sodium dodecyl sulfate (SDS), Triton X-100 polyoxyethylene ester, Ipagel/nonidet P-40 (NP-40)
20 (octylphenoxy)-polyethoxyethanol, digoxin, sodium deoxycholate, and the like, including mixtures thereof. Solubilization can be enhanced by sonication of the suspension. Soluble forms of the protein can be obtained by collecting culture fluid, or solubilizing inclusion bodies, e.g., by treatment with detergent, and if desired sonication or other mechanical processes, as described above. The solubilized or soluble protein can be isolated using
25 various techniques, such as polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), isoelectric focusing, 2-dimensional gel electrophoresis, chromatography (e.g., ion exchange, affinity, immunoaffinity, and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, immunoprecipitation, or by any other standard technique for the purification of proteins.

Alternatively, a nucleic acid or vector according to the invention can be introduced *in vivo* by lipofection. For the past decade, there has been increasing use of liposomes for encapsulation and transfection of nucleic acids *in vitro*. Synthetic cationic lipids designed to limit the difficulties and dangers encountered with liposome mediated transfection can be used to prepare liposomes for *in vivo* transfection of a gene encoding a marker (Felgner, et. al.
30

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

41

(1987, PNAS 84:7413); Mackey, et al. (1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8027-8031); Ulmer et al. (1993, *Science*, 259:1745-1748). The use of cationic lipids may promote encapsulation of negatively charged nucleic acids, and also promote fusion with negatively charged cell membranes (Felgner et al., 1989, *Science*, 337:387-388). Particularly useful lipid compounds and compositions for transfer of nucleic acids are described in International Patent Publications WO95/18863 and WO96/17823, and in U.S. Patent No. 5,459,127. The use of lipofection to introduce exogenous genes into the specific organs *in vivo* has certain practical advantages. Molecular targeting of liposomes to specific cells represents one area of benefit. It is clear that directing transfection to particular cell types would be particularly preferred in a tissue with cellular heterogeneity, such as pancreas, liver, kidney, and the brain. Lipids may be chemically coupled to other molecules for the purpose of targeting [see Mackey, et. al., *supra*]. Targeted peptides, e.g., hormones or neurotransmitters, and proteins such as antibodies, or non-peptide molecules could be coupled to liposomes chemically.

Other molecules are also useful for facilitating transfection of a nucleic acid *in vivo*, such as a cationic oligopeptide (e.g., International Patent Publication WO95/21931), peptides derived from DNA binding proteins (e.g., International Patent Publication WO96/25508), or a cationic polymer (e.g., International Patent Publication WO95/21931).

It is also possible to introduce the vector *in vivo* as a naked DNA plasmid (see U.S. Patents 5,693,622, 5,589,466 and 5,580,859). Naked DNA vectors for gene therapy can be introduced into the desired host cells by methods known in the art, e.g., transfection, electroporation, microinjection, transduction, cell fusion, DEAE dextran, calcium phosphate precipitation, use of a gene gun, or use of a DNA vector transporter (see, Wu et al., 1992, *supra*; Wu and Wu, 1988, *supra*; Hartmut et al., Canadian Patent Application No. 2,012,311, filed March 15, 1990; Williams et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2726-2730). Receptor-mediated DNA delivery approaches can also be used (Curiel et al., 1992, *Hum. Gene Ther.* 3:147-154; Wu and Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432).

"Pharmaceutically acceptable vehicle or excipient" includes diluents and fillers which are pharmaceutically acceptable for method of administration, are sterile, and may be aqueous or oleaginous suspensions formulated using suitable dispersing or wetting agents and suspending agents. The particular pharmaceutically acceptable carrier and the ratio of active compound to carrier are determined by the solubility and chemical properties of the composition, the particular mode of administration, and standard pharmaceutical practice.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

42

Any nucleic acid, polypeptide, vector, or host cell of the invention will preferably be introduced *in vivo* in a pharmaceutically acceptable vehicle or excipient. The phrase "pharmaceutically acceptable" refers to molecular entities and compositions that are physiologically tolerable and do not typically produce an allergic or similar untoward reaction, such as gastric upset, dizziness and the like, when administered to a human. Preferably, as used herein, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "excipient" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the compound is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water or aqueous solution saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions are preferably employed as excipients, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical excipients are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin.

Naturally, the invention contemplates delivery of a vector that will express a therapeutically effective amount of the ABCC11 polypeptide for gene therapy applications. The phrase "therapeutically effective amount" is used herein to mean an amount sufficient to reduce by at least about 15 percent, preferably by at least 50 percent, more preferably by at least 90 percent, and still more preferably prevent, a clinically significant deficit in the activity, function and response of the host. Alternatively, a therapeutically effective amount is sufficient to cause an improvement in a clinically significant condition in the host.

NUCLEIC ACIDS OF THE ABCC11 GENE

The applicants have identified a novel human ABCC-like gene, designated ABCC11. The applicants have also determined that this novel gene is located on the region of chromosome 16q12 (figure 2).

The applicants have also determined that the ABCC11 gene has a unique expression pattern, suggesting that the corresponding proteins may perform tissue-specialized functions (Example 5). In effect, the expression pattern of ABCC11 gene was examined by RT-PCR on mRNA of 16 different human tissues (Clontech). Expression pattern showed that the approximately 5Kb ABCC11 transcript was expressed in all tissues, except kidney, spleen, and colon.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

43

The applicants have further determined potential transcript sequence that corresponds to the full coding sequence (CDS) of ABCC11, and that the ABCC11 according to the invention comprises 29 exons and 28 introns. All exons were flanked by GT and AG dinucleotides consistent with the consensus sequences for splice junctions in eukaryotic genes (Table 1).

Table 1 : Splice sites sequences and exon sizes of ABCC11

ABCC11			
Exon	Size (bp)	Splice acceptor	Splice donor
1	5'UTR:99	Not determined	ACTTATTTATgttaagtagat
2	137	cttttccaaagAAACCTATA	CCAAGCCGAGgtgaactccg
3	159	ccctactagGTTCTCTGCC	ATGTCCAAAGgtgaagctgc
4	148	ctcttccagGCTTCACGCG	ACTCGGCCAgtaagctgca
5	234	ttccttgtagATATTGATTA	CTCAGGAGAGgttaagcagct
6	174	tgtcttgcagGCCATAGCT	CCCACTGCCgttaatgctct
7	148	ctgactccagGTATTCATGA	ATCATGGAAGgtatggaag
8	149	tatttccagACCTAAGAAAG	AGCGTCAACgttaaggtctt
9	108	tccttccagGCTTCAGCA	GAGGTCAAGgttagctcatc
10	252	gtcttccagAAGTTTTCCT	GGTGTCCAAGgttagccttgc
11	72	tggcttgcagGGGATGATG	CTTGGGAGAGgttaagtgatc
12	125	ctctccagAGTGCATTCG	ACAAGGCCGgttaagctcct
13	73	tccttccagATACCTCCAG	CATGACAGAGgttagagcga
14	204	ctgtctgcagATTGGAGAGC	CCAGCTGCAGgttagagccct
15	135	gactgtccagTACTPAGAA	AGCCACTTCgttagagctccg
16	97	ctctccagGACATGTTGC	CCAAATGCTgttagagctgtg
17	90	cttgacccagTCCCGAGCA	CCAGCTGAGgttagagctccg
18	104	tccttccagGTACATGCT	GGGCTCGCGgttagagctccg
19	188	tttcttgcagACCAATAGCA	CTTCACTAGgttagagctccg
20	227	gtctctgcagGTTTCCGCT	TTTATCATATgttagagctccg
21	138	gtccatgcagGATGTCAGG	TCATCAGCCAgtagagctccg
22	187	tccttccagGTTTCAAGAG	CGTCTCAGgttagagctccg
23	90	ttccttccagCTGCTGCTCA	GTACATCAGgttagagctccg
24	190	caaaacccagATGCTGCTCT	ACGGGCTCTgttagagctccg
25	160	tgcacccagGGAATGCTCT	GAACCATCAGgttagagctccg
26	79	catatggttagATTAAACCTA	GACCATCAGgttagagctccg
27	114	catatgcagATCACAAGT	CAACTCCAGgttagagctccg
28	165	tattctccagATCATCTTA	CAATCCGAGgttagagctccg
29	93+3'UTR	tacctccagGCTAGAA	Not determined

The applicants have thus characterized exonic sequences of a novel human ABCC11 gene, which are particularly useful according to the invention for the production of various means of detection of the corresponding ABCC11 gene, or nucleotide expression products in a sample.

Several exons of ABCC11 gene have been characterized by their nucleotide sequence and are identified in Table 2. The human ABCC11 gene consists of 29 exons, having sizes which range from 72 to 252 bp. Of the 28 introns in the ABCC11 gene, 18 are class 0 (where

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

44

the splice occurs between codons), four are class 1 (where the codon is interrupted between the first and the second nucleotide), and six are class 2 (where the splice occurs between the second and the third nucleotide of the codon).

5 **Table 2 : Human ABCC11 exons and introns DNA**

SEQ ID NO:	Exon or Intron number	Exon starts in mRNA	Exon stops in mRNA	Exon starts in genomic fragment	Exon stops in genomic fragment	Length of exon	Intron starts in fragment	Intron stops in fragment	Length of intron
2	1	15	99	25501	25949		25960	27198	1249
3	2	450	586	27199	27335	137	27336	29807	2472
4	3	587	745	29808	29966	159	29967	33342	3376
5	4	746	893	33343	33490	146	33491	34940	1450
6	5	894	1127	34941	35174	234	35175	41483	6309
7	6	1128	1301	41484	41857	174	41858	42426	769
8	7	1302	1449	42427	42574	148	42575	42741	167
9	8	1450	1596	42742	42890	149	42891	44220	1330
10	9	1599	1706	44221	44328	108	44329	46571	2243
11	10	1707	1958	46572	46823	252	46824	49271	2451
12	11	1959	2030	49275	49346	72	49347	52233	2887
13	12	2031	2155	52234	52358	125	52359	54470	2112
14	13	2156	2228	54471	54543	73	54544	57290	2747
15	14	2229	2432	57291	57494	204	57495	59492	1996
16	15	2433	2567	59493	59627	135	59628	59700	73
17	16	2569	2664	59701	59797	97	59798	61447	1650
18	17	2665	2754	61448	61537	90	61538	63786	2249
19	18	2755	2856	63787	63890	104	63891	65051	1161
20	19	2859	3056	65052	65249	198	65250	70341	5092
21	20	3057	3283	70342	70568	227	70569	70678	110
22	21	3284	3421	70679	70816	138	70817	73142	2366
23	22	3422	3608	73143	73329	187	73330	79082	5753
24	23	3609	3898	79083	79172	90	79173	80655	1483
25	24	3699	3898	80656	80845	190	80846	82351	1506
26	25	3899	4048	82352	82511	160	82512	86801	4290
27	26	4049	4127	86802	86880	79	86881	87550	670
28	27	4128	4241	87551	87664	114	87665	90108	2444
29	28	4242	4406	90109	90273	165	90274	90402	129
30	29	4407	4862	90403	90858	456			

Thus the present invention also relates to a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary sequence thereof.

10 The invention also relates to a nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

45

The invention also relates to a nucleic acid comprising at least 8 consecutive nucleotides of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence.

The subject of the invention is, in addition, a nucleic acid having at least 80% nucleotide identity with a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a nucleic acid having at least 85%, preferably 90%, more preferably 95% and still more preferably 98% nucleotide identity with a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30.

The invention also relates to a nucleic acid hybridizing, under high stringency conditions, with a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

cDNA MOLECULE ENCODING THE ABCC11 PROTEIN

The applicants have further determined the cDNA sequences and the full coding sequences (CDS) corresponding to the human ABCC11 gene, and encodes the full length human corresponding protein (Example 2).

The cDNA molecule of the novel human ABCC11 gene consists of 4862 nucleotides as set forth in SEQ ID NO: 1 and contains a 4182 nucleotide coding sequence corresponding to a 1382 amino acids (aa) ABCC11 polypeptide (SEQ ID NO: 31) produced in subjects not affected by disorders of paroxysmal kinesigenic choreoathetosis. The cDNA molecule of the novel human ABCC11 gene having the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 comprises an open reading frame beginning from the nucleotide at position 318 to the nucleotide at position 4499 (base A of the TAA stop codon). According to the invention the ABCC11 cDNA (SEQ ID NO:1) contains a 4149 bp coding sequence from the nucleotide 351 (base A of the ATG codon for initiation of translation) to the nucleotide 4499 of SEQ ID NO:1, which encodes a full length ABCC11 polypeptide of 1382 amino acids of sequence SEQ ID NO:31.

The present invention is thus directed to a nucleic acid comprising SEQ ID NO: 1, or a complementary nucleotide sequence thereof.

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

The invention also relates to a nucleic acid comprising at least eight consecutive nucleotides of SEQ ID NO: 1, or a complementary nucleotide sequence thereof.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

46

The subject of the invention is also a nucleic acid having at least 80% nucleotide identity with a nucleic acid comprising nucleotides of SEQ ID NO:1, or a nucleic acid having a complementary nucleotide sequence thereof.

5 The invention also relates to a nucleic acid having at least 85%, preferably 90%, more preferably 95% and still more preferably 98% nucleotide identity with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, or a complementary nucleotide sequence thereof.

10 Another subject of the invention is a nucleic acid hybridizing, under high stringency conditions, with a nucleic acid comprising nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, or a nucleic acid having a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31.

The invention relates to a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 31.

15 The invention also relates to a polypeptide comprising amino acid sequence of SEQ ID NO: 31.

The invention also relates to a polypeptide comprising amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 30.

20 The invention also relates to a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 80% amino acid identity with a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31, or a peptide fragment thereof.

The invention also relates to a polypeptide having at least 85%, preferably 90%, more preferably 95% and still more preferably 98% amino acid identity with a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31.

25 Preferably, a polypeptide according to the invention will have a length of 4, 5 to 10, 15, 18 or 20 to 25, 35, 40, 50, 70, 80, 100 or 200 consecutive amino acids of a polypeptide according to the invention comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31.

30 Topology predictions based on hydropathy profiles and comparison with other known ABC transporters, suggest that the encoded ABCC11 protein is a full ABC transporters containing two ATP-binding domains (including Walker A and B domains, and signature motifs) and two transmembrane domains (Figure 1). The amino acid sequence of ABCC11 is 41% identical to the human ABCC5 protein, 36% to human ABCC4 and 32% identical to human ABCC2 and ABCC3 proteins. The ABCC11 protein,

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

47

like ABCC4 and ABCC5 proteins, is smaller than another well-known member of the subgroup, ABCC1 (MRP1), appearing to lack the extra N-terminal domain (Borst et al., *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92, 1295-302), which has been shown, however, not to be required for the transport function (Bakos et al., *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 32167-75).

5

Table 3: Homology / Identity percentages between the amino acid sequences of ABCC11, ABCC12, ABCC5, ABCC4, ABCC1, and ABCA1 along the entire sequence

Total sequence	ABCC11	ABCC12	ABCC5	ABCC4	ABCC1	ABCA1
ABCC11	100/100					
ABCC12	59/49	100/100				
ABCC5	50/41	52/42	100/100			
ABCC4	47/36	50/39	51/41	100/100		
ABCC1	44/33	47/35	47/36	53/44	100/100	
ABCA1	-	-	-	-	-	100/100

10 Alignment of the amino acid sequences of ABCC11, ABCC12, and ABCC5 genes reveals an identity ranging from 49 to 41% along the entire sequence (Table 3 and Figure 1).

Phylogenetic analysis of the ABCC subfamily proteins clearly demonstrates a close evolutionary relationship of the ABCC11 gene with the ABCC5 gene (Figure 4). In addition, the analysis of the tree suggests a recent duplication of the ABCC8 and ABCC9 genes, while ABCC10 seems to be one of the first genes to separate from the common ancestor. ABCC1, ABCC2, ABCC3, and ABCC6 genes constitute a well-defined sub-cluster, while the ABCC4 and CFTR (ABCC7) genes form another reliable subset despite apparent early divergence.

20

POLYMORPHISMS WITHIN THE ABCC11 GENE

The analysis of mutations in the ABCC11 gene may be carried out on genomic DNA from several individuals belonging to a family of which several members suffer from the paroxysmal kinesigenic choreoathetosis. According to the invention, a single nucleotide polymorphism has been identified in the coding region of the ABCC11 gene, which encodes the ABCC11 polypeptide. This mutation is more precisely located in the first exon, wherein a G (Guanine) was replaced by a A (adenine) in position 56 of SEQ ID

25

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

48

NO:1, and results in the replacing of an arginine (R) by an histidine (H) at position 19 of the sequence SEQ ID NO:31.

The structural characteristics which make it possible to differentiate the normal sequences from the mutated sequences of ABCC11 (genomic sequences, messenger RNAs, cDNA) may be exploited in order to produce means of detection of the mutated sequences of ABCC11 in a sample, in particular, probes specifically hybridizing with the mutated sequences of ABCC11 or pairs of primers making it possible to selectively amplify the regions of the ABCC11 gene carrying the mutations described above, it being possible to carry out the detection of the presence of these mutations in particular by distinguishing the length of the amplified nucleic acid fragments, by hybridization of the amplified fragments with the aid of the specific probes described above, or by direct sequencing of these amplified fragments.

The detection of these polymorphisms in a DNA sample obtained from a subject may also be carried out with the aid of nucleotide probes or primers specifically hybridizing with a given allele containing one of the polymorphic bases of a polymorphism of the ABCC11 gene according to the invention.

By way of illustration, appropriate nucleotide primers are for example primers whose base at the 3' end hybridizes with the base located immediately on the 5' side of the polymorphic base of the fragment comprising said polymorphism. After the step of hybridization of the specific primer, a step of extension with a mixture of the two dideoxynucleotides complementary to the polymorphic base of said polymorphism, for example differentially labeled by fluorescence, and then a step detection of the fluorescence signal obtained makes it possible to determine which of the two differentially labeled fluorescent dideoxynucleotides has been incorporated and to directly deduce the nature of the polymorphic base present at the level of this polymorphism.

Various approaches may be used for the labeling and detection of the dideoxynucleotides. A method in homogeneous phase based on FRET ("Fluorescence resonance energy transfer") has been described by Chen and Kwok (1997). According to this method, the amplified fragments of genomic DNA containing polymorphisms are incubated with a primer labeled with fluorescein at the 5' end in the presence of labeled dideoxynucleotide triphosphate and a modified Taq polymerase. The labeled primer is extended by one base by incorporation of the labeled dideoxynucleotide specific for the

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

49

allele present on the complementary genomic DNA sequence. At the end of this genotyping reaction, the fluorescence intensities for the two labeling compounds for the labeled dideoxynucleotides are directly analyzed without separation or purification. All these steps may be carried out in the same tube and the modifications of the fluorescence signal monitored in real time. According to another embodiment, the extended primer may be analyzed by MALDI-TOF type mass spectrometry. The base located at the level of the polymorphic site is identified by measuring the mass added to the microsequencing primer (Haff and Smirnov, 1997).

Such nucleotide primers may, for example, be immobilized on a support. Furthermore, it is possible to immobilize on a support, for example in an orderly manner, multiple specific primers as described above, each of the primers being suited to the detection of one of the polymorphisms of the ABCC11 gene according to the invention.

The polymorphisms of the ABCC11 gene according to the invention are useful in particular as genetic markers in studies of association between the presence of a given allele in a subject and the predisposition of this subject to a given pathology, in particular to one of the pathologies already associated with the chromosomal region 16q12 preferably with a pathology linked to a dysfunction in the reverse transport of cholesterol.

