

(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2008-535491

(P2008-535491A)

(43) 公表日 平成20年9月4日 (2008. 9. 4)

| (51) Int. Cl.                        | F I                  | テーマコード (参考) |
|--------------------------------------|----------------------|-------------|
| <b>C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)</b>       | C 1 2 Q 1/68 Z N A A | 2 G O 4 5   |
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006. 01)</b>      | C 1 2 N 15/00 A      | 4 B O 2 4   |
| <b>C O 7 K 16/32 (2006. 01)</b>      | C O 7 K 16/32        | 4 B O 6 3   |
| <b>G O 1 N 33/574 (2006. 01)</b>     | G O 1 N 33/574 A     | 4 C O 8 4   |
| <b>G O 1 N 33/15 (2006. 01)</b>      | G O 1 N 33/574 Z     | 4 C O 8 5   |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 135 頁) 最終頁に続く |                      |             |

(21) 出願番号 特願2008-505525 (P2008-505525)  
 (86) (22) 出願日 平成18年4月7日 (2006. 4. 7)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年11月30日 (2007. 11. 30)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/012863  
 (87) 国際公開番号 W02006/110466  
 (87) 国際公開日 平成18年10月19日 (2006. 10. 19)  
 (31) 優先権主張番号 60/669, 856  
 (32) 優先日 平成17年4月7日 (2005. 4. 7)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/784, 925  
 (32) 優先日 平成18年3月22日 (2006. 3. 22)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

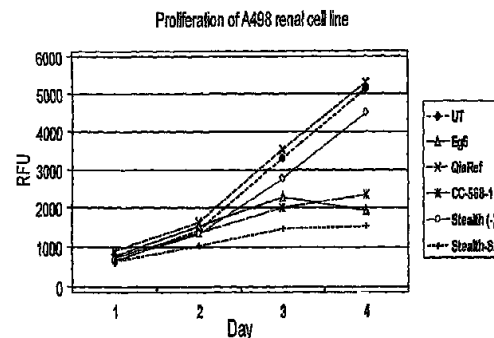
(71) 出願人 506361100  
 ノバルティス ヴァクシNZ アンド ダ  
 イアグノスティクス, インコーポレイテ  
 ッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 946  
 08-2916, エミリービル, ホー  
 トン ストリート 4560  
 (71) 出願人 506353633  
 サグレシュ ディスカバリー, インコー  
 ポレイテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 946  
 08-2916, エミリービル, ホー  
 トン ストリート 4560  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌に関連した遺伝子 (P T P ε)

## (57) 【要約】

本発明は、癌関連遺伝子の分野に属する。特に、t m - P T P 遺伝子またはこの遺伝子によってコードされるタンパク質の存在または不在に基づき、癌または癌を発症する可能性を検出するための方法に関する。本発明はまた、t m - P T P 遺伝子を上方調節するまたは下方調節するための方法および分子を提供する。1つの実施形態において、本発明は、t m - P T P 遺伝子の配列または発現レベルを決定することを含む、生物学的試料において癌細胞を検出するための方法を提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

t m - P T P 遺伝子の配列または発現レベルを決定することを含む、生物学的試料において癌細胞を検出するための方法。

## 【請求項 2】

t m - P T P 遺伝子の発現産物の発現レベルを測定することを含み、対照レベルと異なる発現レベルが疾患の指標となる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

発現産物がタンパク質である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

タンパク質の発現レベルを、そのタンパク質に特異的に結合する抗体を用いて測定する、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

発現産物が m R N A である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 6】

a ) m R N A とプローブの間でのハイブリッド複合体の形成を許容するストリンジェント条件下で組織試料をプローブと接触させること；および

b ) 複合体の形成を検出すること

の工程を含む、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

a ) t m - P T P 遺伝子をコードする核酸発現産物とプローブの間でのハイブリッド複合体の形成を許容するストリンジェント条件下で生物学的試料を核酸プローブと接触させること；および

b ) プローブと生物学的試料からの核酸の間での複合体の形成を検出すること

の工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

複合体の形成が存在しないことが t m - P T P 遺伝子の配列内の突然変異の指標となる、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

形成される複合体の量を、対照試料を使用したときに形成される量と比較する工程をさらに含み、対照と試料の間での形成される複合体の量の差が癌の存在を示す、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

形成される複合体の量の差が上昇または低下である、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

正常組織と比較して試料によって形成される複合体の量の 2 倍またはそれ以上の上昇または低下が疾患の指標となる、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

生物学的試料が組織試料である、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 13】

組織試料が、腎組織、肺組織、卵巣組織、脾組織、結腸組織、前立腺組織、乳房組織または膀胱組織である、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 14】

最初の時点での生物学的試料中の請求項 1 で言及した t m - P T P 遺伝子の発現産物の発現を、2 番目の時点での同じ発現産物の発現と比較することを含み、最初の時点と比較して 2 番目の時点での発現の上昇または低下が癌の進行の指標となる、患者において癌の進行を評価するための方法。

## 【請求項 15】

t m - P T P 遺伝子のポリペプチド発現産物に結合する抗体；および前記抗体と前記ポリペプチドの間での結合反応の検出のために有用な試薬を含む、癌を診断するために有用

10

20

30

40

50

なキット。

【請求項 16】

ストリンジェント条件下で t m - P T P 遺伝子にハイブリダイズする核酸プローブ； t m - P T P 遺伝子を増幅するために有用なプライマー；および疾患の診断を容易にするためにプローブとプライマーを使用するための指示書を含む、癌を診断するために有用なキット。

【請求項 17】

癌を治療するときに使用するための、請求項 1 で言及した t m - P T P 遺伝子の発現産物の発現を調節する上での使用に適する抗体、核酸、タンパク質または医薬組成物。

【請求項 18】

請求項 1 で言及した t m - P T P 遺伝子の発現産物のレベルを調節することを含む、患者において癌を治療するための方法。

【請求項 19】

前記発現産物のレベルを調節する抗体、核酸またはポリペプチドを患者に投与することを含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

癌の治療または診断のための薬剤の製造における、請求項 1 で言及した t m - P T P 遺伝子の発現産物のレベルを調節する抗体、核酸またはポリペプチドの使用。

【請求項 21】

発現が、遺伝子、m R N A またはコードされるタンパク質への作用によって調節される、請求項 18 または請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

発現産物の発現レベルが上方調節されるまたは下方調節される、請求項 18 から 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

発現産物の発現レベルが少なくとも 2 倍の変化で上方調節されるまたは下方調節される、請求項 18 から 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

核酸が、アンチセンス構築物、リボザイムまたは R N A i である、請求項 18 から 23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

癌が、腫瘍増殖の阻害または腫瘍容積の減少によって治療される、請求項 18 から 24 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

癌が、癌細胞の浸潤性を低下させることによって治療される、請求項 18 から 25 のいずれかに記載の方法。

【請求項 27】

薬剤が放射線治療または化学療法と共に使用される、請求項 18 から 26 のいずれかに記載の方法。

【請求項 28】

放射線治療または化学療法を受けている患者において、請求項 1 で言及する t m - P T P 遺伝子の発現産物のレベルを調節する化合物を投与する工程。

【請求項 29】

検出または治療される癌の種類が、腎癌、肺癌、卵巣癌、膀胱癌、結腸癌、前立腺癌、乳癌または膀胱癌である、請求項 18 から 28 のいずれかに記載の方法。

【請求項 30】

患者からの生物学的試料において t m - P T P 発現産物の発現レベルを測定することを含む、患者を t m - P T P 調節抗体による治療に感受性であると特定するための方法。

【請求項 31】

最初の時点での t m - P T P 発現産物の発現レベルを 2 番目の時点での同じ発現産物の

10

20

30

40

50

発現と比較し、最初の時点と比較して２番目の時点での発現の上昇または低下が、癌関連遺伝子が関与する癌の進行の指標となる、請求項３０に記載の方法。

【請求項３２】

ａ）候補因子の存在下で請求項１において言及する癌関連遺伝子の発現産物の発現レベルを検出すること；および

ｂ）前記発現レベルを候補因子の不在下での発現レベルと比較し、発現の差が、候補因子が癌関連遺伝子の発現産物の発現レベルを調節することを示すことを含む、癌細胞の増殖を調節する候補因子を特定するためのアッセイ。

【請求項３３】

ａ）癌関連遺伝子を発現する細胞を候補因子と接触させること、および

ｂ）細胞への候補因子の作用を測定し、発現レベルの変化が、候補因子が発現を調節できることを示すこと

を含む、請求項１で言及する癌関連遺伝子の発現レベルを調節する因子を特定するための方法。

【請求項３４】

候補因子が、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体または有機低分子である、請求項３２または３３に記載の方法。

【請求項３５】

腎癌、肺癌、卵巣癌、膵癌、結腸癌、前立腺癌、乳癌または膀胱癌との相関を検出するために生物学的試料を  $t m - P T P$  遺伝子または発現産物に関してプローブする、請求項１に記載の方法。

【請求項３６】

$t m - P T P$  タンパク質の細胞外ドメイン（配列番号２）に特異的に結合する単離抗体。

【請求項３７】

$t m - P T P$  タンパク質の二量体化を誘導する、請求項３６に記載の抗体。

【請求項３８】

膀胱癌細胞、腎癌細胞または膵癌細胞の生存または増殖を阻害する、請求項３６または３７に記載の抗体。

【請求項３９】

モノクローナル抗体である、請求項３６に記載の抗体。

【請求項４０】

ヒト化抗体である、請求項３６に記載の抗体。

【請求項４１】

ヒト抗体である、請求項３６に記載の抗体。

【請求項４２】

$t m - P T P$  の細胞外ドメインに対して  $10^{-8}$  または  $10^{-9}$  M またはそれ未満の結合親和性を保持する、請求項３６から４１のいずれかに記載の抗体。

