

(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2005-522228

(P2005-522228A)

(43) 公表日 平成17年7月28日(2005.7.28)

(51) Int.C1.<sup>7</sup>

**C12N 15/09**  
**A61K 38/00**  
**A61K 39/00**  
**A61K 39/395**  
**A61K 45/00**

F 1

C 12 N 15/00  
A 61 K 39/00  
A 61 K 39/395  
A 61 K 39/395  
A 61 K 45/00

Z N A A  
H  
E  
T  
A 61 K 45/00

テーマコード(参考)

2 G O 4 5  
4 B O 2 4  
4 B O 6 3  
4 B O 6 4  
4 C O 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-584732 (P2003-584732)  
(86) (22) 出願日 平成15年4月11日 (2003.4.11)  
(85) 翻訳文提出日 平成16年12月8日 (2004.12.8)  
(86) 國際出願番号 PCT/GB2003/001589  
(87) 國際公開番号 WO2003/087840  
(87) 國際公開日 平成15年10月23日 (2003.10.23)  
(31) 優先権主張番号 0208332.7  
(32) 優先日 平成14年4月11日 (2002.4.11)  
(33) 優先権主張国 英国(GB)  
(31) 優先権主張番号 0229875.0  
(32) 優先日 平成14年12月21日 (2002.12.21)  
(33) 優先権主張国 英国(GB)

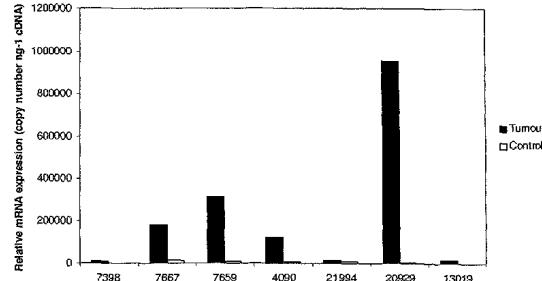
(71) 出願人 504337693  
オックスフォード グライコサイエンシス  
(ユーケイ) リミテッド  
イギリス オックスフォードシャー オー  
エックス 14 4 アールワイ アビンドン  
ミルトン パーク 86 ザ フォーラ  
ム  
(74) 代理人 100082005  
弁理士 熊倉 賢男  
(74) 代理人 100084009  
弁理士 小川 信夫  
(74) 代理人 100084663  
弁理士 箱田 篤  
(74) 代理人 100093300  
弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌に関与するタンパク質

## (57) 【要約】

本発明は、乳癌、肺癌及び/又は肺臓癌の診断、スクリーニング、治療及び予防におけるタンパク質(NKCC1)の新規な使用に関する。本発明はまた、前記タンパク質を含む組成物(ワクチンを含む)、前記タンパク質に対し免疫特異的な抗体、及び前記タンパク質と相互作用するか若しくは前記タンパク質の発現又は活性を調節するか、又は前記タンパク質をコードする核酸の発現を調節する物質を提供する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

対象者における乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌をスクリーニング及び／又は診断する方法、及び／又は乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌治療の有効性をモニターする方法であって、

前記対象者から得られる生物学的サンプルで、以下の(i)及び／又は(ii)を検出及び／又は定量する工程を含む、前記方法：

(i) 以下のa)～c)のいずれかのNKCC1ポリペプチド：

a) 図1(配列番号1)に示すアミノ酸配列を含むもの、又は前記アミノ酸配列から成るもの；

b) 図1(配列番号1)に示すアミノ酸配列に対し、1つ又は2つ以上のアミノ酸置換、改変、欠失又は挿入を有する誘導体であって、NKCC1の免疫学的又は生物学的活性を保持するもの；又は

c) 図1(配列番号1)に示す配列を有するポリペプチドのフラグメントであって、長さが少なくとも10アミノ酸であり且つ前記フラグメントの全長にわたって少なくとも70%の配列同一性を有するもの；及び／又は

(ii) 以下のd)～i)のいずれかの核酸分子：

d) 図1(配列番号2)に示すDNA配列若しくはそのRNA等価物を含むもの、又は前記配列若しくはRNA等価物から成るもの；

e) 前記a)、b)又はc)で定義されるポリペプチドをコードする配列であるもの；

f) 前記d)又はe)の配列と相補的な配列であるもの；

g) 前記d)又はe)の配列と同じポリペプチドをコードする配列であるもの；

h) 前記d)、e)、f)又はg)の配列のいずれかと実質的同一性を示す配列であるもの；又は、

i) 前記d)、e)、f)、g)又はh)のフラグメントであって、長さが少なくとも8ヌクレオチドであるもの。

**【請求項 2】**

前記ポリペプチド又は前記核酸のレベルが先に測定された参照値域又はコントロールと比較される請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記検出の工程が以下を含む請求項1又は2に記載の方法：

(a) 請求項1(i)に記載のポリペプチドに特異的な捕捉試薬と前記サンプルを接觸させ；さらに、

(b) 前記捕捉試薬とサンプル中の前記ポリペプチドとの間で結合が生じたか否かを検出する。

**【請求項 4】**

工程(b)が直接的又は間接的に標識された検出試薬を用いて前記捕捉ポリペプチドを検出することを含む請求項3に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記捕捉試薬が固相に固定される請求項3又は4に記載の方法。

**【請求項 6】**

請求項1(i)に記載のポリペプチドと特異的に結合する抗体、その機能的に活性なフラグメント、誘導体又は類似体。

**【請求項 7】**

前記NKCC1ポリペプチドが、前記ポリペプチドと特異的に結合する抗体を用いて検出及び／又は定量される請求項1に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体であるか、又は検出可能物質、治療薬成分、二次抗体若しくはそのフラグメント、細胞毒性物質又はサイトカインと結合されている、請求項6に記載の抗体又は請求項7に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 9】**

請求項1の(i)に記載のNKCC1ポリペプチドに特異的な捕捉試薬、試薬及び使用説明書を含む、診断用キット。

**【請求項 10】**

対象者における乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌を予防及び／又は治療する方法であって、前記対象者に

- (i) 請求項1の(i)に記載のポリペプチド；又は
  - (ii) 請求項1の(ii)に記載の核酸分子；
- を治療上有効な量で投与することを含む前記方法。

**【請求項 11】**

対象者における乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌を予防及び／又は治療する方法であって、該対象者に請求項6又は8に記載の抗体を治療上有効な量で投与することを含む、前記方法。

**【請求項 12】**

乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の予防及び／又は治療に使用される組成物の製造における、  
 (i) 請求項1の(i)に記載のポリペプチド；又は  
 (ii) 請求項1の(ii)に記載の核酸分子；  
 の使用。

**【請求項 13】**

乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の予防及び／又は治療に使用される組成物の製造における  
 、請求項6又は8に記載の抗体の使用。

**【請求項 14】**

乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の予防及び／又は治療に使用される、  
 (i) 請求項1の(i)に記載のポリペプチド；又は  
 (ii) 請求項1の(ii)に記載の核酸分子。

**【請求項 15】**

乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の予防及び／又は治療に使用される、請求項6又は8に記載の抗体。

**【請求項 16】**

組成物がワクチンである、請求項12に記載の使用。

**【請求項 17】**

核酸が、請求項1の(i)に記載のポリペプチドの発現を阻害する、請求項10記載の方法、  
 又は請求項12、14若しくは16のいずれか1項に記載の使用。

**【請求項 18】**

請求項1の(i)に記載のポリペプチドと相互作用する物質をスクリーニングする方法であ  
 って、  
 (a) 前記ポリペプチドを候補物質と接触させる工程；及び  
 (b) 前記候補物質が前記ポリペプチドと相互作用するか否かを決定する工程；  
 を含む前記方法。

**【請求項 19】**

候補物質とポリペプチドとの間の相互作用の決定が、前記候補物質及び前記ポリペプチ  
 ドの結合を定量的に検出することを含む、請求項18記載の方法。

**【請求項 20】**

(i) 請求項1の(i)に記載のポリペプチドの発現若しくは活性；又は  
 (ii) 請求項1の(ii)に記載の核酸分子の発現；  
 を調節する、抗乳癌、抗膵臓癌及び／又は抗肺癌物質をスクリーニングする方法であ  
 って、  
 a) 候補物質の存在下での前記ポリペプチドの発現若しくは活性又は前記核酸分子の發  
 現を、前記候補物質の非存在下又はコントロール物質の存在下での前記ポリペプチドの發  
 現若しくは活性又は前記核酸分子の発現と比較する工程；及び

10

20

30

40

50

b) 前記候補物質が前記ポリペプチドの発現若しくは活性又は前記核酸分子の発現を変化させるか否かを決定する工程；  
を含む前記方法。

【請求項 21】

該ポリペプチドの発現若しくは活性のレベル又は該核酸分子の発現レベルが、予め定められた参照値域と比較される、請求項20記載の方法。

【請求項 22】

工程b)が、更なる試験、又は抗乳癌、抗肺癌及び／又は抗膵臓癌物質としての治療的若しくは予防的使用のために、前記ポリペプチドの発現若しくは活性又は前記核酸分子の発現を調節する物質を選択することを更に含む、請求項20又は21に記載の方法。 10

【請求項 23】

該ポリペプチドと相互作用するか、又は該ポリペプチドの発現若しくは活性又は該核酸分子の発現を変化させる、請求項18～22のいずれか1項に記載の方法によって同定される活性物質。

【請求項 24】

請求項1の(i)に記載のポリペプチドと相互作用して、前記ポリペプチドの発現若しくは活性を調節する又は請求項1の(ii)に記載の核酸の発現を調節する活性物質の、乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の予防及び／又は治療用組成物の製造における使用。 20

【請求項 25】

乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の予防及び／又は治療で使用するための、請求項1の(i)に記載のポリペプチドと相互作用して、前記ポリペプチドの発現若しくは活性を調節する又は請求項1の(ii)に記載の核酸の発現を調節する、活性物質。 20

【請求項 26】

乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌を予防及び／又は治療する方法であって、  
請求項1の(i)に記載のポリペプチドと相互作用する活性物質、前記ポリペプチドの発現若しくは活性を調節する活性物質、又は請求項1の(ii)に記載の核酸の発現を調節する活性物質を、治療上有効な量で対象者に投与することを含む前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の診断、スクリーニング、治療及び予防におけるタンパク質(NKCC1)の新規な使用に関する。本発明はまた、前記タンパク質を含む組成物(ワクチンを含む)、前記タンパク質に免疫特異的な抗体、及び前記タンパク質と相互作用するか又はその発現若しくは活性を調節する物質、又は前記タンパク質をコードする核酸の発現を調節する物質を提供する。 30

【背景技術】

【0002】

乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の治療における主要な目標は早期検出率の改善、疾患の進行の追跡及び再発の同定に用いることができる新規な非侵襲性マーカーの発見、並びにより優れた及び毒性の低い治療の発見(特に5年生存がなお非常に稀である進行性疾患について)である。癌細胞にいっそう特異的な、理想的には腫瘍細胞表面に発現され、よって免疫治療薬及び標的誘導毒素のような有望な新規アプローチによって攻撃することができる標的の同定が希求されている。 40

癌の免疫治療のための理想的なタンパク質標的は、免疫反応が腫瘍細胞を標的とし、他の器官を標的としないように、正常な組織では限定的発現プロファイルをもち腫瘍では過剰に発現されるべきである。さらにまた、前記タンパク質標的は細胞表面に暴露されるべきで、そこで治療物質に前記がアクセスすることができる。腫瘍特異的タンパク質は多数の癌タイプについて、例えばcDNAのディファレンシャルスクリーニング(R.S. Hubert et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 14523-14528; S. Lucas et al. (2000) Int. J. Cancer 87: 55-60)、及び腫瘍特異抗体によって認識される細胞表面タンパク質 50

の精製 (B. Catimel et al. (1996) J. Biol. Chem. 271 : 25664-25670) のような技術を用いることによって同定されている。

### 【0003】

最近になって、10,000もの発現配列エレメントを含むDNA“チップ”を用いて腫瘍細胞の遺伝子発現の特性が明らかにされた (S.M. Dhanasekaran et al. (2001) Nature 412 : 822-826)。しかしながら、多数且つ広範なこれまでの癌のトランスクリプトーム分析が、腫瘍関連蛋白質を全て、更にはほとんどさえも明らかにしていないことには、いくつかの理由がある。その理由には、以下のものが挙げられる：

(i) 転写産物と疾患関連蛋白質レベルとの間の相関性の欠如；特に膜蛋白質については、長い半減期を持つ場合が多く、そのために高度なmRNA代謝回転を有さないことが、よく知られている。従って、正常細胞と癌細胞との間の蛋白質レベルの差は一貫しているにもかかわらず、所定の膜蛋白質のmRNAの変化を、癌状態と関連づけることは難しい場合が多い；

(ii) 転写産物、例えばerbB2/HER2-neuの単純な示差的レベルよりもむしろ、疾患状態における蛋白質の移行が、癌細胞において正常乳房細胞におけるよりもはるかに大きい形質膜局在を示し、並びに転写因子であるエストロゲン受容体及びSTAT3は、核へと移行し、それらの腫瘍原性作用を発揮する；並びに

(iii) 新規／特徴付けられていない遺伝子は、1チップ当たりの発現した配列エレメントの数並びにDNAクローニングの知識及び利用可能性に関して制限があるcDNAアレイの「閉じたシステム」においては、高度には提示されない。

### 【0004】

図1(配列番号1)に示したNKCC1(その配列はSwissProtデータベース(<http://www.expasy.org/>で入手可能)でアクセス番号P55011により入手できる)は、ブメタニド感受性のナトリウム-カリウム-塩化物(Na-K-Cl)コトランスポーターである(Payne et al. (1995) J. Biol. Chem. 270(30) : 17977-17985)。Na-K-Clコトランスポーターの2つのアイソフォームが同定された：1つは吸収上皮の先端膜上に存在し(NKCC2)、1つは分泌上皮の基底外側膜に存在していた(NKCC1)。前記Na-K-Clコトランスポーターの機能は、塩化物イオンの上皮を貫通する電気的に中性の輸送(1Na : 1K : 2Clの比率)を提供することであり、前記コトランスポーターは、ナトリウム及びカリウムチャネル並びにナトリウムポンプと共に作用して、膜を貫通する塩化ナトリウムの正味の輸送をもたらす。この輸送メカニズムの調節不全は例えば囊胞性線維症及び分泌性下痢のような疾患をもたらす。

ヒトのNKCC1タンパク質はヒト大腸癌細胞株(T84)のスクリーニングによって同定された(Payne et al. (1995) 上掲書)。前記は板鰓類、マウス、ラット、ウサギ及びカレイで同定されたNKCC1タンパク質と顕著な類似性を示す。

### 【0005】

Na-K-Clコトランスポーターの両アイソフォームは大きなN末端及びC末端ドメイン及び2つの膜貫通セグメントを含む類似構造を示す。NKCC1はNKCC2よりも極めて大きく、N末端に80個の余分なアミノ酸を有し、興味深いことには前記N末端は種の間で極めて大きな変動を示し、この部分がイオン輸送に直接かかわることを示唆している。最近の研究によると、NKCC1は2つのスプライス変種をもつ可能性が示された。前記は多様な器官タイプで示差的発現を示し、示差的スプライシングがNKCC1活性に調節的役割を果す可能性が示唆された(Vibat et al. (2001) Anal. Biochem. 298(2) : 218-30)。

NKCC1の過剰発現が、遺伝子発現プロファイルによって喘息患者で報告された(G.M. Dolganov et al. (2001) Genome Res. 11(9) : 1473-83)。このデータは続いて免疫組織化学的に確認された(前記免疫組織化学は、喘息患者でNKCC1の発現がゴブレット細胞で限定して増加することを示し、喘息の粘液過剰分泌におけるNKCC1の病的生理学上の役割を暗示した)。

しかしながら、乳癌、肺癌及び/又は膵臓癌の治療におけるNKCC1の有用性を示すNKCC1タンパク質発現の癌に関連する変化は、これまで示されていなかった。

### 【発明の開示】

10

20

30

40

50

## 【0006】

本発明はNKCC1タンパク質の発現は乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌で増加し、さらにNKCC1 mRNAはいくつかの組織で限定的発現を示し、乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌で発現が増加し、乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の治療と診断におけるその有用性が示唆されるという発見に基づいている。

したがって、本発明のある特徴では、対象者における乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌をスクリーニング及び／又は診断する方法、及び／又は乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の治療の有効性をモニターする方法が提供される。前記方法は、前記対象者から得た生物学的サンプルで以下の a ) ~ c ) のNKCC1ポリペプチドを検出及び／又は定量する工程を含む：

a) 図1(配列番号1)に示すアミノ酸配列を含むもの、又は前記アミノ酸配列から成るものの；  
10

b) 図1(配列番号1)に示すアミノ酸配列に対し、1つ又は2つ以上のアミノ酸置換、改変、欠失又は挿入を有する誘導体であり、NKCC1の免疫学的又は生物学的活性を保持するもの；又は

c) 図1(配列番号1)に示す配列を有するポリペプチドのフラグメントであり、長さが少なくとも10アミノ酸であり且つ前記フラグメントの全長にわたって少なくとも70%の配列同一性を有するもの。

## 【0007】

前記a)~c)に記載されたポリペプチドを以下では“NKCC1ポリペプチド”と称する。“ポリペプチド”という用語はペプチド、ポリペプチド及びタンパク質を含む。これらは特に指定されない限り互換的に用いられる。  
20