The methods for the genetic analysis of complex characters (phenotypes) are of various types (Lander and Schork, 1994, Science, 265, 2037-2048, 1994). In general, the biallelic polymorphisms according to the invention are useful in any of the methods described in the state of the art intended to demonstrate a statistically significant correlation between a genotype and a phenotype. The biallelic polymorphisms may be used in linkage analyses and in allele sharing methods. Preferably, the biallelic polymorphisms according to the invention are used to identify genes associated with detectable characters (phenotypes) in use for studies of association, an approach which does not require the use of families affected by the character, and which allows, in addition, the identification of genes associated with complex and sporadic characters.

Other statistical methods using biallelic polymorphisms according to the invention are for example those described by Forsell et al. (Biol. Psychiatry, 1997, 42 : 898-903), Xiong et al. (Am. J. Hum. Genet., 1999, 64 : 629-640), Horvath et al. (Am. J. Hum. Genet., 1998, 63 : 1886-1897), Sham et al. (Ann. Hum. Genet., 1995, 59 : 323-336) or Nickerson et al. (Genomics, 1992, 12 : 377-387).

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

50

NUCLEOTIDE PROBES AND PRIMERS

Nucleotide probes and primers hybridizing with a nucleic acid (genomic DNA, messenger RNA, cDNA) according to the invention also form part of the invention.

5 According to the invention, nucleic acid fragments derived from a polynucleotide comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30 or of a complementary nucleotide sequence are useful for the detection of the presence of at least one copy of a nucleotide sequence of the ABCC11 gene or of a fragment or of a variant (containing a mutation or a polymorphism) thereof in a sample.

10 The nucleotide probes or primers according to the invention comprise a nucleotide sequence comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The nucleotide probes or primers according to the invention comprise at least 8 consecutive nucleotides of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence.

15 Preferably, nucleotide probes or primers according to the invention have a length of 10, 12, 15, 18 or 20 to 25, 35, 40, 50, 70, 80, 100, 200, 500, 1000, 1500 consecutive nucleotides of a nucleic acid according to the invention, in particular of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence.

20 Alternatively, a nucleotide probe or primer according to the invention consists of and/or comprise the fragments having a length of 12, 15, 18, 20, 25, 35, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 consecutive nucleotides of a nucleic acid according to the invention, more particularly of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence.

25 The definition of a nucleotide probe or primer according to the invention therefore covers oligonucleotides which hybridize, under the high stringency hybridization conditions defined above, with a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence.

30 A nucleotide primer or probe according to the invention may be prepared by any suitable method well known to persons skilled in the art, including by cloning and action of restriction enzymes or by direct chemical synthesis according to techniques such as the phosphodiester method by Narang et al. (1979, *Methods Enzymol.* 68:90-98) or by Brown et al. (1979, *Methods Enzymol.* 68:109-151), the diethylphosphoramidite method by

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

51

Beaucage et al. (1981, *Tetrahedron Lett.*, 22: 1859-1862) or the technique on a solid support described in EU patent No. EP 0,707,592.

Each of the nucleic acids according to the invention, including the oligonucleotide probes and primers described above, may be labeled, if desired, by incorporating a marker which can be detected by spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical or chemical means. For example, such markers may consist of radioactive isotopes (^{32}P , ^{33}P , ^3H , ^{35}S), fluorescent molecules (5-bromodeoxyuridine, fluorescein, acetylaminofluorene, digoxigenin) or ligands such as biotin. The labeling of the probes is preferably carried out by incorporating labeled molecules into the polynucleotides by primer extension, or alternatively by addition to the 5' or 3' ends. Examples of nonradioactive labeling of nucleic acid fragments are described in particular in French patent No. 78 109 75 or in the articles by Urdea et al. (1988, *Nucleic Acids Research*, 11:4937-4957) or Sanchez-Pescador et al. (1988, *J. Clin. Microbiol.*, 26(10):1934-1938).

Preferably, the nucleotide probes and primers according to the invention may have structural characteristics of the type to allow amplification of the signal, such as the probes described by Urdea et al. (1991, *Nucleic Acids Symp Ser.*, 24:197-200) or alternatively in European patent No. EP-0,225,807 (CHIRON).

The oligonucleotide probes according to the invention may be used in particular in Southern-type hybridizations with the genomic DNA or alternatively in northern-type hybridizations with the corresponding messenger RNA when the expression of the corresponding transcript is sought in a sample.

The probes and primers according to the invention may also be used for the detection of products of PCR amplification or alternatively for the detection of mismatches.

Nucleotide probes or primers according to the invention may be immobilized on a solid support. Such solid supports are well known to persons skilled in the art and comprise surfaces of wells of microtiter plates, polystyrene beads, magnetic beads, nitrocellulose bands or microparticles such as latex particles.

Consequently, the present invention also relates to a method of detecting the presence of a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or of a complementary nucleotide sequence, or a nucleic acid fragment or variant of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or of a complementary nucleotide sequence in a sample, said method comprising the steps of:

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

52

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

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

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

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

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

- a) one or more nucleotide probe(s) or primer(s) as described above;
- b) where appropriate, the reagents necessary for the hybridization reaction.

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

15 According to a second aspect, the detection box or kit is characterized in that the oligonucleotide probes comprise a detectable marker.

According to a specific embodiment of the detection kit described above, such a kit will comprise a plurality of oligonucleotide probes and/or primers in accordance with the invention which may be used to detect a target nucleic acid of interest or alternatively to
20 detect mutations in the coding regions or the non-coding regions of the nucleic acids according to the invention, more particularly of nucleic acids comprising any one of SEQ ID NOs: 1-28, or a complementary nucleotide sequence.

Thus, the probes according to the invention, immobilized on a support, may be ordered into matrices such as "DNA chips". Such ordered matrices have in particular been described
25 in US patent No. 5,143,854, in published PCT applications WO 90/15070 and WO 92/10092.

Support matrices on which oligonucleotide probes have been immobilized at a high density are for example described in US patent No. 5,412,087 and in published PCT application WO 95/11995.

The nucleotide primers according to the invention may be used to amplify any one of
30 the nucleic acids according to the invention, and more particularly a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or of a complementary nucleotide sequence. Alternatively, the nucleotide primers according to the invention may be used to

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

53

amplify a nucleic acid fragment or variant of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or of a complementary nucleotide sequence.

In a particular embodiment, the nucleotide primers according to the invention may be used to amplify a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-30, or of a complementary nucleotide sequence.

Another subject of the invention relates to a method of amplifying a nucleic acid according to the invention, and more particularly a nucleic acid comprising a) any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence, b) as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-30, or of a complementary nucleotide sequence, contained in a sample, said method comprising the steps of:

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

To carry out the amplification method as defined above, use will be preferably made of any of the nucleotide primers described above.

The subject of the invention is, in addition, a box or kit for amplifying a nucleic acid according to the invention, and more particularly a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence, or as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-30, or of a complementary nucleotide sequence, said box or kit comprising:

- a) a pair of nucleotide primers in accordance with the invention, whose hybridization position is located respectively on the 5' side and 3' side of the target nucleic acid whose amplification is sought; and optionally,
- b) reagents necessary for the amplification reaction.

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

The subject of the invention is, in addition, a box or kit for amplifying all or part of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence, said box or kit comprising:

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

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

54

2) reagents necessary for an amplification reaction.

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

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

- a) one or more nucleotide probes according to the invention;
- b) where appropriate, reagents necessary for a hybridization reaction.

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

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

According to a specific embodiment of the detection kit described above, such a kit will comprise a plurality of oligonucleotide probes and/or primers in accordance with the invention which may be used to detect target nucleic acids of interest or alternatively to detect mutations in the coding regions or the non-coding regions of the nucleic acids according to the invention. According to preferred embodiment of the invention, the target nucleic acid comprises a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or of a complementary nucleic acid sequence. Alternatively, the target nucleic acid is a nucleic acid fragment or variant of a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or of a complementary nucleotide sequence.

The nucleotide primers according to the invention are particularly useful in methods of genotyping subjects and/or of genotyping populations, in particular in the context of studies of association between particular allele forms or particular forms of groups of alleles (haplotypes) in subjects and the existence of a particular phenotype (character) in these subjects, for example the predisposition of these subjects to develop diseases a pathology whose candidate chromosomal region is situated on chromosome 16, more precisely on the 16q arm and still more precisely in the 16q12 locus, such as a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

30 RECOMBINANT VECTORS

The invention also relates to a recombinant vector comprising a nucleic acid according to the invention. "Vector" for the purposes of the present invention will be understood to

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

55

mean a circular or linear DNA or RNA molecule which is either in single-stranded or double-stranded form.

Preferably, such a recombinant vector will comprise a nucleic acid chosen from the following nucleic acids:

- 5 a) a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof;
- b) a nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-29, or a complementary nucleotide sequence thereof;
- c) a nucleic acid having at least eight consecutive nucleotides of a nucleic acid
10 comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or of a complementary nucleotide sequence thereof;
- d) a nucleic acid having at least 80% nucleotide identity with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof;
- 15 e) a nucleic acid having 85%, 90%, 95%, or 98% nucleotide identity with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof;
- f) a nucleic acid hybridizing, under high stringency hybridization conditions, with a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of 1) any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a
20 complementary nucleotide sequence thereof;
- g) a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31; and
- h) a nucleic acid encoding a polypeptide comprising amino acid sequence SEQ ID NO: 31.

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

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

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

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

56

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

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

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

In addition, the recombinant vectors according to the invention may include one or more origins for replication in the cellular hosts in which their amplification or their expression is sought, markers or selectable markers.

By way of example, the bacterial promoters may be the LacI or LacZ promoters, the T3 or T7 bacteriophage RNA polymerase promoters, the lambda phage PR or PL promoters.

The promoters for eukaryotic cells will comprise the herpes simplex virus (HSV) virus thymidine kinase promoter or alternatively the mouse metallothionein-L promoter.

Generally, for the choice of a suitable promoter, persons skilled in the art can preferably refer to the book by Sambrook et al. (1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York) cited above or to the techniques described by Fuller et al. (1996, *Immunology, in: Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al.(eds.).

When the expression of the genomic sequence of any one of the ABC11 gene will be sought, use will preferably be made of the vectors capable of containing large insertion sequences. In a particular embodiment, bacteriophage vectors such as the P1 bacteriophage vectors such as the vector p158 or the vector p158/neo8 described by Sternberg (1992, *Trends Genet.*, 8:1-16; 1994, *Mamm. Genome*, 5:397-404) will be preferably used.

The preferred bacterial vectors according to the invention are for example the vectors pBR322(ATCC37017) or alternatively vectors such as pAA223-3 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), and pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, UNITED STATES).

There may also be cited other commercially available vectors such as the vectors pQE70, pQE60, pQE9 (Qiagen), psiX174, pBluescript SA, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene).

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

57

They may also be vectors of the baculovirus type such as the vector pVT.1392/1393 (Pharmingen) used to transfect cells of the Sf9 line (ATCC No. CRL 1711) derived from *Spodoptera frugiperda*.

They may also be adenoviral vectors such as the human adenovirus of type 2 or 5.

5 A recombinant vector according to the invention may also be a retroviral vector or an adeno-associated vector (AAV). Such adeno-associated vectors are for example described by Flotte et al. (1992, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 7:349-356), Samulski et al. (1989, *J. Virol.*, 63:3822-3828), or McLaughlin BA et al. (1996, *Am. J. Hum. Genet.*, 59:561-569).

To allow the expression of a polynucleotide according to the invention, the latter must
10 be introduced into a host cell. The introduction of a polynucleotide according to the invention into a host cell may be carried out *in vitro*, according to the techniques well known to persons skilled in the art for transforming or transfecting cells, either in primary culture, or in the form of cell lines. It is also possible to carry out the introduction of a polynucleotide according to the invention *in vivo* or *ex vivo*, for the prevention or treatment of diseases linked to ABC11
15 deficiencies.

To introduce a polynucleotide or vector of the invention into a host cell, a person skilled in the art can preferably refer to various techniques, such as the calcium phosphate precipitation technique (Graham et al., 1973, *Virology*, 52:456-457; Chen et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7 : 2745-2752), DEAE Dextran (Gopal, 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1188-1190),
20 electroporation (Tur-Kaspa, 1996, *Mol. Cell. Biol.*, 6:716-718; Potter et al., 1984, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 81(22):7161-5), direct microinjection (Harland et al., 1985, *J. Cell. Biol.*, 101:1094-1095), liposomes charged with DNA (Nicolau et al., 1982, *Methods Enzymol.*, 149:157-76; Fraley et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352).

Once the polynucleotide has been introduced into the host cell, it may be stably
25 integrated into the genome of the cell. The integration may be achieved at a precise site of the genome, by homologous recombination, or it may be randomly integrated. In some embodiments, the polynucleotide may be stably maintained in the host cell in the form of an episome fragment, the episome comprising sequences allowing the retention and the replication of the latter, either independently, or in a synchronized manner with the cell cycle.

30 According to a specific embodiment, a method of introducing a polynucleotide according to the invention into a host cell, in particular a host cell obtained from a mammal, *in vivo*, comprises a step during which a preparation comprising a pharmaceutically compatible vector and a "naked" polynucleotide according to the invention, placed under the

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

58

control of appropriate regulatory sequences, is introduced by local injection at the level of the chosen tissue, for example myocardial tissue, the "naked" polynucleotide being absorbed by the myocytes of this tissue.

Compositions for use *in vitro* and *in vivo* comprising "naked" polynucleotides are for example described in PCT Application No. WO 95/11307 (Institut Pasteur, Inserm, University of Ottawa) as well as in the articles by Tacson et al. (1996, *Nature Medicine*, 2(8):888-892) and Huygen et al. (1996, *Nature Medicine*, 2(8):893-898).

According to a specific embodiment of the invention, a composition is provided for the *in vivo* production of the ABCC11 protein. This composition comprises a polynucleotide encoding the ABCC11 polypeptide placed under the control of appropriate regulatory sequences, in solution in a physiologically acceptable vector.

The quantity of vector which is injected into the host organism chosen varies according to the site of the injection. As a guide, there may be injected between about 0.1 and about 100 µg of polynucleotide encoding the ABCC11 protein into the body of an animal, preferably into a patient likely to develop a disease linked ABCC11 deficiency.

Consequently, the invention also relates to a pharmaceutical composition intended for the prevention of or treatment of a patient or subject affected by ABCC11 deficiency, comprising a nucleic acid encoding the ABCC11 protein, in combination with one or more physiologically compatible excipients.

Preferably, such a composition will comprise a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, wherein the nucleic acid is placed under the control of an appropriate regulatory element or signal.

The subject of the invention is, in addition, a pharmaceutical composition intended for the prevention of or treatment of a patient or a subject affected ABCC11 deficiency, comprising a recombinant vector according to the invention, in combination with one or more physiologically compatible excipients.

The invention relates to the use of a nucleic acid according to the invention, encoding the ABCC11 protein, for the manufacture of a medicament intended for the prevention or the treatment of subjects affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

The invention also relates to the use of a recombinant vector according to the invention, comprising a nucleic acid encoding the ABCC11 protein, for the manufacture of a medicament intended for the prevention of paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

59

The invention further relates to the use of a nucleic acid according to the invention, encoding the ABCC11 protein, for the manufacture of a medicament intended for the prevention or the treatment of pathologies linked to the dysfunction of transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH, glucuronate, or sulfate.

The invention also relates to the use of a recombinant vector according to the invention, comprising a nucleic acid encoding the ABCC11 protein, for the manufacture of a medicament intended for the treatment of and prevention of pathologies linked to the dysfunction of transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH, glucuronate, or sulfate.

The subject of the invention is therefore also a recombinant vector comprising a nucleic acid according to the invention that encodes the ABCC11 protein or polypeptide.

The invention also relates to the use of such a recombinant vector for the preparation of a pharmaceutical composition intended for the treatment and/or for the prevention of diseases or conditions associated with deficiency or paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

The present invention also relates to the use of cells genetically modified *ex vivo* with such a recombinant vector according to the invention, or of cells producing a recombinant vector, wherein the cells are implanted in the body, to allow a prolonged and effective expression *in vivo* of at least a biologically active ABCC11 polypeptide.

Vectors useful in methods of somatic gene therapy and compositions containing such vectors.

The present invention also relates to a new therapeutic approach for the treatment of pathologies linked to ABCC11 deficiencies. It provides an advantageous solution to the disadvantages of the prior art, by demonstrating the possibility of treating the pathologies linked to the ABCC11 deficiency by gene therapy, by the transfer and expression *in vivo* of a gene encoding the ABCC11 protein involved in the paroxysmal kinesigenic choreoathetosis. The invention thus offers a simple means allowing a specific and effective treatment of the 16q12 located pathologies such as, paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

Gene therapy consists in correcting a deficiency or an abnormality (mutation, aberrant expression and the like) and in bringing about the expression of a protein of therapeutic interest by introducing genetic information into the affected cell or organ. This genetic information may be introduced either *ex vivo* into a cell extracted from the organ, the modified cell then being reintroduced into the body, or directly *in vivo* into the appropriate tissue. In

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

60

this second case, various techniques exist, among which various transfection techniques involving complexes of DNA and DEAE-dextran (Pagano et al., *J. Virol.*, 1 (1967)891), of DNA and nuclear proteins (Kaneda et al., 1989, *Science* 243:375), of DNA and lipids (Felgner et al., 1987, *PNAS* 84:7413), the use of liposomes (Traley et al., 1980, *J.Biol.Chem.*, 255:10431), and the like. More recently, the use of viruses as vectors for the transfer of genes has appeared as a promising alternative to these physical transfection techniques. In this regard, various viruses have been tested for their capacity to infect certain cell populations. In particular, the retroviruses (RSV, HMS, MMS, and the like), the HSV virus, the adeno-associated viruses and the adenoviruses.

The present invention therefore also relates to a new therapeutic approach for the treatment of pathologies linked to ABCC11 deficiencies, consisting in transferring and in expressing *in vivo* genes encoding ABCC11. In a particularly preferred manner, the applicant has now found that it is possible to construct recombinant vectors comprising a nucleic acid encoding ABCC11 protein, to administer these recombinant vectors *in vivo*, and that this administration allows a stable and effective expression of at least one of the biologically active ABCC11 protein *in vivo*, with no cytopathological effect.

Adenoviruses constitute particularly efficient vectors for the transfer and the expression of any one of the ABCC11 gene. The use of recombinant adenoviruses as vectors makes it possible to obtain sufficiently high levels of expression of this gene to produce the desired therapeutic effect. Other viral vectors such as retroviruses or adeno-associated viruses (AAV) can allow a stable expression of the gene are also claimed.

The present invention is thus likely to offer a new approach for the treatment and prevention of ABCC11 deficiencies.

The subject of the invention is therefore also a defective recombinant virus comprising a nucleic acid according to the invention that encodes the ABCC11 protein or polypeptide.

The invention also relates to the use of such a defective recombinant virus for the preparation of a pharmaceutical composition which may be useful for the treatment and/or for the prevention of ABCC11 deficiencies.

The present invention also relates to the use of cells genetically modified *ex vivo* with such a defective recombinant virus according to the invention, or of cells producing a defective recombinant virus, wherein the cells are implanted in the body, to allow a prolonged and effective expression *in vivo* of the biologically active ABCC11 polypeptide.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

61

The present invention is particularly advantageous because it is possible to induce a controlled expression, and with no harmful effect of ABCC11 in organs which are not normally involved in the expression of this protein. In particular, a significant release of the ABCC11 protein is obtained by implantation of cells producing vectors of the invention, or infected *ex vivo* with vectors of the invention.