【請求項４３】

請求項３７に記載の抗体および医薬的に適切な担体、賦形剤または希釈剤を含有する医薬組成物。

【請求項４４】

第二の治療因子をさらに含有する、請求項４３に記載の医薬組成物。

【請求項４５】

第二の治療因子が癌化学療法剤である、請求項４４に記載の医薬組成物。

【請求項４６】

請求項３９に記載の抗体を治療有効量で投与する工程を含む、膀胱癌、腎癌または膵癌に罹患している被験者を治療する方法。

【請求項４７】

被験者が膀胱癌に罹患している、請求項４６に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 48】

被験者が腎癌に罹患している、請求項 46 に記載の方法。

## 【請求項 49】

被験者が膀胱癌に罹患している、請求項 46 に記載の方法。

## 【請求項 50】

膀胱癌、腎癌または膀胱癌からなる群より選択される癌の治療のための医薬の製造における請求項 39 に記載の抗体の使用。

## 【請求項 51】

癌が膀胱癌である、請求項 50 に記載の使用。

## 【請求項 52】

癌が腎癌である、請求項 50 に記載の使用。

## 【請求項 53】

癌が膀胱癌である、請求項 50 に記載の使用。

## 【請求項 54】

抗体が、Src キナーゼを脱リン酸化する tm - PTP タンパク質の能力を低下させる、請求項 46 に記載の方法。

## 【請求項 55】

抗体が、パキシリンリン酸化を誘導する tm - PTP タンパク質の能力を低下させる、請求項 46 に記載の方法。

## 【請求項 56】

抗体が tm - PTP タンパク質の二量体化を誘導する、請求項 46 に記載の方法。

## 【請求項 57】

a) 膀胱細胞、腎細胞または膀胱細胞と候補抗体を接触させること；  
b) 前記細胞の生存または増殖を検出すること；および  
c) 細胞の生存または増殖の低下が検出される場合、前記候補抗体を癌の治療のために有用な抗体として特定すること  
の工程を含む、癌の治療のために有用な tm - PTP タンパク質の細胞外ドメインに対する抗体をスクリーニングする方法。

## 【請求項 58】

前記細胞が、Hs700T、A498、H520 および DU145 からなる群より選択される、請求項 57 に記載の方法。

## 【請求項 59】

a) tm - PTP タンパク質またはそのフラグメントを候補抗体と接触させること；および  
b) 前記候補抗体の存在下で前記 tm - PTP タンパク質またはそのフラグメントの二量体化のレベルを検出すること  
の工程を含む、tm - PTP タンパク質またはそのフラグメントの二量体化を誘導する抗体をスクリーニングする方法。

## 【請求項 60】

候補抗体を細胞と接触させることおよび前記候補抗体の存在下で前記細胞の増殖を検出することの工程をさらに含む、請求項 59 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本願は、2005 年 4 月 7 日に出的した米国仮特許出願 60 / 669 , 856 および 2006 年 3 月 22 日に出的した米国仮特許出願 60 / 784 , 925 の利益を主張する。

## 【0002】

(技術分野)

本発明は、癌関連遺伝子の分野に属する。特に、tm - PTP 遺伝子またはこの遺伝子によってコードされるタンパク質の存在または不在に基づき、癌または癌を発症する可

10

20

30

40

50

能性を検出するための方法に関する。本発明はまた、 $t m - P T P$  遺伝子を上方調節するまたは下方調節するための方法および分子を提供する。加えて、本発明は、癌の治療のための方法および分子、ならびに癌の治療のために有用な分子をスクリーニングする方法を提供する。

#### 【背景技術】

#### 【0003】

##### (発明の背景)

癌遺伝子(オンコジーン)は、癌を引き起こし得る遺伝子である。発癌現象は、癌遺伝子を含むウイルスによる細胞の感染、宿主ゲノムにおける癌原遺伝子(癌遺伝子になる潜在的可能性を有する正常遺伝子)の活性化、および癌原遺伝子および癌抑制遺伝子の突然変異を含む、多種多様な機構によって起こり得る。発癌は基本的に体細胞進化(すなわち増殖制御の漸進的喪失による突然変異および変異体の自然選択によって駆動される。これらの体細胞突然変異の標的として働く遺伝子は、それらの突然変異体表現型が優性であるか劣性であるかに依存して、それぞれ癌原遺伝子または癌抑制遺伝子のいずれかに分類される。

10

#### 【0004】

ヒトならびに動物の癌に関与することが知られる数多くのウイルスが存在する。ここで特に興味深いのは、癌遺伝子自体を含まないウイルスである；これらは遅性トランスフォーマーレトロウイルスである。そのようなウイルスは、宿主ゲノムに組み込み、様々な方法で隣接癌原遺伝子に影響を及ぼすことによって腫瘍を誘発する。プロウイルス挿入突然変異はレトロウイルス生活環の通常の結果である。感染細胞では、レトロウイルスゲノムのDNAコピー(プロウイルスと呼ばれる)が宿主ゲノムに組み込まれる。新たに組み込まれたプロウイルスは、2つの機構のいずれかによって組み込み部位でまたはその近くでシスの遺伝子発現に影響を及ぼし得る。I型挿入突然変異は、プロウイルスロングターミナルリピート(LTR)内の調節配列(エンハンサーおよび/またはプロモーター)の結果として近位遺伝子の転写を上方調節する。遺伝子のイントロンまたはエクソン内に位置するII型挿入突然変異は、プロウイルスロングターミナルリピート(LTR)内の調節配列(エンハンサーおよび/またはプロモーター)の結果として前記遺伝子の転写を上方調節し得る。加えて、II型挿入突然変異は、オープンリーディングフレーム内への直接の組み込みまたは両側でコード配列に隣接するイントロンへの組み込みのいずれかの故にコード領域のランケーションを引き起こすことがあり、ランケート型または不安定な転写産物/タンパク質産物を導き得る。挿入部位またはその付近の配列の分析は、多くの新しい癌原遺伝子の特定を導いた。

20

30

#### 【0005】

リンパ腫および白血病に関して、AKVマウス白血病ウイルス(MLV)またはSL3-3MLVなどのレトロウイルスは、感受性新生児マウスに接種したとき、または生殖細胞系に担持されるとき腫瘍の強力な誘発物質である。挿入部位の分析によりリンパ腫や白血病の誘発に関連して配列番号が特定される。そのすべてが参照により明白にここに組み込まれる、非特許文献1；非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4；非特許文献5；および非特許文献6参照。癌、特に乳癌、前立腺癌および上皮起源の癌に関しては、哺乳動物レトロウイルスであるマウス乳腺癌ウイルス(MMTV)は、感受性新生児マウスに接種したとき、または生殖細胞系に担持されるとき腫瘍の強力な誘発物質である。Mammary Tumours in the Mouse: J. Hilgers and M. Sluyser; Elsevier/North-Holland Biomedical Press; New York, N.Y. 編集。

40

#### 【0006】

特定生細胞における遺伝子発現のパターンは、その現在の状態の特徴である。細胞の状態または型におけるほぼすべての相違が、1またはそれ以上の遺伝子のRNAレベルの相違に反映される。特性決定されていない遺伝子の発現パターンを比較することは、それらの機能への手がかりを与え得る。数百または数千個の遺伝子の発現のハイスループット分

50

析は、(a)複雑な遺伝病の特定、(b)組織と疾患状態の間での、経時的な識別的遺伝子発現の分析、および(c)薬剤発見と毒性試験において役立ち得る。ある遺伝子の発現レベル上昇または低下は癌生物学と相関する。たとえば癌遺伝子は腫瘍発生の正の調節因子であり、一方癌抑制遺伝子は腫瘍発生の負の調節因子である(非特許文献7)。

#### 【0007】

免疫療法、または治療目的のための抗体の使用は、近年、癌を治療するために用いられてきた。受動免疫療法は、癌の治療におけるモノクローナル抗体の使用を含む。たとえば非特許文献8参照。これらの抗体の固有の治療上の生物学的活性は、腫瘍細胞の増殖または生存の直接阻害および身体の免疫系の天然の細胞致死作用を動員する能力を含む。これらの物質は、単独であるいは照射または化学療法剤と共に投与される。それぞれリンパ腫および乳癌の治療に関して承認された、Rituxan(登録商標)およびHerceptin(登録商標)はそのような治療薬の2つの例である。あるいは、抗体は、抗体が毒性物質に結合し、腫瘍に特異的に結合することによってその物質を腫瘍へと向かわせる、抗体複合体を作製するために使用される。Mylotarg(登録商標)は、白血病の治療のために使用される承認された抗体複合体の一例である。しかしこれらの抗体は、原因ではなく腫瘍そのものを標的する。

10

#### 【0008】

抗癌治療のためのよりよいアプローチは、癌を引き起こし得る癌原遺伝子を標的することである。これを行うためには、最初に癌原遺伝子を特定しなければならない。ひとたびこれらの遺伝子が特定されれば、癌の発症を検出するためにそれらを監視することができ、その後癌を治療するためにそれらを標的することができる。

20

#### 【0009】

PTPはタンパク質チロシンホスファターゼ(PTP)ファミリーの成員である。PTPの5個の選択的スプライシング転写産物変異体が報告されており(図5)、そのうちの1個は、短い細胞外ドメイン、1個の膜貫通領域、および2個の縦列細胞質内触媒ドメインを有する受容体型PTP(tm-PTP)をコードする。その他の4個のスプライシング変異体は異なる親水性N末端を含むPTPをコードし、それゆえPTPの細胞質アイソフォーム(cyt-PTP)である。cyt-PTP発現は主として造血組織(脾臓、胸腺および腹腔内マクロファージ)に限定され、一方tm-PTPは肺、脳、副腎および精巣において発現される。