本発明に関しては、生物学的サンプルは任意の供給源、例えば血清サンプル又は組織サンプル(例えば乳房、肺又は膵臓組織)から入手することができる。

NKCC1ポリペプチドを検出／定量する便利な手段は抗体の使用を必要とし、したがって本明細書で定義されるNKCC1はまた抗体作製に利用される。したがって本発明の別の特徴では、対象者で乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌をスクリーニング及び／又は診断するために少なくとも1つのNKCC1ポリペプチドと結合する抗体の使用が提供される。好ましくは、前記抗体は、前記対象者から得られた生物学的サンプルで一定量のNKCC1ポリペプチドの検出及び／又は定量に用いられる。  
30

## 【0008】

ある実施態様では、組織切片での抗体の結合は、異常なポリペプチド分布又は異常なポリペプチドレベルの検出に用いることができる。特別な実施態様では、NKCC1ポリペプチドに対する抗体を用いて、前記ポリペプチドのレベルについて患者の組織(例えば乳房、肺及び／又は膵臓の生検組織)をアッセイすることができる(前記組織ではポリペプチドの異常レベルは乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の指標である)。本明細書で用いられるように、“異常レベル”は、乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌をもたない対象者のレベル又はリファレンスレベルと比較して上昇又は低下しているレベルを意味する。特別な実施態様では、NKCC1ポリペプチドに対する抗体を用いて、前記ポリペプチドのレベルについて患者の組織(例えば乳房、肺及び／又は膵臓の生検組織)をアッセイすることができる(前記組織ではNKCC1ポリペプチドのレベル上昇は乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の指標である)。  
40

適切な免疫アッセイには、例えばウェスタンプロット、放射性免疫アッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、“サンドイッチ”免疫アッセイ、免疫沈澱アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、放射能免疫測定アッセイ、蛍光免疫アッセイ及びプロテインA免疫アッセイのような技術を用いる競合及び非競合アッセイ系が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

## 【0009】

別の特徴では、本発明は、対象者における乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌をスクリーニング及び／又は診断する方法、及び／又は乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の治療の有効性をモニターする方法が提供される。前記方法は、前記対象者から得た生物学的サンプルで以下のd)~i)のNKCC1核酸を検出及び／又は定量する工程を含む：  
50

d ) 図 1 (配列番号2)に示すDNA配列若しくはそのRNA等価物を含むもの、又は前記配列若しくはそのRNA等価物から成るもの；

e ) 前記a )、b )又はc )で定義されるポリペプチドをコードする配列であるもの；

f ) 前記d )又はe )の配列と相補的な配列であるもの；

g ) 前記d )又はe )の配列と同じポリペプチドをコードする配列であるもの；

h ) 前記d )、e )、f )又はg )の配列のいずれかと実質的な同一性を示す配列であるもの；

i ) 前記d )、e )、f )、g )又はh )のフラグメントであって、長さが少なくとも8ヌクレオチドであるもの。

用語「RNA等価物」は、遺伝暗号においてRNAの「U」を「T」で置換えることを斟酌すると、所定のRNA分子が、所定のDNA分子の配列に相補的な配列を有していることを示す。前記核酸分子は単離形でも組換え形でも化学的に合成されたものでもよい。10

#### 【0010】

特に別に指定されない限り、“NKCC1核酸”という用語は、上記のd )～i )で定義される核酸を含み、さらに以下の1つ又は2つ以上の特性を有することができる：

1 ) それらはDNAでもRNAでもよい；

2 ) それらは一本鎖でも二本鎖でもよい；

3 ) それらは組換え形で提供されてもよく、例えば5'及び/又は3'フランкиング配列と共に結合し、天然には存在しない分子を提供する；

4 ) それらは5'及び/又は3'フランкиング配列をもたずに提供することができ、前記は通常天然に存在する；20

5 ) それらは実質的に純粋な形態で提供することができる。したがってそれらは夾雑タンパク質及び/又は他の核酸を実質的に含まない形態で提供することができる；及び

6 ) それらはイントロンとともに又はイントロンを含まずに(例えばcDNA)提供することができる。

前述の記載から、当業者には多数の核酸の用途が本発明の範囲内に包含されることが理解されよう。

#### 【0011】

別の特徴では、本発明は、対象者における乳癌、肺癌及び/又は膵臓癌の予防及び/又は治療する方法を提供する。前記方法は、前記対象者に治療的に有効な量のNKCC1ポリペプチド又はNKCC1核酸を投与することを含む。30

さらに別の特徴では、本発明は、乳癌、肺癌及び/又は膵臓癌の予防及び/又は治療で使用される組成物の製造においてNKCC1ポリペプチド又はNKCC1核酸の使用を提供する。前記対象は哺乳類、好ましくはヒトである。

上記の特徴では、NKCC1ポリペプチドは単離形又は組換え形で提供され、他の成分と融合されてあってもよい。前記のNKCC1ポリペプチドは実質的に純粋な形態で、すなわち他のタンパク質を実質的に含まないで提供することができる。したがって、NKCC1ポリペプチドは、前記が存在する主な成分である組成物として提供されるであろう(すなわち、前記ポリペプチドは、溶媒又は担体を除いて重量/重量基準で測定したとき少なくとも50%、好ましくは少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも98%のレベルで存在する)。40

さらに詳細な本発明の理解のために、上記のa )～c )の範囲に含まれるポリペプチドをこれから詳細に考察する。

#### 【0012】

##### (a ) の範囲に含まれるポリペプチド)

前記a )の範囲に含まれるポリペプチドは、図1(配列番号1)に示される特定のアミノ酸配列から成るか、又は図1(配列番号1)に示される配列に対しさらに付加的なN-末端及び/又は付加的なC-末端アミノ酸配列を有することができる。さらにまたNKCC1ポリペプチドは“成熟”タンパク質の形態であっても、又は大きなタンパク質(例えば融合タンパク質)の一部分であってもよい。

10

20

30

40

50

付加的なN-末端又はC-末端配列は種々の理由により提供することができる。分泌若しくはリーダー配列、プレ-、プロ-若しくはプレプロ-タンパク質配列、又は精製を促進する配列（例えばアフィニティタグ）を含む付加的アミノ酸配列を含むことはしばしば有利である。組換えの生成時に安定性を提供することができる付加的配列もまた用いることができる。場合によってそのような配列は、付加配列又はその一部として切断可能な配列を取り込むことによって必要に応じて除去することができる。したがって、NKCC1ポリペプチドは他のポリペプチドを含む他の成分と融合させることができる。そのような付加配列及びアフィニティタグは当業界では周知である。そのような付加配列を提供する技術も当業界で周知である。

## 【0013】

10

付加配列は、特定のポリペプチドの特徴を変化させるために提供することができる。これは、特定の発現系における発現の改善又は発現の調節で有用であろう。例えば、付加配列はタンパク質分解に対する何らかの保護を提供することができる。

付加配列はまたポリペプチドの特性を変化させて同定又は精製の促進に有用であろう。例えば、融合タンパク質は、アフィニティクロマトグラフィーによって単離できる成分（例えばマルチヒスチジン残基、FLAGタグ、HAタグ又はmycタグ、ただしこれらに限定されない）とポリペプチドが連結された状態で提供することができる。前記成分は抗原又はエピトープであって、アフィニティカラムは固定された抗体又は固定された抗体フラグメントを含むことができる。前記抗体又はそのフラグメントは前記抗原又はエピトープ（望ましくは高度の特異性を有する）と結合する。前記融合タンパク質は、通常は適切な緩衝液の添加によってカラムから溶出させることができる。

20

しかしながら、付加的なN-末端又はC-末端配列はポリペプチドを得るために用いた個々の技術の結果として単に存在することがあり、必ずしも特定の有利な特性を前記ポリペプチドに提供する必要はない。そのようなポリペプチドは本発明に包含される。

付加的なN-末端又はC-末端配列が存在する場合はいつでも、得られたポリペプチドが、図1（配列番号1）に示したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫学的又は生物学的活性を示すことが所望される。

## 【0014】

## （b）の範囲に含まれるポリペプチド）

30

上記b）で定義したポリペプチドに注目すれば、これらのポリペプチドが上記a）で示されたポリペプチドの誘導体であることは当業者には理解されよう（ただし、そのような誘導体は、好ましくは図1（配列番号1）に示したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫学的又は生物学的活性を示すことが条件とされる）。また別には、前記ポリペプチドの生物学的活性は改変することができる。したがって、誘導体は翻訳後改変（例えばリン酸化、糖化及びファルネシル化、ただしこれらに限定されない）を含むことができることは当業者には理解されよう。改変は、天然に生じる改変（例えば翻訳後改変、ただしこれに限定されない）及び天然には生じない改変（例えば突然変異誘発によって導入することができるもの）を含む。

タンパク質の活性に影響を与えない、タンパク質のアミノ酸配列における変更が生じてもよい。これらの変更にはアミノ酸の欠失、挿入及び置換が含まれ、代替スプライシング及び／又は複数の翻訳開始部位及び終止部位の存在から生じることができる。多形性現象は翻訳プロセスの不正確性の結果として生じるであろう。したがって、前記タンパク質の生物学的又は免疫学的活性に影響を与えないアミノ酸配列の変化は許容されるであろう。

40

## 【0015】

本発明のさらに別の特徴では、例えば乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の治療及び／又は予防でドミナントネガティブ又は構成的に活性を有するNKCC1ポリペプチドの使用が意図される。したがって、ある実施態様では、欠失、挿入、改変又は置換アミノ酸は前記ペプチドにドミナントネガティブな活性を与える。別の実施態様では、前記欠失、挿入、改変又は置換アミノ酸は前記ポリペプチドに構成的活性を与える。

種々の変更が特定の活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列に加えられて、前記活性

50

の少なくとも一部分、好ましくは前記活性の実質的な部分を有する誘導体（時に、変種又は“ミューテイン”として知られる）が生成されることは当業者には理解されよう。上記のa)に記載されたようなポリペプチドの誘導体は本発明の範囲に包含され、下記で極めて詳細に考察される。それらには対立遺伝子型誘導体及び非対立遺伝子型誘導体が含まれる。

#### 【0016】

NKCC1ポリペプチドの誘導体の例は、1つ又は2つ以上の他のアミノ酸による1つ又は2つ以上のアミノ酸の置換を有するが上記a)で定義したポリペプチドである。種々のアミノ酸が類似の特性を有することは当業者には知られていよう。前記ポリペプチドの所望の活性を失うことなく、ポリペプチドの1つ又は2つ以上の前記のようなアミノ酸を1つ又は2つ以上の前記のようなアミノ酸によってしばしば置換することができる。10

したがって、アミノ酸のグリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン（脂肪族側鎖を有するアミノ酸）はしばしば互いに置換することができる。これらの可能な置換のうちで、グリシンとアラニンを用いて互いに置換することが好ましく（それらは比較的短い側鎖を有するために）、バリン、ロイシン及びイソロイシンを用いて互いに置換することが好ましい（それらはより大きな疎水性脂肪族側鎖をもつため）。

#### 【0017】

しばしば互いに置換することができる他のアミノ酸には以下が含まれる：

- フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン（芳香族側鎖をもつアミノ酸）；20
- リジン、アルギニン及びヒスチジン（塩基性側鎖をもつアミノ酸）；
- アスパルテート及びグルタメート（酸性側鎖をもつアミノ酸）；
- アスパラギン及びグルタミン（アミド側鎖をもつアミノ酸）；
- システイン及びメチオニン（硫黄含有側鎖をもつアミノ酸）；及び
- アスパラギン酸及びグルタミン酸でそれぞれホスホセリン及びホスホスレオニンを置換することができる（酸性側鎖をもつアミノ酸）。

前記の性質をもつ置換は、“保存的”又は“半保存的”アミノ酸置換と称される。

#### 【0018】

アミノ酸欠失又は挿入もまた上記a)に示したアミノ酸配列に対して実施できる。したがって例えば、前記ポリペプチドの生物学的及び／又は免疫学的活性に対する実質的な影響をもたないアミノ酸、又は少なくともそのような活性を排除しないアミノ酸を欠失させることができる。そのような欠失は、ポリペプチドの全長及び分子量を減少させ、一方活性を維持することができるので有利であろう。それによって特定の目的に必要なポリペプチドの量を減少させることができる（例えば用量レベルを減少させることができる）。30

上記a)で示したアミノ酸配列に対するアミノ酸の挿入もまた実施することができる。NKCC1ポリペプチドの特性を変化させるために（例えば融合タンパク質について上記で説明したように、同定、精製又は発現を促進するために）アミノ酸の挿入を実施することができる。

上記a)で示したアミノ酸配列に対するアミノ酸の変更は任意の適切な技術を用いて、例えば位置特異的突然変異誘発（Hutchinson et al. (1978) J. Biol. Chem. 253: 6551）を用いて実施できる。

本発明で使用されるポリペプチドへのアミノ酸置換又は挿入は天然に存在するか、又は天然に存在しないアミノ酸を用いて実施できることは理解されよう。天然アミノ酸であれ、合成アミノ酸であれ、L型アミノ酸のみが存在することが好ましい。

#### 【0019】

どんなアミノ酸変化が実施されるとても（置換、改変、挿入又は欠失の手段にかかわらず）、好ましいNKCC1ポリペプチドは、上記a)で定義したポリペプチドと少なくとも50%の配列同一性有し、より好ましくは配列同一性の程度は少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%である。少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも98%の配列同一性がもっとも好ましい。

同一性という用語は、2つのポリペプチド配列間の類似性を表すために用いることがで

きる。アミノ酸配列の同一性の程度は、例えば“ベストヒット(best fit)”(Smith and Waterman (1981) Advances in Applied Mathematics, 482-489)のようなプログラムを用いて計算し、任意の2つの配列間で最大の類似性をもつセグメントを見つけることができる。前記アラインメントは、アミノ酸類似性マトリックス、例えば文献 (Schwarz and Dayhoff (1979) Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayhoff, M.O., Ed pp353-358) に記載されたようなものを用いて得られるスコアを最大限にすることによって実施される。

#### 【0020】

前記工程を実施するための当業界で周知のソフトウェアパッケージはCLUSTALプログラムである。前記は2つのポリペプチドのアミノ酸配列を比較し、どちらかの配列に適切なスペースを挿入することによって最適アラインメントを見出す。最適アラインメントに対するアミノ酸同一性又は類似性(同一性 + アミノ酸の種類の保存)もまた例えばBLASTXのようなソフトウェアパッケージを用いて計算することができる。前記のプログラムでは、最大の長さをもつ類似配列のアラインメントを見出し、前記のフィットに対する値を割り当てる。いずれのワンパターン比較についても、その各々が異なるスコアを有する、類似性をもついくつかの領域を見出すことができる。異なる長さを有する2つのポリペプチドは長いほうのフラグメントの全長に対して比較できることは当業者には理解されよう。また別には小領域を比較することもできる。有用な比較を実施するためには通常同じ長さの配列が比較される。

高度の配列同一性が存在する場合は、アミノ酸配列に比較的わずかな相違しか存在しないであろう。したがって例えば20未満、10未満又は5未満の相違であろう。

#### 【0021】

(c) の範囲に含まれるポリペプチド)

上記で考察したように、ポリペプチドの長さを減少させることは、しばしば有利である(好ましくは得られた短いポリペプチドはなお所望の活性を有するか、又は有用な抗体を生じることができる)。したがって特徴c)は、本発明で使用される上記a)又はb)のポリペプチドのフラグメントを包含する。

本明細書で用いられるように、“フラグメント”という用語は、親ポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも10アミノ酸残基、好ましくは少なくとも15アミノ酸残基、少なくとも20アミノ酸残基、少なくとも25アミノ酸残基、少なくとも40アミノ酸残基、少なくとも50アミノ酸残基、少なくとも60アミノ酸残基、少なくとも70アミノ酸残基、少なくとも80アミノ酸残基、少なくとも90アミノ酸残基、少なくとも100アミノ酸残基、少なくとも125アミノ酸残基、少なくとも150アミノ酸残基、少なくとも175アミノ酸残基、少なくとも200アミノ酸残基、少なくとも250アミノ酸残基、少なくとも300アミノ酸残基、少なくとも350アミノ酸残基、少なくとも400アミノ酸残基、少なくとも450アミノ酸残基、少なくとも500アミノ酸残基、少なくとも550アミノ酸残基、少なくとも600アミノ酸残基、少なくとも650アミノ酸残基、少なくとも700アミノ酸残基、少なくとも750アミノ酸残基、少なくとも800アミノ酸残基、少なくとも850アミノ酸残基、少なくとも900アミノ酸残基、少なくとも950アミノ酸残基、少なくとも1000アミノ酸残基、少なくとも1050アミノ酸残基、少なくとも1100アミノ酸残基、少なくとも1150アミノ酸残基又は少なくとも1200アミノ酸残基のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。NKCC1ポリペプチドの任意のフラグメントは親ポリペプチドの機能的活性を保持している場合もいない場合もある。フラグメントはその全長にわたって図1(配列番号1)に示したアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性を有する。好ましくはフラグメントは少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも98%の同一性を有する。当業者は個々のフラグメントが活性を有するか否かを決定することができよう。

#### 【0022】

NKCC1ポリペプチドは抗原性材料として有用で、乳癌、肺癌及び/又は膵臓癌の治療又は予防のためのワクチンの製造に用いることができる。そのような材料は“抗原性”又は“免疫原性”を有するであろう。一般的には、“抗原性”は、タンパク質が抗体を生成す

10

20

30

40

50

るために用いることができるか、又は実際に対象者で抗体反応を誘導することができることを意味するために用いられる。“免疫原性”は、タンパク質が対象者で免疫反応を誘引することができることを意味するために用いられる。したがって、後者の事例では、タンパク質は抗体反応だけでなく非抗体系免疫反応もまた生じる。