The activity of these ABCC protein transporters produced in the context of the present invention may be of the human or animal ABCC11 type. The nucleic sequence used in the context of the present invention may be a cDNA, a genomic DNA (gDNA), an RNA (in the case of retroviruses) or a hybrid construct consisting, for example, of a cDNA into which one or more introns (gDNA) would be inserted. It may also involve synthetic or semisynthetic sequences. In a particularly advantageous manner, a cDNA or a gDNA is used. In particular, the use of a gDNA allows a better expression in human cells. To allow their incorporation into a viral vector according to the invention, these sequences are preferably modified, for example by site-directed mutagenesis, in particular for the insertion of appropriate restriction sites. The sequences described in the prior art are indeed not constructed for use according to the invention, and prior adaptations may prove necessary, in order to obtain substantial expressions. In the context of the present invention, the use of a nucleic sequence encoding the human ABCC11 protein is preferred. Moreover, it is also possible to use a construct encoding a derivative of the ABCC11 protein. A derivative of the ABCC11 protein comprises, for example, any sequence obtained by mutation, deletion and/or addition relative to the native sequence, and encoding a product retaining the lipophilic substances transport activity. These modifications may be made by techniques known to a person skilled in the art (see general molecular biological techniques below). The biological activity of the derivatives thus obtained can then be easily determined, as indicated in particular in the examples of the measurement of the efflux of the substrate from cells. The derivatives for the purposes of the invention may also be obtained by hybridization from nucleic acid libraries, using as probe the native sequence or a fragment thereof.

These derivatives are in particular molecules having a higher affinity for their binding sites, molecules exhibiting greater resistance to proteases, molecules having a higher therapeutic efficacy or fewer side effects, or optionally new biological properties. The derivatives also include the modified DNA sequences allowing improved expression *in vivo*.

In a first embodiment, the present invention relates to a defective recombinant virus comprising a cDNA encoding the ABCC11 polypeptide. In another preferred embodiment of

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

62

the invention, a defective recombinant virus comprises a genomic DNA (gDNA) encoding the ABCC11 polypeptide. Preferably, the ABCC11 polypeptide comprises an amino acid sequence SEQ ID NO: 31, respectively.

The vectors of the invention may be prepared from various types of viruses.
5 Preferably, vectors derived from adenoviruses, adeno-associated viruses (AAV), herpesviruses (HSV) or retroviruses are used. It is preferable to use an adenovirus, for direct administration or for the ex vivo modification of cells intended to be implanted, or a retrovirus, for the implantation of producing cells.

The viruses according to the invention are defective, that is to say that they are
10 incapable of autonomously replicating in the target cell. Generally, the genome of the defective viruses used in the context of the present invention therefore lacks at least the sequences necessary for the replication of said virus in the infected cell. These regions may be either eliminated (completely or partially), or made non functional, or substituted with other sequences and in particular with the nucleic sequence encoding the ABCC11 protein.
15 Preferably, the defective virus retains, nevertheless, the sequences of its genome which are necessary for the encapsidation of the viral particles.

As regards more particularly adenoviruses, various serotypes, whose structure and properties vary somewhat, have been characterized. Among these serotypes, human adenoviruses of type 2 or 5 (Ad 2 or Ad 5) or adenoviruses of animal origin (see Application
20 WO 94/26914) are preferably used in the context of the present invention. Among the adenoviruses of animal origin which can be used in the context of the present invention, there may be mentioned adenoviruses of canine, bovine, murine (example: Mavl, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, avian or simian (example: SAV) origin. Preferably, the adenovirus of animal origin is a canine adenovirus, more preferably a CAV2 adenovirus
25 [Manhattan or A26/61 strain (ATCC VR-800) for example]. Preferably, adenoviruses of human or canine or mixed origin are used in the context of the invention. Preferably, the defective adenoviruses of the invention comprise the ITRs, a sequence allowing the encapsidation and the sequence encoding the ABCC11 protein. Preferably, in the genome of the adenoviruses of the invention, the E1 region at least is made non functional. Still more
30 preferably, in the genome of the adenoviruses of the invention, the E1 gene and at least one of the E2, E4 and L1-L5 genes are non functional. The viral gene considered may be made non functional by any technique known to a person skilled in the art, and in particular by total suppression, by substitution, by partial deletion or by addition of one or more bases in the

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

63

gene(s) considered. Such modifications may be obtained *in vitro* (on the isolated DNA) or *in situ*, for example, by means of genetic engineering techniques, or by treatment by means of mutagenic agents. Other regions may also be modified, and in particular the E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) and L5 (WO95/02697) region. According to a preferred embodiment, the adenovirus according to the invention comprises a deletion in the E1 and E4 regions and the sequence encoding ABCC11 is inserted at the level of the inactivated E1 region. According to another preferred embodiment, it comprises a deletion in the E1 region at the level of which the E4 region and the sequence encoding the ABCC11 protein (French Patent Application FR94 13355) are inserted.

The defective recombinant adenoviruses according to the invention may be prepared by any technique known to persons skilled in the art (Levrero et al., 1991 *Gene* 101; EP 185 573; and Graham, 1984, *EMBO J.*, 3:2917). In particular, they may be prepared by homologous recombination between an adenovirus and a plasmid carrying, *inter alia*, the nucleic acid encoding the ABCC11 protein. The homologous recombination occurs after cotransfection of said adenoviruses and plasmid into an appropriate cell line. The cell line used must preferably (i) be transformable by said elements, and (ii), contain the sequences capable of complementing the part of the defective adenovirus genome, preferably in integrated form in order to avoid the risks of recombination. By way of example of a line, there may be mentioned the human embryonic kidney line 293 (Graham et al., 1977, *J. Gen. Virol.*, 36:59), which contains in particular, integrated into its genome, the left part of the genome of an Ad5 adenovirus (12%) or lines capable of complementing the E1 and E4 functions as described in particular in Applications No. WO 94/26914 and WO95/02697.

As regards the adeno-associated viruses (AAV), they are DNA viruses of a relatively small size, which integrate into the genome of the cells which they infect, in a stable and site-specific manner. They are capable of infecting a broad spectrum of cells, without inducing any effect on cellular growth, morphology or differentiation. Moreover, they do not appear to be involved in pathologies in humans. The genome of AAVs has been cloned, sequenced and characterized. It comprises about 4700 bases, and contains at each end an inverted repeat region (ITR) of about 145 bases, serving as replication origin for the virus. The remainder of the genome is divided into 2 essential regions carrying the encapsidation functions: the left hand part of the genome, which contains the rep gene, involved in the viral replication and the

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

64

expression of the viral genes; the right hand part of the genome, which contains the cap gene encoding the virus capsid proteins.

The use of vectors derived from AAVs for the transfer of genes *in vitro* and *in vivo* has been described in the literature (see in particular WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). These applications describe various constructs derived from AAVs, in which the rep and/or cap genes are deleted and replaced by a gene of interest, and their use for transferring *in vitro* (on cells in culture) or *in vivo* (directly into an organism) said gene of interest. However, none of these documents either describes or suggests the use of a recombinant AAV for the transfer and expression *in vivo* or *ex vivo* of the ABCC11 protein, or the advantages of such a transfer. The defective recombinant AAVs according to the invention may be prepared by cotransfection, into a cell line infected with a human helper virus (for example an adenovirus), of a plasmid containing the sequence encoding the ABCC11 protein bordered by two AAV inverted repeat regions (ITR), and of a plasmid carrying the AAV encapsidation genes (rep and cap genes). The recombinant AAVs produced are then purified by conventional techniques.

As regards the herpesviruses and the retroviruses, the construction of recombinant vectors has been widely described in the literature: see in particular Breakfield et al., (1991, *New Biologist*, 3:203); EP 453242, EP178220, Bernstein et al. (1985); McCormick, (1985, *BioTechnology*, 3:689), and the like.

In particular, the retroviruses are integrating viruses, infecting dividing cells. The genome of the retroviruses essentially comprises two long terminal repeats (LTRs), an encapsidation sequence and three coding regions (gag, pol and env). In the recombinant vectors derived from retroviruses, the gag, pol and env genes are generally deleted, completely or partially, and replaced with a heterologous nucleic acid sequence of interest. These vectors may be produced from various types of retroviruses such as in particular MoMuLV ("murine moloney leukemia virus"; also called MoMLV), MSV ("murine moloney sarcoma virus"), HaSV ("harvey sarcoma virus"); SNV ("spleen necrosis virus"); RSV ("rous sarcoma virus") or Friend's virus.

To construct recombinant retroviruses containing a sequence encoding the ABCC11 protein according to the invention, a plasmid containing in particular the LTRs, the encapsidation sequence and said coding sequence is generally constructed, and then used to transfect a so-called encapsidation cell line, capable of providing *in trans* the retroviral functions deficient in the plasmid. Generally, the encapsidation lines are therefore capable of

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

65

expressing the gag, pol and env genes. Such encapsidation lines have been described in the prior art, and in particular the PA317 line (US 4,861,719), the PsiCRIP line (WO 90/02806) and the GP+envAm-12 line (WO 89/07150). Moreover, the recombinant retroviruses may contain modifications at the level of the LTRs in order to suppress the transcriptional activity, as well as extended encapsidation sequences, containing a portion of the gag gene (Bender et al., 1987, J. Virol., 61:1639). The recombinant retroviruses produced are then purified by conventional techniques.

To carry out the present invention, it is preferable to use a defective recombinant adenovirus. The particularly advantageous properties of adenoviruses are preferred for the *in vivo* expression of a protein having a lipophilic substrate transport activity. The adenoviral vectors according to the invention are particularly preferred for a direct administration *in vivo* of a purified suspension, or for the ex vivo transformation of cells, in particular autologous cells, in view of their implantation. Furthermore, the adenoviral vectors according to the invention exhibit, in addition, considerable advantages, such as in particular their very high infection efficiency, which makes it possible to carry out infections using small volumes of viral suspension.

According to another particularly preferred embodiment of the invention, a line producing retroviral vectors containing the sequence encoding the ABCC11 protein is used for implantation *in vivo*. The lines which can be used to this end are in particular the PA317 (US 4,861,719), PsiCrip (WO 90/02806) and GP+envAm-12 (US 5,278,056) cells modified so as to allow the production of a retrovirus containing a nucleic sequence encoding any one of ABCC11 and ABCC12 proteins according to the invention. For example, totipotent stem cells, precursors of blood cell lines, may be collected and isolated from a subject. These cells, when cultured, may then be transfected with the retroviral vector containing the sequence encoding the ABCC11 protein under the control of viral, nonviral or nonviral promoters specific for macrophages or under the control of its own promoter. These cells are then reintroduced into the subject. The differentiation of these cells will be responsible for blood cells expressing the ABCC11 protein.

Preferably, in the vectors of the invention, the sequence encoding the ABCC11 protein is placed under the control of signals allowing its expression in the infected cells. These may be expression signals which are homologous or heterologous, that is to say signals different from those which are naturally responsible for the expression of the ABCC11 protein. They may also be in particular sequences responsible for the expression of other

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

66

proteins, or synthetic sequences. In particular, they may be sequences of eukaryotic or viral genes or derived sequences, stimulating or repressing the transcription of a gene in a specific manner or otherwise and in an inducible manner or otherwise. By way of example, they may be promoter sequences derived from the genome of the cell which it is desired to infect, or from the genome of a virus, and in particular the promoters of the E1A or major late promoter (MLP) genes of adenoviruses, the cytomegalovirus (CMV) promoter, the RSV-LTR and the like. Among the eukaryotic promoters, there may also be mentioned the ubiquitous promoters (HPRT, vimentin, α -actin, tubulin and the like), the promoters of the intermediate filaments (desmin, neurofilaments, keratin, GFAP, and the like), the promoters of therapeutic genes (of the MDR, CFTR or factor VIII type, and the like), tissue-specific promoters (pyruvate kinase, villin, promoter of the fatty acid binding intestinal protein, promoter of the smooth muscle cell α -actin, promoters specific for the liver; Apo AI, Apo AII, human albumin and the like) or promoters corresponding to a stimulus (steroid hormone receptor, retinoic acid receptor and the like). In addition, these expression sequences may be modified by addition of enhancer or regulatory sequences and the like. Moreover, when the inserted gene does not contain expression sequences, it may be inserted into the genome of the defective virus downstream of such a sequence.

In a specific embodiment, the invention relates to a defective recombinant virus comprising a nucleic acid encoding the ABCG11 protein the control of a promoter chosen from RSV-LTR or the CMV early promoter.

As indicated above, the present invention also relates to any use of a virus as described above for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment and/or prevention of pathologies linked to the transport of lipophilic substances.

The present invention also relates to a pharmaceutical composition comprising one or more defective recombinant viruses as described above. These pharmaceutical compositions may be formulated for administration by the topical, oral, parenteral, intranasal, intravenous, intramuscular, subcutaneous, intraocular or transdermal route and the like. Preferably, the pharmaceutical compositions of the invention comprises a pharmaceutically acceptable vehicle or physiologically compatible excipient for an injectable formulation, in particular for an intravenous injection, such as for example into the patient's portal vein. These may relate in particular to isotonic sterile solutions or dry, in particular, freeze-dried, compositions which, upon addition depending on the case of sterilized water or physiological saline, allow

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

67

the preparation of injectable solutions. Direct injection into the patient's portal vein is preferred because it makes it possible to target the infection at the level of the liver and thus to concentrate the therapeutic effect at the level of this organ.

The doses of defective recombinant virus used for the injection may be adjusted as a function of various parameters, and in particular as a function of the viral vector, of the mode of administration used, of the relevant pathology or of the desired duration of treatment. In general, the recombinant adenoviruses according to the invention are formulated and administered in the form of doses of between 10^4 and 10^{14} pfu/ml, and preferably 10^6 to 10^{10} pfu/ml. The term "pfu" (plaque forming unit) corresponds to the infectivity of a virus solution, and is determined by infecting an appropriate cell culture and measuring, generally after 48 hours, the number of plaques that result from infected cell lysis. The techniques for determining the pfu titer of a viral solution are well documented in the literature.

As regards retroviruses, the compositions according to the invention may directly contain the producing cells, with a view to their implantation.

In this regard, another subject of the invention relates to any mammalian cell infected with one or more defective recombinant viruses according to the invention. More particularly, the invention relates to any population of human cells infected with such viruses. These may be in particular cells of blood origin (totipotent stem cells or precursors), fibroblasts, myoblasts, hepatocytes, keratinocytes, smooth muscle and endothelial cells, glial cells and the like.

The cells according to the invention may be derived from primary cultures. These may be collected by any technique known to persons skilled in the art and then cultured under conditions allowing their proliferation. As regards more particularly fibroblasts, these may be easily obtained from biopsies, for example according to the technique described by Ham (1980). These cells may be used directly for infection with the viruses, or stored, for example by freezing, for the establishment of autologous libraries, in view of a subsequent use. The cells according to the invention may be secondary cultures, obtained for example from pre-established libraries (see for example EP 228458, EP 239034, EP 400047, EP 456640).

The cells in culture are then infected with a recombinant virus according to the invention, in order to confer on them the capacity to produce a biologically active ABCC11 protein. The infection is carried out *in vitro* according to techniques known to persons skilled in the art. In particular, depending on the type of cells used and the desired number of copies

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

68

of virus per cell, persons skilled in the art can adjust the multiplicity of infection and optionally the number of infectious cycles produced. It is clearly understood that these steps must be carried out under appropriate conditions of sterility when the cells are intended for administration *in vivo*. The doses of recombinant virus used for the infection of the cells may be adjusted by persons skilled in the art according to the desired aim. The conditions described above for the administration *in vivo* may be applied to the infection *in vitro*. For the infection with a retrovirus, it is also possible to co-culture a cell to be infected with a cell producing the recombinant retrovirus according to the invention. This makes it possible to eliminate purification of the retrovirus.

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

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

For the preparation of the implants according to the invention, various types of gelling agents may be used. The gelling agents are used for the inclusion of the cells in a matrix having the constitution of a gel, and for promoting the anchorage of the cells on the support, where appropriate. Various cell adhesion agents can therefore be used as gelling agents, such as in particular collagen, gelatin, glycosaminoglycans, fibronectin, lectins and the like. Preferably, collagen is used in the context of the present invention. This may be collagen of human, bovine or murine origin. More preferably, type I collagen is used.

As indicated above, the compositions according to the invention preferably comprise a support allowing the anchorage of the cells. The term anchorage designates any form of biological and/or chemical and/or physical interaction causing the adhesion and/or the attachment of the cells to the support. Moreover, the cells may either cover the support used, or penetrate inside this support, or both. It is preferable to use in the context of the invention a solid, nontoxic and/or biocompatible support. In particular, it is possible to use polytetrafluoroethylene (PTFE) fibers or a support of biological origin.

The present invention thus offers a very effective means for the treatment or prevention of pathologies linked to the transport of lipophilic substances.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

69

In addition, this treatment may be applied to both humans and any animals such as ovines, bovines, domestic animals (dogs, cats and the like), horses, fish and the like.

RECOMBINANT HOST CELLS

5 The invention relates to a recombinant host cell comprising a nucleic acid of the invention, and more particularly, a nucleic acid comprising a nucleotide sequence selected from SEQ ID NO: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a recombinant host cell comprising a nucleic acid of the invention, and more particularly a nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted
10 in SEQ ID NO: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

According to another aspect, the invention also relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector according to the invention. Therefore, the invention also relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector comprising any of the nucleic acids of the invention, and more particularly a nucleic acid comprising a nucleotide
15 sequence of selected from SEQ ID NO: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.

The invention also relates to a recombinant host cell comprising a recombinant vector comprising a nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-30, or of a complementary nucleotide sequence thereof.

20 The preferred host cells according to the invention are for example the following:

a) prokaryotic host cells: strains of *Escherichia coli* (strain DH5- α), of *Bacillus subtilis*, of *Salmonella typhimurium*, or strains of genera such as *Pseudomonas*, *Streptomyces* and *Staphylococcus* ;

b) eukaryotic host cells: HeLa cells (ATCC No. CCL2), Cv 1 cells (ATCC No. CCL70), COS cells (ATCC No. CRL 1650), Sf-9 cells (ATCC No. CRL 1711), CHO cells
25 (ATCC No. CCL-61) 3T3 cells (ATCC No. CRL-6361) or human erythroleukemia K562 (ATCC N° CCL-243).

METHODS FOR PRODUCING ABCC11 POLYPEPTIDE

30 The invention also relates to a method for the production of a polypeptide comprising an amino acid sequence SEQ ID NOs: 31, said method comprising the steps of:

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

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

70

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

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

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

e) where appropriate, characterizing the recombinant polypeptide produced.

The polypeptides according to the invention may be characterized by binding to an immunoaffinity chromatography column on which the antibodies directed against this polypeptide or against a fragment or a variant thereof have been previously immobilized.

10 According to another aspect, a recombinant polypeptide according to the invention may be purified by passing it over an appropriate series of chromatography columns, according to methods known to persons skilled in the art and described for example in F. Ausubel et al (1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y).