30

#### 【0010】

マウスを用いた試験は、RAS関連シグナル伝達経路、サイトカイン誘導性SATASシグナル伝達、ならびに電位依存性カリウムチャネルの活性化におけるPTPの調節的役割を示唆する。

#### 【0011】

CD45(非特許文献9)およびPTPR(非特許文献10)などの他のPTPの作用機構に基づき、tm-PTPホモ二量体化はその生物学的機能を阻害するという仮説が立てられる。tm-PTPは、阻害性p-Tyrを脱リン酸化することによってSrc、FynおよびYesを活性化する。tm-PTPのホモ二量体化はその生物学的機能を阻害すると提案される。tm-PTPリガンドはまだ特定されていない。

40

#### 【0012】

tm-PTPは、rasまたはneuによって特異的に開始される(c-myc、int-2またはヘレグリンによって開始されない)マウス乳腺腫瘍において上方調節されることが知られており、tm-PTPがこれらの2つの癌遺伝子による形質転換において役割を果たし得ることを示唆する。乳房上皮において高レベルのtm-PTPを発現するトランスジェニックマウスは、著明で持続性の乳腺過形成を一樣に発現した。孤立性乳腺腫瘍が乳腺過形成に続発してしばしば検出された。腫瘍の散発性、それらの発現までの長い潜伏期間、および腫瘍における低レベルの導入遺伝子発現は、著者を、tm-PTPが腫瘍形成のために必要であるが十分ではないシグナルを与えるという結論へと導いた(非特許文献11)。cyt-PTPは、v-Ha-rasまたはHer-2によ

50

って開始されるマウス乳腺腫瘍においては発現されない。

【非特許文献1】Sorensen et al, J. Virology 74: 2161 (2000);

【非特許文献2】Hansen et al, Genome Res. 10(2): 237-43 (2000);

【非特許文献3】Sorensen et al, J. Virology 70: 4063 (1996);

【非特許文献4】Sorensen et al, J. Virology 67: 7118 (1993);

【非特許文献5】Joosten et al, Virology 268: 308 (2000); 10

【非特許文献6】Li et al, Nature Genetics 23: 348 (1999)

【非特許文献7】Marshall, Cell, 64: 313-326 (1991); Weinberg, Science, 254: 1138-1146 (1991)

【非特許文献8】Cancer: Principles and Practice of Oncology, 6th Edition (2001) Chapt. 20 pp. 495-508

【非特許文献9】Majeti et al. Science (1998), 279: 88-91) 20

【非特許文献10】PTPR (Jiang et al. Nature (1999), 401: 606-610

【非特許文献11】Elson A. Oncogene. 1999 Dec 9; 18(52): 7535-42

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0013】

(発明の要旨)

マウスモデルを使用して癌原遺伝子を単離するために、挿入突然変異機構によって作用する遅性トランスフォーミングレトロウイルスを用いる、「プロウイルスタギング」として知られる工程によって癌原遺伝子がヒトにおいて特定された。一部のモデルでは、非感染動物は癌の割合が低く、感染動物は高い癌罹患率を有する。関与するレトロウイルスの多くが、形質導入された宿主癌原遺伝子または病原性トランス作用性ウイルス遺伝子を担持しないことは公知であり、それゆえ癌発生率は宿主癌原遺伝子へのプロウイルス組み込みの影響の直接結果であるに違いない。プロウイルス組み込みはランダムであるため、ごくまれな組み込み体を選択増殖の有利性を提供する宿主癌原遺伝子を「活性化し」、これらのまれな事象が、腫瘍におけるクローン化学量論で新しいプロウイルスを生じさせる。化学物質、放射線または自然発生的エラーによって引き起こされる突然変異と異なり、癌減遺伝子挿入突然変異は、公知配列の好都合な大きさの遺伝子マーカー（プロウイルス）が突然変異部位に存在するという事実により、容易に局在化できる。クローン的に組み込まれたプロウイルスに隣接する宿主配列は様々な戦略を用いてクローン化することができる。ひとたびこれらの配列が得られれば、その後、標識された癌原遺伝子を特定することができる。2またはそれ以上の独立した腫瘍の同じ遺伝子座におけるプロウイルスの存在は、癌原遺伝子がプロウイルス組み込み部位またはそのごく近くに存在することの一応の証拠である (Kim et al, Journal of Virology, 2003, 77: 2056-2062; Mikkers, H and Berns, A, Advances in Cancer Research, 2003, 88: 53-99; Keoko et al. Nucleic Acids Research, 2004, 32: D523-D527)。これは、ゲノムがランダムな組み込みには大きすぎて、観察可能なクラスター形成を生じないためである。検出されるいかなるクラスター形成も、生物学的選択 ( 30 40 50



すなわち腫瘍表現型)についての明確な証拠である。さらに、プロウイルス組込み体のパターン(方向を含む)は、各々のクラスターの標的遺伝子の局在化を比較的簡単に、強力な位置情報を提供する。挿入突然変異機構によって癌を引き起こすことが知られる3つの哺乳動物レトロウイルスは、F e L V (ネコにおける白血病/リンパ腫)、M L V (マウスおよびラットにおける白血病/リンパ腫)およびM M T V (マウスにおける乳腺癌)である。

#### 【0014】

そこで、その配列が宿主生物のゲノムに挿入されて癌を生じさせる、癌原性レトロウイルスの使用は、癌に関与する宿主遺伝子の特定を可能にする。これらの配列は、その後、診断、予後判定、調節剤(アゴニストおよびアンタゴニストの両方を含む)のスクリーニング、抗体作製(免疫療法および画像化のため)等を含む、数多くの異なる方法で使用し得る。しかし、当業者に認識されるように、リンパ腫または白血病などの1つの型の癌で特定される癌遺伝子は、他の型の癌にも関与する可能性が非常に高い。

10

#### 【0015】

本発明は、それゆえ、t m - P T P 遺伝子の配列または発現レベルを決定することを含む、生物学的試料において癌細胞を検出するための方法を提供する。

#### 【0016】

この遺伝子は、ここで述べる方法を用いて癌原遺伝子として特定され、確認された。

#### 【0017】

我々は、t m - P T P を、腎癌(腎細胞癌、明細胞癌)、肺癌(非小細胞癌)、膵癌(膵臓の腺癌、腺管癌、膵島細胞癌および粘液性嚢胞癌)および膀胱癌(浸潤性膀胱癌)の治療および診断のための細胞膜関連標的であると特定した。

20

#### 【0018】

ラット細胞において実施した軟寒天アッセイの結果によってさらなる証拠が提供され、そのアッセイでは、t m - P T P の発現が細胞の増殖を上昇させることが示された。

#### 【0019】

R a t - 1細胞系において実施した腫瘍発生能アッセイの形態でさらなる証拠が提供され、そのアッセイでは、t m - P T P 遺伝子のトランスフェクションが腫瘍発生能の著明な上昇を生じさせることが示される。

#### 【0020】

ここで述べる系では、t m - P T P 遺伝子はM M T VおよびM L Vプロウイルスの1型およびI I型組込みを受け、8例で組込みが認められた。この遺伝子はまた、患者の組織試料を用いて、採取した腎癌組織の80%においておよび採取した膵癌組織の85%においてm R N Aレベルで過剰発現されることが認められた。これは我々に、この遺伝子が腎癌および膵癌と関連し、それゆえこれらの疾患の診断および治療のための標的であることを推論させる。

30

#### 【0021】

加えて、様々な癌性および非癌性組織型に関する免疫組織化学アッセイは、この遺伝子が腎細胞癌、明細胞癌、非小細胞癌、膵臓の腺癌、腺管癌、膵島細胞癌、粘液性嚢胞癌および浸潤性膀胱癌において過剰発現されることを明らかにした。これは我々に、この遺伝子がこの型の癌とも関連し、それゆえこれらの疾患の診断および治療のための標的であると結論させる。

40

#### 【0022】

発明人はこの理論に縛られることを望まないが、癌を生じさせる細胞増殖におけるt m - P T P の役割はv - H a - r a sまたはn e uの調節を含むと主張する。この理論によれば、t m - P T P タンパク質に対する抗体またはアンタゴニスト、またはt m - P T P 発現を調節する分子を利用した腎癌および/または膵癌の治療の方法は、好ましくはv - H a - r a sおよび/またはn e uの活性化の低下を導く。また、t m - P T P のホモ型二量体化がその生物学的機能を阻害することも仮定される(図6)。この理論によれば、t m - P T P タンパク質に対する抗体またはアンタゴニスト、またはt m - P

50

T P 発現を調節する分子を利用した腎癌、肺癌、卵巣癌、膵癌、結腸癌、前立腺癌、乳癌および/または膀胱癌の治療の方法は、好ましくは t m - P T P 単量体の二量体化を導くおよび/または t m - P T P 二量体の単量体への解離を低下させる。

【0023】

好ましくは、方法は、t m - P T P 遺伝子の1またはそれ以上(すなわち1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上)の発現産物のレベルを測定する工程を含み、対照レベルと異なる発現レベルが疾患を指示する。

【0024】

発現産物は、好ましくはタンパク質であるが、選択的にmRNA発現産物も検出し得る。タンパク質を使用する場合、タンパク質は、好ましくはそのタンパク質に特異的に結合する抗体によって検出される。「特異的に結合する」という用語は、抗体が他の関連ポリペプチドに対するそれらの親和性よりも実質的に大きい親和性をそれらの標的ポリペプチドに対して有することを意味する。好ましくは、抗 t m - P T P 抗体は t m - P T P に特異的であり、P T Pファミリーの他の成員およびP T P の関連スプライシング変異体と交差反応しない。抗 t m - P T P 抗体は、t m - P T P のすべてのスプライシング変異体、欠失、付加および/または置換突然変異体に結合し得る。抗 t m - P T P 抗体は、t m - P T P 細胞外ドメインに特異的であり得る。