抗原性タンパク質又はポリペプチドをスクリーニングし、エピトープ領域（すなわちタンパク質若しくはポリペプチドの抗原性又は免疫原性に必要な領域）を同定することができることは周知である。当業者に周知の方法を用いてフラグメント、及び／又は相同体及び／又は誘導体を抗原性について調べることができる。したがって、NKCC1ポリペプチドのフラグメントは、1つ又は2つ以上のそのようなエピトープ領域を含むか、又はそれらの抗原性／免疫原性特性を維持するためにそのような領域に充分に類似するであろう。したがって、NKCC1ポリペプチドのフラグメントの場合、同一性の程度はおそらく問題とされない。なぜならば、それらは、本明細書に記載したタンパク質若しくはポリペプチド、相同体又は誘導体の特定の部分に対して100%同一であろう。重要なことは、フラグメントは、それが由來したタンパク質の抗原性及び／又は免疫原性特性を維持するということであろう。

相同体、誘導体及びフラグメントは少なくとも、それらが由來したタンパク質の抗原性及び／又は免疫原性を少なくともある程度は保持するであろう。

#### 【0023】

下記で考察するように、NKCC1ポリペプチドは乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の治療手段として有用である。特にある実施態様では、NKCC1ポリペプチドは別のポリペプチド、例えばHIV/Tatタンパク質のタンパク質トランスダクションドメイン（融合タンパク質の細胞内への進入を促進する）に融合させられる（S. Asoh et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 : 17107-17112）。そのような融合タンパク質は、乳癌、肺癌及び／又は膵臓癌の治療用組成物の製造で使用するために提供することができる。1つ又は2つ以上のそのようなポリペプチドを製造する場合、好ましい手段は組換えDNA技術をベースにすることは当業者には理解されよう。

NKCC1ポリペプチドは、周知の遺伝コードの縮退を考慮すれば、多様な核酸分子によってコードされるであろう。これら分子のいずれも本発明で用いることができる。それらをベクターに挿入し、クローニングして大量のDNA又はRNAを更なる研究のために提供することができる。当業者に公知の技術を用いて、適切なベクターを宿主細胞に導入し、本発明で使用されるポリペプチドを発現させることができる。

#### 【0024】

タンパク質及びポリペプチドのクローニング、発現及び精製技術は当業者には公知である。当業界で周知の方法を用いてDNA構築物を容易に作製することができる。これらの技術は例えば以下の文献に記載されている：J. Sambrook et al. “Molecular Cloning”, 2nd Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989); “Old & Primrose Principles of Gene Manipulation”, 5th Ed., Blackwell Scientific Publications (1994); 及び“Stryer Biochemistry”, 4th Ed., W.H. Freeman and Company (1995)。DNA構築物及び発現タンパク質の改変、例えばプロモーター、エンハンサー、シグナル配列、リーダー配列、翻訳開始及び終止シグナル、並びにDNA安定性制御領域の付加を繰り返して促進することができる。

通常は、DNA構築物はベクター（前記はファージ又はプラスミド由来であろう）に挿入される。タンパク質の発現はベクターで細胞（真核細胞由来でも原核細胞由来でもよい）を形質転換又はトランスフェクションして達成される。そのようなベクター及び適切な宿主細胞は本発明で使用するためにさらに別の特徴を構成する。

#### 【0025】

組換えNKCC1ポリペプチドを製造するために、宿主細胞に遺伝子工学によってNKCC1核酸のための発現系またその一部を取り込ませることができる。そのような操作は当業界で周知の方法、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラントransフェクション、トランスペクション、マイクロインジェクション、陽イオン性脂質仲

10

20

30

40

50

介トランسفエクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、擦過ローディング (scrape loading)、弾道誘導又は感染を用いて実施することができる（例えば以下を参照されたい：Davis et al. “Basic Methods in Molecular Biology”, (1986)及びJ. Sambrook et al. “Molecular Cloning”, 2nd Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)）。

宿主細胞の代表例には、細菌細胞（例えば大腸菌 (*E. coli*)、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、ストレプトミセス及び枯草菌 (*Bacillus subtilis*)）、真菌細胞（例えば酵母細胞及びアスペルギルス細胞）、昆虫細胞（例えばショウジョウバエS2及びスピドブテラSf9細胞）、動物細胞（例えばCHO、COS、HeLa、C127、3T3、HEK293、BHK及びボウズメラノーマ細胞）及び植物細胞が含まれる。10

#### 【0026】

例えば以下のような多様な発現系を用いることができるが、ただしこれらに限定されない：染色体系、エピソーム系及びウイルス由来系、例えば細菌性プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピトープ、挿入エレメント、酵母染色体性エレメント、ウイルス（例えばバキュロウイルス、パボーバウイルス（例えばSV40）、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス及びレトロウイルス）に由来するベクター、及びその組合せに由来するベクター、例えばプラスミド及びバクテリオファージの遺伝エレメントに由来するベクター（例えばコスマド及びファージミド）。発現系は、発現を調節すると同時に発現をひき起こすコントロール領域を含むことができる。一般的には、核酸を維持、増殖及び発現させて宿主でポリペプチドを生成することができる任意の系又はベクターを用いることができる。適切な核酸配列は、周知で日常的な技術（例えば上掲書（Sambrook et al.）に記載されたもの）によって発現系に挿入することができる。適切な分泌シグナルをNKCC1ポリペプチドに取り込ませて、翻訳されたタンパク質を小胞体、細胞周辺腔又は細胞外環境の管腔内に分泌させることができる。これらのシグナルはNKCC1ポリペプチドにとって内因性でもよいが、またそれらは異種のシグナルでもよい。20

#### 【0027】

細胞を含まない翻訳系もまた組換えポリペプチドの製造に用いることができる（例えばウサギ網状赤血球溶解物、コムギ麦芽溶解物、SP6/T7 *in vitro* T&T及びRTS100E.*coli*HYを結合させた転写/翻訳キット（Roche Diagnostics Ltd., Lewes, UK）及びTNTクイックを結合させた転写/翻訳系（Promega UK, Southampton, UK））。

NKCC1核酸は当業界で公知の方法、例えば通常の化学的手段又はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）增幅を用いて合成することができる。NKCC1核酸はまた、例えばc DNAライブラリー、ゲノムライブラリー又は発現ライブラリーをスクリーニングすることによって、任意の種に由来するNKCC1ポリペプチドをコードする遺伝子の同定及びクローニングを可能にする。30

核酸構造の情報を抗体の作製及び遺伝子治療に用いることができる。これに関する技術は、本明細書でさらに詳細に考察するとおり当業者には周知である。

適切な発現系を用いることによって、NKCC1ポリペプチドは糖付加形態又は糖のない形態で発現させることができる。糖のない形態は原核細胞（例えば大腸菌）で発現させることによって生成することができる。40

N-末端メチオニンを含むポリペプチドはある種の発現系を用いて生成することができるが、他の系では成熟ポリペプチドは前記の残基を欠いているであろう。

#### 【0028】

NKCC1ポリペプチドのクローニング、発現及び精製のための好ましい技術は以下に要約する：

ポリペプチドは天然のままの状態で製造するか、又は変性条件下で製造し続けて最折り畳みを実施することができる。バキュロウイルス発現ベクターは分泌プラスミド（例えばpACGP67（Pharmingen））を含み、前記はフレーム内でクローン化されたエピトープタグ配列をもち（例えばmyc、V5又はHis）、検出を促進しその後のタンパク質の精製を可能に50

する。哺乳類発現ベクターはpCDNA3及びpSecTag（両者ともInvitrogen）並びにpREP9及びpCEP4（Invitrogen）を含むであろう。大腸菌系はpBadシリーズ（Hisタグ付き、Invitrogen）又はpGexシリーズ（Pharmacia）を含む。

ある実施態様では、NKCC1ポリペプチドは単離形で提供され、少なくともある程度まで精製されたNKCC1ポリペプチドを含む。NKCC1ポリペプチドは、組換え法を用いて製造するか、合成により製造するか、又は前記の方法を組み合わせて製造することができる。NKCC1ポリペプチドは実質的に純粋な形態で、換言すれば実質的に他のタンパク質を含まない状態で提供することができる。

#### 【0029】

NKCC1ポリペプチドを下記に述べるように細胞をベースにしたスクリーニングアッセイで使用するために発現させる場合は、前記ポリペプチドは細胞表面で生成されることが好ましい。この場合には、細胞はスクリーニングアッセイで使用する前に採取することができる。NKCC1ポリペプチドが培養液中に分泌される場合は、前記培養液を回収して前記ポリペプチドを単離することができる。細胞内で生成される場合には、NKCC1ポリペプチドを回収する前に細胞を先ず溶解させることができる。

NKCC1ポリペプチドは周知の方法によって組換え細胞培養から回収し、精製することができる。前記方法には以下が含まれる：硫安若しくはエタノール沈澱、酸抽出、陰イオン若しくは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、疎水反応クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、分子篩クロマトグラフィー、遠心法、電気泳動法及びレクチンクロマトグラフィー。ある実施態様では前記方法の組合せが用いられる。別の実施態様では、高性能液体クロマトグラフィーが用いられる。さらに別の実施態様では、NKCC1ポリペプチドに特異的に結合する抗体を用いて、NKCC1を含むサンプルから前記ポリペプチドを枯渇させるか、又は前記ポリペプチドを精製することができる。前記ポリペプチドを単離又は精製時に変性させたときは、当業界で周知の技術を用いて、NKCC1ポリペプチドの天然の構造又は活性を示す構造を再生させるために、リフォールディングさせることができる。

#### 【0030】

NKCC1ポリペプチドをコードする核酸分子（本明細書では“コード”核酸と称される）の他に、本発明はまたそれと相補的な核酸もまた利用する。したがって、例えば二本鎖核酸分子の両鎖が本発明に含まれる（それらが互いに結合しているか否かにかかわらない）。さらにまたmRNA分子及び相補的DNA分子（例えばcDNA）も含まれる。

上記で考察した核酸分子のいずれかとハイブリダイズすることができる核酸分子の、乳癌、肺癌及び/又は膵臓癌の診断、スクリーニング、治療及び/又は診断における使用もまた本発明に包含される。そのような核酸分子は本明細書では“ハイブリダイズ（する）”核酸分子と称される。ハイブリダイズ核酸分子は、例えばプローブ又はプライマーとして有用であろう。

望ましくはそのようなハイブリダイズ分子は長さが少なくとも8ヌクレオチド、好ましくは長さが25又は少なくとも50ヌクレオチドである。前記ハイブリダイズ核酸分子は好ましくは上記のd）、e）、f）、g）、h）又はi）の核酸分子と特異的にハイブリダイズする。

#### 【0031】

望ましくは、ハイブリダイズ分子はストリンジェントな条件下で前記の分子とハイブリダイズするであろう。ストリンジェントな条件の一例は、目的のハイブリダイゼーションが、約35～約65の間の温度で約0.9モルの塩溶液を用いて実施される場合である。しかしながら、当業者であれば、例えばプローブの長さ、塩基の組成、存在するイオンのタイプなどの変数(variables)を考慮して、前記のような条件を変動させることができるであろう。高度な選択性のために、比較的ストリンジェントな条件（例えば低塩又は高温条件）を使用して二重鎖が形成される。本明細書で用いられるように、“高度にストリンジェントな条件”とは、0.5MのNaHPO<sub>4</sub>、7%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、1mMのEDTA、6

10

20

30

40

50

5 でのフィルター結合DNAとのハイブリダイゼーション、及び0.1XのSSC / 0.1% SDS、68 での洗滌を意味する (F.M. Ausubel et al. eds., 1989, "Current Protocols in Molecular Biology", Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York, p.2.10.3)。いくつかの応用では、より低いストリンジエンシー条件が二重鎖形成に要求される。本明細書で用いられるように、“中程度にストリンジエントな条件”は、0.2XSSC / 0.1% SDSで42 での洗滌を意味する (Ausubel et al. 1989, 上掲書)。ハイブリダイゼーション条件ではまた、ホルムアミドの添加量を増加させハイブリッド二重鎖を不安定にさせることによってストリンジエンシーを高めることができる。したがって、個々のハイブリダイゼーション条件は容易に操作することができ、一般的には所望される結果に応じて選択されるであろう。一般的には、50%のホルムアミドの存在下での都合のよいハイブリダイゼーション温度は以下のとおりである：NKCC1ポリペプチドをコードする遺伝子フラグメントと95~100%同一のプローブに対しては42 、90~95 %同一性に対しては37 、及び70~90%同一性に対しては32 。ゲノムライブラリーの調製では、DNAフラグメントが生成され、そのいくつかはNKCC1ポリペプチドの一部分又は全體をコードするであろう。前記DNAは種々の制限酵素を用いて特定の部位で切断することができる。また別には、マンガンの存在下でDNA分解酵素を用いて前記DNAをフラグメント化するか、又は前記DNAは物理的に例えば超音波処理によってせん断することができる。続いて前記DNAフラグメントを標準的な技術(アガロース及びポリアクリルアミドゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィー並びにショ糖勾配遠心分離を含むが、ただしこれらに限定されない)によってサイズにしたがって分離することができる。前記DNAフラグメントを続いて適切なベクター(プラスミド、コスミド、バクテリオファージラムダ又はT<sub>4</sub>、酵母人工染色体(YAC)を含むが、ただしこれらに限定されない)に挿入することができる(例えば以下を参照されたい：J. Sambrook et al. 1989 "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 1D Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; D.M. Glover, (ed.), 1985, "DNA Cloning: A Practical Approach", MRL Press, LTD., Oxford, U.K. Vol. I, II: F.M. Ausubel et al. eds., 1989, "Current Protocols in Molecular Biology", Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York)。前記ゲノムライブラリーを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スクリーニングすることができる(Benton & Davis, 1977, Science 196: 180; Grunstein & Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 : 3961)。

### 【0032】

タンパク質をコードするDNAの操作は、タンパク質の改変及び精製目的での大量のタンパク質の製造の両方で特に強力な技術である。前記には所望の核酸配列増幅のためのPCR技術の使用が含まれる。したがって、本明細書で提供される配列データを用いてPCRで使用されるプライマーをデザインし、それによって所望の配列を見つけ、これを高度に増幅することができる。

典型的には、プライマーは少なくとも8ヌクレオチドの長さを有し、一般的には少なくとも10ヌクレオチドの長さであろう(例えば15~25ヌクレオチドの長さである)。いくつかの事例では、少なくとも30又は少なくとも35ヌクレオチドの長さのプライマーが用いられるであろう。

さらに別の選択肢として化学合成を用いることができ、前記は自動化されてあってもよい。比較的短い配列は化学的に合成し一緒に連結させてより長い配列を提供することができる。

### 【0033】

同一性という用語はまた2つの個々のDNA配列間の類似性を示すために用いることができる。“bestfit”プログラム(Smith & Waterman, 1981, Advances in applied Mathematics, 482-489)は、2つの核酸配列間で類似性をもつ最良のセグメントを見つけるために用いられるコンピュータソフトの一タイプの例であるが、一方GAPプログラムは配列の全長にわたってアラインメントを実施し、どちらかの配列に適切なようにスペースを挿入する

10

20

30

40

50

ことによって最適なアラインメントを見つけることを可能にする。d)、e)及びf)の配列のいずれかと実質的な同一性を示す配列、例えば少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも98%の配列同一性をもつのが好ましい。

#### 【0034】

本発明で使用されるハイブリダイズ核酸分子は、上記のd) - i)に包含される核酸分子とその全長にわたって高度な配列同一性を有するであろう（例えば少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも98%の配列同一性）。当業者に理解されるように、ある一本鎖核酸分子と別の核酸分子とが有する配列同一性が高ければ高いほど、前記が、前記他の核酸分子と相補的な核酸分子と適切な条件下でハイブリダイズする確率は高くなるであろう。10

所望の場合は、NKCC1ポリペプチドをコードする遺伝子、関連遺伝子、又は関連核酸配列若しくはサブ配列（相補的配列を含む）も又はイブリダイゼーションアッセイに用いることができる。NKCC1ポリペプチドをコードする核酸、又は少なくとも8ヌクレオチドを含むそのサブ配列をハイブリダイゼーションプローブとして用いることができる。ハイブリダイゼーションアッセイは、NKCC1ポリペプチドをコードする遺伝子の発現異常を伴う症状、障害又は疾患の検出、予後、診断又はモニターのために、又は乳癌、肺癌及び/又は膵臓癌を示唆する徵候若しくは症状をもつ患者の示差的診断のために用いることができる。20

#### 【0035】

特にある実施態様では、そのようなハイブリダイゼーションアッセイは以下の工程を含む方法によって実施することができる：20

i) NKCC1ポリペプチドをコードするDNA又はRNAとハイブリダイズすることができる核酸と、核酸を含む生物学的サンプルをハイブリダイゼーションが生じる条件下で接触させ；さらに

ii)生じた一切のハイブリダイゼーションを検出又は測定する。

本発明はまた、NKCC1ポリペプチドをコードするRNAとハイブリダイズすることができる核酸プローブを含むキットを提供する。特別な実施態様では、キットは、1つ又は2つ以上の容器の中に一対のプライマー（例えば各々が6 - 30ヌクレオチド、より好ましくは10 - 30ヌクレオチド、さらに好ましくは10 - 20ヌクレオチド）を含む。前記プライマーは、適切な反応条件下ではNKCC1ポリペプチドをコードする核酸の少なくとも一部分の増幅を、例えばポリメラーゼ連鎖反応（例えば以下を参照のこと：Innis et al. 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CA）、リガーゼ連鎖反応（EP320308号を参照されたい）、Q レプリカーゼの使用、環状プローブ反応又は当業界で公知の他の方法によってプライミングすることができる。30

#### 【0036】

別の実施態様では、乳癌、肺癌及び/又は膵臓癌治療用ワクチンとして使用されるNKCC1ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と相補的な10又はそれ以上の連続するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの調製物が提供される。そのような調製物はアジュバント又は他の賦形剤を含むことができる。