15 A polypeptide according to the invention may also be prepared by conventional chemical synthesis techniques either in homogeneous solution or in solid phase. By way of illustration, a polypeptide according to the invention may be prepared by the technique either in homogeneous solution described by Houben Weyl (1974, *Methoden der Organischen Chemie*, E. Wunsch Ed., 15-I:15-II) or the solid phase synthesis technique described by Merrifield (1965, *Nature*, 207(996):522-523; 1965, *Science*, 150(693):178-185).

A polypeptide termed "homologous" to a polypeptide having an amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 31 also forms part of the invention. Such a homologous polypeptide comprises an amino acid sequence possessing one or more substitutions of an amino acid by an equivalent amino acid of SEQ ID NO: 30.

25 An "equivalent amino acid" according to the present invention will be understood to mean for example replacement of a residue in the L form by a residue in the D form or the replacement of a glutamic acid (E) by a pyro-glutamic acid according to techniques well known to persons skilled in the art. By way of illustration, the synthesis of peptide containing at least one residue in the D form is described by Koch (1977). According to another aspect, two amino acids belonging to the same class, that is to say two uncharged polar, nonpolar, basic or acidic amino acids, are also considered as equivalent amino acids.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

71

Polypeptides comprising at least one nonpeptide bond such as a retro-inverse bond (NHCO), a carba bond (CH₂CH₂) or a ketomethylene bond (CO-CH₂) also form part of the invention.

Preferably, the polypeptides according to the invention comprising one or more additions, deletions, substitutions of at least one amino acid will retain their capacity to be recognized by antibodies directed against the nonmodified polypeptides.

ANTIBODIES

The ABCC11 polypeptide according to the invention, in particular 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of any one of SEQ ID NO: 31, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of any one of SEQ ID NO: 30, or 3) a polypeptide termed "homologous" to a polypeptide comprising amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 31, may be used for the preparation of an antibody, in particular for detecting the production of a normal or altered form of ABCC11 polypeptide in a patient.

An antibody directed against a polypeptide termed "homologous" to a polypeptide having an amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 31 also forms part of the invention. Such an antibody is directed against a homologous polypeptide comprising an amino acid sequence possessing one or more substitutions of an amino acid by an equivalent amino acid of SEQ ID NO: 31.

"Antibody" for the purposes of the present invention will be understood to mean in particular polyclonal or monoclonal antibodies or fragments (for example the F(ab)₂ and Fab fragments) or any polypeptide comprising a domain of the initial antibody recognizing the target polypeptide or polypeptide fragment according to the invention.

Monoclonal antibodies may be prepared from hybridomas according to the technique described by Kohler and Milstein (1975, *Nature*, 256:495-497).

According to the invention, a polypeptide produced recombinantly or by chemical synthesis, and fragments or other derivatives or analogs thereof, including fusion proteins, may be used as an immunogen to generate antibodies that recognize a polypeptide according to the invention. Such antibodies include but are not limited to polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, and an Fab expression library. The anti-ABCC5, anti-ABCC4, or anti-ABCC1 antibodies of the invention may be cross reactive, e.g., they may recognize corresponding ABCC11 polypeptide from different species. Polyclonal antibodies have greater likelihood of cross reactivity. Alternatively, an antibody of the invention may be

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

72

specific for a single form of ABCC11. Preferably, such an antibody is specific for human ABCC11.

Various procedures known in the art may be used for the production of polyclonal antibodies to the ABCC11 polypeptide or derivative or analog thereof. For the production of antibody, various host animals can be immunized by injection with the ABCC11 polypeptide, or a derivatives (e.g., fragment or fusion protein) thereof, including but not limited to rabbits, mice, rats, sheep, goats, etc. In one embodiment, the ABCC11 polypeptide or a fragment thereof can be conjugated to an immunogenic carrier, e.g., bovine serum albumin (BSA) or keyhole limpet hemocyanin (KLH). Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, including but not limited to Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanins, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (*bacille Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum*.

For preparation of monoclonal antibodies directed toward the ABCC11 polypeptide, or a fragment, analog, or derivative thereof, any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture may be used. These include but are not limited to the hybridoma technique originally developed by Kohler and Milstein (1975, *Nature*, 256:495-497), as well as the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today*, 4:72; Cote et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:2026-2030), and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole et al., 1985, in: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). In an additional embodiment of the invention, monoclonal antibodies can be produced in germ-free animals (WO89/12690). In fact, according to the invention, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Morrison et al., 1984, *J. Bacteriol.* 159:870; Neuberger et al., 1984, *Nature*, 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452-454) by splicing the genes from a mouse antibody molecule specific for the ABCC11 polypeptide together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used; such antibodies are within the scope of this invention. Such human or humanized chimeric antibodies are preferred for use in therapy of human diseases or disorders (described *infra*), since the human or humanized antibodies are much less likely than xenogenic antibodies to induce an immune response, in particular an allergic response, themselves.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

73

According to the invention, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Patent Nos. 5,476,786 and 5,132,405 to Huston; U.S. Patent 4,946,778) can be adapted to produce ABCC11 polypeptide-specific single chain antibodies. An additional embodiment of the invention utilizes the techniques described for the construction of Fab expression libraries (Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for the ABCC11 polypeptide, or its derivative, or analog.

Antibody fragments which contain the idiotype of the antibody molecule can be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited to: the F(ab')₂ fragment which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule; the Fab' fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragment, and the Fab fragments which can be generated by treating the antibody molecule with papain and a reducing agent.

In the production of antibodies, screening for the desired antibody can be accomplished by techniques known in the art, e.g., radioimmunoassay, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoradiometric assays, gel diffusion precipitation reactions, immunodiffusion assays, *in situ* immunoassays (using colloidal gold, enzyme or radioisotope labels, for example), western blots, precipitation reactions, agglutination assays (e.g., gel agglutination assays, hemagglutination assays), complement fixation assays, immunofluorescence assays, protein A assays, and immunoelectrophoresis assays, etc. In one embodiment, antibody binding is detected by detecting a label on the primary antibody. In another embodiment, the primary antibody is detected by detecting binding of a secondary antibody or reagent to the primary antibody. In a further embodiment, the secondary antibody is labelled. Many means are known in the art for detecting binding in an immunoassay and are within the scope of the present invention. For example, to select antibodies which recognize a specific epitope of the ABCC11 polypeptide, one may assay generated hybridomas for a product which binds to the ABCC11 polypeptide fragment containing such epitope. For selection of an antibody specific to the ABCC11 polypeptide from a particular species of animal, one can select on the basis of positive binding with the ABCC11 polypeptide expressed by or isolated from cells of that species of animal.

The foregoing antibodies can be used in methods known in the art relating to the localization and activity of the ABCC11 polypeptide, e.g., for Western blotting, ABCC11

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

74

polypeptide *in situ*, measuring levels thereof in appropriate physiological samples, etc. using any of the detection techniques mentioned above or known in the art.

In a specific embodiment, antibodies that agonize or antagonize the activity of the ABCC11 polypeptide can be generated. Such antibodies can be tested using the assays described *infra* for identifying ligands.

The present invention relates to an antibody directed against 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 31, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 31, or 3) a polypeptide termed "homologous" to a polypeptide comprising amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 31, also forms part of the invention, as produced in the trioma technique or the hybridoma technique described by Kohbor et al. (1983, *Hybridoma*, 2(1):7-16).

The invention also relates to single-chain Fv antibody fragments (ScFv) as described in US patent No. 4,946,778 or by Martineau et al. (1998, *J Mol Biol*, 280(1):117-127).

The antibodies according to the invention also comprise antibody fragments obtained with the aid of phage libraries as described by Ridler et al., (1995, *Biotechnology* (NY), 13(3):255-260) or humanized antibodies as described by Reinmann et al. (1997, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 13(11):933-943) and Leger et al., (1997, *Hum Antibodies*, 8(1):3-16).

The antibody preparations according to the invention are useful in immunological detection tests intended for the identification of the presence and/or of the quantity of antigens present in a sample.

An antibody according to the invention may comprise, in addition, a detectable marker which is isotopic or nonisotopic, for example fluorescent, or may be coupled to a molecule such as biotin, according to techniques well known to persons skilled in the art.

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

- a) bringing the sample to be tested into contact with an antibody directed against 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 31, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 31, or 3) a polypeptide termed "homologous" to a polypeptide comprising amino acid sequence of SEQ ID NO: 31, and
- b) detecting the antigen/antibody complex formed.

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

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

75

a) an antibody directed against 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:31, 2) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 31, or 3) a polypeptide termed "homologous" to a polypeptide comprising amino acid sequence of SEQ ID NO: 31, and

5 b) a reagent allowing the detection of the antigen/antibody complexes formed.

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND THERAPEUTIC METHODS OF TREATMENT

The invention also relates to pharmaceutical compositions intended for the prevention and/or treatment of a deficiency in the transport of cholesterol or inflammatory lipid substances, characterized in that they comprise a therapeutically effective quantity of a polynucleotide capable of giving rise to the production of an effective quantity of the ABCC11 functional polypeptide, in particular a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31.

15 The invention also provides pharmaceutical compositions comprising a nucleic acid encoding any one of ABCC11 polypeptide according to the invention and pharmaceutical compositions comprising the ABCC11 polypeptide according to the invention intended for the prevention and/or treatment of diseases which are mapped on the chromosome locus 16q12.

The present invention also relates to a new therapeutic approach for the treatment of 20 pathologies linked to the transport of lipophilic substances, comprising transferring and expressing *in vivo* nucleic acids encoding the ABCC11 protein according to the invention.

Thus, the present invention offers a new approach for the treatment and/or the prevention of pathologies such as the paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

Consequently, the invention also relates to a pharmaceutical composition intended for 25 the prevention of or treatment of subjects affected by a dysfunction of the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH conjugated drugs, glucuronate, or sulfate, comprising a nucleic acid encoding at the ABCC11 protein in combination with one or more physiologically compatible vehicle and/or excipient.

According to a specific embodiment of the invention, a composition is provided for 30 the *in vivo* production of the ABCC11 protein. This composition comprises a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide placed under the control of appropriate regulatory sequences, in solution in a physiologically acceptable vehicle and/or excipient.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

76

Therefore, the present invention also relates to a composition comprising a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31, wherein the nucleic acid is placed under the control of appropriate regulatory elements.

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

According to another aspect, the subject of the invention is also a preventive and/or
curative therapeutic method of treating diseases caused by a deficiency in the transport of
lipophilic substances, such a method comprising a step in which there is administered to a
patient a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide according to the invention in said
10 patient, said nucleic acid being, where appropriate, combined with one or more
physiologically compatible vehicles and/or excipients.

The invention also relates to a pharmaceutical composition intended for the prevention
of or treatment of subjects affected by, a deficiency of the ABCC11 gene, comprising a
recombinant vector according to the invention, in combination with one or more
15 physiologically compatible excipients.

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

The invention also relates to the use of a nucleic acid according to the invention,
encoding the ABCC11 protein, for the manufacture of a medicament intended for the
prevention and/or treatment in various forms or more particularly for the treatment of subjects
25 affected by a paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

The invention also relates to the use of a recombinant vector according to the
invention, comprising a nucleic acid encoding the ABCC11 protein, for the manufacture of a
medicament intended for the prevention and/or treatment of subjects affected by a paroxysmal
kinesigenic choreoathetosis.
30

The invention also relates to the use of a nucleic acid according to the invention,
encoding the ABCC11 protein, for the manufacture of a medicament intended for the
prevention and/or treatment in various forms or more particularly for the treatment of subjects

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

77

affected by a deficiency in the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH conjugated drugs, glucuronate, or sulfate.

The invention also relates to the use of a recombinant vector according to the invention, comprising a nucleic acid encoding the ABCC11 protein, for the manufacture of a medicament intended for the prevention and/or treatment of a deficiency in the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH conjugated drugs, glucuronate, or sulfate.

As indicated above, the present invention also relates to the use of a defective recombinant virus according to the invention for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment and/or prevention of pathologies linked to the paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.

The invention relates to the use of such a defective recombinant virus for the preparation of a pharmaceutical composition intended for the treatment and/or prevention of a deficiency associated with the transport of anionic drugs, such as methotrexate (MTX), neutral drugs conjugated to acidic ligands, such as GSH conjugated drugs, glucuronate, or sulfate. Thus, the present invention also relates to a pharmaceutical composition comprising one or more defective recombinant viruses according to the invention.

The present invention also relates to the use of cells genetically modified *ex vivo* with a virus according to the invention, or of producing cells such as viruses, implanted in the body, allowing a prolonged and effective expression *in vivo* of a biologically active ABCC11 protein.

The present invention shows that it is possible to incorporate a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide into a viral vector, and that these vectors make it possible to effectively express a biologically active, mature form. More particularly, the invention shows that the *in vivo* expression of the ABCC11 gene may be obtained by direct administration of an adenovirus or by implantation of a producing cell or of a cell genetically modified by an adenovirus or by a retrovirus incorporating such a DNA.

Preferably, the pharmaceutical compositions of the invention comprise a pharmaceutically acceptable vehicle or physiologically compatible excipient for an injectable formulation, in particular for an intravenous injection, such as for example into the patient's portal vein. These may relate in particular to isotonic sterile solutions or dry, in particular, freeze-dried, compositions which, upon addition depending on the case of sterilized water or

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

79

physiological saline, allow the preparation of injectable solutions. Direct injection into the patient's portal vein is preferred because it makes it possible to target the infection at the level of the liver and thus to concentrate the therapeutic effect at the level of this organ.

A "pharmaceutically acceptable vehicle or excipient" includes diluents and fillers which are pharmaceutically acceptable for method of administration, are sterile, and may be aqueous or oleaginous suspensions formulated using suitable dispersing or wetting agents and suspending agents. The particular pharmaceutically acceptable carrier and the ratio of active compound to carrier are determined by the solubility and chemical properties of the composition, the particular mode of administration, and standard pharmaceutical practice.

Any nucleic acid, polypeptide, vector, or host cell of the invention will preferably be introduced *in vivo* in a pharmaceutically acceptable vehicle or excipient. The phrase "pharmaceutically acceptable" refers to molecular entities and compositions that are physiologically tolerable and do not typically produce an allergic or similar untoward reaction, such as gastric upset, dizziness and the like, when administered to a human. Preferably, as used herein, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "excipient" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the compound is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water or aqueous solution saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions are preferably employed as excipients, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical excipients are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin.

The pharmaceutical compositions according to the invention may be equally well administered by the oral, rectal, parenteral, intravenous, subcutaneous or intradermal route.

According to another aspect, the subject of the invention is also a preventive and/or curative therapeutic method of treating diseases caused by a deficiency in the transport of cholesterol or inflammatory lipid substances, comprising administering to a patient or subject a nucleic acid encoding the ABCG11 polypeptide, said nucleic acid being combined with one or more physiologically compatible vehicles and/or excipients.

In another embodiment, the nucleic acid, recombinant vectors, and compositions according to the invention can be delivered in a vesicle, in particular a liposome (see Langer,

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

79

1990, Science, 249:1527-1533; Treat et al., 1989, *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss: New York, pp. 353-365; and Lopez-Berestein, 1989, In: *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss: New York, pp. 317-327).

5 In a further aspect, recombinant cells that have been transformed with a nucleic acid according to the invention and that express high levels of the ABCC11 polypeptide according to the invention can be transplanted in a subject in need of the ABCC11 polypeptide. Preferably autologous cells transformed with the ABCC11 encoding nucleic acid according to the invention are transplanted to avoid rejection; alternatively, technology is available to
10 shield non-autologous cells that produce soluble factors within a polymer matrix that prevents immune recognition and rejection.

A subject in whom administration of the nucleic acids, polypeptides, recombinant vectors, recombinant host cells, and compositions according to the invention is performed is preferably a human, but can be any animal. Thus, as can be readily appreciated by one of
15 ordinary skill in the art, the methods and pharmaceutical compositions of the present invention are particularly suited to administration to any animal, particularly a mammal, and including, but by no means limited to, domestic animals, such as feline or canine subjects, farm animals, such as but not limited to bovine, equine, caprine, ovine, and porcine subjects, wild animals (whether in the wild or in a zoological garden), research animals, such as mice,
20 rats, rabbits, goats, sheep, pigs, dogs, cats, etc., avian species, such as chickens, turkeys, songbirds, etc., i.e., for veterinary medical use.

Preferably, a pharmaceutical composition comprising a nucleic acid, a recombinant vector, or a recombinant host cell, as defined above, will be administered to the patient or subject.

25

METHODS OF SCREENING AN AGONIST OR ANTAGONIST COMPOUND FOR THE ABCC11 POLYPEPTIDE

According to another aspect, the invention also relates to various methods of screening
30 compounds or small molecules for therapeutic use which are useful in the treatment of diseases due to a deficiency in the transport of cholesterol or inflammatory lipid substances.

The invention therefore also relates to the use of the ABCC11 polypeptide, or of cells expressing the ABCC11 polypeptide, for screening active ingredients for the prevention

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

80

and/or treatment of diseases resulting from a dysfunction in the ABCC11 gene. The catalytic sites and oligopeptide or immunogenic fragments of the ABCC11 polypeptide can serve for screening product libraries by a whole range of existing techniques. The polypeptide fragment used in this type of screening may be free in solution, bound to a solid support, at the cell surface or in the cell. The formation of the binding complexes between the ABCC11 polypeptide fragment and the tested agent can then be measured.

Another product screening technique which may be used in high-flux screenings giving access to products having affinity for the protein of interest is described in application WO84/03564. In this method, applied to the ABCC11 protein, various products are synthesized on a solid surface. These products react with the corresponding ABCC11 protein or fragment thereof and the complex is washed. The products binding the ABCC11 protein are then detected by methods known to persons skilled in the art. Non-neutralizing antibodies can also be used to capture a peptide and immobilize it on a support.

Another possibility is to perform a product screening method using the ABCC11 neutralizing competition antibodies, ABCC11 protein and a product potentially binding the ABCC11 protein. In this manner, the antibodies may be used to detect the presence of a peptide having a common antigenic unit with the ABCC11 polypeptide or protein.

Of the products to be evaluated for their ability to increase activity of ABCC11, there may be mentioned in particular kinase-specific ATP homologs involved in the activation of the molecules, as well as phosphatases, which may be able to avoid the dephosphorylation resulting from said kinases. There may be mentioned in particular inhibitors of the phosphodiesterase (PDE) theophylline and 3-isobutyl-1-methylxanthine type or the adenylyl cyclase forskolin activators.

Accordingly, this invention relates to the use of any method of screening products, *i.e.*, compounds, small molecules, and the like, based on the method of translocation of cholesterol or lipophilic substances between the membranes or vesicles, this being in all synthetic or cellular types, that is to say of mammals, insects, bacteria, or yeasts expressing constitutively or having incorporated human ABCC11 encoding nucleic acid. To this effect, labeled lipophilic substances analogs may be used.

Furthermore, knowing that the disruption of numerous transporters have been described (van den Hazel et al., 1999, *J. Biol Chem*, 274: 1934-41), it is possible to think of using cellular mutants having a characteristic phenotype and to complement the function thereof with the ABCC11 protein and to use the whole for screening purposes.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

81

The invention also relates to a method of screening a compound or small molecule active on the transport of a substrate, an agonist or antagonist of the ABCC11 polypeptide, said method comprising the following steps:

- a) preparing a membrane vesicle comprising the ABCC11 polypeptide and the substrate comprising a detectable marker;
- b) incubating the vesicle obtained in step a) with an agonist or antagonist candidate compound;
- c) qualitatively and/or quantitatively measuring release of the substrate comprising a detectable marker; and
- d) comparing the release measurement obtained in step b) with a measurement of release of labeled substrate by a vesicle that has not been previously incubated with the agonist or antagonist candidate compound.