【0025】

癌関連 t m - P T P タンパク質は癌細胞上または癌細胞内で発現されるため、抗体は癌関連 t m - P T P タンパク質に特異的であり得る。たとえば癌細胞上で発現された癌関連タンパク質におけるグリコシル化パターンは、非癌細胞上で発現されたこれらの同じタンパク質におけるグリコシル化のパターンとは異なり得る。

【0026】

ここで使用する、「抗体」という用語は、対象とする抗原決定基に結合することができる、無傷分子ならびにF a b、F ( a b ' )<sub>2</sub> およびF vなどのそのフラグメントを指す。抗体のさらなる例は、完全構築された抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(たとえば二重特異性抗体)、一本鎖抗体、ダイアボディ、および所望生物学的活性(たとえば t m - P T P の細胞外ドメインへの結合)を示すことを条件として前記を含む組換えペプチドを含む。「実質的により大きな親和性」とは、他の関連ポリペプチドに対する親和性と比較して、本発明の標的ポリペプチドに対する親和性の測定可能な上昇が存在することを意味する。親和性は、他の公知のホモログまたはオーソログの親和性と比較して、標的ポリペプチドに対して少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、100倍、10<sup>3</sup>倍、10<sup>4</sup>倍、10<sup>5</sup>倍、10<sup>6</sup>倍またはそれ以上である。あるいは、抗体が公知のホモログまたはオーソログと交差反応することは有用であり得る。

【0027】

好ましくは、抗体は、高い親和性で、好ましくは10<sup>-4</sup> M、10<sup>-5</sup> M、10<sup>-6</sup> Mまたはそれ以下、好ましくは10<sup>-7</sup> M、10<sup>-8</sup> Mまたはそれ以下、最も好ましくは10<sup>-9</sup> Mまたは10<sup>-10</sup> Mまたはそれ以下の解離定数で t m - P T P に結合する; サブナノモルの親和性(0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 n Mまたはさらにはそれ以下)が好ましい。

【0028】

mRNA発現産物を使用する場合、mRNA発現産物は、好ましくは、mRNAとプローブの間でハイブリッド複合体の形成を可能にするストリンジェントな条件下で組織試料をプローブと接触させること; および複合体の形成を検出すること、の工程によって検出される。

【0029】

癌関連遺伝子自体は、t m - P T P 遺伝子をコードする核酸発現産物とプローブの間でハイブリッド複合体の形成を可能にするストリンジェントな条件下で生物学的試料を核酸プローブと接触させること; および生物学的試料からプローブと核酸の間の複合体の形成を検出すること、によって検出し得る。そのような場合、複合体の形成が存在しないこ

10

20

30

40

50

とは、好ましくは t m - P T P 遺伝子の配列内の突然変異を指示する。

【 0 0 3 0 】

好ましい方法は、形成された複合体の量を、対照組織を使用したときに形成される量と比較することを含み、対照と試料の間での形成複合体の量の差が癌の存在を指示する。好ましくは、正常組織と比較して試験組織によって形成される複合体の量の差は、上昇または低下である。より好ましくは、形成複合体の量の 2 倍の上昇または低下が疾患を指示する。さらに一層好ましくは、形成複合体の量の 3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍またはさらには 100 倍の上昇または低下が疾患を指示する。

【 0 0 3 1 】

本発明の方法において使用される生物学的試料は、好ましくは組織試料である。いかなる組織試料も使用し得る。好ましくは、しかしながら、組織は腎組織、肺組織、膵臓組織または膀胱組織から選択される。

【 0 0 3 2 】

本発明はまた、最初の時点での生物学的試料における上記で言及した t m - P T P 遺伝子の 1 またはそれ以上（すなわち 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 またはそれ以上）の発現産物の発現を、2 番目の時点での同じ発現産物の発現と比較することを含み、最初の時点に比べて 2 番目の時点での発現の上昇または低下あるいは発現上昇または低下の割合の上昇または低下が癌の進行を指示する、患者における癌の進行を評価するための方法を提供する。

【 0 0 3 3 】

本発明はまた、t m - P T P 遺伝子のポリペプチド発現産物に結合する抗体；および前記抗体と前記ポリペプチドの間の結合反応の検出のために有用な試薬を含む、癌を診断するために有用なキットを提供する。好ましくは、抗体は t m - P T P ポリペプチドに特異的に結合する。

【 0 0 3 4 】

さらに、本発明は、ストリンジェントな条件下で t m - P T P 遺伝子にハイブリダイズする核酸プローブ；t m - P T P 遺伝子を増幅するために有用なプライマー；および場合により、疾患の診断を容易にするためにプローブとプライマーを使用するための指示書を含む、癌を診断するために有用なキットを提供する。

【 0 0 3 5 】

本発明はさらに、癌の治療における使用のための、t m - P T P 遺伝子の発現産物の発現を調節する上での使用に適した抗体、核酸またはタンパク質を提供する。

【 0 0 3 6 】

従って、本発明は、上記で列挙した t m - P T P 遺伝子の 1 またはそれ以上（すなわち 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 またはそれ以上）の発現産物のレベルを調節することを含む、患者において癌を治療するための方法を提供する。そのような方法は、好ましくは、前記発現産物のレベルを調節する抗体、核酸またはポリペプチドを治療上有効な量で患者に投与することを含む。

【 0 0 3 7 】

本発明は、それゆえまた、癌の治療または診断のための医薬の製造における、t m - P T P 遺伝子の発現産物のレベルを調節する抗体、核酸またはポリペプチドの使用を提供する。そのような発現レベルは、好ましくは遺伝子、m R N A またはコードされるタンパク質への作用によって調節される。発現は、好ましくは上方調節または下方調節される。たとえば調節の変化は、2 倍、3 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、さらには 100 倍またはそれ以上であり得る。

【 0 0 3 8 】

癌関連タンパク質は癌細胞上または癌細胞内で発現されるため、本発明に従った使用に適する抗体は癌関連タンパク質に特異的であり得る。たとえば癌細胞上で発現された癌関連タンパク質におけるグリコシル化パターンは、非癌細胞上で発現されたこれらの同じタンパク質におけるグリコシル化のパターンとは異なり得る。好ましくは、そのような状況

10

20

30

40

50

において、本発明に従った抗体は、癌細胞上で発現された癌関連タンパク質に対してのみ特異的である。これは治療用抗体に関して特に価値がある。

【0039】

本発明に従った治療用途に適する抗体は、好ましくは抗体依存性細胞傷害（ADCC）を惹起するために有効であり得る。ADCCは、Fc受容体を発現する非特異的細胞傷害性細胞が標的細胞上の結合抗体を認識し、その後標的細胞の溶解を生じさせる、細胞媒介性反応を指す（Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290）。本発明に従った治療用途に適する抗体は、好ましくは抗体依存性細胞媒介性食作用（ADCP）を惹起するために有効であり得る。ADCPは、Fc受容体を発現する非特異的細胞傷害性細胞が標的細胞上の結合抗体を認識し、その後食作用を生じさせる、細胞媒介性反応である。これらの工程は、それらの表面にIgG抗体のFc部分についての受容体を有する、ナチュラルキラー（NK）細胞によって媒介される。IgGが、癌細胞を含む「外来性」膜結合細胞上のエピトープに対して作製されるとき、抗体のFab部分は癌細胞と反応する。NK細胞が、次に、抗体のFc部分に結合する。

10

【0040】

好ましくは、本発明に従った治療用途のための抗体は、ADCCを惹起するために有効であり、標的に結合し、ADCC活性を有することによって癌細胞の生存を調節する。抗体は、ADCC活性を高めるように遺伝子工作することができる（たとえば米国特許第20050054832A1号、Xencor Inc. およびその中で引用される資料参照）。

20

【0041】

そのような方法において使用される核酸型は、好ましくはアンチセンス構築物、リボザイムまたはRNAi、特にsiRNAである。

【0042】

癌は、腫瘍増殖の抑制または腫瘍容積の低減によって、あるいは癌細胞の浸潤性を低下させることによって治療し得る。一部の実施形態では、上述した治療の方法は、手術、ホルモン除去療法、放射線治療または化学療法の1またはそれ以上と組み合わせて使用される。たとえば患者が既に化学療法を受けている場合、上記に列挙した発現産物のレベルを調節する本発明の化合物も投与し得る。化学療法剤、ホルモン剤および/または放射線治療剤および本発明に従った化合物を同時に、別々にまたは連続的に投与し得る。

30

【0043】

好ましくは、上述した方法の1つに従って検出または治療される癌は、腎癌、膵癌、肺癌または膀胱癌から選択される。

【0044】

本発明はまた、その患者からの生物学的試料において癌関連遺伝子発現産物の発現レベルを測定することを含む、患者を癌関連抗原調節抗体による治療に対して感受性と特定するための方法を提供する。

40

【0045】

さらに、本発明は、最初の時点での癌関連遺伝子発現産物の発現レベルを、2番目の時点での同じ発現産物の発現と比較し、最初の時点に比べて2番目の時点での発現の上昇または低下が、癌関連遺伝子が関係する癌の進行を指示する、患者を癌関連抗原調節抗体による治療に対して感受性と特定するための方法を提供する。

【0046】

本発明はまた、その患者からの生物学的試料においてtm-PTP 発現産物の発現レベルを測定することを含む、患者をtm-PTP 調節抗体による治療に対して感受性と特定するための方法を提供する。

【0047】

50

さらに、本発明は、最初の時点での癌関連遺伝子発現産物の発現レベルを、2番目の時点での同じ発現産物の発現と比較し、最初の時点に比べて2番目の時点での発現の上昇または低下が、癌関連遺伝子が関係する癌の進行を指示する、患者を癌関連抗原調節抗体による治療に対して感受性と特定するための方法を提供する。2つの時点の間の上昇または低下は、2倍、3倍、5倍、10倍、20倍、50倍、さらには100倍またはそれ以上であり得る。