さらに別の実施態様では、本発明は、乳癌、肺癌及び/又は膵臓癌の治療で使用される医薬組成物の製造での少なくとも1つのNKCC1核酸の使用を提供する。40

プライマー及び/又はプローブとして使用される以外にも、ハイブリダイズ核酸分子をアンチセンス分子として用いて、相補的核酸分子との結合によりNKCC1ポリペプチドの発現を変化させることができる。この技術はアンチセンス療法で用いることができる。

本明細書で用いられるように、“アンチセンス”核酸は、本明細書で定義したポリペプチドをコードするRNA（好ましくはmRNA）の一部と相補的な多少の配列によりハイブリダイズすることができる核酸を指す。アンチセンス核酸はそのようなポリペプチドをコードするmRNAのコード領域及び/又は非コード領域と相補的であろう。そのようなアンチセンス核酸は発現を阻害する化合物として有用であり、乳癌、肺癌及び/又は膵臓癌の治療50

又は予防に使用することができる。

【0037】

特別な実施態様では、NKCC1ポリペプチドの発現はアンチセンス核酸の使用によって阻害される。本発明は、NKCC1ポリペプチドをコードする遺伝子又はcDNAに対してアンチセンスである少なくとも8スクレオチドを含む核酸の治療的又は予防的使用を提供する。

内因性ポリペプチド発現もまた、標的誘導される相同組換えを用いて、前記ポリペプチドをコードする遺伝子又はそのような遺伝子のプロモーターの不活性化又は“ノックアウト”により低下させることができる（例えば以下を参照されたい：Smithies et al. 1985, Nature 317: 230-234; Thomas & Capecchi, 1987, Cell 51: 503-512; Thompson et al. 1989, Cell 5: 313-321; Zijlstra et al. 1989, Nature 342: 435-438）。例え  
10 ば、内因性遺伝子と相同なDNAによってフランкиングされている非機能性ポリペプチド（又は完全に無関係のDNA配列）をコードする変異遺伝子（前記ポリペプチドをコードする遺伝子のコード領域又は調節領域）を用いて（選択マーカー及び／又は負の選択マーカーを有するものでもないものでもよい）、標的遺伝子を発現する細胞にin vivoでトランسفェクトすることができる。標的誘導される相同組換えを介した前記DNA構築物の挿入によって前記標的遺伝子の不活性化が生じる。このアプローチをヒトに応用することができるが、前記組換DNA構築物は直接投与されるか、又は必要な部位に適切なウイルスベクターを用いてin vivoで標的誘導されることを条件とする。

【0038】

別の実施態様では、NKCC1ポリペプチドの遺伝子発現を低下させるために周知の遺伝子“ノックアウト”リボザイム又は三重ヘリックス法を併用しながらNKCC1ポリペプチドをコードする遺伝子配列を用い、NKCC1ポリペプチドのレベル又は活性を低下させることによって乳癌、膵臓癌及び／又は肺癌の症状を改善することができる。このアプローチでは、リボザイム又は三重ヘリックス分子を用いて前記遺伝子の活性、発現又は合成を調節し、したがって乳癌、膵臓癌及び／又は肺癌の症状を改善する。そのような分子は、変異又は非変異標的遺伝子の発現を低下又は阻害するようにデザインすることができる。そのような分子の作製技術及び使用技術は当業界では周知である。  
20

さらに別の実施態様では、NKCC1核酸は遺伝子治療で投与される（例えば以下を参照されたい：T. Hoshida et al. 2002, Pancreas, 25: 111-121; Y. Ikuno, 2002, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43: 2406-2411; C. Bolland, 2002, Blood 99: 3179-3187; E. Lee, 2001, Mol. Med. 7: 773-782）。  
30

遺伝子治療とは、発現させた核酸又は発現させることができる核酸の対象者への投与を指す。この実施態様では、前記核酸はそのコードタンパク質を生成し、前記タンパク質はポリペプチド機能を促進することによって治療的効果を仲介する。

【0039】

好ましい特徴では、医薬組成物はNKCC1核酸（例えばNKCC1ポリペプチドをコードする核酸）を含み、前記核酸はNKCC1ポリペプチド又はそのキメラタンパク質を適切な宿主で発現する発現ベクターの一部分である。特に、そのような核酸は前記ポリペプチドのコード領域に機能的に連結されたプロモーターを有し、前記プロモーターは誘発性又は構成性（及び場合によって組織特異的）である。特にまた別の実施態様では、前記コード配列及び他の任意の所望配列が、ゲノム内の所望の位置で相同組換えを促進する領域によってフランкиングされた（したがって前記核酸の染色体内発現が提供される）核酸分子が用いられる（Koller & Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935; Zijlstra et al. 1989, Nature 342: 435-438）。  
40

前記核酸の患者への送達は直接的で、この場合、患者は核酸又は核酸含有ベクターに直接暴露される。前記アプローチはin vivo遺伝子治療として知られている。また別には核酸の患者への送達は間接的で、この場合、先ず初めに細胞がin vitroで形質転換され、続いて患者に移植される。前記アプローチはex vivo遺伝子治療として知られている。

【0040】

本発明はまた、NKCC1は乳癌、膵臓癌及び／又は肺癌の治療及び／又は予防のための適

切な免疫治療標的であることを示す。したがってまた別の特徴で、本発明はNKCC1ポリペプチドを認識する抗体並びに乳癌、膵臓癌及び／又は肺癌の治療及び／又は予防でのそれらの使用を提供する。

NKCC1ポリペプチドは抗体を生じる免疫原として用いることができ、前記抗体はそのような免疫原と免疫特異的に結合する。前記抗体は本明細書ではNKCC1抗体と称される。NKCC1抗体にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、ヒト化又はキメラ抗体、一本鎖抗体、Fabフラグメント及びF(ab')フラグメント、Fab発現ライブラリーによって生成されるフラグメント、抗イディオタイプ（抗Id）抗体及び上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントが含まれるが、ただしこれらに限定されない。本明細書で用いられる“抗体”という用語は免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち抗原と特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を指す。前記免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子の任意のクラス（例えばIgG、IgE、IgM、IgD及びIgA）又はサブクラスであろう。好みの抗体はNKCC1ポリペプチドと特異的に結合し、その結果それらを用いてそのようなポリペプチドを精製し、及び／又はその活性を阻害することができる。特異的に認識する又は特異的に結合するとは、前記抗体が他のポリペプチドに対するよりもNKCC1ポリペプチドに対してより強い親和性を有することを意味する。

#### 【0041】

抗体の製造では、所望の抗体についてのスクリーニングは当業界で公知の技術、例えばELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）によって達成できる。例えば、抗体（NKCC1ポリペプチドの特定のドメインを認識する）の選択のために、作製したハイブリドーマをそのようなドメインを含むポリペプチドフラグメントと結合する生成物についてアッセイすることができる。第一のポリペプチド相同体と特異的に結合するが、第二ポリペプチド相同体とは特異的に結合しない（又は弱く結合する）抗体の選択のために、第一のポリペプチド相同体との陽性結合及び第二のポリペプチド相同体との結合の欠如（又は低い結合）を基準にして選択することができる。

NKCC1モノクローナル抗体（mAb）の調製のためには、持続的細胞株培養によって抗体分子の生成を提供する任意の技術を用いることができる。例えば、最初Kohler & Milstein（1975, *Nature* 256: 495-497）によって開発されたハイブリドーマ技術を、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor et al. 1983, *Immunology Today* 4: 72）及びヒトモノクローナル抗体を生成するためのEBV-ハイブリドーマ技術（Cole et al. 1985, “*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*”, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96）と同様に用いることができる。そのような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及び任意のそのサブクラスを含む任意の免疫グロブリンであろう。本発明で使用されるmAbを產生するハイブリドーマはin vitro又はin vivoで培養することができる。本発明のさらに別の実施態様では、mAbは公知の技術を用いて無菌動物で製造することができる。

#### 【0042】

前記mAbにはヒトmAb及びキメラmAb（例えばヒト-マウスキメラ）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。キメラ抗体は、別個の部分が異なる動物種に由来する分子であり、例えばヒトの免疫グロブリン定常領域及びネズミのmAb由来の可変領域を有するものである（例えばUS4,816,567及びUS4,816,397を参照されたい）。ヒト化抗体は、ヒト以外の種に由来する1つ又は2つ以上の相補性決定領域（CDR）及びヒト免疫グロブリン分子由来の枠組み領域を有するヒト以外の種の抗体分子である（例えばUS5,585,089を参照されたい）。

キメラ及びヒト化mAbは当業界で公知の組換えDNA技術によって、例えば以下に記載の方法を用いて製造することができる：W087/02671； EP184187； EP171496； EP173494； WO86/01533； US4,816,567； EP125023； Better et al. 1988, *Science* 240: 1041-1043； Liu et al. 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443； Liu et al. 1987, *J. Immunol.* 139: 3521-3526； Sun et al. 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218； Nishimura et al. 1987, *Canc. Res.* 47: 999-1005； Wood et al. 1985, *Nature* 314: 446-449； Shaw et al. 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559； Morrison,

10

20

20

30

30

40

40

50

1985, Science 229 : 1202-1207 ; Oi et al. 1986, Bio/Techniques 4 : 214 ; US5,225,539 ; Jones et al. 1986, Nature 321 : 552-525 ; Verhoeven et al. 1988, Science 239 : 1534 ; 及びBeidler et al. 1988, J. Immunol. 141 : 4053-4060。

#### 【 0 0 4 3 】

ヒトの患者を治療するためには完全にヒトの抗体が特に望ましい。そのような抗体はトランスジェニックマウスを用いて作製することができる。前記トランスジェニックマウスは内因性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子を発現することはできないが、ヒトの重鎖及び軽鎖遺伝子を発現することができる。前記マウスは選択抗原（例えば本発明で使用されるポリペプチドの全体又は一部）により通常の態様で免疫される。前記トランスジェニックマウスが保持するヒト免疫グロブリンのトランスジーンはB細胞分化時に再編成され、  
10 続いてクラススイッ칭及び体細胞変異を受ける。したがって、そのような技術を用いて、治療的に有用なIgG、IgA、IgM、IgD及びIgE抗体を製造することができる。ヒトの抗体を作製するこの技術の大要については以下を参照されたい：Lonberg and Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol. 13 : 65-93。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体の製造技術並びにそのような抗体の作製プロトコルの詳細な考察については例えば以下を参照されたい：US5,625,126；US5,633,425；US5,569,825；US5,661,016；及びUS5,545,806。

選択したエピトープを認識する完全にヒトの抗体は“誘導選択 (guided selection)”と称される技術を用いて作製することができる。このアプローチでは、選択した非ヒトモノクローナル抗体（例えばマウス抗体）を用いて、同じエピトープを認識する完全なヒト抗体の選択を誘導する（Jespers et al. 1994, Bio/Technology 12 : 899-903）。  
20

#### 【 0 0 4 4 】

NKCC1抗体はまた当業界で公知の種々のファージディスプレー方法を用いて作製することができる。ファージディスプレー方法では、機能的な抗体ドメインがファージ粒子の表面にディスプレーされる（前記ファージ粒子は前記抗体ドメインをコードするポリヌクレオチド配列を保持する）。特にそのようなファージは、レパートリー抗体ライブラリー又は順列組合せ抗体ライブラリー（例えばヒト又はネズミ）から発現される抗原結合ドメインのディスプレーに利用することができる。問題の抗原と結合する抗原結合ドメインを発現しているファージは、抗原（例えば標識抗原又は固体表面若しくはビーズに結合若しくは捕捉させた抗原）を用いて選択又は同定することができる。前記の方法で用いられるファージは典型的に纖維状ファージであり、前記はファージ遺伝子III又は遺伝子VIIITンパク質と遺伝子組換えにより融合させたFab、Fv又はジスルフィド安定化Fv抗体ドメインを有するファージから発現されるfd及びM13結合ドメインを含む。本発明の抗体を作製するために用いることができるファージディスプレー方法には以下の文献に記載されたものが含まれる：Brimkman et al. 1995, J. Immunol. Methods 182 : 41-50；Ames et al. 1995, J. Immunol. Method 184 : 177-186；Kettleborough et al. 1994, Eur. J. Immunol. 24 : 952-958；Persic et al. 1997, Gene 187 : 9-18；Burton et al. 1994, Advances in Immunology 57 : 191-280；W090/02809；W091/10737；W092/01047；W092/18619；W093/11236；W095/15982；W095/20401；及び米国特許第5,698,426号、5,223,409号、5,403,484号、5,580,717号、5,427,908号、5,750,753号、5,821,047号、5,571,698号、5,427,908号、5,516,637号、5,780,225号、5,658,727号、5,733,743号及び5,969,108号。  
30

#### 【 0 0 4 5 】

上記の参考文献に記載されているように、ファージ選択後にファージの抗体コード領域を単離し、前記を用いて完全な抗体（ヒト抗体又は所望の他の任意の抗原結合フラグメントを含む）を作製し、さらに例えば以下に記載するように任意の所望の宿主（哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母及び細菌を含む）で発現させることができる。以下に開示されたような当業界で公知の方法を用い、例えば遺伝子組換えによりFab、Fab'及びF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを作製するための技術もまた利用することができる：W092/22324；Mullinax et al. 1992, BioTechniques 12(6) : 864-869；Sawai et al. 1995, AJRI 34 : 26-34；Better et al. 1988, Science 240 : 1041-1043。

単鎖Fv及び抗体を作製するために用いることができる技術の例には以下に記載されたも  
50

のが含まれる：US4,946,778；US5,258,498；Huston et al., 1991, Methods in Enzymology 203 : 46-88；Shu et al. 1993, PNAS 90 : 7995-7999；Skerra et al. 1988, Science 240 : 1038-1040。

#### 【0046】

本発明はさらに二重特異性抗体の使用を提供する。前記抗体は当業界で公知の方法によって作製することができる。完全長の二重特異性抗体の伝統的な作製は2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現によるもので、この場合、前記2つの鎖は異なる特異性を有する(Milstein et al. 1983, Nature 305 : 537-539)。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のランダムアソートメントのために、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10の別個の抗体分子の潜在的混合物を生じ、そのうちの1つだけが正しい二重特異性構造を有する。前記正しい分子の精製(通常はクロマトグラフィー工程によって実施される)はかなり面倒であり生成物収量は低い。類似の方法が以下の文献に開示されている：W093/08829；Traunecker et al. 1991, EMBO J. 10 : 3655-3659。

別個のより好ましいアプローチにしたがえば、所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)をもつ抗体の可変ドメインが免疫グロブリンの定常ドメイン配列と融合される。前記融合は好ましくは免疫グロブリン重鎖定常ドメイン(少なくともヒンジの一部、C<sub>H</sub>2及びC<sub>H</sub>3領域を含む)を用いて実施される。軽鎖の結合に必要な部位を含有する第一の重鎖定常領域(C<sub>H</sub>1)を有する(少なくとも融合物の1つとして存在する)ことが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物(所望の場合はさらに免疫グロブリン軽鎖)をコードするDNAを別個の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物にコトランスフェクションする。このために、前記構築に用いられる3つのポリペプチド鎖の不均等な比率によって最適な収量が提供されるとき、実現する3つのポリペプチドフラグメントの相互の比率の調節に大きな融通性が提供される。しかしながら、等しい比率にある少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高収量をもたらすとき、又は前記の比率が特に重要ではないときは、2つ又は3つ全てのポリペプチド鎖を1つの発現ベクターに挿入することが可能である。

#### 【0047】

前記アプローチの好ましい実施態様では、前記二重特異性抗体は、一方のアームに第一の結合特異性をもつハイブリッド免疫グロブリン重鎖、及び他方のアームに(第二の結合特異性を提供する)ハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対を含む。この非対称性構造は、所望の二重特異性物質を望ましくない免疫グロブリン鎖の組合せから分離するのを助ける。なぜならば、二重特異性分子の片側半分にのみ免疫グロブリン軽鎖が存在することによって容易な分離方法が提供されるからである。このアプローチはW094/04690に開示されている。二重特異性抗体の作製についての更なる詳細については例えば以下を参照されたい：Suresh et al. 1986, Methods in Enzymology, 121 : 210。

本発明は抗NKCC1抗体の機能的に活性なフラグメント、誘導体又は類似体を提供する。“機能的に活性な”とは、前記フラグメント、誘導体又は類似体が、それらが由來した抗体によって認識される抗原と同じ抗原を認識する抗-抗イディオタイプ抗体(すなわち第三次抗体)を誘導することができることを意味する。特に好ましい態様では、前記免疫グロブリン分子のイディオタイプの抗原性は、枠組み及び前記抗原を特異的に認識するCDR配列のC末端のCDR配列を欠失させることによって強化することができる。どのCDR配列が抗原と結合するかを決定するために、CDR配列を含む合成ペプチドを当業界で公知の任意の結合アッセイによる抗原との結合アッセイで用いることができる。

#### 【0048】

本発明は、抗体フラグメント(例えばF(ab')<sub>2</sub>フラグメント及びFabフラグメント、たしこれに限定されない)を提供する。特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは公知の技術によって作製することができる。F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは可変領域、軽鎖定常領域及び重鎖のC<sub>H</sub>1ドメインから成り、抗体分子のペプシン消化によって生成される。FabフラグメントはF(ab')<sub>2</sub>フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成される。本発明はまた、NKCC1抗体の重鎖及び軽鎖ダイマー又はその任意の最少フラグメント(例えばFv)、又は一本鎖抗体(SCA)(例えば以下に記載されたようなもの：US4