ABCC11 polypeptide comprise an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31.

According to a first aspect of the above screening method, the membrane vesicle is a synthetic lipid vesicle, which may be prepared according to techniques well known to a person skilled in the art. According to this particular aspect, the ABCC11 protein may be recombinant proteins.

According to a second aspect, the membrane vesicle is a vesicle of a plasma membrane derived from cells expressing at least one of ABCC11 polypeptide. These may be cells naturally expressing the ABCC11 polypeptide or cells transfected with a nucleic acid encoding at least one ABCC11 polypeptide or recombinant vector comprising a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide.

According to a third aspect of the above screening method, the substrate is an anionic drug, such as the methotrexate (MTX).

According to a fourth aspect of the above screening method, the substrate is a neutral drug conjugated to acidic ligands such as GSH, glucuronate, or sulfate conjugated drugs.

According to a fifth aspect, the substrate is radioactively labelled, for example with an isotope chosen from ^3H or ^{125}I .

According to a sixth aspect, the substrate is labelled with a fluorescent compound, such as NBD or pyrene.

According to a seventh aspect, the membrane vesicle comprising the labelled substrates and the ABCC11 polypeptide is immobilized at the surface of a solid support prior to step b).

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

82

According to a eighth aspect, the measurement of the fluorescence or of the radioactivity released by the vesicle is the direct reflection of the activity of the substrate transport by the ABCC11 polypeptide.

The invention also relates to a method of screening a compound or small molecule active on the transport of anion, an agonist or antagonist of the ABCC11 polypeptide, said method comprising the following steps:

a) obtaining cells, for example a cell line, that, either naturally or after transfecting the cell with the ABCC11 encoding nucleic acid, expresses the ABCC11 polypeptide;

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

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

d) incubating the cells obtained in step c) with an agonist or antagonist candidate compound for the ABCC11 polypeptide;

e) measuring efflux of the labelled anion; and

f) comparing the value of efflux of the labelled anion determined in step e) with a value of the efflux of a labelled anion measured with cells that have not been previously incubated in the presence of the agonist or antagonist candidate compound of ABCC11 polypeptide.

In a first specific embodiment, the ABCC11 polypeptide comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31.

According to a second aspect, the cells used in the screening method described above may be cells not naturally expressing, or alternatively expressing at a low level, the ABCC11 polypeptide, said cells being transfected with a recombinant vector according to the invention capable of directing the expression of a nucleic acid encoding the ABCC11 polypeptide.

According to a third aspect, the cells may be cells having a natural deficiency in anion transport, or cells pretreated with one or more anion channel inhibitors such as VerapamilTM or tetrathylammonium.

According to a fourth aspect of said screening method, the anion is a radioactively labelled iodide, such as the salts $K^{125}I$ or $Na^{125}I$.

According to a fifth aspect, the measurement of efflux of the labelled anion is determined periodically over time during the experiment, thus making it possible to also establish a kinetic measurement of this efflux.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

83

According to a sixth aspect, the value of efflux of the labelled anion is determined by measuring the quantity of labelled anion present at a given time in the cell culture supernatant.

According to a seventh aspect, the value of efflux of the labelled anion is determined as the proportion of radioactivity found in the cell culture supernatant relative to the total radioactivity corresponding to the sum of the radioactivity found in the cell lysate and the radioactivity found in the cell culture supernatant.

in the presence of a compound stimulating the production of interleukine and of an agonist or antagonist candidate compound;

The following examples are intended to further illustrate the present invention but do not limit the invention.

EXAMPLES

EXAMPLE 1 : Search of human ABCC11 gene in genomic database

Searches of the GeneBank HTGS database were performed with the TBLASTN and TBLASTP programs with the known ABC transporter nucleotide and protein sequences as queries. Amino acid alignments were generated with the PILEUP program included in the Genetics Computer Group (GCG) Package. The GRAIL and GeneScan programs on Genome analysis pipeline 1 were utilized to predict genomic structures of the new genes.

The human ABCC11 transporter gene sequence was detected on the bacterial artificial chromosome (BAC) clone #AC007600 from the GenBank HTGS database. cDNA sequencing, genomic structure prediction programs, and computer searches determined the sequence and genomic structure of the new gene belonging to the ABCC subfamily.

Primers were designed from expressed sequence tag (EST) clone sequences and from predicted cDNA sequences from 5' and 3' regions of genes. ABCC11 cDNA sequence was confirmed by PCR amplification of testis or liver cDNA (Clontech). Sequencing was performed on the ABI 377 sequencer according to the manufacturer's protocols (Perkin Elmer). Positions of introns were determined by comparison between genomic (BAC AC007600) and cDNA sequences.

EXAMPLE 2: Radiation hybrid Mapping (Figure 2)

The chromosomal localization of the human ABCC11 gene was determined by mapping on the GeneBridge4 radiation hybrid panel (Research Genetics), according to the manufacturer's protocol.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

84

Radiation hybrid mapping placed *ABCC11* to the centromeric region of human chromosome 16, flanked by markers D16S3093 and D16S409 (Figure 2). The region encompasses 5.4 cM, or 132.5 cR, and could not be narrowed down further due to the lack of recombination and/or mapped polymorphic markers in this region. The *ABCC11* gene most likely localized on chromosome 16q12.1, since it maps closer to the 16q marker D16S409 (13.24 cR) than the 16p marker D16S3093 (119.40 cR) (Figure 2). The *ABCC12* was located at the same locus, separated by about 200kb from *ABCC11*. *ABCC11* and *ABCC12* are located tandemly with their 5' ends facing towards the centromere. Two more *ABCC* subfamily genes, *ABCC1* and *ABCC6*, have been mapped to the short arm of the same chromosome, to 16p13.1 (Cole et al. (1992) *Science* 258, 1650-1654 ; Allikmets et al. (1996) *Human Mol. Genet.* 5, 1649-1655. The 3' ends of *ABCC1* and *ABCC6* are only about 9 kb apart from each other so the genes face opposite directions (Cai et al., *J Mol Med*, 2000, 78, 36-46).

The locus for paroxysmal kinesigenic choreoathetosis (PKC) has been assigned to 16p11.2-q12.1, between markers D16S3093 and D16S416 (Tornita et al., *Am J Hum Genet.* 1999, 65, 1688-97 ; Bennett et al., *Neurology*, 2000, 54, 125-30; Figure 2). An overlapping locus has been predicted to contain the gene for infantile convulsions with paroxysmal choreoathetosis (ICCA; Lee et al., *Hum Genet.* 1998, 103, 608-12). It was suggested that mutations in a novel ion-channel gene on chromosome 16 might be responsible for PKC and/or ICCA (Bennett et al., *Neurology*, 2000, 54, 125-30). Since another member of the *ABCC* subfamily, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), functions as a cyclic AMP-regulated channel, and also as a regulator of other ion channels and transporters (Kleizen et al., *J Cell Biol.* 2000, 79, 544-56), it is feasible that this gene may function as ion channels (or regulators) and that mutations in these could result in a disease phenotype. Expression analysis of *ABCC11* reveals that this gene is expressed in muscle and brain tissues, supporting the working hypothesis of the skeletal muscle or brain-related etiology of PKC. In summary, chromosomal localization, potential function, and expression profile make this gene a promising candidate for PKC/ICCA.

EXAMPLE 3: Phylogenetic Analysis (Figure 5)

Phylogenetic analyses of the *ABCC* subfamily proteins clearly demonstrate a relatively recent duplication of the *ABCC11* and *ABCC12* genes (Fig. 5). The resulting neighbor-joining tree shows with maximum confidence (100-level of bootstrap support) a

WO 02/072632

85

PCT/EP02/03241

close evolutionary relationship of the ABCC11/ABCC12 cluster with the ABCC5 gene (Fig.5). In addition, the analysis of the tree suggests a recent duplication of the ABCC8 and ABCC9 genes, while ABCC10 seems to be one of the first genes to separate from the common ancestor. ABCC1, ABCC2, ABCC3, and ABCC6 genes constitute a well-defined sub-cluster, while the ABCC4 and CFTR (ABCC7) genes form another reliable subset despite apparent early divergence.

EXAMPLE 4 : Cell lines

The human erythroleukemia K562 cells were obtained from the American Tissue Culture Collection (Rockville MD) and were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine. The 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) resistant cells, K562/PMEA, were derived as described by Hatse et al. (*Mol Pharmacol*, 1996, 50, 1231-42). T-lymphoblast cell lines CRM and (-)2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC)-resistant CEM-3TC cells were selected. Cell lines, CEMss and CEM-r1, were described by Robbins et al. (*Mol Pharmacol*, 1995, 47, 391-7). CEM-r1 is highly resistant to PMEA due to an overexpression of *ABCC4* (Schuetz et al., *Nat Med*, 1999, 5, 1048-51). Total RNA from these six cell lines (three pairs of wild type and resistant cell lines) was isolated with TRIzol (GIBCO BRL), and RT-PCR performed at varying cycle numbers oligonucleotide primers as mentioned in Figure 3. The PCR products were subcloned and verified by direct sequencing.

Reverse transcription

In a total volume of 11.5 µl, 500 ng of mRNA poly(A)+ (Clontech) mixed with 500 ng of oligodT are denatured at 70°C for 10 min and then chilled on ice. After addition of 10 units of RNasin, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTP, Superscript first strand buffer and 200 units of Superscript II (Life Technologies), the reaction is incubated for 45 min at 42°C.

PCR

Each polymerase chain reaction contained 400 µM each dNTP, 2 units of *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polymerase (Ampli Taq Gold; Perkin Elmer), 0.5 µM each primer, 2.5 mM MgCl₂, PCR buffer and 50 ng of DNA, or about 25 ng of cDNA, or 1/50th of primary PCR mixture. Reactions were carried out for 30 cycles in a Perkin Elmer 9700 thermal cycler in 96-well microtiter plates. After an initial denaturation at 94°C for 10 min, each cycle

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

86

consisted of: a denaturation step of 30 s (94°C), a hybridization step of 30 s (64°C for 2 cycles, 61°C for 2 cycles, 58°C for 2 cycles and 55°C for 28 cycles), and an elongation step of 1 min/kb (72°C). PCR ended with a final 72°C extension of 7 min. In case of RT-PCR, control reactions without reverse transcriptase and reactions containing water instead of cDNA were performed for every sample.

DNA Sequencing

PCR products are analyzed and quantified by agarose gel electrophoresis, purified with a P100 column. Purified PCR products were sequenced using ABI Prism BigDye terminator cycle sequencing kit (Perkin Elmer Applied Biosystems). The sequence reaction mixture was purified using Microcon-100 microconcentrators (Amicon, Inc., Beverly). Sequencing reactions were resolved on an ABI 377 DNA sequencer (Perkin Elmer Applied Biosystems) according to manufacturer's protocol (Applied Biosystems, Perkin Elmer).

Primers

Oligonucleotides were selected using Prime from GCG package or Oligo 4 (National Biosciences, Inc.) softwares. Primers were ordered from Life Technologies, Ltd and used without further purification.

EXAMPLE 5: Expression of ABCC11 in human tissues and nucleotide-resistant cell lines

The expression pattern for the *ABCC11* gene was examined by PCR on multiple tissue expression arrays (Clontech) with gene-specific primers resulting in about 500 bp PCR fragments (Figure 3). Approximately 5000 bp mRNA species was observed by Northern blot. The primers used in expression studies amplified the *ABCC11* cDNA from exon 7 to exon 10, resulting in a 527bp PCR fragment (Figure 3). In case of lung, a smaller (419bp) fragment was detected also (Figure 3). Direct sequencing of the PCR product determined that the shorter PCR product lacked exon 9 of the *ABCC11* gene. Since these results were confirmed in repeated experiments, frequent skipping of *ABCC11* exon 9 may occur *in vivo*. Exon skipping and alternative splicing events have been described for several ABC genes by Rickers et al. (Human Genet. (1994) 94, 311-313) and Bellincampi et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun. (2001) 283, 590-597).

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

87

Systematic analysis of the tissue source of the *ABCC11* ESTs from the public dbEST and the proprietary Incyte LifeSeq Gold databases resulted in 29 ESTs, with the majority being derived from breast tumor tissue (17). The others were from prostate (5 clones), testis (3), CNS (2), and colon (2). No EST had been derived from muscle libraries.

5 Since this new gene shows extensive structural similarity to *ABCC5* (and to a certain extent, *ABCC4*), expression in three pairs of cell lines, K562 and K562-PMEA, CEMss and CEM-r1, CEM and CEM-3TC was also assessed. The K562-PMEA and CEM-r1 lines have been selected for resistance to PMEA, the CEM-3TC for resistance to the cytidine nucleoside analog, 3TC. No difference was observed in expression levels of *ABCC11* between the
10 parental and PMEA-resistant cell lines. In contrast, the CEM-3TC cell line revealed a reproducible 2-3 fold increase in the expression of *ABCC11*, when compared to the parental line CEM. This is a potentially interesting finding when one considers the close evolutionary relationship of *ABCC11* and *ABCC5* (Figures 1 and 5), in further view of recent studies demonstrating selective nucleotide analog transport by *ABCC5* (Wijnholds et al., *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97, 7476-81). In addition, since the efflux-resistant phenotype of CEM-3TC
15 can be explained only in part by *ABCC4* overexpression, the higher expression of *ABCC11* in these cells warrants further investigation.

20

EXAMPLE 6 : Construction of the expression vector containing the complete cDNA of *ABCC11* in mammalian cells

The *ABCC11* gene may be expressed in mammalian cells. A typical eukaryotic expression vector contains a promoter which allows the initiation of the transcription of the
25 mRNA, a sequence encoding the protein, and the signals required for the termination of the transcription and for the polyadenylation of the transcript. It also contains additional signals such as enhancers, the Kozak sequence and sequences necessary for the splicing of the mRNA. An effective transcription is obtained with the early and late elements of the SV40 virus promoters, the retroviral LTRs or the CMV virus early promoter. However, cellular
30 elements such as the actin promoter may also be used. Many expression vectors may be used to carry out the present invention, an example of such a vector is pcDNA3 (Invitrogen).

EXAMPLE 7 : Production of normal and mutated *ABCC11* polypeptide.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

88

The normal ABCC11 polypeptide encoded by complete corresponding cDNAs whose isolation is described in Example 2, or the mutated ABCC11 polypeptide whose complete cDNA may also be obtained according to the techniques described in Example 2, may be easily produced in a bacterial or insect cell expression system using the baculovirus vectors or in mammalian cells with or without the vaccinia virus vectors. All the methods are now widely described and are known to persons skilled in the art. A detailed description thereof will be found for example in F. Ausubel et al. (1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y).

EXAMPLE 8: Production of an antibody directed against a mutated ABCC11 polypeptide.

The antibodies in the present invention may be prepared by various methods (Current Protocols In Molecular Biology Volume 1 edited by Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl - Massachusetts General Hospital Harvard Medical School, chapter 11, 1989). For example, the cells expressing a polypeptide of the present invention are injected into an animal in order to induce the production of serum containing the antibodies. In one of the methods described, the proteins are prepared and purified so as to avoid contaminations. Such a preparation is then introduced into the animal with the aim of producing polyclonal antisera having a higher activity.

In the preferred method, the antibodies of the present invention are monoclonal antibodies. Such monoclonal antibodies may be prepared using the hybridoma technique (Köhler et al, 1975, *Nature*, 256:495; Köhler et al, 1976, *Eur. J. Immunol.* 6:292; Köhler et al, 1976, *Eur. J. Immunol.*, 6:511; Hammett et al., 1981, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y., pp. 563-681). In general, such methods involve immunizing the animal (preferably a mouse) with a polypeptide or better still with a cell expressing the polypeptide. These cells may be cultured in a suitable tissue culture medium. However, it is preferable to culture the cells in an Eagle medium (modified Earle) supplemented with 10% fetal bovine serum (inactivated at 56°C) and supplemented with about 10 g/l of nonessential amino acids, 1000 U/ml of penicillin and about 100 µg/ml of streptomycin.

The splenocytes of these mice are extracted and fused with a suitable myeloma cell line. However, it is preferable to use the parental myeloma cell line (SP2O) available from the ATCC. After fusion, the resulting hybridoma cells are selectively maintained in HAT medium

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

89

and then cloned by limiting dilution as described by Wands et al. (1981, *Gastroenterology*, 80:225-232). The hybridoma cells obtained after such a selection are tested in order to identify the clones secreting antibodies capable of binding to the polypeptide.

Moreover, other antibodies capable of binding to the polypeptide may be produced according to a 2-stage procedure using anti-idiotypic antibodies such a method is based on the fact that the antibodies are themselves antigens and consequently it is possible to obtain an antibody recognizing another antibody. According to this method, the antibodies specific for the protein are used to immunize an animal, preferably a mouse. The splenocytes of this animal are then used to produce hybridoma cells, and the latter are screened in order to identify the clones which produce an antibody whose capacity to bind to the specific antibody-protein complex may be blocked by the polypeptide. These antibodies may be used to immunize an animal in order to induce the formation of antibodies specific for the protein in a large quantity.

It is preferable to use Fab and F(ab')₂ and the other fragments of the antibodies of the present invention according to the methods described here. Such fragments are typically produced by proteolytic cleavage with the aid of enzymes such as Papain (in order to produce the Fab fragments) or Pepsin (in order to produce the F(ab')₂ fragments). Otherwise, the secreted fragments recognizing the protein may be produced by applying the recombinant DNA or synthetic chemistry technology.

For the *in vivo* use of antibodies in humans, it would be preferable to use "humanized" chimeric monoclonal antibodies. Such antibodies may be produced using genetic constructs derived from hybridoma cells producing the monoclonal antibodies described above. The methods for producing the chimeric antibodies are known to persons skilled in the art (for a review, see: Morrison (1985, *Science* 229:1202); Oi et al., (1986, *Biotechnology*, 4:214); Cabilly et al., US patent No. 4,816,567; Taniguchi et al., EP 171496; Morrison et al., EP 173494; Neuberger et al., WO 8601533; Robinson et al., WO 8702671; Boulianne et al. (1984, *Nature*, 312:643); and Neuberger et al., (1985, *Nature*, 314:268).

EXAMPLE 9 : Determination of polymorphisms/mutations in the ABCC11 gene.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

90

The detection of polymorphisms or of mutations in the sequences of the transcripts or in the genomic sequence of the ABCC11 gene may be carried out according to various protocols. The preferred method is direct sequencing.

For patients from whom it is possible to obtain an mRNA preparation, the preferred method consists in preparing the cDNAs and sequencing them directly. For patients for whom only DNA is available, and in the case of a transcript where the structure of the corresponding gene is unknown or partially known, it is necessary to precisely determine its intron-exon structure as well as the genomic sequence of the corresponding gene. This therefore involves, in a first instance, isolating the genomic DNA BAC or cosmid clone(s) corresponding to the transcript studied, sequencing the insert of the corresponding clone(s) and determining the intron-exon structure by comparing the cDNA sequence to that of the genomic DNA obtained.

The technique of detection of mutations by direct sequencing consists in comparing the genomic sequence of the ABCC11 gene obtained from homozygotes for the disease or from at least 8 individuals (4 individuals affected by the pathology studied and 4 individuals not affected) or from at least 32 unrelated individuals from the studied population. The sequence divergences constitute polymorphisms. All those modifying the amino acid sequence of the wild-type protein may be mutations capable of affecting the function of said protein which it is preferred to consider more particularly for the study of cosegregation of the mutation and of the disease (denoted genotype-phenotype correlation) in the pedigree, or of a pharmacological response to a therapeutic molecule in the pharmacogenomic studies, or in the studies of case/control association for the analysis of the sporadic cases.