【0048】

本発明はさらに、その患者からの生物学的試料において t m - P T P 発現産物の発現レベルを測定することを含む、患者を t m - P T P 調節抗体による治療に対して感受性と特定するための方法を提供する。そのような方法では、最初の時点での t m - P T P 発現産物の発現レベルを、2番目の時点での同じ発現産物の発現と比較し、最初の時点に比べて2番目の時点での発現の上昇または低下が、癌関連遺伝子が関係する癌の進行を指示する、患者を t m - P T P 調節抗体による治療に対して感受性と特定するための方法を提供する。

10

【0049】

本発明はさらに、

a) 候補因子の存在下で、本発明の上述した実施形態のいずれかにおいて列挙した t m - P T P 遺伝子の1またはそれ以上(すなわち1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上)の発現のレベルを検出すること;および

b) 前記発現レベルを候補因子の不在下での発現レベルと比較して、発現の差が、候補因子が t m - P T P 遺伝子の発現産物の発現レベルを調節することを示唆することを含む、癌細胞の増殖を調節する候補因子を特定するためのアッセイを提供する。

20

【0050】

本発明はまた、

本発明の上述した実施形態のいずれかにおいて定義した t m - P T P 遺伝子を発現する細胞を候補因子と接触させること、および

細胞への候補因子の作用を測定し、発現レベルの変化が、候補因子が発現を調節できることを示唆すること

を含む、 t m - P T P 遺伝子の発現レベルを調節する物質を特定するための方法を提供する。好ましくは、このアッセイのために使用する細胞は、 t m - P T P タンパク質が癌を引き起こす上で役割を有すると関係づけられる細胞型に属する。

30

【0051】

好ましくは、前記物質はポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体または有機低分子である。

【0052】

1つの実施形態では、本発明は、 t m - P T P タンパク質の細胞外ドメイン(配列番号2)に特異的に結合する単離抗体を提供する。もう1つの実施形態では、抗体は t m - P T P タンパク質の二量体化を誘導する。さらにもう1つの実施形態では、抗体は、膀胱、腎または膵癌細胞の生存または増殖を阻害する。さらにもう1つの実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である。もう1つの実施形態では、抗体は、 $10^{-8}$  Mまたは $10^{-9}$  Mまたはそれ以下の t m - P T P の細胞外ドメインへの結合親和性(より高い結合親和性)を保持する。

40

【0053】

本発明のもう1つの実施形態では、本発明に従った前記抗体および医薬的に適切な担体、賦形剤または希釈剤を含有する医薬組成物が提供される。もう1つの実施形態では、医薬組成物は第二の治療因子をさらに含む。さらにもう1つの実施形態では、第二の治療因子は癌化学療法剤である。

【0054】

本発明のさらにもう1つの実施形態では、前記抗体を治療上有効な量で投与する工程を含む、膀胱、腎または膵癌に罹患している被験者を治療する方法が提供される。もう1つ

50

の実施形態では、被験者は膀胱癌、腎癌または膵癌に罹患している。もう1つの実施形態では、抗体は、Srcキナーゼを脱リン酸化するtm-PTPタンパク質の能力を低下させ、パキシリンリン酸化を誘導するtm-PTPタンパク質の能力を低下させ、および/またはtm-PTPタンパク質の二量体化を誘導する。

【0055】

さらにもう1つの実施形態では、本発明は、膀胱、腎または膵癌からなる群より選択される癌の治療のための医薬の製造における前記抗体の使用を提供する。

【0056】

さらにもう1つの実施形態では、本発明は、a)膀胱、腎または膵細胞と候補抗体を接触させること；b)細胞の生存または増殖を検出すること；およびc)細胞の生存または増殖の低下が検出される場合、候補抗体を癌の治療のために有用な抗体と特定すること、の工程を含む、癌の治療のために有用なtm-PTPタンパク質の細胞外ドメインに対する抗体をスクリーニングする方法を提供する。もう1つの実施形態では、前記細胞は、Hs700T、A498、H520およびDU145からなる群より選択される。さらにもう1つの実施形態では、細胞は、tm-PTPの細胞外ドメインを容易に検出可能に発現する何らかの細胞である。

【0057】

さらにもう1つの実施形態では、本発明は、a)tm-PTPタンパク質またはそのフラグメントを候補抗体と接触させること；およびb)前記候補抗体の存在下で、tm-PTPタンパク質またはそのフラグメントの二量体化のレベルを検出すること、の工程を含む、tm-PTPタンパク質またはそのフラグメントの二量体化を誘導する抗体をスクリーニングする方法を提供する。もう1つの実施形態では、前記方法は、候補抗体を細胞と接触させることおよび前記候補抗体の存在下で細胞の増殖を検出すること、の工程をさらに含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0058】

(詳細な説明)

本発明は、tm-PTPが癌の発生に関係することを同定する。この遺伝子を、それゆえ、「tm-PTP遺伝子」(配列番号1)と称する。そこで、この遺伝子によってコードされるtm-PTPポリペプチド(たとえば配列番号2)を「癌関連ポリペプチド」または「癌関連タンパク質」と称する。これらの癌関連ポリペプチドをコードする核酸配列を「癌関連ポリヌクレオチド」と称する。tm-PTP遺伝子をコードするおよび/または発現する細胞を「癌関連細胞」と称する。tm-PTP遺伝子をコードする細胞を、「癌関連遺伝子型」を有すると言う。癌関連タンパク質を発現する細胞を、「癌関連表現型」を有すると言う。「癌関連配列」は、tm-PTP遺伝子に由来するポリペプチドおよびポリヌクレオチド配列の両方を指す。「癌関連核酸」は、tm-PTP遺伝子を含むDNA、ならびにその遺伝子に由来するmRNAおよびcDNAを包含する。

【0059】

これに関して「関連」とは、ヌクレオチドまたはタンパク質配列が、正常組織と比較して癌において区別的に発現される、活性化される、不活性化されるまたは変化していることを意味する。以下で概説するように、癌関連配列は、癌において上方調節される(すなわちより高いレベルで発現される)もの、ならびに下方調節される(すなわちより低いレベルで発現される)ものを含む。癌関連配列はまた、変化した配列(すなわちトランケート型配列または点突然変異を含む、置換、欠失または挿入を有する配列)を含み、同じ発現プロファイルまたは変化したプロファイルを示す。一般に、癌関連配列はヒトからである；しかし、当業者に認識されるように、他の生物からの癌関連配列は、疾患の動物モデルおよび薬剤評価において有用であり得る；それゆえ、他の癌関連配列は、げっ歯動物(ラット、マウス、ハムスター、モルモット等)、霊長動物および家畜(ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ等)を含む哺乳動物を含む、脊椎動物から特定し得る。一部の場合、原核

生物癌関連配列が有用であり得る。他の生物からの癌関連配列は、以下で概説する手法を用いて入手し得る。

#### 【 0 0 6 0 】

癌関連配列は組換え核酸を含む。ここでは「組換え核酸」という用語により、一般に、自然界では通常認められない形態で、ポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼによる核酸の操作によって最初にインビトロで形成された核酸を意味する。それゆえ組換え核酸はまた、線状形態の単離核酸であるか、または通常は連結されていないDNA分子を連結することによってインビトロで形成されるベクターにクローニングされており、どちらも本発明のためには組換え体とみなされる。ひとたび組換え核酸が作製され、宿主細胞または生物に再導入されれば、インビトロ操作ではなく宿主細胞のインビボ細胞機構を用いて複製することは了解される；しかし、そのような核酸は、いったん組換えによって生産されれば、その後インビボで複製しても、本発明のためにはやはり組換えまたは単離とみなされる。ここで使用する「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、何らかの長さのヌクレオチドの重合体である。この用語は分子の一次構造だけを指す。それゆえ、この用語は二本鎖および一本鎖DNAおよびRNAを含む。この用語はまた、公知の種類の修飾、たとえば当技術分野で公知の標識、メチル化、「キャップ」、天然に生じるヌクレオチドの1またはそれ以上の類似体による置換、たとえば非荷電結合を有するもの（たとえばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）、たとえばタンパク質（たとえばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リシン等を含む）などのペンダント部分を含むもの、インターカレート剤を有するもの（たとえばアクリジン、プソラレン等）、キレート化剤を含むもの（たとえば金属、放射性金属等）、アルキル化剤を含むもの、修飾結合を有するもの（たとえばアノマー核酸等）などの、ヌクレオチド間修飾、ならびに非修飾形態のポリヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 6 1 】

ここで使用する、指定配列「に由来する」ポリヌクレオチドは、指定ヌクレオチド配列の領域に対応するおよそ少なくとも約6ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約8ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約10 - 12ヌクレオチド、さらに一層好ましくは少なくとも約15 - 20ヌクレオチドの配列からなるポリヌクレオチド配列を指す。「対応する」とは、指定配列に相同または相補的であることを意味する。好ましくは、ポリヌクレオチドが由来する領域の配列は、tm - PTP 遺伝子に固有の配列に相同または相補的である。

#### 【 0 0 6 2 】

「組換えタンパク質」は、組換え手法を用いて、すなわち上述したような組換え核酸の発現を通して作製されるタンパク質である。組換えタンパク質は、少なくとも1またはそれ以上の特徴によって天然に生じるタンパク質と区別される。たとえば前記タンパク質は、その野生型宿主において通常結合している一部またはすべてのタンパク質および化合物から単離または精製されており、それゆえ実質的に純粋であり得る。たとえば単離タンパク質は、好ましくは所与の試料中の総タンパク質の少なくとも約0.5重量%、より好ましくは少なくとも約5重量%を構成する、その天然の状態で通常結合している物質の少なくとも一部を伴わない。実質的に純粋なタンパク質は、総タンパク質の約50 ~ 75重量%を構成し、約80%が好ましく、約90%が特に好ましい。この定義は、ある生物からの癌関連タンパク質の異なる生物または宿主細胞における生産を含む。あるいはタンパク質は、タンパク質が高濃度レベルで生産されるように誘導的プロモーターまたは高発現プロモーターの使用を通して、通常見られるよりも有意に高い濃度で生産され得る。あるいはタンパク質は、以下で論じるような、エピトープタグの付加またはアミノ酸置換、挿入および欠失のように、自然界では通常認められない形態であり得る。