10

20

30

40

50

, 946,778 ; Bird, 1988, Science 242 : 423-42 ; Huston et al. 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 5979-5883 ; Ward et al. 1989, Nature 334 : 544-54)、又はNKCC1抗体と同じ特異性を有する他の任意の分子を提供する。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋によりFv領域の重鎖及び軽鎖フラグメントを結合させて一本鎖ポリペプチドを生じることによって生成される。大腸菌で機能的なFvフラグメントを構築させる技術を用いることができる(Skerra et al. 1988, Science 242 : 1038-1041)。

#### 【0049】

他の実施態様では、本発明はNKCC1抗体(又は機能的に活性なそのフラグメント)の融合タンパク質を提供する。前記融合タンパク質では、例えば抗体は、共有結合(例えばペプチド結合)を介して、そのN-末端又はC-末端のどちらかで別の(前記抗体ではない)タンパク質(又はその部分であって、前記タンパク質の少なくとも10、20又は50アミノ酸部分)のアミノ酸と融合される。好ましくは前記抗体(又はそのフラグメント)は他のタンパク質と前記の定常ドメインのN末端で共有結合される。上記で述べたように、そのような融合タンパク質は精製を容易にし、in vivoでの半減期を延長し、上皮バリアーを貫通して免疫系への抗原の送達を高めることができる。10

NKCC1抗体には、例えば任意のタイプの分子を共有結合させることによって改変される類似体及び誘導体がそのような共有結合が免疫特異的結合を妨げない限り含まれる。例えば例示として挙げれば、前記抗体の誘導体及び類似体には、例えば糖付加、アセチル化、PEG化、ホスフィル化、アミド化、公知の保護基/封鎖基による誘導、タンパク分解切断、細胞性リガンド又は他のタンパク質との結合などによってさらに改変されたものが含まれる。多数の化学的改変のいずれも公知の技術によって実施することができる。前記技術には特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化などが含まれるが、ただしこれらに限定されない。さらにまた前記類似体又は誘導体は1つ又は2つ以上の非古典的アミノ酸を含むこともできる。20

#### 【0050】

NKCC1ポリペプチドの存在場所の決定及び前記ペプチドの活性に関連して当業界で公知の方法で(例えばこれらのタンパク質の画像化若しくは放射性画像化、適切な生理学的サンプルにおけるそのレベルの測定のために)、診断方法などで、さらに放射線療法のために前述の抗体を用いることができる。

NKCC1抗体は、抗体の合成について当業界で公知の任意の方法によって、特に化学的合成又は組換え発現によって製造することができ、好ましくは組換え発現技術によって製造される。30

抗体又はそのフラグメント、誘導体若しくは類似体の組換え発現は前記抗体をコードする核酸の構築を必要とする。前記抗体のヌクレオチド配列が判明している場合は、前記抗体をコードする核酸を化学的に合成したオリゴヌクレオチドから組み立てることができる(例えば以下に記載されているように組み立てることができる: Kutmeier et al. 1994, BioTechniques 17 : 242)。簡単に記せば、前記は、抗体をコードする配列の部分を含むオーバーラップするオリゴヌクレオチドの合成、前記オリゴヌクレオチドのアニーリング及び連結、さらに前記連結させたオリゴヌクレオチドのPCRによる増幅を必要とする。

#### 【0051】

また別には、前記抗体をコードする核酸は、前記抗体のクローニングによって入手することができる。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンを未だ利用することができないが抗体分子の配列は判明している場合は、前記抗体をコードする核酸は、適切な供給源(例えば抗体cDNAライブラリー又は任意の組織若しくは抗体発現細胞から作製されるcDNAライブラリー)から、PCR増幅によって(その配列の3'及び5'末端とハイブリダイズすることができる合成プライマーを使用する)、又はクローニングによって(特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用する)入手することができる。40

特定の抗原を特異的に認識する抗体分子(又はそのような抗体をコードする核酸をクローニングするためのcDNAライブラリー用供給源)を利用できない場合は、特定の抗原に特異的な抗体は、当業界で公知の任意の方法によって、例えば動物(例えばウサギ)を免

50

20

20

30

40

50

疫してポリクローナル抗体を作製するか、より好ましくはモノクローナル抗体を作製することによって製造することができる。また別には、抗体の少なくともFab部分をコードするクローンを、前記特定の抗原と結合するFabフラグメントのクローンについてFab発現ライブラリーをスクリーニングするか(例えば以下に記載されたように実施できる:Huse et al. 1989, Science 246: 1275-1281)、又は抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって入手することができる(例えば以下を参照されたい:Clackson et al. 1991, Nature 352: 624; Hane et al. 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4937)。

#### 【0052】

少なくとも抗体分子の可変ドメインをコードする核酸がいったん得られたら、前記核酸を前記抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むベクターに導入することができる(例えばW086/05807; W089/01036; US5,122,464)。核酸の同時発現によって完全な抗体分子の発現を可能にする完全な軽鎖又は重鎖を含むベクターもまた利用できる。続いて抗体をコードする核酸を用いて、鎖内ジスルフィド結合に必要な1つ又は2つ以上の可変領域のシステイン残基をスルフヒドリル基を含まないアミノ酸で置換又は欠失させるために必要なヌクレオチドの置換(又は欠失)を導入することができる。そのような改変は、ヌクレオチド配列の特定の変異又は欠失を導入するための当業界で公知の任意の方法によって実施することができる。前記方法には、例えば化学的突然変異誘発、*in vitro*位置特異的突然変異誘発(Hutchinson et al. 1978, J. Biol. Chem. 253: 6551)、PCRによる方法などが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

さらにまた、“キメラ抗体”的作製のために開発された技術を用いることができる(Morrison et al. 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855; Neuberger et al. 1984, Nature 312: 604-608; Takeda et al. 1985, Nature 314: 452-454)。前記技術では、適切な抗原特異性をもつマウス抗体分子の遺伝子が、適切な生物学的活性をもつヒト抗体分子の遺伝子とともにスプライシングされる。上記で述べたように、キメラ抗体は別個の部分が別個の動物種に由来する分子であり、例えばネズミのmAb由来の可変領域及びヒト抗体の定常領域をもつもの(例えばヒト化抗体)である。

#### 【0053】

いったん抗体分子をコードする核酸が得られたら、抗体分子を產生するベクターを当業界で周知の操作を用いて組換えDNA技術によって作製することができる。したがって、前記抗体分子の配列を含む核酸を発現させることによるこれら抗体の調製方法は本明細書に記載される。当業者に周知の方法を用いて、抗体分子のコード配列並びに適切な転写及び翻訳コントロールシグナルを含む発現ベクターを構築することができる。前記の方法には、例えば*in vitro*組換えDNA技術、合成技術及び*in vivo*遺伝子組換えが含まれる。例えば以下に記載された操作方法を参照されたい: Sambrook et al. 1990 “Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, 2d Ed., Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; 及び Ausubel et al. eds., 1989, “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley & Sons, NY。

発現ベクターは一般的な技術によって宿主細胞に移され、前記トランスフェクトされた細胞を続いて一般的な技術によって培養してNKCC1抗体を製造する。

組換えNKCC1抗体の発現に用いられる宿主細胞は細菌細胞(例えば大腸菌)でもよいが、特に完全な組換え抗体分子の発現のためには好ましくは真核細胞を用いることができる。特に哺乳類細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)が、例えばヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子(major intermediate early gene)プロモーターエレメントのようなベクターと併せて有効な抗体の発現系である(Foecking et al. 1986, Gene 45(1): 101-105; Cockett et al. 1990, BioTechnology 8: 2)。

#### 【0054】

多様な宿主発現ベクター系を利用してNKCC1抗体分子を発現することができる。そのような宿主発現系は、問題のコード配列を製造し続いて精製する乗り物であるだけでなく、また適切なヌクレオチドコード配列で形質転換又はトランスフェクトするとき、*in situ*でNKCC1抗体を発現する細胞もある。前記には、抗体のコード配列を含む組換えバクテ

10

20

30

40

50

リオファージDNA、プラスミドDNA又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換した微生物、例えば細菌（例えば大腸菌、枯草菌）；抗体コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母（例えばサッカロミセス、ピキア（Pichia））；抗体コード配列を含む組換えイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）を感染、又は組換えプラスミド発現ベクター（例えばTiプラスミド）で形質転換させた昆虫細胞系；又は哺乳類細胞のゲノム由来のプロモーター（例えばメタロチオネインプロモーター）若しくは哺乳類ウイルス由来のプロモーター（例えばアデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含む組換え発現構築物を保有する哺乳類細胞系（例えばCOS、CHO、BHK、HEK293、3T3細胞）。

## 【0055】

細菌系では、発現される抗体分子の使用目的に応じて多数の発現ベクターを有利に選択することができる。例えば、そのようなタンパク質を大量に製造するときは（抗体分子を含む医薬組成物の製造のため）、精製が容易な高レベルの融合タンパク生成物の発現を誘導するベクターが所望される。そのようなベクターには、大腸菌発現ベクターpUR278 (Ruther et al. 1983, EMBO J. 2: 1791)（この場合、融合タンパク質を产生することができるよう抗体コード配列はlacZコード領域のフレーム内でベクターに個々に連結することができる）；pINベクター (Inoue & Inoue, 1985, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109 ; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509) などが含まれるが、ただしこれらに限定されない。グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させるために、pGEXベクターもまた用いることができる。一般的には、そのような融合タンパク質は可溶性で、マトリックスグルタチオン-アガロースビーズへの吸着及び結合、続いて有利グルタチオンの存在下での溶出によって溶解細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターはトロンビン又はXa因子のプロテアーゼ切断部位を含むようにデザインされており、クローニングした標的遺伝子生成物はGST部分から遊離させることができる。

## 【0056】

昆虫系では、オートグラファ=カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (AcNPV) を外来遺伝子発現ベクターとして用いる。前記ウイルスはスpodoptera=フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞で増殖する。抗体コード配列を個々に前記ウイルスの非必須領域（例えばポリヘドリン遺伝子）でクローニングし、AcNPVプロモーター（例えばポリヘドリンプロモーター）の制御下に置くことができる。哺乳類の宿主細胞では、多数のウイルス由来発現系（例えばアデノウイルス発現系）を利用することができる。

上記で考察したように、挿入配列の発現を調節するか、又は所望される特別な態様で遺伝子生成物を改変するか又はプロセッシングを施す宿主細胞株を選択することができる。タンパク生成物のそのような改変（例えば糖化）及びプロセッシング（例えば切断）は前記タンパク質の活性のために重要である。

組換え抗体の長期にわたる高収量産生のため、安定な発現が好ましい。例えば、安定に問題の抗体を発現する細胞株は、抗体のヌクレオチド配列及び選択マーカー（例えばネオマイシン又はハイグロマイシン）のヌクレオチド配列を含む発現ベクターで細胞をトランスフェクトし、前記選択マーカーの発現について選択することによって作製することができる。そのような遺伝子工学により作出された細胞株は、抗体分子と直接又は間接的に相互作用する物質のスクリーニング及び評価に特に有用であろう。

## 【0057】

前記抗体分子の発現レベルはベクターの増幅によって高めることができる（大要については、以下を参照されたい：Bebbington & Hentschel, "The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning", vol.3, Academic Press, New York, 1987）。抗体を発現するベクター系のマーカーが増幅可能なときは、宿主細胞の培養中に存在する阻害物質のレベルにおける増加はマーカー遺伝子のコピー数を増加させるであろう。前記増幅される領域は抗体遺伝子に

10

20

30

40

50

結合しているので、抗体の產生もまた増加するであろう (Crouse et al. 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 257)。

前記宿主細胞は、2つの発現ベクター、重鎖由来ポリペプチドをコードするベクター及び軽鎖由来ポリペプチドをコードする第二のベクターでコトランスクエクションすることができる。2つのベクターは同一の選択マーカーを含み、重鎖及び軽鎖の同等な発現を可能にする。また別には、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方をコードする単一ベクターを用いてもよい。そのような状況では、軽鎖が重鎖の前に配置されて、過剰な有毒な遊離の重鎖を回避すべきである (Proudfoot, 1986, Nature 322: 52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197)。重鎖及び軽鎖のコード配列はcDNA又はゲノムDNAを構成することができる。

10

#### 【0058】

NKCC1抗体がいったん組換えにより発現したら、前記を抗体分子の精製において当業界で公知の任意の方法によって、例えばクロマトグラフィー（例えばイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー（例えばプロテインA又は固有抗原による）、及びサイズ分離カラムクロマトグラフィー）、遠心沈澱、示差的溶解性によって、又はタンパク質精製のための他の標準的技術によって精製することができる。

また別には、発現される融合タンパク質に特異的な抗体を用いることによっていずれの融合タンパク質も容易に精製することができる。例えば、Janknechtらが記載した系は、ヒト細胞株で発現させた非変性融合タンパク質の容易な精製を可能にする (Janknecht et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 872-897)。この系では、対象とする遺伝子が、その遺伝子のオープンリーディングフレームが6ヒスチジン残基から成るアミノ末端タグに翻訳的に融合されるように、ワクシニア組換えプラスミドでサブクローニングされる。前記タグは前記融合タンパク質のためのマトリックス結合ドメインとして機能する。組換えワクシニアウイルスに感染させた細胞の抽出物をNi<sup>2+</sup>ニトリロ酢酸-アガロースカラムに装荷し、ヒスチジンタグ付加タンパク質をイミダゾール含有緩衝液で選択的に溶出させる。

20

#### 【0059】

好ましい実施態様では、NKCC1抗体は診断薬又は治療薬成分と結合させられる。前記抗体は診断又は実施されている治療計画の有効性の決定に用いることができる。検出可能な物質に抗体を結合させることによって検出を容易にすることができる。検出可能な物質の例には種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性核種、陽電子放出金属（陽電子放出断層撮影法で使用する場合）及び非放射性常磁性金属イオンが含まれる。本発明の診断で使用する抗体と結合させることができる金属イオンについては、一般的には米国特許第4,741,900号を参照されたい。適切な酵素にはセイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適切な補欠分子族にはストレプトアビジン、アビジン及びビオチンが含まれ、適切な蛍光物質にはウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド及びフィコエリトリンが含まれ、適切な発光物質にはルミノールが含まれる。適切な生物発光物質にはルシフェラーゼ、ルシフェリン及びエクオリンが含まれ、適切な放射性核種には<sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In及び<sup>99</sup>Tcが含まれる。

30

#### 【0060】

ある実施態様では、本発明はまた、NKCC1捕捉試薬（例えば抗体）を含む診断キットを提供する。さらにまた、そのようなキットは場合によって1つ又は2つ以上の以下のものを含む：

- (1) 前記捕捉試薬を診断、予後、治療のモニター又は前記用途の任意の組合せに使用するための指示物；
- (2) 前記捕捉試薬に対する標識された結合パートナー；
- (3) 前記捕捉試薬を固定するための固相（例えば試薬片）；及び
- (4) 診断、予後、治療的な使用又は前記の任意の組合せについての規制承認を示す標

40

50

識又は挿入物。

前記捕捉試薬に対し無標識結合パートナーが提供される場合は、抗NKCC1捕捉試薬それ自体が検出可能なマーカー（例えば化学発光、酵素、蛍光又は放射能成分）で標識され得る。

#### 【0061】

NKCC1抗体を治療物質又は薬剤成分と結合させて、与えられた生物学的反応を改変させることができる。前記治療物質又は薬剤成分は古典的な化学的治療物質に限定されると解されるべきではない。例えば、前記薬剤成分は所望の生物学的活性を有するタンパク質又はポリペプチドでもよい。そのようなタンパク質には、例えば毒素（例えばアブリン、リシンA、シュードモナス内毒素、又はジフテリア毒素）、タンパク質（例えば腫瘍壞死因子、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\beta$ -インターフェロン、神経増殖因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノーゲンアクチベーター、血栓因子若しくは抗血管形成物質（例えばアンギオスタチン又はエンドスタチン）、又は生物反応調節物質（例えばリンホカイン、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-6(IL-6)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、神経増殖因子(NGF)又は他の増殖因子）が含まれよう。他の治療成分には、放射性核種（例えば $^{111}\text{In}$ 及び $^{90}\text{Y}$ ）、抗生物質（例えばカリケアミシン）又は薬剤（例えばアルキルホスホコリン、トポイソメラーゼIインヒビター、タキソイド及びスラミンが含まれるが、ただしこれらに限定されない）が含まれよう。

#### 【0062】

そのような治療成分を抗体に結合させる技術は周知で、例えば以下を参照されたい：Arnon et al. "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp.243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al. "Antibodies for Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp.623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies' 84: Biological and Clinical Applications, Pinchera et al.(eds.), pp475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp.303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al. "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982) 及びDubowchik et al. 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123。

また別に抗体は第二の抗体と結合させて、米国特許第4,676,980号に記載されたような抗体のヘテロ結合物を生成することができる。

抗体に結合させた治療成分を含む、又は含まない抗体を、単独若しくは細胞毒性因子及び/又はサイトカインと併用して投与することができる治療薬として用いることができる。

#### 【0063】

本発明のさらに別の特徴では、NKCC1ポリペプチドの特性、例えばその発現、酵素活性及び結合活性を調節（例えばアップレギュレート又はダウンレギュレート）する活性を有する物質をスクリーニングする方法が提供される。本発明はまた、乳癌、肺癌及び/又は膵臓癌の治療又は予防のために薬剤の有効性を同定又は証明するために、薬剤の発見に使用されるアッセイを提供する。候補物質は、乳癌、肺癌及び/又は膵臓癌をもつ対象者で本明細書に定義したポリペプチドのレベルを調節するその能力についてアッセイすることができる。乳癌、肺癌及び/又は膵臓癌をもつ対象者でNKCC1ポリペプチドレベルを、乳癌、肺癌及び/又は膵臓癌をもたない対象者で見出されるレベルに調節することができる物質、又は乳癌、肺癌及び/又は膵臓癌の実験動物モデルで同様な変化をもたらすことができる物質を、更なる薬剤発見のための先導物質として、又は治療に用いることができる。NKCC1ポリペプチドの発現は、例えば免疫アッセイによって、ゲル電気泳動とそれに続