EXAMPLE 10 : Identification of a causal gene for a disease linked to the chromosomal locus, such as paroxysmal kinesigenic choreoathetosis by causal mutation or a transcriptional difference

Among the mutations identified according to the method described in Example 9, all those associated with the disease phenotype are capable of being causal. Validation of these results is made by sequencing the gene in all the affected individuals and their relations.

Moreover, Northern blot or RT-PCR analysis, according to the methods described in Example 4, using RNA specific to affected or nonaffected individuals makes it possible to detect notable variations in the level of expression of the gene studied, in particular in the absence of transcription of the gene.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

91

EXAMPLE 11: Construction of recombinant vectors comprising a nucleic acid encoding the ABCC11 protein

5 Synthesis of a nucleic acid encoding the human ABCC11 protein:

Total RNA (500 ng) isolated from a human cell (for example, placental tissue, Clontech, Palo Alto, CA, USA, or THP1 cells) may be used as source for the synthesis of the cDNA of the human ABCC11 gene. Methods to reverse transcribe mRNA to cDNA are well known in the art. For example, one may use the system "Superscript one step RT-PCR (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA).

Oligonucleotide primers specific for ABCC11 cDNA may be used for this purpose. These oligonucleotide primers may be synthesized by the phosphoramidite method on a DNA synthesizer of the ABI 394 type (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Sites recognized by the restriction enzyme NotI may be incorporated into the amplified ABCC11 cDNA to flank the cDNA region desired for insertion into the recombinant vector by a second amplification step using 50 ng of human ABCC11 cDNA as template, and 0.25 μ M of the ABCC11 specific oligonucleotide primers used above containing, at their 5' end, the site recognized by the restriction enzyme NotI (5'-GCGGCCGC-3'), in the presence of 200 μ M of each of said dideoxynucleotides dATP, dCTP, dTTP and dGTP as well as the *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase (Stratagene, Inc. La Jolla, CA, USA).

The PCR reaction may be carried out over 30 cycles each comprising a step of denaturation at 95°C for one minute, a step of renaturation at 50°C for one minute and a step of extension at 72°C for two minutes, in a thermocycler apparatus for PCR (Cetus Perkin Elmer Norwalk, CT, USA).

25 Cloning of the cDNA of the human ABCC11 gene into an expression vector:

The human ABCC11 cDNA insert may then be cloned into the NotI restriction site of an expression vector, for example, the pCMV vector containing a cytomegalovirus (CMV) early promoter and an enhancer sequence as well as the SV40 polyadenylation signal (Beg et al., 1990, PNAS, 87:3473; Applebaum-Boden, 1996, JCI 97), in order to produce an expression vector designated pABCC11.

The sequence of the cloned cDNA can be confirmed by sequencing on the two strands using the reaction set "ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing ready" (marketed by

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

92

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a capillary sequencer of the ABI 310 type (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Construction of a recombinant adenoviral vector containing the cDNA of the human ABCC11 gene;

Modification of the expression vector pCMV- β :

The β -galactosidase cDNA of the expression vector pCMV- β (Clontech, Palo Alto, CA, USA, Gene Bank Accession No. U02451) may be deleted by digestion with the restriction endonuclease NotI and replaced with a multiple cloning site containing, from the 5' end to the 3' end, the following sites: NotI, AscI, RsrII, AvrII, SmaI, and NotI, cloned at the region of the NotI restriction site. The sequence of this multiple cloning site is:

5'-CGGCCGCGGCCGCGCCCGACCGCTAGGATTAAATCGCGGCCGCG-3'.

The DNA fragment between the EcoRI and SmaI sites of the modified expression vector pCMV may be isolated and cloned into the modified XbaI site of the shuttle vector pXCXII (McKinnon et al., 1982, Gene, 19:33; McGrory et al., 1988, Virology, 163:614).

Modification of the shuttle vector pXCXII:

A multiple cloning site comprising, from the 5' end to the 3' end the XbaI, EcoRI, SfiI, PmeI, NheI, SrfI, PaeI, SalI and XbaI restriction sites having the sequence:

5'-CTCTAGAATTGGCCTCCGTGGCCGTTTAAACGCTAGCGCCCGGCTTAATTAA GTCGACTCTAGAGC-3', may be inserted at the level of the XbaI site (nucleotide at position 3329) of the vector pXCXII (McKinnon et al., 1982, Gene 19:33; McGrory et al., 1988, Virology, 163:614).

The EcoRI-SalI DNA fragment isolated from the modified vector pCMV- β containing the CMV promoter/enhancer, the donor and acceptor splicing sites of FV40 and the polyadenylation signal of FV40 may then be cloned into the EcoRI-SalI site of the modified shuttle vector pXCX, designated pCMV-11.

Preparation of the shuttle vector pAD12-ABCA:

The human ABCC11 cDNA is obtained by an RT-PCR reaction, as described above, and cloned at the level of the NotI site into the vector pCMV-12, resulting in the obtaining of the vector pCMV-ABCC11.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

93

Construction of the ABC1 recombinant adenovirus:

The recombinant adenovirus containing the human ABCC11 cDNA may be constructed according to the technique described by McGrory et al. (1988, *Virology*, 163:614).

5 Briefly, the vector pAD12-ABCA is cotransfected with the vector tGM17 according to the technique of Chen et al. (1987, *Mol Cell Biol.*, 7:2745-2752).

Likewise, the vector pAD12-Luciferase was constructed and cotransfected with the vector pJM17.

10 The recombinant adenoviruses are identified by PCR amplification and subjected to two purification cycles before a large-scale amplification in the human embryonic kidney cell line HEK 293 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA).

The infected cells are collected 48 to 72 hours after their infection with the adenoviral vectors and subjected to five freeze-thaw lysing cycles.

15 The crude lysates are extracted with the aid of Freon (Halocarbhone 113, Matheson Product, Scaucus, N.J. USA), sedimented twice in cesium chloride supplemented with 0.2% murine albumine (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) and dialysed extensively against buffer composed of 150 mM NaCl, 10 mM Hepes (pH 7.4), 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, and 1 mM CaCl₂.

20 The recombinant adenoviruses are stored at -70°C and titrated before their administration to animals or their incubation with cells in culture.

The absence of wild-type contaminating adenovirus is confirmed by screening with the aid of PCR amplification using oligonucleotide primers located in the structural portion of the deleted region.

25 Validation of the expression of the human ABCC11 cDNA:

Polyclonal antibodies specific for a human ABCC11 polypeptide may be prepared as described above in rabbits and chicks by injecting a synthetic polypeptide fragment derived from an ABCC11 protein, comprising all or part of an amino acid sequence as described in SEQ ID NO: 30. These polyclonal antibodies are used to detect and/or quantify the expression
30 of the human ABCC11 gene in cells and animal models by immunoblotting and/or immunodetection.

Expression *in vitro* of the human ABCC11 cDNA in cells:

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

94

Cells of the HEK293 line and of the COS-7 line (American Tissue Culture Collection, Bethesda, MD, USA), as well as fibroblasts in primary culture derived from Tangier patients or from patients suffering from hypo-alpha₂-lipoproteinemia are transfected with the expression vector pCMV-ABCC11 (5-25 µg) using Lipofectamine (BRL, Gaithersburg, MD, USA) or by coprecipitation with the aid of calcium chloride (Chen et al., 1987, Mol Cell Biol., 7:2745-2752).

These cells may also be infected with the vector pABCC11-AdV (Index of infection, MOI=10).

The expression of human ABCC11 may be monitored by immunoblotting as well as by quantification of the efflux of cholesterol induced by apoA-1 using transfected and/or infected cells.

Expression in vivo of the ABCC11 gene in various animal models:

An appropriate volume (100 to 300 µl) of a medium containing the purified recombinant adenovirus (pABCA-AdV or pLucif-AdV) containing from 10⁸ to 10⁹ lysis plaque-forming units (pfu) are infused into the Saphenous vein of mice (C57BL/6, both control mice and models of transgenic or knock-out mice) on day 0 of the experiment.

The evaluation of the physiological role of the ABCC11 protein in the transport of cholesterol or inflammatory lipid substances is carried out by determining the total quantity of cholesterol or appropriate inflammatory lipid substances before (day zero) and after (days 2, 4, 7, 10, 14) the administration of the adenovirus.

Kinetic studies with the aid of radioactively labelled products are carried out on day 5 after the administration of the vectors rLucif-AdV and rABCA-AdV in order to evaluate the effect of the expression of the ABCC11 gene on the transport of cholesterol and inflammatory lipid substances.

Furthermore, transgenic mice and rabbits overexpressing the ABCC11 gene may be produced, in accordance with the teaching of Vaisman (1995) and Hoeg (1996) using constructs containing the human ABCC11 cDNA under the control of endogenous promoter such as ABCC11, or CMV or apoE.

The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

95

description and the accompanying figures. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

96

CLAIMS

1. An isolated nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.
- 5 2. An isolated nucleic acid comprising at least eight consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.
3. An isolated nucleic acid comprising at least 80% nucleotide identity with a nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide
10 sequence thereof.
4. The isolated nucleic acid according to claim 3, wherein the nucleic acid comprises an 85%, 90%, 95%, or 98% nucleotide identity with the nucleic acid comprising any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.
5. An isolated nucleic acid that hybridizes under high stringency conditions with a
15 nucleic acid comprising a) any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.
6. An isolated nucleic acid comprising a nucleotide sequence as depicted in any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.
7. A nucleotide probe or primer specific of ABCC11 gene, wherein the nucleotide
20 probe or primer comprises at least 15 consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.
8. A nucleotide probe or primer specific for an ABCC11 gene, wherein the nucleotide probe or primer comprises a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NO: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof.
- 25 9. A method of amplifying a region of the nucleic acid according to claim 1, wherein the method comprises:
 - a) contacting the nucleic acid with two nucleotide primers, wherein the first nucleotide primer hybridizes at a position 5' of the region of the nucleic acid, and the second nucleotide primer hybridizes at a position 3' of the region of the nucleic acid, in the presence of reagents
30 necessary for an amplification reaction; and
 - b) detecting the amplified nucleic acid region.
10. A method of amplifying a region of the nucleic acid according to claim 1, wherein the two nucleotide primers are selected from the group consisting of

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

97

- a) a nucleotide primer comprising at least 15 consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-29, or of a complementary nucleotide sequence,
- b) a nucleotide primer as in any one of claims 7-9,
- c) a nucleotide primer comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a nucleic acid having a complementary sequence thereof.
11. A kit for amplifying the nucleic acid according to claim 1, wherein the kit comprises:
- a) two nucleotide primers whose hybridization position is located respectively 5' and 3' of the region of the nucleic acid; and optionally,
- b) reagents necessary for an amplification reaction.
12. The kit according to claim 11, wherein the two nucleotide primers are selected from the group consisting of
- a) a nucleotide primer comprising at least 15 consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or of a complementary nucleotide sequence,
- b) a nucleotide primer as in any one of claims 7-9,
- c) a nucleotide primer comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a nucleic acid having a complementary sequence thereof.
13. The nucleotide probe or primer according to any of claim 7-9, wherein the nucleotide probe or primer comprises a marker compound.
14. A method of detecting a nucleic acid according to claim 1, wherein the method comprises:
- a) contacting the nucleic acid with a nucleotide probe selected from the group consisting of
- 1) a nucleotide probe comprising at least 15 consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof,
- 2) a nucleotide primer as in any one of claims 7-9,
- 3) a nucleotide probe comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof, and
- b) detecting a complex formed between the nucleic acid and the probe.
15. The method of claim 14, wherein the probe is immobilized on a support.
16. A kit for detecting the nucleic acid according to claim 1, wherein the kit comprises

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

98

- a) a nucleotide probe selected from the group consisting of 1) a nucleotide probe comprising at least 15 consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or of a complementary nucleotide sequence, 2) a nucleotide primer as in any one of claims 7-9, 3) a nucleotide probe comprising a nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-30, or a complementary nucleotide sequence thereof, and optionally,
- b) reagents necessary for a hybridization reaction.
17. The kit according to claim 16, wherein the probe is immobilized on a support.
18. A recombinant vector comprising the nucleic acid according claim 1.
19. The vector according to claim 18, wherein the vector is an adenovirus.
20. A recombinant host cell comprising the recombinant vector according to claim 21.
21. A recombinant host cell comprising the nucleic acid according claim 1.
22. An isolated nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of any one of SEQ ID NO: 31.
23. A recombinant vector comprising the nucleic acid according to claim 22.
24. A recombinant host cell comprising the nucleic acid according to claim 22.
25. A recombinant host cell comprising the recombinant vector according to claim 23.
26. An isolated polypeptide selected from the group consisting of
- a) a polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 31,
- b) a polypeptide fragment or variant of a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31, and
- c) a polypeptide homologous to a polypeptide comprising amino acid sequence of SEQ ID NO: 30.
27. An antibody directed against the isolated polypeptide according to claim 26.
28. The antibody according to claim 27, wherein the antibody comprises a detectable compound.
29. A method of detecting a polypeptide, wherein the method comprises
- a) contacting the polypeptide with an antibody according to claim 27; and
- b) detecting an antigen/antibody complex formed between the polypeptide and the antibody.
30. A diagnostic kit for detecting a polypeptide, wherein the kit comprises
- a) the antibody according to claim 27; and
- b) a reagent allowing detection of an antigen/antibody complex formed between the polypeptide and the antibody.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

99

31. A pharmaceutical composition comprising the nucleic acid according to claim 1 and a physiologically compatible excipient.
32. A pharmaceutical composition comprising the recombinant vector according to claim 18 and a physiologically compatible excipient.
- 5 33. Use of the nucleic acid according to claim 1 for the manufacture of a medicament intended for the prevention and/or treatment of a subject affected by paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.
34. Use of a recombinant vector according to claim 21 for the manufacture of a medicament for the prevention and/or treatment of subjects affected by paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.
- 10 35. Use of isolated ABCC11 polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31 for the manufacture of a medicament intended for the prevention and/or treatment of subjects affected by paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.
36. A pharmaceutical composition comprising a polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 31, and a physiologically compatible excipient.
- 15 37. Use of isolated ABCC11 polypeptide comprising an amino acid sequence of the SEQ ID NO: 31 for screening an active ingredient for the prevention or treatment of paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.
38. Use of a recombinant host cell expressing the ABCC11 polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 31 for screening an active ingredient for the prevention or treatment of paroxysmal kinesigenic choreoathetosis.
- 20 39. A method of screening an agonist or an antagonist of the ABCC11 polypeptide, wherein the method comprises
- a) preparing a membrane vesicle comprising at least one of the ABCC11 polypeptide and a substrate comprising a detectable marker;
- 25 b) incubating the vesicle obtained in step a) with an agonist or antagonist candidate compound;
- c) qualitatively and/or quantitatively measuring a release of the substrate comprising the detectable marker; and
- 30 d) comparing the release of the substrate measured in step b) with a measurement of a release of a labeled substrate by a membrane vesicle that has not been previously incubated with the agonist or antagonist candidate compound.

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

100

40. A method of screening an agonist, or an antagonist of ABCC11 polypeptide, wherein the method comprises

- a) incubating a cell that expresses the ABCC11 polypeptide with an anion labeled with a detectable marker;
- 5 b) washing the cell of step a) whereby excess labeled anion that has not penetrated into the cell is removed;
- c) incubating the cell obtained in step b) with an agonist or antagonist candidate compound for the ABCC11 polypeptide;
- d) measuring efflux of the labeled anion from the cell; and
- 10 e) comparing the efflux of the labeled anion determined in step d) with efflux of a labeled anion measured with a cell that has not been previously incubated with the agonist or antagonist candidate compound.