#### 【 0 0 6 3 】

ここで使用する、「タグ」、「配列タグ」または「プライマータグ配列」という用語は、そのようなタグを担持するポリヌクレオチドのバッチを特定するのに役立つ特定核酸配

列を有するオリゴヌクレオチドを指す。同じ生物学的ソースからのポリヌクレオチドは、その後の分析においてその起源ソースに従ってポリヌクレオチドが特定できるように、特定配列タグで共有結合標識される。配列タグはまた、核酸増幅反応のためのプライマーとしても役立つ。

#### 【0064】

「マイクロアレイ」は、固体支持体の表面に形成された、各々が定義された面積を有する、好ましくは離れた不連続な領域の線形または二次元アレイである。マイクロアレイ上の別々の領域の密度は、固相支持体の表面で検出される標的ポリヌクレオチドの総数によって決定され、好ましくは少なくとも約  $50 / \text{cm}^2$ 、より好ましくは少なくとも約  $100 / \text{cm}^2$ 、さらに一層好ましくは少なくとも約  $500 / \text{cm}^2$ 、なお一層好ましくは少なくとも約  $1,000 / \text{cm}^2$  である。ここで使用する、DNA マイクロアレイは、標的ポリヌクレオチドを増幅するまたはクローン化するために使用される、チップまたは他の表面に置かれたオリゴヌクレオチドプライマーのアレイである。アレイ内のプライマーの各特定群の位置は既知であるため、標的ポリヌクレオチドの同一性は、マイクロアレイ内の特定位置へのそれらの結合に基づいて決定することができる。

10

#### 【0065】

「リンカー」は、制限部位を含む合成オリゴデオキシリボヌクレオチドである。リンカーは、その後のベクター分子へのフラグメントのクローニングにおいて使用できる制限部位を作製するために DNA フラグメントの末端に平滑末端連結し得る。

20

#### 【0066】

「標識」という用語は、検定試料における標的ポリヌクレオチドの存在を指示する検出可能なシグナルを生じることができる組成物を指す。適切な標識は、放射性同位体、ヌクレオチド発色団、酵素、基質、蛍光分子、化学発光部分、磁性粒子、生物発光部分等を含む。標識は、それ自体、顕微鏡的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、化学的、または他の何らかの適切な手段によって検出し得る何らかの組成物である。「標識」という用語は、検出可能な物理的性質を有する何らかの化学基または部分、または基質の検出可能な生成物への変換を触媒する酵素などの、化学基または部分が検出可能な物理的性質を示すようにすることができる何らかの化合物を指すために使用される。「標識」という用語はまた、特定の物理的性質の発現を阻害する化合物を包含する。標識はまた、他方の成員が検出可能な物理的性質を担持する、結合対の成員である化合物であり得る。

30

#### 【0067】

「支持体」という用語は、ビーズ、粒子、ディップスティック、繊維、フィルター、膜、およびスライドガラスなどのシランまたはシリケート支持体などの従来の支持体を指す。

#### 【0068】

「増幅する」という用語は、試料中の標的分子の存在によって作製される、たとえば付加的な標的分子、または標的様分子または標的分子に相補的な分子を含み得る増幅産物を作製することを意味するために広い意味で使用される。標的が核酸である状況では、増幅産物は、DNA または RNA ポリメラーゼまたは逆転写酵素で酵素的に作製することができる。

40

#### 【0069】

ここで使用する、「生物学的試料」という用語は、たとえば血液、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、皮膚、気道、腸管および尿生殖路、涙、唾液、乳、細胞（血球を含むがこれに限定されない）、腫瘍、器官を含むがこれらに限定されない、個体から単離された組織または体液の試料、およびまたインビトロ細胞培養成分の試料を指す。

#### 【0070】

ここで使用する「生物学的ソース」という用語は、標的ポリヌクレオチドが由来するソースを指す。ソースは、細胞、組織または体液を含むがこれらに限定されない、上述した「試料」の何らかの形態であり得る。「異なる生物学的ソース」は、同じ個体の異なる細

50



胞／組織／器官、または同じ種の異なる個体からの細胞／組織／器官、または異なる種からの細胞／組織／器官を指すことができる。

#### 【 0 0 7 1 】

( 癌関連遺伝子 )

「 t m - P T P 」とは、ここでは、アクセッション番号 N M \_ 0 0 6 5 0 4 の下で参照される m R N A を有し、アクセッション番号 N P \_ 0 0 6 4 9 5 の下で参照されるポリペプチドをコードする、 N C B I 公的データベースにおいて遺伝子座 I D 5 7 3 1 によって参照される遺伝子「タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体型 ( 膜貫通スプライシング変異体 )」を意味する。

#### 【 0 0 7 2 】

この遺伝子は M L V プロウイルスの I I 型組込みを受け、4例で組込みが認められた。この結果は、この分野において一般的に受け入れられている2ヒット規則に適合するため興味深い ( K i m e t a l , J o u r n a l o f V i r o l o g y , 2 0 0 3 , 7 7 : 2 0 5 6 - 2 0 6 2 ; M i k k e r s , H a n d B e r n s , A , A d v a n c e s i n C a n c e r R e s e a r c h , 2 0 0 3 , 8 8 : 5 3 - 9 9 ; K e o k o e t a l . N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h , 2 0 0 4 , 3 2 : D 5 2 3 - D 5 2 7 ) 。

#### 【 0 0 7 3 】

この遺伝子は、患者の組織試料を用いて、採取した腎癌組織の80%においておよび採取した膵癌組織の85%においてmRNAレベルで過剰発現されることが認められた。これは我々に、この遺伝子が腎癌および膵癌と関連し、それゆえこれらの疾患の診断および治療のための有望な標的であることを推論させる。

#### 【 0 0 7 4 】

加えて、様々な癌性および非癌性組織型に関する免疫組織化学アッセイは、この遺伝子が腎細胞癌、明細胞癌、非小細胞癌、膵臓の腺癌、腺管癌、膵島細胞癌、粘液性嚢胞癌および浸潤性膀胱癌において過剰発現されることを明らかにした。これは我々に、この遺伝子がこの型の癌とも関連し、それゆえこれらの疾患の診断および治療のための有望な標的であると推論させる。

#### 【 0 0 7 5 】

この遺伝子の発現だけでは癌を引き起こすのに十分でないと考えられる。あるいはこの遺伝子の発現上昇が癌を引き起こすのに十分であるかもしれない。さらなる選択肢として、この遺伝子の発現が閾値レベルに達するかまたは閾値レベルを超えたときに癌が誘発されるのかもしれない。閾値レベルは、「正常」対照における発現レベルと比較したときの遺伝子の発現の上昇または低下パーセンテージとして表わし得る。

#### 【 0 0 7 6 】

本発明はまた、上記で言及した t m - P T P 遺伝子のホモログの使用を許容する。そのような相同性は、上記で言及した完全遺伝子配列に基づくことができ、一般に、ホモロジープログラムまたはハイブリダイゼーション条件を用いて、以下で概説するように決定される。t m - P T P 遺伝子のホモログは、t m - P T P 遺伝子と、好ましくはその細胞外ドメインと約75%以上(すなわち80、85、90、92、94、95、96、97、98、99%またはそれ以上)の相同性を有する。そのようなホモログは、スプライシング変異体、欠失、付加および/または置換突然変異体を含み、一般に機能的類似性を有し得る。

#### 【 0 0 7 7 】

これに関して相同性とは、配列類似性または同一性を意味し、同一性が好ましい。相同性についての好ましい比較は、配列エラーを含む配列を正しい配列と比較することである。この相同性は、S m i t h & W a t e r m a n , A d v . A p p l . M a t h . 2 : 4 8 2 ( 1 9 8 1 ) の局所的ホモロジーアルゴリズム、N e e d l e m a n & W u n s c h , J . M o l . B i o l . 4 8 : 4 4 3 ( 1 9 7 0 ) のホモロジーアラインメントアルゴリズム、P e a r s o n & L i p m a n , P N A S U S A 8 5 : 2 4 4

10

20

30

40

50

4 ( 1 9 8 8 ) の類似性に関する検索方法、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実施 ( W i s c o n s i n G e n e t i c s S o f t w a r e P a c k a g e , G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , 5 7 5 S c i e n c e D r i v e , M a d i s o n , W I ) における G A P 、 B E S T F I T 、 F A S T A および T F A S T A ) 、好ましくはデフォルト設定を用いた、 D e v e r e u x e t a l . , N u c l . A c i d R e s . 1 2 : 3 8 7 - 3 9 5 ( 1 9 8 4 ) によって述べられている B e s t F i t 配列プログラムを含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の標準手法を用いて、または精査によって決定される。

#### 【 0 0 7 8 】

有用なアルゴリズムの一例は P I L E U P である。P I L E U P は、漸進的なペアワイズアラインメントを用いて関連配列の群からマルチプル配列アラインメントを作成する。また、アラインメントを作成するために使用したクラスター形成関係を示す樹を作図することができる。P I L E U P は、F e n g & D o o l i t t l e , J . M o l . E v o l . 3 5 : 3 5 1 - 3 6 0 ( 1 9 8 7 ) の漸進的アラインメント法の単純化を用いる；その方法は H i g g i n s & S h a r p C A B I O S 5 : 1 5 1 - 1 5 3 ( 1 9 8 9 ) によって述べられたものに類似する。有用な P I L E U P パラメータは、デフォルトギャップ加重 3 . 0 0 、デフォルトギャップ長加重 0 . 1 0 、および加重末端ギャップを含む。