10

20

30

40

50

く可視化、活性の検出によって、又は本明細書で開示されるか、若しくは当業者に周知の他の任意の方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイを用いて臨床モニタリング又は薬剤開発における候補物質をスクリーニングすることができる（この場合、大量のNKCC1ポリペプチドは疾患の代用マーカーとして機能する）。

#### 【0064】

したがって、本発明はNKCC1ポリペプチドと結合するか、又はNKCC1ポリペプチドの発現若しくは活性に対し調節的効果（例えば刺激、抑制、アップレギュレーション又はダウングリュレーション効果）をもつ活性物質を同定する方法を提供する。前記物質の例には、核酸（例えばDNA及びRNA）、炭水化物、脂質、タンパク質、ペプチド、ペプチド擬似物質、アゴニスト、アンタゴニスト、小分子及び他の薬剤が含まれるが、ただしこれらに限定されない。候補物質は、当業界で公知の順列組合せライブラリー方法により多くの適切な任意のアプローチを用いて入手できる。前記ライブラリーには生物学的ライブラリー、空間的配置を設定できるパラレル固相又は溶液相ライブラリー、デコンボルーションを必要とする合成ライブラリー方法、“1ビーズ1化合物”ライブラリー方法及びアフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー方法が含まれる。生物学的ライブラリーによるアプローチはペプチドライブラリーに限られるが、他の4つのアプローチはペプチド、非ペプチドオリゴマー又は小分子化合物ライブラリーにも応用できる（Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12: 145; US5,738,996; US5,807,683）。

#### 【0065】

分子ライブラリー合成方法の例は当業界では例えば以下の文献で見出すことができる： DeWott et al. 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909; Erb et al. 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422; Zuckermann et al. 1994, J. Med. Chem. 37: 2678; Cho et al. 1993, Science 261: 1303; Carell et al. 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell et al. 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; Gallop et al. 1994, J. Med. Chem. 37: 1233。

物質ライブラリーは、例えば溶液として（例えば、Houghten, 1992, Bio/Techniques 13: 412-421）、又はビーズ上で（Lam, 1991, Nature 354: 82-84）、チップ上で（Fodor, 1993, Nature 364: 555-556）、細菌で（US5,223,409）、胞子で（US5,571,698; US5,403,484; US5,223,409）、プラスミドで（Cull et al. 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869）、又はファージで（Scott and Smith, 1990, Science 249: 386-390; Devlin, 1990, Science 249: 404-406; Cwirla et al. 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378-6382; Felici, 1991, J. Mol. Biol. 222: 301-310）提示することができる。

#### 【0066】

ある実施態様では、NKCC1ポリペプチドと相互作用する（すなわち結合する）物質は細胞ベースのアッセイ系で同定される。この実施態様にしたがえば、NKCC1ポリペプチドを発現する細胞を候補物質又はコントロール物質と接触させ、前記候補物質が前記ポリペプチドと相互作用する能力を判定する。所望の場合は、このアッセイを用いて、複数の候補物質（ライブラリー）をスクリーニングすることができる。細胞は、例えば原核細胞由来でも（例えば大腸菌）、真核細胞由来でもよい（例えば酵母又は哺乳類）。さらに、前記細胞はNKCC1ポリペプチドを内因的に発現することができるが、また遺伝子操作によって前記ポリペプチドを発現してもよい。いくつかの実施態様では、NKCC1ポリペプチド又は候補物質は、例えば放射能標識（例えば<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S又は<sup>125</sup>I）又は蛍光標識（例えばフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルdehyド又はフルオレスカミン）で標識され、ポリペプチドと候補物質との相互作用の検出を可能にする。候補物質がNKCC1ポリペプチドと直接又は間接的に相互作用する能力は当業者に公知の方法で決定することができる。例えば、候補物質とポリペプチドとの相互作用はフローサイトメトリー、シンチレーションアッセイ、免疫沈澱又はウェスタンプロット分析によって決定することができる。

#### 【0067】

10

20

30

40

50

別の実施態様では、NKCC1ポリペプチドと相互作用する（すなわち結合する）物質は無細胞アッセイ系で同定される。この実施態様にしたがえば、天然の又は組換えNKCC1ポリペプチドを候補物質又はコントロール物質と接触させ、前記ポリペプチドと相互作用する候補物質の能力を判定する。所望の場合には、このアッセイを用いて、複数の候補物質（ライブラリー）をスクリーニングすることができる。好ましくは、例えば特異的に前記ポリペプチドを認識又は結合する固定抗体とポリペプチドを接触させることによって、又はタンパク質を結合するようにデザインした表面とポリペプチドの精製調製物を接触させることによって前記ポリペプチドを先ず固定する。前記ポリペプチドは部分的又は完全に精製されても（例えば部分的又は完全に他のタンパク質を含まない）、又は細胞溶解物の一部分であってもよい。さらにまた、前記ポリペプチドは、NKCC1ポリペプチド又はその生物学的活性部分及び例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼのようなドメインを含む融合タンパク質であってもよい。また別には、前記ポリペプチドは当業者に周知の技術を用いて（例えばビオチン付加キット、Pierce Chemicals；Rockford, IL）ビオチン付加してもよい。前記候補物質が前記ポリペプチドと相互作用する能力は当業者に公知の方法によって決定することができる。

10

20

30

40

#### 【0068】

別の実施態様では、細胞ベースのアッセイ系を用いて、タンパク質（例えば酵素）又はその生物学的に活性な部分と結合するか又はその活性を調節する物質が同定される（前記タンパク質はNKCC1ポリペプチドの生成又は分解に必要であるか、又は前記ポリペプチドの翻訳後改変に必要である）。一次スクリーニングでは、NKCC1ポリペプチドの產生、分解又は翻訳後改変を調節する化合物を同定するために、複数の物質（ライブラリー）を天然の状態又は遺伝子組換えにより以下の(i)及び(ii)を発現する細胞と接触させる：(i) NKCC1ポリペプチド及び(ii) NKCC1ポリペプチドのプロセッシングに必要なタンパク質。所望の場合は、一次スクリーニングで同定した活性物質を、続いて二次スクリーニングで対象とする特定のポリペプチドを天然の状態又は組換えによって発現する細胞でアッセイすることができる。候補物質がNKCC1ポリペプチドの产生、分解又は翻訳後改変を調節する能力は当業者に公知の方法（フローサイトメトリー、シンチレーションアッセイ、免疫沈澱又はウェスタンプロット分析を含むが、ただしこれらに限定されない）によって決定することができる。

30

#### 【0069】

別の実施態様では、NKCC1ポリペプチドと競合的に相互作用する（すなわち競合的に結合する）物質が競合結合アッセイで同定される。この実施態様にしたがえば、前記ポリペプチドを発現する細胞を候補物質及び前記ポリペプチドと相互作用することが判明している物質と接触させ、続いて前記候補物質が前記ポリペプチドと競合的に相互作用する能力を判定する。また別には、ポリペプチドと競合的に相互作用する（すなわち競合的に結合する）物質は、前記ポリペプチドと候補物質及び前記ポリペプチドと相互作用することが判明している物質を無細胞アッセイ系で接触させることによって同定される。上記で述べたように、候補物質が本発明で使用されるポリペプチドと相互作用する能力は当業者に公知の方法によって決定することができる。これらのアッセイは、細胞ベースであろうと無細胞系であろうと、複数の候補物質（ライブラリー）のスクリーニングに用いることができる。

40

#### 【0070】

別の実施態様では、NKCC1ポリペプチド又はNKCC1核酸の発現を調節する（すなわちアップレギュレート又はダウンレギュレートする）活性物質は、前記ポリペプチド又は核酸を発現する細胞（例えば原核細胞又は真核細胞由来の細胞）を候補物質又はコントロール物質（例えばリン酸緩衝食塩水（PBS））と接触させ、前記ポリペプチドの発現又は前記ポリペプチドを発現する核酸の発現を測定することによって同定される。候補物質の存在下でのNKCC1ポリペプチド又はNKCC1核酸の発現レベルが、候補物質の非存在下（例えばコントロール物質の存在下）での前記ポリペプチド又は核酸の発現レベルと比較される。続いて、この比較を基にして候補物質を前記ポリペプチドの発現の調節物質として同定するこ

50

とができる。例えば、前記ポリペプチド又は核酸の発現が候補物質の存在下で非存在下よりも顕著に高いときは、前記候補物質は前記ポリペプチド又は核酸の発現の刺激物質と同定される。また別には、前記ポリペプチド又は核酸の発現が候補物質の存在下で非存在下よりも顕著に低いときは、前記候補物質は前記ポリペプチド又は核酸発現の阻害物質と同定される。NKCC1ポリペプチド又は核酸の発現レベルは本明細書の記載を基にして当業者に公知の方法によって決定することができる。例えばDNA又はmRNA発現はノーザンプロット分析又はRT-PCRによって評価することができ、タンパク質レベルはウェスタンプロット分析で評価することができる。

#### 【0071】

別の実施態様では、NKCC1ポリペプチドの活性を調節する活性物質は、前記ポリペプチドを含有する調製物、又は前記ポリペプチドを発現する細胞（例えば原核細胞又は真核細胞）を候補物質又はコントロール物質と接触させ、前記候補物質が前記ポリペプチドの活性を調節する（刺激又は阻害する）能力を決定することによって同定される。NKCC1ポリペプチドの活性は、“下流のエフェクター”に対するその影響を検出することによって〔例えば前記ポリペプチドの細胞性シグナルのトランスタクション経路の誘導（例えば細胞内Ca<sup>2+</sup>、ジアシルグリセロール、IP<sub>3</sub>など）、前記標的の適切な基質に対する触媒活性又は酵素活性の検出、レポーター遺伝子（NKCC1ポリペプチドに応答し、さらに検出可能なマーカー（例えばルシフェラーゼ）をコードする核酸に機能的に連結された調節エレメント）の誘導の検出、又は細胞性反応（例えば本事例の場合のように細胞の分化又は細胞の増殖）の検出〕、本明細書の記載に基づいて評価することができ、当業者に公知の技術を前記の活性の測定に用いることができる（例えばUS5,401,639を参照されたい）。続いて候補物質の影響をコントロール物質と比較することによって、前記候補物質をNKCC1ポリペプチド活性の調節物質と同定することができる。適切なコントロール物質にはリン酸緩衝食塩水（PBS）及び通常の食塩水（NS）が含まれる。

#### 【0072】

別の実施態様では、NKCC1ポリペプチドの発現、活性、又は発現と活性の両方を調節する活性物質が動物モデルで同定される。適切な動物の例にはマウス、ラット、ウサギ、サル、モルモット、イヌ及びネコが含まれるが、ただしこれらに限定されない。好ましくは用いられる動物は乳癌、膵臓癌及び／又は肺癌のモデルである。この実施態様にしたがえば、候補物質又はコントロール物質は、例えば経口的、直腸経由、又は非経口的（例えば腹腔内又は静脈内）に適切な動物に投与され、前記ポリペプチドの発現、活性、又は発現と活性の両方に対する影響が決定される。ポリペプチド発現における変化は、上記に記載した適切な方法のいずれかにより本明細書の記載を基に判定することができる。また別には、治療されるべき疾患又は病態に附隨する臨床症状に対する物質の投与の影響（例えば臨床症状が改善される、発症が延びるか又は疾患の進行が遅くなる）をモニターすることによって、それら物質を同定することができる。したがって別の実施態様では、候補物質で処置された哺乳類群では未処置哺乳類群と比較して疾患に附隨する1つ又は2つ以上の臨床症状の重篤度を低下させるか、又は疾患の進行を遅らせる物質が前記疾患の有力な活性物質と同定される。乳癌、膵臓癌及び／又は肺癌に精通している医師に既知の技術を用いて、候補物質が前記疾患に附隨する1つ又は2つ以上の臨床症状を変化させるか否かを決定することができる。例えば、乳癌、膵臓癌及び／又は肺癌患者の保持腫瘍を縮小させる候補物質は乳癌、膵臓癌及び／又は肺癌患者の治療に有益であろう。

#### 【0073】

特にある実施態様では、上記に記載したスクリーニングの方法はさらに、抗乳癌、抗肺癌及び／又は抗膵臓癌物質としての治療的又は予防的使用の更なるテストのために、前記ポリペプチドの発現若しくは活性又は前記核酸の発現を調節する物質を選択することを含むことができる。

さらに別の実施態様では、NKCC1ポリペプチドは、二重ハイブリッド(two-hybrid)アッセイ又は三重ハイブリッドアッセイで“おとり(bait)タンパク質”として用いられ、前記ポリペプチドと結合又は相互作用する他のタンパク質が同定される（例えば以下を参照さ

10

20

30

40

50

れたい：US5,283,317；Zrvos et al. 1993, Cell 72: 223-232；Madura et al. 1993, J. Biol. Chem. 268: 12046-12054；Bartel et al. 1993, Bio/Techniques 14: 920-924；Iwabuchi et al. 1993, Oncogene 8: 1693-1696；W094/10300）。当業者には理解されるところであるが、そのような結合タンパク質はまた、NKCC1ポリペプチドによるシグナル伝達で、例えばNKCC1ポリペプチドを必要とするシグナリング経路の上流又は下流工10レメントとして中心的に関与する可能性が高い。

#### 【0074】

本発明はさらにNKCC1ポリペプチド、NKCC1核酸、NKCC1抗体、NKCC1ポリペプチドの発現又は活性を調節する物質、NKCC1ポリペプチドと相互作用する物質、又はNKCC1核酸の発現を調節する物質（上記に記載したスクリーニング方法によって同定されるものを含む）、及び本明細書に記載する治療のためのそれらの使用を提供する。下記では、NKCC1ポリペ10  
プチド、NKCC1核酸及びNKCC1抗体は“活性物質”と称する。“治療”という用語には治療的措置又は予防的措置のいずれかが含まれる。本明細書で具体的な活性物質又は物質の組合せを用いて疾患又は症状の治療又は予防方法が述べられる場合は、そのような言及は、前記疾患又は症状の治療用医薬の製造における前記活性物質又は活性物質の組合せの使用を含むことを意図していることは理解されよう。

#### 【0075】

本発明はまた、活性物質の投与による乳癌、肺臓癌及び／又は肺癌の治療及び／又は予防を提供する。

さらに別の特徴では、本発明は、乳癌、肺癌及び／又は肺臓癌の治療又は予防のための組成物（前記組成物はワクチンである）の製造におけるNKCC1ポリペプチドの使用を提供する。前記ワクチンは場合によって1つ又は2つ以上の適切なアジュバントを含む。当業界で周知のアジュバントの例には無機ゲル（例えば水酸化アルミニウム）及び油中水乳濁液（例えばフロイントの不完全アジュバント）が含まれる。他の有用なアジュバントは当業者にはよく知られているであろう。

さらに別の特徴では、本発明は以下を提供する：

(a) 免疫原性組成物（好ましくはワクチン）の製造におけるNKCC1ポリペプチドの使20  
用；

(b) 対象者の免疫誘導における前記のような免疫原性組成物の使用；及び

(c) 対象者で乳癌、肺癌及び／又は肺臓癌を治療若しくは予防する方法、又は対象者30  
に乳癌、肺癌及び／又は肺臓癌に対してワクチン接種する方法、前記方法は前記対象者に有効量のNKCC1ポリペプチド（好ましくはワクチン）を投与する工程を含む。

#### 【0076】

ある実施態様では、1つ又は2つ以上の活性物質が、単独で投与されるか、又は乳癌、肺癌及び／又は肺臓癌のための1つ若しくは2つ以上の別の治療又は治療薬と（例えば同時、連続的若しくは別個に）併用して投与される。そのような治療の例には、外科手術及び放射線照射療法が含まれる。治療物質の例には以下が含まれる：シクロホスファミド（Cytosan（登録商標））；メトトレキセート（Methotrexate（登録商標））；5-フルオロウラシル（5-FU）；パクリタキセル（Taxol）；ドセタキセル（Taxotere（登録商標））；ビンクリスチン（Oncovin（登録商標））；ビンプラスチン（Velban（登録商標））；ビノレルビン（Navelbine（登録商標））；ドキソルビシン（Adriamycin）；タモキシフェン（Nolvadex（登録商標））；トレミフェン（Fareston（登録商標））；メゲストロールアセテート（Megace（登録商標））；アナストロゾール（Arimidex（登録商標））；ゴセレリン（Zladex（登録商標））；抗HER2モノクローナル抗体（Herceptin（登録商標））；キャベシタビン（Xeloda（登録商標））及びラロキシフェンヒドロクロリド（Evista（登録商標））。

#### 【0077】

本明細書で考察されるように、本発明の活性物質は対象者で乳癌、肺癌及び／又は肺臓癌の治療又は予防で有用である。したがって、さらに別の特徴では、本発明は、少なくとも1つの活性物質を場合によって1つ又は2つ以上の医薬的に許容できる賦形剤、担体又は

10

20

30

40

50

希釈剤とともに含む医薬組成物を提供する。ある実施態様では、前記医薬組成物はワクチンとして使用され、したがって任意の付加的成分がワクチンとして使用するために許容される。さらにまた、1つ又は2つ以上の適切なアジュバントをそのようなワクチン調製物に添加できることは当業者には理解されよう。

通常前記組成物は、通常は医薬として許容できる担体を含む無菌的な医薬組成物の一部として提供されるであろう。前記医薬組成物は、患者への所望の投与方法にしたがって任意の適切な形態を有することができる。