41. An implant comprising the recombinant host cell according to claim 24 or 25.

FIGURE 1

FIGURE 1

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

2/5

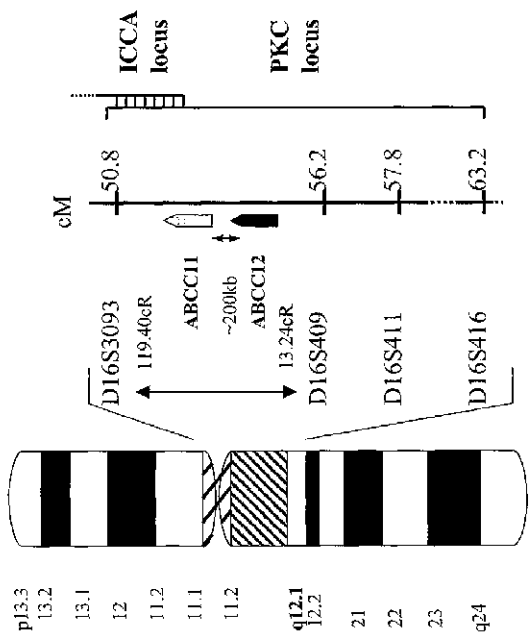


FIGURE 2

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

3/5



FIGURE 3

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

4/5

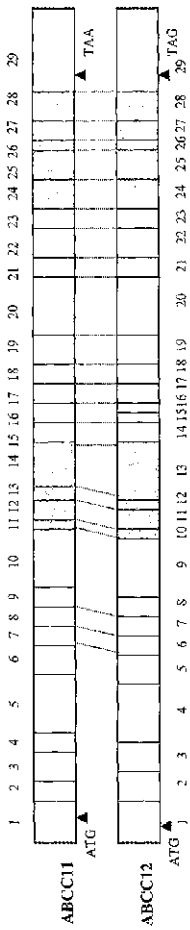


FIGURE 4

WO 02/072632

PCT/EP02/03241

5/5

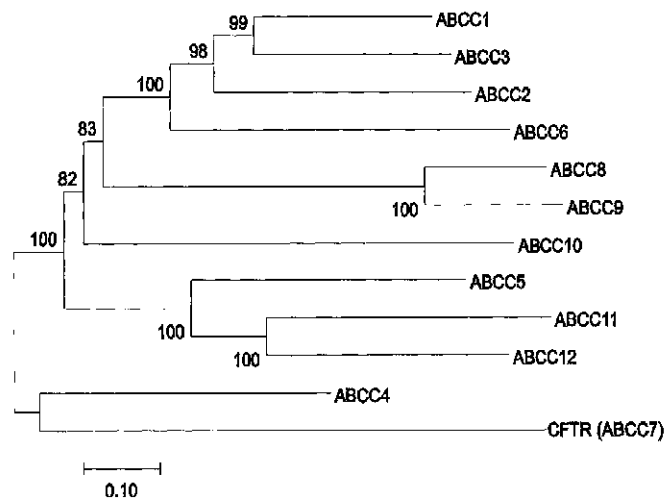


Figure 5

WO 02/072632

1/12

PCT/EP02/03241

LIST OF SEQUENCES

<110> AVENTIS PHARMA SA
US GOVERNMENT of the UNITED STATES

<120> NUCLEIC ACID OF THE HUMAN ABCG1 GENE, VECTORS
CONTAINING SUCH NUCLEIC ACID, AND USES THEREOF

<130> ABCG1 GENE

<140> R701305

<141> 2002-03-05

<150> 60/272,757

<151> 2001-03-05

<160> 31

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4862

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

acttggagaa agcaagaaga ctgattlta: gaggaggggt ttgatacaatc aaaggagatt 60
gcccaggatc aagggllcgg tyllgggggt ggaatlggga ggaatggttaq agaagctttc 120
aolaaaglot lggggcgtga ggccttgagaa gahgtttana aagaaggatc aagcacaggc 180
aaaggagagg aaaggagcagg caaccaaacg torgaatggc cccaatatgc tccctucagu 240
gtatgcaccc ctctttctggc tgcctcaguc agaatolaag clldlletaa nccctcctgt 300
cttttcatal lclclgatlc tgggaacga agaatltggca ggaactgaaa atgactaggc 360
agaggacata rhgggtgccc aactclctg gtgcctcctg gaatcctggc atccacatag 420
ggatgcacat cgtttcaggc attatttata aaacutatac cctucacagt ggcuccttga 480
glcagcaaga cagaaalcll yaggtlccay ggaaggcagg tgtccacagg tggggcaggt 540
atgatcttgc ctllagaaac atyallccct lccgllccaa gccagagttt cctgcccccc 600
acccctctga caalgcctggc ctgttctctt aactcaccgt qtcctggctc acccctctca 660
tgatcccaag cttacggagt cgttagatg agaacacat cctccactg tccgtccatg 720
acgctccaga caaaatgtc caaaggcttc acgctcttgy gaagaagaa gctcacaagg 780
gagggalaga aagaacttca ctgcttctag tcatgctcag gttccagaga acaagggtga 840
ctttcagagg ccttctgggc atctgcttct gcatgctcag tgtactcagg ccaatattga 900
ttacacaaaa cctcctggaa taccagagag agcagcttgg gaatgtgtgc cctggagtg 960
gaclclgctt lgcctclll clclccgaat gtcgaagtc cctgagtttc tctccagtt 1020
ggaatccaa ccaacgcaca gcaatcaggt tccagcagg cgttccctcc tttgcctttg 1080
aqaagctcat caaatttaag tctgtaabac aactacatc aggaagaggc atcagcttct 1140
tcacccgtga tctaaactac ctgtttgagc ggtgtgtcta tggancccta gtactgaten 1200
cctgcgcata cctggcctac tgcagcattt ctccctactt cattatrga tccactgnat 1260
ctallgcctt clllalclal clnctggtt: tccactcagg ggtatccatg acaagcattg 1320
clctgaaggc tcaacatcac acatctgagg ctagcagcca ggcuatcctg gtgacagtg 1380
aatctctcac tgcatttaag ctgatttana tgtccacatc ggaagaaccc kttgcnaon 1440
caattgaaga cctaagagag aaggaacgga aactattgga gtagtgaggc cttgtncaga 1500
gactgaagag tataaactct tccatctctc ccaactctgc cccagcggtc tgggtttcca 1560
ccacacatac cttaacactc aaactcagag cgtcacttgc ctccagcatg ctggcctcct 1620
tgaatctctt cgggtgttca gtgttctttg tgcctattgc agcaaaaggt ctccagcaat 1680
ccaagtctgc agtgatgagg tccaagaagt ttttctctca gggagagcct gttttctatg 1740
tccagacatt acaagacccc agcaagcttc tggtttttga ggaagcacc ttgtctatgc 1800
aacagacctg tcccgagatc gtcaatgggg caactggagc qtagaggaac gggcatgctt 1860
ctgaggggat gacccggccl agaatgtccc tggggccaga ggaagaaggg aacagcclgg 1920
gcccgagttt gcaoaagctc aaccggttgc tgcacaagg gatgatgta ggggtctgag 1980
gcaanacggg gagtgttaag agcagcctgt tgcacagcat nctggagag atgactctgc 2040
tcaggggctc ggtgggggtg caagggaagtc tggcctatgt ccccaagcay gactgatag 2100

```


WO 02/072632

2/12

PCT/EP02/03241

```

ttagggggaa catcagggag aacatcctca tgggaggggc atatgacaaq gcccgatacc 2160
tccaggtggt ccaatggtgc tccctgaacc gggacctgga actctctgac ttggagaca 2220
tgcacagagnt tggagagagg ggcctcaacc tctctggggg gcagaaacag aggalcagac 2280
tggcccgggc cgtctattcc gnnctnaga tctacccgnt ggaagacccc ngtctgtgfg 2340
tgyacggcca cgtggggaag cactttttt agagatgcat taagagacac cccaggggga 2400
agacgctngt cctggttqtc caccgggtgc agactlaga atlltggggc cagalcaltl 2460
tcttgcgaaz tggggaaztc tghgaaztc gzanctcagf tgggtfaatg nagaanaagg 2520
ggaaatctgc ccaacttacc caqaadatgc auaaggaac cacttcggac ccgttgcaag 2580
aacagcaaaa galagcagay aagcacaagf lagaaagtua gctcttgccc auctccctgg 2640
aagaatctct caacggaaat gctgtgccc agcataagct caaacaggag gaggagatgg 2700
aagaaggctc cllgagltgg agggctctacc accactacal ccagcgagct gaggglada 2760
tggctctcttg cataatttcc ttctctctgg tctctatctt ctcttaacg acttcaact 2820
tcttctcttg gactctactg tgggagcagg gctcggggac caatagcagg cgaagagaca 2880
atggaaccat ggcagacatg gcaacatctc cagacacatc tcaactgctc tctacccgg 2940
tgggtgacag gctcaaacgc ctgctctctc lctgtgtggg gctctgctcc ttagggatct 3000
tccacaaagt nacaggaag gnatccacgg cctgcacaaa caagctcttc ascaaggctt 3060
lccgctgccc catgaatttc tltgacacca tcccaatacc ccgcttttgg aactctctgg 3120
caggggactt ggaacagctg gacacagctct tggcaacttc ttcagagcag tctctggccc 3180
tctctctaat ggtgatgcgc gtrctgttga ttgtcaggtt gctgctcaca tctactgctt 3240
tctctctaat catcaactgc gtrctgttga ttgtcaggtt gctgctcaca tctactgctt 3300
tctctctaat caagagactg ggaactatca gctgctcaca tctactgctt 3360
tctctctaat agcctcagac tctactatga tctactgctt 3420
tctctctaat cctgactatg ggcacacatc actactgctt 3480
tctctctaat actcagcag gactcactga ccaactctgt gactctgctt 3540
tctctctaat tggcattctc tctactatga actcactgct gactctgctt 3600
tctctctaat ggcctcagc tctactatga actcactgct gactctgctt 3660
tctctctaat tctagagag actactgact actactgact gactctgctt 3720
tctctctaat agcacaactt tctactatga actactgact gactctgctt 3780
tctctctaat catgaactac agagacacac cactcagc gctcagcgc actcactg 3840
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 3900
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 3960
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4020
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4080
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4140
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4200
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4260
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4320
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4380
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4440
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4500
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4560
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4620
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4680
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4740
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4800
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4860
tctctctaat cactcagc gctcagcgc cactcagc gctcagcgc actcactg 4920

```

<210> 2

<211> 449

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

actgggatba agcaaaaga ctgattttat gagcgggggt ttgatadato aaaggagatc 60
gccacagctc aaggggaggg tcttgggggt ggttggggga cgtctgttag aagacgttct 120
actaatgctt ttggggctga ggcctgagaa gatgtttaaa aagaggggat aagcacaggc 180
taacacaggg aaaggcaggg caaccaaac ccctgatggc ccaaatatgc tccctgcaag 240
gagtgctcgc ctctctgggt tgcacaggg gagatcttag ctctctctaa cctctgctgt 300
ctctctctat ctctctgctt cggggaacga agaatctgga ggcactgaaa atgactlagga 360

```

WO 02/072632

3/12

PCT/EP02/03241

agaggacata ctggglgnc aactctcttcg gtggcctcgc gaatcgtggc atcgacatac 420
 gggalgcacat ggttttcaggc cttattttas 449

<210> 3
 <211> 137
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 aaaaacctata ctctccaaga tggccctcgg agtcagcaay agagaaatcc tgaggtctca 60
 gggaggggcag ctglocaacc gtgggggaag tatgatgctg ccttgagaaac catgatttcc 120
 ttccctccca agccagag 137

<210> 4
 <211> 159
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 gtttctctgc ccccaagccc tggacaatgc tggcctgttc tcttacctca cgtgtctcatg 60
 cttcccccag ctcatctcc aaagcttacc ggtctgctta gatgagaac ccttctcttc 120
 actgtcagtc catgatgctt cagacaaaa tcttcaaaag 159

<210> 5
 <211> 148
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 gcttcacccg clltgggtag aggaagcttc agggcgaggg attgaaaaag cttcagtgct 60
 tctgctgagc ctgaggttcc agagaaacag gtctgatttc gctccatttc tggccatctc 120
 cttctgcatt gcaagtgtac tgggccc 148

<210> 6
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 atattgattt taccaaagat cctgggaatt tccagagagc agttggggaa tgttctccat 60
 ggagtgggac ctgcttttgc cctttttctc tccgaatgtg tgaagctctc gagttttctc 120
 tccagtttga taccacaaca agcacaagcc atcaggctcc gactagctgt ttccctcttt 180
 gcttttgaga agctcatcca atttaagtct gtaatacaca tccctcagg agag 234

<210> 7
 <211> 174
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 gctctcagct tcllccacgg tcatgtaaac taccgttttg agggggtgtg ctatgggccc 60
 ctgctactga tccctgcgc atcctgtgtc atctgcagca ttctctcta cttcatatt 120
 ggtctacatg catttattgc catcttatgc tatctctctg ttttccact ggcg 174

<210> 8

WO 02/072632

4/12

PCT/EP02/03241

<211> 148

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

gtatctcatga caagaaatggc tctgaaggct cagcttcaca catctgaggc cagcgaccag 60
 cccatccgtg tgcaccagtga agttctcact tgccttaagg tgaattaaaat gtaacacatgg 120
 gagaacacct ttgcacaaat catteagc 148

<210> 9

<211> 149

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 9

acctaaagag gaaggaaagg aaactattgg agaatgcggg gcttggctnag agcctgacaa 60
 gtataacatt gtctatcath ccaacagtgg caacagcggg ctgggtttccc atccacacat 120
 ccttaagct gaaactcaca gcttcnag 149

<210> 10

<211> 108

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 10

gccttcagca tgcctggccc ctgactcttc cttagctgtt cagtgttttc tctgcctatt 60
 gcagtcacag gtctcagaa tcttaagctt gtagtgatga gtttcaag 108

<210> 11

<211> 252

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

aagtcttctc tccaggagag ccttgthtct tctgtccnag cattacaaga cccacagaaa 60
 gttctggctt ttgaggaggc caacttctca tggcaacaga cctgtccnag gctctcaat 120
 ggcgcacagg agctggagag gaacgggcat gctctgagg gcatyaccag gcctagagat 180
 gccctcgggc cagayyaaga aggyaacnag ctgggcccag agtgcacaa gatcaacctg 240
 gtggtgtcca ag 252

<210> 12

<211> 72

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 12

gggatgatgt taggggtctg cggcaacacg gggagtggta agagcagcct gttgtcagcc 60
 atcctggagg ag 72

<210> 13

<211> 123

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 13

atgcacttgc tggagggctc gctgggggtg cagggaagcc tggcctatgt cccacagcag 60

WO 02/072632

5/12

PCT/EP02/03241

gcttggctcg tcaagcggaa catcaggagg aacatctcca tggagggcgc atalgacaag 120
gcccgc 125

<210> 14
<211> 73
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 14
atccctccag gtgcttcact gctgctcctt caatggggac ctggaacttc tgcctcttgg 60
agcctatgac gac 73

<210> 15
<211> 204
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 15
attggagggc ggggctctaa cctctctggg gggcggaaac agagctatcg cctggccgcg 60
gctctcttct cggacagcca gatctctctg ctggagcagc cctgctctgc tctggagcgc 120
cactggggga accacattct cgaaggctgc attagagcgc cactcagggc gaagacgctc 180
gtctctggga cctctcagct gacg 204

<210> 16
<211> 135
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 16
tacttagaal ttctggcca gactccttct tggaaatcg ggaacatctg tggaaatgca 60
actcaagcgc agtctctgca gaaacagggg aaatagccc aacttatcca gaagatgcac 120
acggaagcca ctctg 135

<210> 17
<211> 97
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 17
gacatgttgc agggccacgc caagatagca gaggagccca aggtacgaag ccagctctcg 60
gcacctctcc tggagagctc tctcagcgga atgctg 97

<210> 18
<211> 89
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 18
tgcctcagca tcaatctcca cagcaggagc agatcgaaga aggcctctct agttgaggg 60
tctaccacca ctacatccag gacgtggga 89

<210> 19
<211> 104
<212> ADN
<213> Homo sapiens

WO 02/072632

6/12

PCT/EP02/03241

<400> 19
 gtttcattggt ctcttgcaata atttctctctc tctgggtgct gactgctctc ttaaggctct 60
 taagctctctg gtgggtgagc taatgggttg agagggtctc gggg 104

<210> 20
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 accaatagca gcgcagagag caatgggacc atggcaagaa tggggactcat tgaagaaat 60
 cctcaactgt ccttctacca gctgggtgtat gggctcacc cctgctcct catctgtgtg 120
 ggggtctgct cctcaaggat tttcaccaaa gtcaagagga aggcctccac ggcctctgac 180
 aacaagcctt tcaacaag 198

<210> 21
 <211> 227
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 gttttctgct gcccacagag tttctttgac accatcccaa tggggaggct tttcaactgc 60
 ttgggaaggg acttggaaac gctgggacaa cttctccca tcttttcaga gcagtctctg 120
 gttctgtcct ttttgggtat ggcgtctctg ttgattgtca gctgtctgct tccatatac 180
 ctgtttatgg gaggcctaatt catgtttatt tggttcattt atttatac 227

<210> 22
 <211> 138
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 gatgttcaag aaggccatcg gtatcttcaa gaggcttggg aactatagcc ggctctctct 60
 attctcccaa aacctcaall ctctgcaagg cctgagctcc atccatgtct atgggaaaac 120
 tgaagactta atagcct 138

<210> 23
 <211> 187
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 gtttaagagg ctgaactgat cgcagaalaa ctacctctct ttgtttctat ctctccacac 60
 atggatggca ttggggctgg agatcagaa caactctgtg acattggctg ttgcccctgt 120
 cgtgctcttt ggcatttctt cccccccta ctccctaaa gtcatggctg tcaactctgt 180
 gctgcag 187

<210> 24
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 ctgggtctca gtttcaggc cactgcccgg atgggttgg agacagaggc acagtctacg 60
 cctgtataga ggaactctga gtaactgag 90

WO 02/072632

7/12

PCT/EP02/03241

<210> 25
 <211> 190
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 atgtgaggct cgggaagctc ttacacatg gaaggaaca gttgtccca ggggtggca 50
 cagcaaggga aaatcatatt tcaggattt cactcgaat acagagaaa cagacccacc 120
 gtgtttacg gcatcaact gacatcaga ggcacagag tggtaggat cgtgggaag 180
 acgggtcttg 190

<210> 26
 <211> 160
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 ggaagtccc cttaggcag cctctcttc gctgttggg gacatggca ggcgggttc 60
 tcaatgaagg cgtggacatt tycagatcg gcttgagga cttcgggtc agctctcag 120
 tgalcccca agalccagt atgtctcag gaccatcag 160

<210> 27
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 attcaacctt cttcccttt accgacac tgaccagag atctgggat ccttgagag 60
 gacattcttg accaaggcc 79

<210> 28
 <211> 114
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 atctcaagt tccccatca gctgcatac gatgtcttg aacaggtg aaactctct 60
 gtacgggaga ggaagctct ctgcattgc agggctgtg ttgcacac caag 114

<210> 29
 <211> 165
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 atcatccta tggatgagc cacagcttc attgacatg agacagac cclgalccag 60
 cgcacatcc gtgaagcct ccagggtgc accgtctct tcattgcca cagtgatcc 120
 actgtctga actgtgaca catctgggt atgggcacg gaag 165

<210> 30
 <211> 456
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

WO 02/072632

8/12

PCT/EP02/03241

```

<400> 30
gtggtagaat ttgatcgccc ggaagtcctg cggaggaagg ctgggtcatt gttcgagcc 60
ctcttgccc cagccacttc ttcactgaga taaggagatg tggagacttc atggagggcg 120
gcactgagc tcagaggctc acccaggtgc agcttcgagg ccacacgctt gggcctttct 180
tctttggaga tgagaacttc tcttggaagg aggggttaac gtgggggggg tgggggttgc 240
tggatggaaa cccgggaata ggcctacttg tggcctctaa gaccttagaa cccagaacc 300
atctaaagaa tgggattcac tcatcattgc gttctccttt taactlalat gelyaataat 360
tttataataa gylaasagct tatagcttcc tgatctcggt tagaagtctt gaaaatgctg 420
tactgacttt gtaaaatata aaactaagga aaactc 456

```

<210> 31

<211> 1382

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

```

Met Thr Arg Lys Arg Thr Tyr Trp Val Pro Asn Ser Ser Gly Gly Leu
  1          5          10          15

Val Asn Arg Gly Ile Asp Phe Gly Asp Asp Met Val Ser Gly Leu Ile
 20          25          30

Tyr Lys Thr Tyr Thr Leu Gln Asp Gly Pro Trp Ser Gln Gln Gln Arg
 35          40          45

Asn Pro Glu Ala Pro Gly Arg Ala Ala Val Pro Pro Trp Gly Lys Tyr
 50          55          60

Asp Ala Ala Leu Arg Thr Met Ile Pro Phe Arg Pro Lys Pro Arg Phe
 65          70          75          80

Pro Ala Pro Gln Pro Leu Asp Asn Ala Gly Leu Phe Ser Tyr Leu Thr
 85          90          95

Val Ser Trp Leu Thr Pro Phe Met Ile Gln Ser Leu Arg Ser Arg Leu
100          105          110

Asp Glu Asn Thr Ile Pro Pro Leu Ser Val His Asp Ala Ser Asp Lys
115          120          125

Asn Val Gln Arg Leu His Arg Leu Trp Glu Glu Glu Val Ser Arg Arg
130          135          140

Gly Ile Glu Lys Ala Ser Val Leu Leu Val Met Leu Arg Phe Gln Arg
145          150          155          160

Thr Arg Leu Phe Phe Asp Ala Leu Leu Gly Ile Cys Phe Cys Ile Ala
165          170          175

Ser Val Leu Gly Pro Ile Leu Ile Ile Pro Lys Phe Leu Glu Tyr Ser
180          185          190

Glu Glu Gln Leu Gly Asn Val Val His Gly Val Gly Leu Cys Phe Ala
195          200          205

Leu Phe Leu Ser Glu Cys Val Lys Ser Leu Ser Phe Ser Ser Ser Trp
210          215          220

Ile Ile Asn Gln Arg Thr Ala Ile Arg Phe Arg Ala Ala Val Ser Ser
225          230          235          240