#### 【 0 0 7 9 】

有用なアルゴリズムのもう 1 つの例は、A l t s c h u l e t a l . , J . M o l . B i o l . 2 1 5 , 4 0 3 - 4 1 0 ( 1 9 9 0 ) および K a r l i n e t a l . , P N A S U S A 9 0 : 5 8 7 3 - 5 7 8 7 ( 1 9 9 3 ) に述べられている、B L A S T ( B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o l ) アルゴリズムである。特に有用な B L A S T プログラムは、A l t s c h u l e t a l . , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , 2 6 6 : 4 6 0 - 4 8 0 ( 1 9 9 6 ) ; <http://blast.wustl.edu/> ] から得られた W U - B L A S T - 2 プログラムである。W U - B L A S T - 2 はいくつかの検索パラメータを使用し、その大部分はデフォルト値に設定される。調節可能なパラメータは以下の数値に設定される：オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0 . 1 2 5、ワード閾値 ( T ) = 1 1。H S P S 及び H S P S 2 パラメータは動的値であり、特定配列の組成物およびそれに対して対象配列を検索する特定データベースの組成物に依存してプログラム自体によって確立される；しかし、その数値は感受性を高めるために調節し得る。アミノ酸配列同一性パーセント値は、マッチする同一残基の数を整列領域内の「より長い」配列の残基の総数で除することによって決定される。「より長い」配列は、整列領域内で最も多くの有効残基を有するものである ( アラインメントスコアを最大化するために W U - B l a s t - 2 によって導入されたギャップは無視する ) 。

#### 【 0 0 8 0 】

アラインメントは、整列する配列へのギャップの導入を含み得る。加えて、t m - P T P 遺伝子よりも多いまたは少ないヌクレオチドを含む配列に関しては、ヌクレオシドの総数に対する相同ヌクレオシドの数に基づいて決定されることは了解される。それゆえ、ここで特定する配列よりも短い配列の相同性は、より短い配列内のヌクレオシドの数を用いて決定される。

#### 【 0 0 8 1 】

本発明のもう 1 つの実施形態では、中から高ストリンジェンシー条件下で、ここで提供するポリヌクレオチドまたはそのフラグメントまたはその相補的配列にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチド組成物が提供される。ハイブリダイゼーション手法は分子生物学の技術分野において周知である。説明のために、他のポリヌクレオチドと本発明のポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを試験するための適切な中ストリンジェント条件は、5 × S S C ( 「塩化ナトリウムクエン酸ナトリウム」 ) ; 9 m M N a C l 、0 . 9 m M クエン酸ナトリウム ) 、0 . 5 % S D S 、1 . 0 m M E D T A ( p H 8 . 0

10

20

30

40

50

）の溶液中でのプレ洗浄；50～60℃、5×SSCで一晩のハイブリダイゼーション；次に0.1% SDSを含む2×、0.5×および0.2×SSCの各々による65℃で20分間の2回の洗浄を含む。当業者は、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーが、ハイブリダイゼーション溶液の塩含量および/またはハイブリダイゼーションを実施する温度を変化させることなどによって容易に操作できることを理解する。たとえばもう1つの実施形態では、適切な高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーションの温度を、たとえば60～65℃または65～70℃に上げることを除いて、上述したものを含む。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加によっても達成し得る。

#### 【0082】

それゆえ、本明細書全体を通じて特定する核酸および列挙する配列またはそれらの相補物に高ストリンジェンシー下でハイブリダイズする核酸は、癌関連配列とみなされる。高ストリンジェンシー条件は当技術分野において公知である；たとえば、どちらも参照によりここに組み込まれる、Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, 1989、およびShort Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel, et al. 参照。ストリンジェント条件は配列依存的であり、種々の状況において異なる。より長い配列はより高い温度で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションについての広範な指針は、Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993) に認められる。一般に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度とpHで特定配列についての熱融点( $T_m$ )より約5～10℃低く選択される。 $T_m$ は、標的に相補的なプローブの50%が平衡で標的配列にハイブリダイズする(標的配列は過剰に存在するため、 $T_m$ では、プローブの50%が平衡で占められる)温度である(規定されたイオン強度、pHおよび核酸濃度の下で)。ストリンジェントな条件は、塩濃度が、pH 7.0～8.3で約1.0 Mナトリウムイオン未満、典型的には約0.01～1.0 Mナトリウムイオン(または他の塩)濃度であり、温度は、短いプローブ(たとえば10～50ヌクレオチド)に関しては少なくとも約30℃、およびより長いプローブ(たとえば50ヌクレオチド以上)に関しては少なくとも約60℃である。もう1つの実施形態では、よりストリンジェントでない条件が使用される；たとえば、当技術分野で公知のように、中または低ストリンジェンシー条件が使用され得る；ManiatisとAusubel、前出、およびTijssen、前出参照。

#### 【0083】

(tm-PTP 遺伝子発現の検出)

tm-PTP 遺伝子は特定されており、そのコード配列とアミノ酸配列をここで参照する。ひとたびその天然ソースから単離されると、たとえばプラスミドまたは他のベクター内に含まれるかまたは線状核酸セグメントとしてそこから切り出されると、組換え癌関連核酸は、他の癌関連核酸、たとえば付加的なコード領域を特定し、単離するためのプローブとしてさらに使用することができる。また、修飾または変異型癌関連核酸およびタンパク質を作製するための「前駆体」核酸としても使用できる。tm-PTP 遺伝子ヌクレオチド配列は、tm-PTP 遺伝子に特異的なプローブを設計するために使用できる。

#### 【0084】

癌関連核酸はいくつかの方法で使用し得る。癌関連核酸にハイブリダイズし得る核酸プローブを作製し、スクリーニングおよび診断方法において、または遺伝子治療および/またはアンチセンス適用のために使用されるバイオチップに結合することができる。あるいは、癌関連タンパク質のコード領域を含む癌関連核酸を、やはりスクリーニングの

10

20

30

40

50

ためまたは患者への投与のために、癌関連タンパク質の発現のための発現ベクターに導入することができる。

#### 【0085】

遺伝子発現を数量化するための1つのそのようなシステムは動的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) である。動的PCRは、特定核酸配列の同時増殖と数量化を可能にする。特異性は、標的部位をひとくくりにする一本鎖核酸配列に選択的に接触するように設計された合成オリゴヌクレオチドプライマーに由来する。このオリゴヌクレオチドプライマーの対は、標的配列の各々の鎖上で特異的な非共有結合複合体を形成する。これらの複合体は、二本鎖DNAの反対方向のインビトロ転写を促進する。反応混合物の温度サイクリングは、プライマー結合、転写、および個々の鎖への核酸の再融解の連続サイクルを作り出す。その結果は標的dsDNA産物の対数増加である。この産物を、インターカレート化染料または配列特異的プローブの使用を通してリアルタイムで定量することができる。SYBR (登録商標) Green Iは、dsDNAに選択的に結合して蛍光シグナルの付随する上昇を生じさせる、インターカレート化染料の一例である。TaqMan (登録商標) テクノロジーと共に使用されるような配列特異的プローブは、オリゴヌクレオチドの反対側の末端に共有結合した蛍光色素と消光分子からなる。プローブは、2つのプライマー間において標的DNA配列を特異的に結合するように設計される。PCR反応の間にDNA鎖が合成されたとき、蛍光色素がポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性によってプローブから開裂され、シグナルの脱消光を生じさせる。プローブシグナル伝達法はインターカレート化染料法よりも特異的であり得るが、各々の場合に、シグナル強度は生産されるdsDNA産物に比例する。各々のタイプの数量化法は、各々のウエルが対象核酸配列に特異的なプライマーおよび/またはプローブである、マルチウエル液相アレイにおいて使用できる。組織または細胞系のメッセンジャーRNA試料と共に使用するとき、プローブ/プライマー反応のアレイは、多数の対象遺伝子産物の発現を同時に定量することができる。Germer, S., et al, Genome Res. 10: 258 - 266 (2000); Heid, C.A., et al, Genome Res. 6, 986 - 994 (1996) 参照。

10

20

30

40

50

#### 【0086】

DNAマイクロアレイ技術の最近の発達は、1つの固相支持体上で複数の標的癌関連核酸分子の大規模アッセイを実施することを可能にする。米国特許第5,837,832号 (Chee et al.) および関連特許出願は、試料中の特定核酸配列のハイブリダイゼーションと検出のためにオリゴヌクレオチドプローブのアレイを固定化することを述べている。対象組織から単離された対象標的ポリヌクレオチドをDNAチップにハイブリダイズさせ、標的ポリヌクレオチドの選択性および別々のプローブ位置でのハイブリダイゼーションの程度に基づいて特定配列を検出する。アレイの1つの重要な用途は、異なる細胞、しばしば対象細胞と対照細胞における遺伝子の発現プロファイルを比較し、それぞれの細胞の間での遺伝子発現の差を特定する、識別的遺伝子発現の分析においてである。そのような情報は、特定細胞または組織型において発現される遺伝子のタイプの特定および発現プロファイルに基づく癌状態の診断のために有用である。

#### 【0087】

典型的には、標識cDNAを得るために対象試料からのRNAを逆転写に供する。米国特許第6,410,229号 (Lockhart et al.) 参照。次にcDNAを、チップまたは他の表面上に既知の順序で配置した既知配列のオリゴヌクレオチドまたはcDNAにハイブリダイズする。標識cDNAがハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの位置はcDNAに関する配列情報を提供するが、一方ハイブリダイズした標識RNAまたはcDNAの量は、対象RNAまたはcDNAの相対的存在量の推定を提供する。Schenk, et al, Science 270: 467 - 470 (1995) 参照。たとえばヒト癌における遺伝子発現パターンを分析するためのcDNAマイクロアレイの使用がDeRisi, et al, (Nature Genetics 14: 457 - 460 (1996)) によって述べられている。