前記医薬組成物は単位用量(unit dosage)形態で提供することができ、一般的には封入容器で提供されるであろう。さらに前記組成物はキットの一部分として提供することができる。そのようなキットは通常は(必ずというわけではないが)使用のための指示物を含む。前記キットは前記複数の単位用量形態を含むことができる。10

#### 【0078】

前記医薬組成物は、任意の適切な経路[例えば経口(頬側、舌下を含む)、直腸、鼻内、局所(頬側、舌下又は経皮を含む)、腔内、又は非経口(皮下、筋肉内、静脈内又は皮内を含む)経路]による投与のために調整することができる。そのような組成物は製薬業界で公知の任意の方法によって、例えば前記活性物質を無菌的条件下で担体又は賦形剤と混合することによって製造することができる。

経口投与用に適応させた医薬組成物は、別個に分離した単位量(例えばカプセル又は錠剤)として、散剤若しくは顆粒として、溶液、シロップ若しくは懸濁液として(水性若しくは非水性液で、又は食用泡沬若しくはホイップとして、又は乳液として)提供することができる。20

錠剤又は硬質ゼラチンカプセルのために適切な賦形剤にはラクトース、トウモロコシ澱粉又はその誘導体、ステアリン酸又はその塩が含まれる。

軟質ゼラチンカプセルで使用される適切な賦形剤には例えば植物油、みつろう、脂肪、半固体又は液状ポリオールなどが含まれる。

#### 【0079】

溶液及びシロップの製造のために使用できる賦形剤には、例えば水、ポリオール及び砂糖が含まれる。懸濁液の製造には油(例えば植物油)を用いて水中油又は油中水懸濁液を提供することができる。

経皮投与に適応させた医薬組成物は、使用者の表皮に長時間密着することを意図した別個に分離したパッチとして提供することができる。例えば活性成分は、文献(Pharmaceutical Research, 3(6): 318(1986))に一般的に記載されたイオン導入によってパッチから供給することができる。30

局所投与に適応させた医薬組成物は、軟膏、クリーム、懸濁液、ローション、粉末、溶液、ゲル、スプレー、エアゾル、又はオイルとして製剤化することができる。目又は他の外部組織(例えば口及び皮膚)の感染のためには、前記組成物は好ましくは局所軟膏又はクリームとして適用される。軟膏として製剤化するときは、活性物質はパラフィン基剤又は水に混和性の軟膏基剤とともに用いることができる。また別には、活性物質は、水中油クリーム基剤又は油中水基剤とともにクリームとして製剤化することができる。目の局所投与に適応させた医薬組成物には滴下目薬が含まれ、前記には活性成分は適切な担体(特に水性溶媒)に溶解又は懸濁される。口部への局所投与に適応させた医薬組成物にはロゼンジ、香錠及び口内洗滌液が含まれる。40

#### 【0080】

直腸投与に適応させた医薬組成物は座薬又は浣腸として提供することができる。

担体が固体である鼻内投与に適応させた医薬組成物には、粒子サイズが例えば20~500ミクロンの範囲にある粗い粉末が含まれ、前記は鼻道から迅速な吸入によって、鼻の直ぐ側に保持された容器から投与される。鼻内スプレーとして又は鼻内ドロップとして投与される場合、前記担体が液体の適切な組成物には活性物質の水性又は油性溶液が含まれる。

吸入による投与に適応させた医薬組成物には、種々のタイプの用量計測加圧エアゾルの手段、ネブライザー又は散布器によって生成することができる微粒子ダスト又はミストが50

含まれる。

腔内投与に適応させた医薬組成物はペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、泡沫又はスプレー組成物として提供することができる。

#### 【0081】

非経口投与に適応させた医薬組成物には、水性及び非水性無菌的注射溶液並びに水性及び非水性無菌的懸濁液が含まれる。前記溶液は抗酸化剤、緩衝液、制菌剤及び、前記組成物を目的の受容者の血液に対し実質的にアイソトニックにする溶質を含み、前記懸濁液は懸濁剤及び膨張剤を含むことができる。注射用溶液に用いることができる賦形剤には、例えば水、アルコール、ポリオール、グリセリン及び植物油が含まれる。前記組成物は単回投与又は複数回投与容器で、例えば封入アンプル及びバイアルで提供することができる。さらに前記は、フリーズドライ(凍結乾燥)状態で保存することができ、使用直前に注射のために保持されている無菌的液体(例えば水)の添加を必要とするだけである。即時注射溶液及び懸濁液は無菌的粉末、顆粒及び錠剤から調製できる。

前記医薬組成物は保存料、可溶化剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、甘味料、着色剤、香料、塩類(本発明で使用されるポリペプチドはそれ自体医薬的に許容できる塩の形態で提供することができる)、緩衝剤、コーティング物質又は抗酸化剤を含むことができる。

本発明で使用される活性物質の用量は、乳癌、肺癌及び/又は膵臓癌の病期、治療される個体の年齢及び状態などに応じて広い範囲で変動させることができ、医師が最終的に適切な使用用量を決定する。前記投薬は適切なようにしばしば反復される。副作用が生じた場合、通常の臨床慣行にしたがって投薬の量及び/又は頻度を減らすことができる。

#### 【0082】

乳癌、膵臓癌及び/又は肺癌におけるNKCC1の重要性のゆえに、下記が本発明のさらに別の特徴を構成する:

i) 患者で乳癌、膵臓癌及び/又は肺癌の治療をモニター又は評価する方法。前記方法は、前記患者から得られた生物学的サンプルでNKCC1ポリペプチド又はNKCC1核酸の有無を決定する工程及び/又は定量する工程を含む。

ii) (a) 乳癌、膵臓癌及び/又は肺癌の発生の予防、(b) 乳癌、膵臓癌及び/又は肺癌の進行の予防、又は(c) 乳癌、膵臓癌及び/又は肺癌の症状の改善のために、患者に治療的に有効な量の活性物質を投与することを含む乳癌、膵臓癌及び/又は肺癌を治療する方法。前記活性物質は、乳癌、膵臓癌及び/又は肺癌の患者でNKCC1ポリペプチドと相互作用するか若しくは調節(例えばアップレギュレート若しくはダウンレギュレート)するか、又はNKCC1ポリペプチドの発現又は生物学的活性(又はその両方)を補足する。

iii) NKCC1ポリペプチドと相互作用するか、又はNKCC1ポリペプチドの発現又は活性を調節する活性物質の、乳癌、膵臓癌及び/又は肺癌の治療用組成物の製造における使用。

iv) 対象者で乳癌、膵臓癌及び/又は肺癌を予防及び/又は治療する方法。前記方法は、少なくとも1つのNKCC1ポリペプチドと結合する治療的に有効な量の抗体を前記対象者に投与することを含む。

v) 少なくとも1つのNKCC1ポリペプチドと結合する抗体の、乳癌、膵臓癌及び/又は肺癌の予防及び/又は治療で使用される組成物の製造における使用。

本発明の各特徴の好ましい特性は他の特徴の各々のように必要な変更を加えられる。

本明細書に引用した各参考文献、特許及び特許出願の内容は参照によりその全体が本明細書に含まれる。

本発明をこれから下記の実施例を参照しながら説明する。本実施例は本発明の範囲を限定するものと解されてはならない。本実施例では添付の図面が参照される。

#### 【実施例】

#### 【0083】

##### (実施例1: NKCC1の同定)

NKCC1を、乳癌(MDA MB468/BT474)及び膵臓(HPAFII)細胞株から単離した。

分画の前に、 $15\text{cm}^2$ の培養皿にコンフレントになるまで増殖させた。採集及び抽出の前に、前記細胞(約 $2 \times 10^9$ 細胞)をPBS-CMで3回洗滌した。プラスチックの細胞リフターを

10

20

30

40

50

用いて、細胞を培養皿から氷冷PBS-CM(2×10<sup>8</sup>細胞につき5mL)中へ搔きとった。続いて細胞を1000×gで5分、4で遠心した。上清を取り除き、細胞を10mLのホモジエナイス緩衝液(10mMのHEPES、1mMのEDTA、1mMのバナジン酸塩、0.02%のアザイドに250mMのショ糖)に再懸濁させ、続いて1000×gで5分、4で遠心した。上清を除去した。続いて細胞ペレットを、その細胞の5倍容積のホモジエナイス緩衝液+プロテアーゼインヒビター(sigma)中に再懸濁させた。ボールベアリングホモジナイザー(BBH)(8.002mmの鋼球)を冷却し、ホモジエナイス緩衝液で洗滌した。前記細胞懸濁液を2mLのシリングにとり、一方の端を前記BBHに取り付けた。別のシリングをBBHの他方の端に取り付けた。前記細胞混合物をチャンバーから5回通過させた。細胞の破壊は顕微鏡を用いてモニターし、細胞が充分に溶解してから、得られた混合物を1000×gで5分、4で遠心した。

10

## 【0084】

得られた上清(PNS)を保持し、1mLのホモジエナイス緩衝液を前記核ペレットに添加し、続いて1000×Gで5分遠心した。これら2つの分画をプールし、さらに3000×Gで10分、4で遠心した。前記3000×Gの上清をSW40又はSW60遠心管中の2mLの60%ショ糖緩衝剤(chsion)上に重層し、ゆっくりと加速及び減速しながら100000×Gで45分遠心した。未精製形質膜は、ショ糖緩衝剤の最上部の分離した層として明瞭であった。上部の層(サイトゾル)を取り出し、形質膜はパストールピペットを用いて採集した。未精製形質膜画分の%ショ糖は屈折計を用いて決定した。前記膜調製物をHEPES緩衝液で希釈し、ショ糖含有量を15%未満に下げた。前記粗形質膜調製物をSW40遠心管中の予め作製した15~60%のショ糖勾配上に重層し、ゆっくりと加速及び減速しながら100000×Gで17時間遠心した。

20

## 【0085】

グラディエントアンローダーを用いて、前記ショ糖勾配を分画した(スピード0.5、幅2.5、35分画)。前記画分のタンパク質含有量を測定し、10μgのタンパク質を4~20%のアクリルアミド1Dゲル(Novex)で泳動し、トランスフェリンレセプター、オキシドレダクターゼII及びカルネキシンに対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを実施した。

トランスフェリン免疫反応性を有するが、オキシドレダクターゼII又はカルネキシンに対する免疫反応性をもたない形質膜画分を同定した。これらのショ糖画分をプールし、10mMのHEPES、1mMのEDTA、1mMのバナジン酸塩、0.02%アザイドにより少なくとも4倍まで希釈した。前記希釈ショ糖画分をSW40又はSW60に加え、ゆっくりと加速及び減速しながら100000×Gで45分遠心した。膜ペレットから上清を除去し、前記ペレットを3回PBS-CMで洗滌した。膜ペレットを2%のSDS(63mMトリス塩酸、pH7.4)で可溶化させた。タンパク質アッセイを実施し、続いてメルカプトエタノール(最終2%)、グリセロール(10%)及びプロモフェノールブルー(0.0025%最終)を添加した。最後に抽出タンパク質サンプルを1D溶解緩衝液で最終タンパク質濃度1μg/μLで可溶化し、一次元PAGEで前記タンパク質を分離させた。

30

## 【0086】

## [質量分析]

1Dゲルから抽出したタンパク質をトリプシンで消化し、脱着に337nmの波長のレーザー及びリフレクトロン分析モードを用いMALDI-TOF-MS(VoyagerSTR, Applied Biosystems)によって分析した。NKCC1のために選択された質量はさらにナノスプレーイオン供給源(Micromass UK Ltd.)を備えつけたQTOF-MSを用いてタンデム質量分析計で特性を調べた。MALDI分析の前に、前記サンプルを脱塩し、C18Zip Tips(登録商標)(Millipore)を用いて濃縮した。タンデムマススペクトロメトリー(MS)のためのサンプルは、C18 SPE材を組んだナノLCシステム(LC Packings, Amsterdam, The Netherlands)を用いて精製した。

40

SEQUENT検索プログラム(Eng et al. 1994, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5: 976-989)を用い、National Center for Biotechnology Information(NCBI)の非重複的データベース中のタンパク質エントリーで構築された公開ドメインタンパク質データベースに対し、トリプシン消化ペプチドの未解釈タンデム質量スペクトルを検索した。このデータベースは<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>でアクセスでき、さらにまた発現配列タグエントリ

50

ーで構築されている (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>)。配列データベース検索の結果として、タンデムアミノ酸配列がSwissProtアクセス番号P55011(ブメタニド感受性ナトリウム(カリウム)塩化物コトランスポーター1)と適合することが見出された。図1(配列番号1)を参照されたい、適合タンデム配列は太字で示されている。

#### 【0087】

さらにまた、質量スペクトル分析から得られたペプチドの質量データ及びMOWSEデータベース検索を用いて、配列を同定した。ペプチドの質量情報は、他の分析方法(例えばタンパク質配列分析)とは別個に未知のサンプルタンパク質の固有で迅速な同定を可能にする充分な識別力を有する“フィンガープリント”サインを提供する。実際に行ったところ、50000を越えるタンパク質に由来するフラグメントデータベースに対して検索したとき、3つ~4つの実験的に決定したペプチド質量を用いて、サンプルタンパク質がユニークに同定されることが示された(D.J.C. Pappin, P. Hojrup and A.J. Bleasby “Rapid Identification of Proteins by Peptide-Mass Fingerprinting”, Current Biology (1993), vol3, 327-332; 及び<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Bioinformatics/Webapp/mowse/>)。MOWSEデータベース検索に用いられたコードのバージョンは、以下の改変を有していた：親タンパク質のサイズは計算に含まれず、例えばタイチンのような大型タンパク質は、もはやスコアを偏らせない；代りに、質量(x)のペプチドの理論的頻度(frequency)は、ペプチドの質量(x)及びアミノ酸の平均質量を用いて概算され、一方失われた内部切断(トリプシンによる)のために0.2の確率及びタンパク分解切断部位の出現の確率には0.1が考慮される。

あるペプチドの質量(x)に対する1つのマッチングに割り当てられるスコアは、そのようなマッチングをランダムに見出す確率の対数であり、前記質量をもつフラグメントの頻度に反比例する。

したがって、前記スコアは、ペプチド質量(x)に対する1つのマッチングのスコアを質量(x)に対してプロットすることによって見出される、直線回帰式を用いて計算される。この様態によりNKCC1について予想されたトリプシンフラグメントに対し2つの質量マッチング(mass match)が同定され、これらはまたP55011にも適合した(図1(配列番号1)を参照されたい)。質量マッチングにより同定された配列を、イタリック体及び下線で示す。この方法の精度は20ppmであった。

#### 【0088】

##### (実施例2：ヒト組織でのNKCC1mRNAの発現)

リアルタイムの定量的RT-PCRを用い(C.A. Heid et al. 1996, Genome Res. 6: 986-994; T.B. Morrison et al. 1998, Biotechniques 24: 954-958)、正常なヒトの組織(図2)、7人の乳癌患者に由来する、ドナーが一致する腫瘍及び隣接正常組織(図3)、正常臍臍及び腫瘍由来臍臍細胞株並びに組織標本(図4)におけるNKCC1mRNAの分布を分析した。

##### [RT-PCRによるNKCC1mRNAの定量]

リアルタイムRT-PCRを用いて、正常ヒト組織mRNA(Clontech)、乳癌患者由来のドナーが一致する腫瘍及び隣接正常組織、正常臍臍及び腫瘍由来臍臍細胞株並びに組織標本におけるNKCC1発現を定量的に測定した。正常及び腫瘍組織サンプルについての倫理的承認は手術時に得られた(Univ. of Oxford, UK)。PCRに用いたプライマーは以下のとおりである：

センス：5' cacctactacctgcgcaccc3' (配列番号3)

アンチセンス：5' gaccacagcatctgggttggaa3' (配列番号4)

反応には、5ngのcDNA(RT-PCRキット(Life Technologies)のためのスーパースクリプト=ファーストストランド=シンテシスを用いて調製)、SYBR緑色蛍光配列検出試薬(PE Biosystems)、センス及びアンチセンスプライマーが含まれ、ABI7700配列検出系(BE Biosystems)で分析した。PCRの条件は以下のとおりである：50℃2分を1サイクル；95℃10分を1サイクル；さらに95℃15秒を40サイクル；65℃で1分。PCR生成物の蓄積はSYBR緑色蛍

10

20

30

40

50

光の増加としてリアルタイムで測定し、データは配列検出プログラムv1.6.3(PE Biosystems)を用いて分析した。最初の鑄型コピー数対蛍光及び増幅サイクル相關標準曲線は、鑄型として増幅PCR生成物を用いて作成し、各サンプルにおけるNKCC1コピー数の算出に用いた。

NKCC1mRNAの分布は全般的に正常組織で低く、最高レベルのmRNA発現は乳房、前立腺、精巣及び脳組織で認められた(図2)。

治療中の乳癌組織におけるNKCC1mRNAの発現を7人の乳癌患者に由来する同一人の隣接正常組織と比較した(図3)。NKCC1発現は、同一人のコントロール組織と比較して全ての腫瘍サンプルで増加し、7つのサンプルのうち6サンプルは6倍の発現増加を示した。

NKCC1mRNA発現はまた正常及び腫瘍臓組織並びに細胞株でも分析した(図4)。NKCC1発現は、対応する正常な臓組織及び細胞株(それぞれ平均=16及び5コピー/ng cDNA)よりも臓腫瘍組織(平均=69コピー/ng cDNA)及び腫瘍由来細胞株(平均=1013コピー/ng cDNA)で顕著に高かった。

### 【0089】

(実施例3：乳癌、肺癌及び臓癌組織のNKCC1の免疫組織化学的分析)