```

WO 02/072632

9/12

PCT/EP02/03241

Phe Ala Phe Glu Lys Leu Ile Gln Phe Lys Ser Val Ile His Thr Thr
 245 250 255
 Ser Gly Glu Ala Ile Ser Phe Phe Thr Gly Asp Val Asn Tyr Leu Phe
 260 265 270
 Glu Gly Val Cys Tyr Gly Pro Leu Val Leu Ile Thr Cys Ala Ser Leu
 275 280 285
 Val Ile Cys Ser Ile Ser Ser Tyr Phe Ile Ile Gly Tyr Thr Ala Phe
 290 295 300
 Ile Ala Ile Leu Cys Tyr Leu Leu Val Phe Pro Leu Ala Val Phe Met
 305 310 315 320
 Thr Arg Met Ala Val Lys Ala Gln His His Thr Ser Glu Val Ser Asp
 325 330 335
 Gln Arg Ile Arg Val Thr Ser Glu Val Leu Thr Cys Ile Lys Leu Ile
 340 345 350
 Lys Met Tyr Thr Trp Glu Lys Pro Phe Ala Lys Ile Ile Glu Asp Leu
 355 360 365
 Arg Arg Lys Glu Arg Lys Leu Leu Glu Lys Cys Gly Leu Val Gln Ser
 370 375 380
 Leu Thr Ser Ile Thr Leu Phe Ile Ile Pro Thr Val Ala Thr Ala Val
 385 390 395 400
 Trp Val Leu Ile His Thr Ser Leu Lys Leu Lys Leu Thr Ala Ser Met
 405 410 415
 Ala Phe Ser Met Leu Ala Ser Leu Asn Leu Leu Arg Leu Ser Val Phe
 420 425 430
 Phe Val Pro Ile Ala Val Lys Gly Leu Thr Asn Ser Lys Ser Ala Val
 435 440 445
 Met Arg Phe Lys Lys Phe Phe Leu Gln Glu Ser Pro Val Phe Tyr Val
 450 455 460
 Gln Thr Leu Gln Asp Pro Ser Lys Ala Leu Val Phe Glu Glu Ala Thr
 465 470 475 480
 Leu Ser Trp Gln Glu Thr Cys Pro Gly Ile Val Asn Gly Ala Leu Glu
 485 490 495
 Leu Glu Arg Asn Gly His Ala Ser Glu Gly Met Thr Arg Pro Arg Asp
 500 505 510
 Ala Leu Gly Pro Glu Glu Glu Gly Asn Ser Leu Gly Pro Glu Leu His
 515 520 525
 Lys Ile Asn Leu Val Val Ser Lys Gly Met Met Leu Gly Val Cys Gly
 530 535 540
 Asn Thr Gly Ser Gly Lys Ser Ser Ser Leu Ser Ala Thr Leu Glu Glu
 545 550 555 560

WO 02/072632 10/12 PCT/EP02/03241

Met His Leu Leu Glu Gly Ser Val Gly Val Gln Gly Ser Leu Ala Tyr
565 570 575

Val Pro Gln Gln Ala Trp Ile Val Ser Gly Asn Ile Arg Glu Asn Ile
580 585 590

Leu Met Gly Gly Ala Tyr Asp Lys Ala Arg Tyr Leu Gln Val Leu His
595 600 605

Cys Cys Ser Leu Asn Arg Asp Leu Glu Leu Leu Pro Phe Gly Asp Met
610 615 620

Thr Glu Ile Gly Glu Arg Gly Leu Asn Leu Ser Gly Gly Gln Lys Gln
625 630 635 640

Arg Ile Ser Leu Ala Arg Ala Val Tyr Ser Asp Arg Gln Ile Tyr Leu
645 650 655

Leu Asp Asp Pro Leu Ser Ala Val Asp Ala His Val Gly Lys His Ile
660 665 670

Phe Glu Glu Cys Ile Lys Lys Thr Leu Arg Gly Lys Thr Val Val Leu
675 680 685

Val Thr His Gln Leu Gln Tyr Leu Glu Phe Cys Gly Gln Ile Ile Leu
690 695 700

Leu Glu Asn Gly Lys Ile Cys Glu Asn Gly Thr His Ser Glu Leu Xot
705 710 715 720

Gln Lys Lys Gly Lys Tyr Ala Gln Leu Ile Gln Lys Met His Lys Glu
725 730 735

Ala Thr Ser Asp Met Leu Gln Asp Thr Ala Lys Ile Ala Glu Lys Pro
740 745 750

Lys Val Glu Ser Gln Ala Leu Ala Thr Ser Leu Glu Glu Ser Leu Asp
755 760 765

Gly Asn Ala Val Pro Gln His Gln Leu Thr Gln Glu Glu Met Glu
770 775 780

Glu Gly Ser Leu Ser Trp Arg Val Tyr His His Tyr Ile Gln Ala Ala
785 790 795 800

Gly Gly Tyr Met Val Ser Cys Ile Ile Phe Phe Phe Val Val Leu Ile
805 810 815

Val Phe Leu Thr Ile Phe Ser Phe Trp Trp Leu Ser Tyr Trp Leu Glu
820 825 830

Gln Gly Ser Gly Thr Asn Ser Ser Arg Glu Ser Asn Gly Thr Met Ala
835 840 845

Asp Leu Gly Asn Ile Ala Asp Asn Pro Gln Leu Ser Phe Tyr Gln Leu
850 855 860

Val Tyr Gly Leu Asn Ala Leu Leu Leu Ile Cys Val Gly Val Cys Ser
865 870 875 880

Ser Gly Ile Phe Thr Lys Val Thr Arg Lys Ala Ser Thr Ala Leu His

WO 02/072632 11/12 PCT/EP02/03241

885 890 895

Asn Lys Leu Phe Asn Lys Val Phe Arg Cys Pro Met Ser Phe Phe Asp
900 905 910

Thr Ile Pro Ile Gly Arg Leu Leu Asn Cys Phe Ala Gly Asp Leu Glu
915 920 925

Gln Leu Asp Gln Leu Leu Pro Ile Phe Ser Glu Gln Phe Leu Val Leu
930 935 940

Ser Leu Met Val Ile Ala Val Leu Leu Ile Val Ser Val Leu Ser Pro
945 950 955 960

Tyr Ile Leu Leu Met Gly Ala Ile Ile Met Val Ile Cys Phe Ile Tyr
965 970 975

Cys Met Met Phe Lys Lys Ala Val Gly Val Phe Lys Arg Leu Glu Asn
980 985 990

Tyr Ser Arg Ser Pro Leu Phe Ser His Ile Leu Asn Ser Leu Gln Gly
995 1000 1005

Leu Ser Ser Ile His Val Tyr Gly Lys Thr Glu Asp Phe Ile Ser Gln
1010 1015 1020

Phe Lys Arg Leu Thr Asp Ala Gln Asn Asn Tyr Leu Leu Phe Leu
1025 1030 1035 1040

Ser Ser Thr Arg Trp Met Ala Leu Arg Leu Glu Ile Met Thr Asn Leu
1045 1050 1055

Val Thr Leu Ala Val Ala Leu Phe Val Ala Phe Gly Ile Ser Ser Thr
1060 1065 1070

Pro Tyr Ser Phe Lys Val Met Ala Val Asn Ile Val Leu Gln Leu Ala
1075 1080 1085

Ser Ser Phe Gln Ala Thr Ala Arg Ile Gly Leu Glu Thr Glu Ala Gln
1090 1095 1100

Phe Thr Ala Val Glu Arg Ile Leu Gln Tyr Met Lys Met Cys Val Ser
1105 1110 1115 1120

Glu Ala Pro Leu His Met Glu Gly Thr Ser Cys Pro Gln Gly Trp Pro
1125 1130 1135

Gln His Gly Glu Ile Ile Phe Gln Asp Tyr His Met Lys Tyr Arg Asp
1140 1145 1150

Asn Thr Pro Thr Val Leu His Gly Ile Asn Leu Thr Ile Arg Gly His
1155 1160 1165

Glu Val Val Gly Ile Val Gly Arg Thr Gly Ser Gly Lys Ser Ser Leu
1170 1175 1180

Gly Met Ala Leu Phe Arg Leu Val Glu Pro Met Ala Gly Arg Ile Leu
1185 1190 1195 1200

Ile Asp Gly Val Asp Ile Cys Ser Ile Gly Leu Glu Asp Leu Arg Ser
1205 1210 1215

WO 02/072632

12/12

PCT/EP02/03241

Lys Leu Ser Val Ile Pro Gln Asp Pro Val Leu Leu Ser Gly Thr Ile
 1220 1225 1230
 Arg Phe Asn Leu Asp Pro Phe Asp Arg His Thr Asp Gln Gln Ile Trp
 1235 1240 1245
 Asp Ala Leu Glu Arg Thr Phe Leu Thr Lys Ala Ile Ser Lys Phe Pro
 1250 1255 1260
 Lys Lys Leu His Thr Asp Val Val Glu Asn Gly Gly Asn Phe Ser Val
 1265 1270 1275 1280
 Gly Glu Arg Gln Leu Leu Cys Ile Ala Arg Ala Val Leu Arg Asn Ser
 1285 1290 1295
 Lys Ile Ile Leu Ile Asp Glu Ala Thr Ala Ser Ile Asp Met Glu Thr
 1300 1305 1310
 Asp Thr Leu Ile Gln Arg Thr Ile Arg Glu Ala Phe Gln Gly Cys Thr
 1315 1320 1325
 Val Leu Val Ile Ala His Arg Val Thr Thr Val Leu Asn Cys Asp His
 1330 1335 1340
 Ile Leu Val Met Gly Asn Gly Lys Val Val Glu Phe Asp Arg Pro Glu
 1345 1350 1355 1360
 Val Leu Arg Lys Lys Pro Gly Ser Leu Phe Ala Ala Leu Met Ala Thr
 1365 1370 1375
 Ala Thr Ser Ser Leu Arg
 1380

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

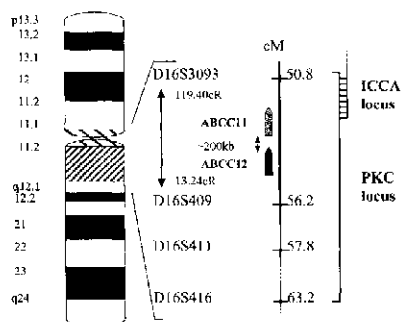
(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 September 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/072632 A3

- (51) International Patent Classification: **C07K 14/705**,
C12Q 1/68, C12N 15/63, S10, C07K 16/28, A61K
48/00, 39/00, G01N 33/68, 33/53
- (21) International Application Number: PCT/EP02/03241
- (22) International Filing Date: 5 March 2002 (05.03.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00/272,757 5 March 2001 (05.03.2001) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): **AVEN-
TIS PHARMA S.A.** [FR/FR]; Direction brevets, 20 av-
enue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR); **THE GOV-
ERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMER-
ICA** [US/US]; US Department of Health and Human Ser-
vices, 200 Independence Avenue, Washington, DC 20501
[US].
- (72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **ROSIER-MON-
TUS, Marie** [FR/FR]; 71 rue des Baronnets, F-92160
Antony (FR); **PRADES, Catherine** [FR/FR]; 30 av-
enue du Général De Gaulle, F-94320 Thiais (FR);
ARNOLD, REGUIGNE, Isabelle [FR/FR]; 112 rue
de Bry, F-94320 Champs-sur-Marne (FR); **DEAN,
Michael** [US/US]; 1362 Hitchinpost Lane, Frederick, MD
[US]; **ALLIKMETTS, Rando** [US/US]; 8-J Lamplight
Village Road, MONROE, NY 10950 [US]; **DENEFFLE,
Patrice** [FR/FR]; 15 avenue des Fusillés de Chateaubriand,
F-94100 Saint-Maur (FR).
- (74) Agent: **LECCA, Patricia**; AVANTIS PHARMA S.A.,
Direction brevets, 20 avenue Raymond Aron, F-92160
Antony Cedex (FR).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EN, ES, FI, FR, GB, GR, GU,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG.

[Continued on next page]

(54) Title: NUCLEIC ACIDS OF THE HUMAN ABCC11 GENE VECTORS CONTAINING SUCH NUCLEIC ACIDS AND
USING THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to nucleic acids corresponding to various exons of the ABCC11 gene as well as the cDNA encoding the novel full length of ABCC11 protein. The invention also relates to means for the detection of polymorphisms in general, and of mutations in particular, in the ABCC11 gene or in the corresponding protein produced by the allelic form of the ABCC11 gene.

WO 02/072632 A3

WO 02/072632 A3 SL, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.**Published:**
— with international search report

(84) **Designated States** *regional:* ARIPO patent (G11, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW);
Parisian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM);
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent
(BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NI, SN, TD, TG).

(88) **Date of publication of the international search report:**
27 November 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/03241
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 C12Q1/68 C12N15/63 C12N15/10 C07K16/28 A61K48/00 A61K39/00 G01N33/58 G01N33/53		
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) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search term(s) used) EP0-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALLIKMETS R ET AL: "Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the Expressed Sequence Tags Database" HUMAN MOLECULAR GENETICS, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 5, no. 10, 1996, pages 1649-1655, XP002120400 ISSN: 0964-6906 see in particular Fig. 2 the whole document --- ---	1-6,9-41
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Parent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document but published on or after the international filing date *C* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (see specification) *D* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *E* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *F* 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 *G* 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 *H* 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 *I* document member of the same patent family		
Date of the report completion of the international search		Date of mailing of the international search report
28 January 2003		12/02/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1, 51018 Patentstein 2 81731 Munich 91, Germany Tel: (+31-70) 240-2240, Fax: 31 051 894 01 Telex: (+31-70) 890-0076		Authorized officer Morawetz, R

Form PCT/EP/2002 (patent sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/03241
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 EMBL 'Online! 5 December 2000 (2000-12-05) STRAUSBERG R: "7p46c02.x1 NCI_CGAP_Pr28 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3648818 3', mRNA sequence" Database accession no. BF447217 XP002228904 the whole document	1-6
X	DATABASE GENESEQ 'Online! 21 May 1999 (1999-05-21) BRUCE D ET AL.: "Homo sapiens chromosome 16 clone RP11-264A16, complete sequence." Database accession no. AC007600 XP002228905 see e.g. nt 90397-90854	1-6
A	BENNETT LYNDIA B ET AL: "A locus for paroxysmal kinesigenic dyskinesia maps to human chromosome 16." NEUROLOGY, vol. 54, no. 1, 11 January 2000 (2000-01-11), pages 125-130, XP009004537 ISSN: 0028-3878 the whole document	
A	TOMITA HIRO-AKI ET AL: "Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis locus maps to chromosome 16p11.2-q12.1." AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 65, no. 6, December 1999 (1999-12), pages 1688-1697, XP002228122 ISSN: 0002-9297 the whole document	
P, X	DATABASE GENESEQ 'Online! 23 July 2001 (2001-07-23) HARRAS M ET AL.: "Novel human transporter protein (NHP) encoding cDNA." Database accession no. AAF83643 XP002228906 the whole document	1-6, 9-41
P, X	-& DATABASE GENESEQ 'Online! 23 July 2001 (2001-07-23) HARRAS M ET AL.: "Novel human transporter protein (NHP)." Database accession no. AAB62555 XP002228909 the whole document	1-6, 9-41
P, X	-& WO 01 32706 A (LEXICON GENETICS INC) 10 May 2001 (2001-05-10) see SEQ ID NO: 17 and SEQ ID NO: 18 --- -/-	1-6, 9-41

Intern: P13115A210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/03241

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	TAMMUR J ET AL: "Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCB11 and ABCB12, tandemly duplicated on chromosome 16q12" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 273, no. 1, 25 July 2001 (2001-07-25), pages 89-96, XP004296790 ISSN: 0378-1119 the whole document	1-6,9-41
P,X	BERA TAPAN K ET AL: "MRP8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer." MOLECULAR MEDICINE (NEW YORK), vol. 7, no. 8, August 2001 (2001-08), pages 509-516, XP009004597 ISSN: 1076-1551 the whole document	1-6,9-41
P,X	YABUCHI HIKARU ET AL: "Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABCB11 and ABCB12." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 288, no. 4, 9 November 2001 (2001-11-09), pages 933-939, XP002228123 ISSN: 0006-291X the whole document	1-6,9-41
T	DATABASE GENESEQ 'Online! 10 June 2002 (2002-06-10) CURTIS RAJ: "Human ATP-binding cassette transporter 44589." Database accession no. AAM51155 XP002228907 the whole document	1-6,9-41
T	-& DATABASE GENESEQ 'Online! 10 June 2002 (2002-06-10) CURTIS RAJ: "Human ATP-binding cassette transporter 44589 cDNA." Database accession no. ABA92270 XP002228910 the whole document	1-6,9-41
P,X	& WO 02 16589 A (CURTIS RORY A J ;MILLENNIUM PHARM INC (US)) 28 February 2002 (2002-02-28) -/-	1-6,9-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/03241

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>DATABASE GENESEQ 'Online! 15 August 2002 (2002-08-15) GISH KC ET AL.: "Prostate cancer-associated protein #96." Database accession no. AB661895 XP002228908 the whole document</p>	1-6, 9-41
T	<p>-& DATABASE GENESEQ 'Online! 15 August 2002 (2002-08-15) GISH KC ET AL.: "Prostate cancer-associated DNA sequence #97." Database accession no. ABK92211 XP002228911 the whole document</p>	1-6, 9-41
E	<p>& WO 02 30268 A (EOS BIOTECHNOLOGY INC) 18 April 2002 (2002-04-18)</p>	1-6, 9-41
E	<p>WO 02 085943 A (ARNOULD-REGUIGNE ISABELLE ;AVENTIS PHARMA SA (FR); ROSIER-MONTUS M) 31 October 2002 (2002-10-31) figure 1 -----</p>	1-6, 9-41

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2002)

International Application No. PCT/JP 02/03241

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 7, 8

Present claim 7 relates to a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely a nucleotide probe or primer specific of the ABC11 gene, wherein the nucleotide probe or primer comprises at least 15 consecutive nucleotides of a nucleotide sequence of any of SEQ ID NOs: 1-30.

The claim covers all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for none of such products. In the present case, the claim so lacks support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claim also lacks clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. A similar objection applies to claim 8 which hasn't been searched either.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/EP 02/03241
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 7, 8 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 64(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As at least one searchable claim could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> 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.:	
Remark on Protest <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees. </div>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/EP 02/03241	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 02085943	A	31-10-2002	WO 02085943 A2	31-10-2002	

Form PCT/ISA/210 (patent family members) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/18	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 Q 1/68	A 6 1 K 37/02	

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

(74)代理人 100080355

弁理士 西村 公佑

(74)代理人 100127926

弁理士 結田 純次

(74)代理人 100105290

弁理士 三輪 昭次

(72)発明者 マリー・ロジエ - モンテュス

フランス国 F - 9 2 1 6 0 アントニ・リュエバコネ 2 1

(72)発明者 カトリン・ブラデ

フランス国 F - 9 4 3 2 0 ティエ・アヴニュデュジェネラルドゥゴール 3 0

(72)発明者 イザベル・アルヌール - レギン

フランス国 F - 9 4 4 3 0 シェネヴィエーレシュルマルン・リュードゥブリ 1 1 2

(72)発明者 マイケル・ディーン

アメリカ合衆国メリーランド州フレデリック・ヒッチンポストレイン 1 3 6 2

(72)発明者 ランドー・アリクメツ

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 9 5 0・モンロー・ランブライトヴィレッジロード 8 - J

(72)発明者 パトリス・デネフル

フランス国 F - 9 4 1 0 0 サンモール・アヴニュデフュジエドゥシャトーブリアン 4 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 BA80

4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR42 QR50

QR55 QR62 QR66 QR72 QR77 QR82 QS03 QS25 QS28 QS34

QS39 QX01

4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA24 CA44

4C084 AA02 AA13 BA02 NA14 ZA221

4C087 AA01 BC83 NA14 ZA22

4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 CA40 DA50 DA75 EA20 FA74