乳癌におけるNKCC1の中心的関与をさらに明瞭に示すために、特異的抗NKCC1抗体による免疫組織化学を用いて、多数のドナーの乳腺管癌組織並びに肺腺癌及び臓癌組織切片におけるNKCC1タンパク質発現を調べた。

#### [抗体の作製]

抗NKCC1ポリクローナル抗体は、2つの特異的ペプチド(Immune Systems Ltd. UK)で免疫したモルモットで作製した。ペプチド配列は、疎水性、抗原性、表面確率(surface probability)及び他の公知のタンパク質ファミリーメンバーに対する弱い相同意を意図した合成のために選択した。ペプチドは、Fmoc化学反応を用いて各々の末端にシステイン残基を付加しながら合成し、免疫前のキーホールリンペットヘモシアニンの固有チオール反応性カップリングを可能にした。用いたペプチドはSKKPKGFFGYKC(配列番号5)及びSGESEPAKGSEAKGC(配列番号6)であった。固定した上記ペプチドのカラムを用いて、抗体をアフィニティー精製した。

#### [乳癌組織のNKCC1免疫組織化学]

免疫組織化学分析をホルマリン固定パラフィン包埋組織のマイクロアレーで実施した。前記マイクロアレイは、55人のドナーに由来する乳癌組織の1mm切片及び20切片の種々の正常組織(Clinomics Laboratories Inc., 165 Tor Court, Pittsfield, MA01201)を含んでいた。スライドは以下によって脱パラフィンした：キシレンで5分洗滌を2回、続いて連続的段階的(successive graded)エタノール溶液により水和させ、さらにPBSで5分間洗滌した。前記スライドを0.01Mのクエン酸緩衝液(pH6)に浸漬、最高出力(950W)で10分マイクロ波処理して、抗原回復(retrieval)を行った。また抗体による検出は、室温で10分間のオートザイム(AbCam)による組織のプロテアーゼ処理によっても改善した。1.5μg/mLの一次ポリクローナル抗体(2.5%ロバ血清/PBS)の添加前に、前記組織を10%のロバ血清/PBSで1時間ブロッキングした。3回PBSで洗滌した後、前記組織切片を1:200に希釈した(2.5%ロバ血清/PBS中に2.5μg/mL)ビオチン結合二次抗体(ビオチン-SP-結合アフィニピュア(AffiniPure)ロバ抗モルモット抗体(Jackson ImmunoResearch))とともに1時間インキュベートした。スライドをPBSで3回洗滌し、前記組織を1:100に希釈したストレプトアビジン-HRP(Jackson ImmunoResearch)(2.5%ロバ血清/PBS中に5μg/mL)とともにインキュベートし、続いてPBSで5分間3回洗滌した。DAB基質溶液(Dako Ltd.)を製造元の指示にしたがって用い、抗体シグナルを検出した。隣接組織のアレイはヘマトキシリントエオシン(Dako Ltd.)のために対比染色を施し、光学顕微鏡に取り付けたデジタルカメラで画像を撮影した。

NKCC1免疫染色は乳癌組織で認められ、NKCC1は、(隣接する乳房組織と比較して)乳癌組織の乳腺管癌細胞で特異的にさらに強く発現されることが明瞭であった。NKCC1免疫反応性を合計55人の乳癌ドナーの組織で調べた。これらのうち、癌細胞において7つが非常に強いNKCC1染色を示し、30が強い/中等度の染色を示し、13が弱い染色を示し、5つが染

10

20

30

40

50

色を示さなかった。

【0090】

[肺癌組織及び肺臓癌組織のNKCC1免疫化学]

免疫組織化学分析を、ホルマリン固定パラフィン包埋組織のマイクロアレイで実施した。前記マイクロアレーは、多様なドナーに由来する癌組織の1mm切片(Clinomics Laboratories Inc. (165 Tor Court, Pittsfield, MA01201)から入手)を含んでいた。スライドは、キシレンの5分洗滌を2回、続いて連続的段階的エタノール溶液により水和し、さらにPBSで5分の洗滌によってパラフィン除去した。抗原回復は前記スライドを0.01Mのクエン酸緩衝液(pH6)に浸漬し、最高出力(950W)で10分マイクロ波処理を実施し、さらに前記組織をペプシン(1mg/mL)で1分、pH2で室温処理することによって実施した。1μg/mLの一次抗NKCC1ポリクローナル抗体(2.5%ロバ血清/PBS)の1時間の添加前に、前記組織を10%のロバ血清/PBSで1時間ブロッキングした。3回PBSで洗滌した後、前記組織切片を1:200に希釈した(2.5%ロバ血清/PBS中に2.5μg/mL)ビオチン結合二次抗体(ビオチン-SP-結合アフィニピュア(AffiniPure)ロバ抗モルモットIgG(Jackson ImmunoResearch))とともに1時間インキュベートした。スライドをPBSで3回洗滌し、前記組織を1:100に希釈した(2.5%ロバ血清/PBS中に5μg/mL)ストレプトアビジン-HRP(Jackson ImmunoResearch)とともにインキュベートし、続いてPBSで5分間3回洗滌した。抗体シグナルはDAB基質溶液(Dako Ltd.)を用い製造元の指示にしたがって検出した。

隣接するコントロール切片と比較して、NKCC1に対する切片の染色増加が肺及び肺臓組織切片の両方で観察された。

【0091】

(実施例4:組換え細胞株におけるNKCC1の細胞内分布)

蛍光免疫細胞化学を用いて組換え細胞でのNKCC1の細胞内分布を調べた。

ヒトNKCC1(配列番号2)の完全長オープンリーディングフレームをプラスミドベクター pCDNA3.1(Invitrogen)にPCRでクローニングした。トランスフェクション試薬GeneJuice(登録商標)(Invitrogen)を用い製造元の指示にしたがって、HEK293細胞及びCHO-K1細胞をNKCC1.pcdNA3.1プラスミド(Invitrogen)で安定にトランスフェクションさせた。完全長のNKCC1を発現しているHEK細胞プールを、抗生物質含有培養液(0.2mg/mLのG418)での増殖について選択した。完全長NKCC1発現CHO-K1細胞を希釈によりクローニングし、抗生物質含有培養液(0.2mg/mLのG418)での増殖について選択した。2つのCHO-K1クローン、4D8及び3C5を更なる評価のために選択した。

【0092】

トランスフェクション並びに非トランスフェクションHEK293細胞及びCHO-K1細胞を8ウェルのチャンバースライド(Nalge Nunc)に $6 \times 10^4$ 細胞/ウェルの密度で播種した。37及び5%CO<sub>2</sub>で24時間インキュベートした後、培養液をスライドから除去し、プラスチックのチャンバーハウジングも除去した。前記スライドをコプラン(Coplin)ジャー中のPBSで5分間1回洗滌した。過剰のPBSをスライドから取り除き、続いてスライドを5分間100%アセトン中に置いた。前記インキュベーションの後で、スライドを簡単に風乾し、続いて湿潤なチャンバーに平らに置き、PBS1%(w/v)BSAで適切に希釈した500μLの一次抗体とともに1時間インキュベートした。前記一次抗体は、配列番号5のペプチドに対して作製されたモルモット抗NKCC1ポリクローナル抗体(2μg/mL)(Immune Systems Ltd., UK)又は2μg/mLのモルモットガンマグロブリン(Sigma)である。続いてスライドを1回につき5分間PBSで3回洗滌した。前記スライドを、PBS1%(w/v)BSAで1:200に希釈した500μLのビオチン-SP-結合アフィニピュアロバ抗モルモット抗体(Jackson ImmunoResearch)とともに湿潤なチャンバー中で1時間インキュベートした。前記のインキュベーションの後で、PBSで1回の洗滌につき5分間3回洗滌し、さらにPBS1%(w/v)BSAで1:700に希釈した500μLのCy3-結合エキストラアビジン(Sigma)とともに湿潤チャンバーで1時間インキュベートした。このインキュベーションに続いて、スライドを1回につき5分間PBSで4回洗滌した。続いてスライドを2μg/mLのビスベンゾイミド(BisBenzimide)(Sigma)とともに30秒インキュベートし、さらにPBSで2分間洗滌した。カバースリップを蛍光強化媒体(Dak

10

20

30

40

50

o Ltd.) 中で前記スライドにマウントし、続いて DMIRE 蛍光顕微鏡 (Leica Microsystems (UK) Ltd.) に取り付けたデジタルカメラ DC300F で画像を撮影した。

得られた画像は、NKCC1 が NKCC1 トランスフェクション HEK293 及び CHO 細胞の形質膜上で強く発現されることを明瞭に示した。前記の染色は NKCC1 トランスフェクション細胞に極めて特異的であった。なぜならば、非トランスフェクション HEK293 及び CHO-K1 細胞の抗 NKCC1 ポリクローナル抗体による染色は非常に低い蛍光レベルを示したからである。NKCC1 トランスフェクション細胞のコントロールモルモット IgG による染色は、非常に低レベルのバックグラウンド蛍光を示した。

したがって、NKCC1 は正常なヒト組織で限定的発現パターンを示し、また乳癌組織、肺癌組織、膵臓癌組織及び癌細胞株で上昇する。NKCC1 をトランスフェクションされた細胞株の免疫細胞化学により、明瞭な膜との結合が示され、NKCC1 が、乳癌、肺癌及び / 又は膵臓癌の治療及び / 又は予防に対する免疫療法によるアプローチにおいて可能性を有することを唆している。10

本発明は本出願で述べた特定の実施態様に限定されるべきではない（前記実施態様は本発明の個々の特徴の 1 つの例示を意図するものである）。本明細書に列挙された方法及び装置の他に、本発明に包含される機能的に等価の方法及び装置が前述記載及び図面か当業者には明白であろう。そのような改変及び変型例も添付の請求の範囲内に包含されよう。

### 【図面の簡単な説明】

#### 【0093】

【図 1】NKCC1 のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す (GenBank アクセス番号 : U30246; SwissProt アクセス番号 : P55011)。乳癌及び膵臓癌細胞株の膜調製物で NKCC1 を同定するために用いたタンデムスペクトルは太字、イタリック体及び下線付きで示されている。NKCC1 に割り当てられたマスは太字及びイタリック体で示されている（下記を参照されたい）。30

【図 2】NKCC1 mRNA の正常組織分布を示す。正常組織における mRNA レベルがリアルタイム RT-PCR で定量された。mRNA レベルはコピー数 /  $\text{ng}^{-1}$  cDNA として表されている。

【図 3】正常及び乳癌組織における NKCC1 mRNA の発現を示す。ドナーが一致する正常組織と隣接する腫瘍組織の NKCC1 mRNA レベルはリアルタイム RT-PCR で測定された。mRNA レベルはコピー数 /  $\text{ng}^{-1}$  cDNA として表されている。

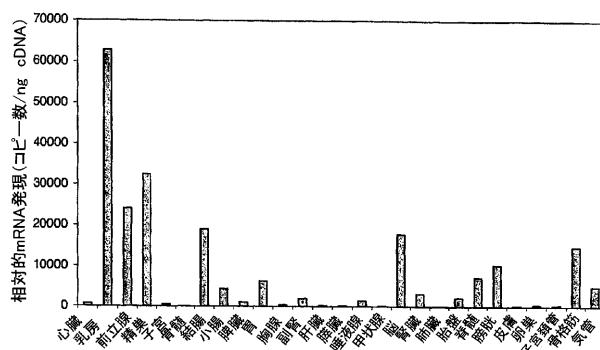
【図 4】正常膵臓組織、膵臓癌組織、並びに正常膵臓及び腫瘍由来膵臓細胞株における NKCC1 mRNA の発現を示す。NKCC1 mRNA レベルはリアルタイム RT-PCR で測定された。mRNA レベルはコピー数 /  $\text{ng}^{-1}$  cDNA として表されている。40

〔 図 1 〕

Figure 1

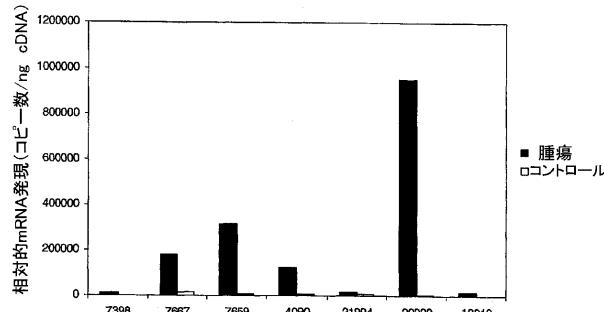
【图2】

**Figure 2**



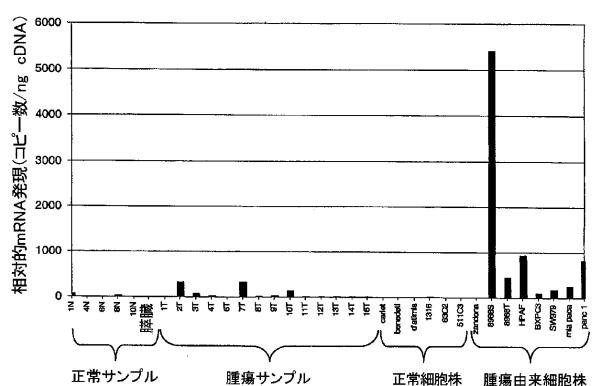
【図3】

**Figure 3**



## 【図4】

Figure 4



## 【配列表】

2005522228000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No PCT/GB 03/01589
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/574 G01N33/68 C07K14/47		
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 G01N 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 terms used) BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHUMAKER HOLL ET AL: "CFTR upregulates the expression of the basolateral Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> cotransporter in cultured pancreatic duct cells" AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, vol. 277, no. 6 part 1, December 1999 (1999-12), pages C1100-C1110, XP001157084 ISSN: 0002-9513 abstract	1-9, 18-21
X	WO 00 55633 A (EOS BIOTECHNOLOGY INC) 21 September 2000 (2000-09-21) abstract; claims	1-9, 18-21
		-/-
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
*E* earlier document but published on or after the International filing date		
*L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
*P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed		
*T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
*Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the International search report	
28 January 2004	12/02/2004	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer GONCALVES M L F C	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No  
PCT/GB 03/01589

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VIBAT C R ET AL: "Quantitation of Na+-K+-2Cl- cotransport splice variants in human tissues using kinetic polymerase chain reaction." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. UNITED STATES 15 NOV 2001, vol. 298, no. 2, 15 November 2001 (2001-11-15), pages 218-230, XP002268394 ISSN: 0003-2697 abstract; figures 5-7	1-9, 18-21
A	MAJID ANEELA ET AL: "Expression of the Na+-K+-2Cl- cotransporter in alpha and beta cells isolated from the rat pancreas" PFLUEGERS ARCHIV EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, vol. 442, no. 4, 3 May 2001 (2001-05-03) - July 2001 (2001-07), pages 570-576, XP009024842 ISSN: 0031-6768 abstract	1-9, 18-21
P,X	ADAM PAUL J ET AL: "Comprehensive proteomic analysis of breast cancer cell membranes reveals unique proteins with potential roles in clinical cancer." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 8, 10 December 2002 (2002-12-10) - 21 February 2003 (2003-02-21), pages 6482-6489, XP002268395 ISSN: 0021-9258 abstract	1-9, 18-21

International Application No. PCT/GB 03 01589

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 23-24

Present claims 23 and 24 relate to a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely "Interact with a polypeptide as defined in claim 1 (i)".

The claims cover all compounds 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 only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack 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 claims also lack 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. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the subject-matter of claims 1-9 and 18-22.

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/GB 03/01589

**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.  Claims Nos.: 10-17, 23-24, 22, 25, 26  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 10-17, 22, 25 and 26: Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy
2.  Claims Nos.: 23-24  
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.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box 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.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/GB 03/01589

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0055633	A	21-09-2000	US 6316272 B1	13-11-2001
			US 6294343 B1	25-09-2001
			AU 3755300 A	04-10-2000
			CA 2369319 A1	21-09-2000
			EP 1163524 A2	19-12-2001
			WO 0055633 A2	21-09-2000
			US 2003198951 A1	23-10-2003
			US 2003118509 A1	26-06-2003
			US 6566502 B1	20-05-2003
			US 6455668 B1	24-09-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/577	Z
// C 0 7 K 16/30	A 6 1 K 37/02	
C 1 2 P 21/08	C 0 7 K 16/30	
	C 1 2 P 21/08	

(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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,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,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW)

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 テレット ジョナサン アレキサンダー

イギリス オックスフォードシャー オーエックス14 4アールワイ アピンドン ミルトン  
パーク 86 ザ フォーラム オックスフォード グライコサイエンシス (ユーケイ) リミテッド内

F ターム(参考)	2G045	AA34	BB10	BB24	CB01	CB02	DA36	FB03			
	4B024	AA01	AA11	BA54	BA61	BA80	CA02	CA09	CA12	CA20	DA02
		DA03	EA04	GA11	HA11	HA13	HA14	HA17			
	4B063	QA01	QA05	QA19	QQ02	QQ08	QQ21	QQ41	QQ53	QQ61	QQ79
		QQ89	QQ91	QR08	QR32	QR35	QR40	QR42	QR48	QR56	QR62
		QR77	QR80	QS16	QS25	QS33	QS34	QS36	QX01	QX02	
	4B064	AG27	CA10	CA20	CC01	CC24	DA01	DA13			
	4C084	AA17	BA01	BA08	BA22	CA18	CA53	DA27	NA14	ZB09	ZB26
	4C085	AA03	AA13	AA14	BB01	BB11	CC02	CC07	CC08	CC21	CC31
		DD23	DD62	DD63	EE01						
	4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	BA41	BA50	CA40	DA75	DA76
		EA20	EA22	EA51	FA71	FA72	FA74				