## 【 0 0 8 8 】

癌関連核酸に対応する核酸プローブを作製し得る。典型的には、これらのプローブは開示されている t m - P T P 遺伝子に基づいて合成される。バイオチップに結合する核酸プローブは、標的配列と本発明のプローブの特異的ハイブリダイゼーションが起こるように、癌関連核酸、すなわち標的配列（試料の標的配列または、たとえばサンドイッチにおける、他のプローブ配列）に実質的に相補的であるように設計される。以下で概説するように、標的配列と本発明の一本鎖核酸の間のハイブリダイゼーションに干渉するいくつかの塩基対ミスマッチが存在し得るという意味で、この相補性は完全である必要はない。ヌクレオチドレベルでの遺伝子の全体的相同性は、おそらく約 40 % またはそれ以上、おそらく約 60 % またはそれ以上、さらにはより高い可能性で約 80 % またはそれ以上であり、加えて、約 8 ~ 12 ヌクレオチドまたはそれ以上の対応する隣接配列が存在すると予想される。しかし、突然変異の数が多すぎて極めて低いストリンジェントのハイブリダイゼーション条件下でさえもハイブリダイゼーションが起こり得ない場合、その配列は相補的標的配列ではない。それゆえ、ここでは「実質的に相補的」とは、ここで概説するように、プローブが通常の反応条件下で、特に高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするのに十分なだけ標的配列に相補的であることを意味する。配列が本発明に従った t m - P T P 遺伝子にユニークであるか否かは、当業者に公知の手法によって決定できる。たとえば配列を、それが非感染宿主または他の生物において存在するかどうかを判定するために、データバンク、たとえば Gene Bank の配列と比較することができる。配列はまた、癌を誘発することが知られるものを含む、他のウイルス因子の公知の配列と比較することもできる。

10

20

## 【 0 0 8 9 】

好ましくは、t m - P T P 発現の検出に適するプローブは、t m - P T P の非保存領域に特異的である。「非保存領域」とは、P T P ファミリーの他の成員との相同性が平均より低い領域を指す。好ましくは、これらの非保存領域における他の P T P ファミリー成員への類似性は 50 % より低い。

## 【 0 0 9 0 】

Q - P C R を用いた t m - P T P の検出のためにここで使用したプローブは、a) C A T T C A T A G C C C T C A G C A A C A T T、b) C G T A A A C T C T T C A C A G C T T G A A A T A C A、c) A A G T C C C T C G G C T T T T A C T C G C T C C A A であった。a) と b) は、それぞれ t m - P T P 正および逆プライマーの例であり、c) は t m - P T P プローブプライマーの一例である。これらのプローブおよびプライマーは、それゆえ、本発明のこの態様の実施形態を形成する。

30

## 【 0 0 9 1 】

核酸プローブは一般に一本鎖であるが、部分的には一本鎖で且つ部分的には二本鎖であり得る。プローブの鎖の数は、標的配列の構造、組成物および性質によって決定される。一般に、オリゴヌクレオチドは約 6、8、10、12、15、20、30 から約 100 塩基長の範囲であり、約 10 ~ 約 80 塩基が好ましく、約 30 ~ 約 50 塩基が特に好ましい。すなわち、一般に遺伝子全体がプローブとして使用されることはまれである。一部の実施形態では、数百塩基までの、はるかに長い核酸が使用できる。プローブは、当業者に公知の条件下で相補的鋳型配列にハイブリダイズするのに十分なだけ特異的である。プローブ配列と、それらがハイブリダイゼーションの間にハイブリダイズするそれらの相補的鋳型（標的）配列との間でのミスマッチの数は、F A S T A によって測定したとき（デフォルト設定）一般に 15 % を超えず、通常は 10 % を超えず、好ましくは 5 % を超えない。

40

## 【 0 0 9 2 】

オリゴヌクレオチドプローブは、核酸において通常認められる天然に生じる複素環式塩基（ウラシル、シトシン、チミン、アデニンおよびグアニン）、ならびに修飾塩基および塩基類似体を含み得る。標的配列へのプローブのハイブリダイゼーションと適合性であるいかなる修飾塩基または塩基類似体も、本発明の実施において有用である。プローブの糖または配糖体部分は、デオキシリボース、リボース、および / または、たとえば 2' - O

50

- アルキルリボースなどの、これらの糖の修飾形態を含み得る。もう1つの実施形態では、糖部分は2'-デオキシリボースである；しかし、プローブが標的配列にハイブリダイズする能力と適合性であるいかなる糖部分も使用できる。

【0093】

プローブのヌクレオシド単位は、当技術分野において周知のように、ホスホジエステル骨格によって連結され得る。さらなる実施形態では、ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、スルファメート（たとえば米国特許第5,470,967号）およびポリアミド（すなわちペプチド核酸）を含むがこれらに限定されない、プローブの特異的ハイブリダイゼーションと適合性である当業者に公知のいかなる結合も含み得る。ペプチド核酸は、Nielsen et al. (1991) Science 254:1497-1500、米国特許第5,714,331号、およびNielsen (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10:71-75に述べられている。

【0094】

プローブはキメラ分子であり得る、すなわち2種類以上の塩基または糖サブユニットを含むことができ、および/または結合は、同じプライマー内で2種類以上であり得る。プローブは、当技術分野において公知のように、その標的配列へのハイブリダイゼーションを促進する部分、たとえばインターカレート化剤および/または副溝結合剤を含み得る。塩基、糖およびヌクレオシド間骨格の変異、ならびにプローブ上の何らかのペンダント基の存在は、配列特異的様式で、その標的配列と結合するプローブの能力と適合性である。既知のおよび今後開発される数多くの構造修飾がこれらの結合内で可能である。好都合には、本発明に従ったプローブは、それらがシグナル増幅を可能にするような構造特徴を有してもよく、そのような構造特徴は、たとえばUrdea et al. (Nucleic Acids Symp. Ser., 24:197-200 (1991))または欧州特許第EP-0225,807号に述べられているような分枝DNAプローブである。さらに、プローブを形成する様々な複素環式塩基、糖、ヌクレオシドおよびヌクレオチドを作製するための合成方法、および特異的なあらかじめ定められた配列のオリゴヌクレオチドの作製は広く開発されており、当技術分野において公知である。オリゴヌクレオチド合成のための好ましい方法は、米国特許第5,419,966号の教示を含む。

【0095】

標的核酸における多型および/または二次構造、データの重複性等を明らかにするために特定標的核酸についての多数のプローブを設計し得る。配列あたり2個以上のプローブを使用する、一部の実施形態では、オーバーラッププローブまたは単一標的tm-PTP遺伝子の異なる部分に対するプローブを使用する。すなわち、2個、3個、4個またはそれ以上のプローブを、3個が好ましいが、特定標的についての重複性で構築するために使用する。プローブは、オーバーラップであり得る（すなわち何等かの共通配列を有する）か、またはtm-PTP遺伝子の異なる配列に特異的であり得る。多数の標的ポリヌクレオチドを本発明に従って検出しようとするとき、特定標的ポリヌクレオチドに対応する各々のプローブまたはプローブ群は、マイクロアレイの別個の領域に位置する。

【0096】

プローブは、マイクロアレイのウェル内または表面上などの溶液中に存在し得るか、または固体支持体に結合し得る。使用できる固体支持体材料の例は、プラスチック、セラミック、金属、樹脂、ゲルおよび膜を含む。固体支持体の有用な種類は、プレート、ビーズ、磁性材料、マイクロビーズ、ハイブリダイゼーションチップ、膜、結晶、セラミックおよび自己集合単層を含む。もう1つの実施形態は、多数のプローブ結合部位を有するゲルまたはハイブリダイゼーションチップなどの、二次元または三次元マトリックスを含む（Pevzner et al., J. Biomol. Struct. & Dyn. 9:399-410, 1991; Maskos and Southern, Nuc. Acids Res. 20:1679-84, 1992）。ハイブリダイゼーションチップは、その後標的核酸とハイブリダイズする、非常に大きなプローブアレイを構築するために使用で

きる。チップのハイブリダイゼーションパターンの分析は標的ヌクレオチド配列の特定に役立ち得る。パターンは手動またはコンピュータで分析することができるが、ハイブリダイゼーションによる位置的配列決定がコンピュータ分析および自動化に適することは明らかである。配列再構成のために開発されたアルゴリズムおよびソフトウェアはここで述べる方法に適用し得る (R. Drmanac et al., J. Biomol. Struct. & Dyn. 5: 1085 - 1102, 1991; P. A. Pevzner, J. Biomol. Struct. & Dyn. 7: 63 - 73, 1989)。

#### 【0097】

当業者に認識されるように、核酸は多種多様な方法で固体支持体に結合または固定化することができる。ここでは「固定化」は、核酸プローブと固体支持体の間の会合または結合が、以下で概説する結合、洗浄、分析および除去の条件下で十分に安定であることを意味する。結合は共有または非共有であり得る。「非共有結合」および文法的等価物とは、ここでは静電的、親水的および疎水的相互作用の1またはそれ以上を意味する。ストレプトアビジンなどの分子の支持体への共有結合およびビオチニル化プローブのストレプトアビジンへの非共有結合は、非共有結合に含まれる。「共有結合」および文法的等価物とは、ここでは、2つの部分、固体支持体とプローブが、結合、結合および配位結合を含む少なくとも1つの結合によって連結していることを意味する。共有結合は、プローブと支持体の間で直接形成され得るか、または架橋剤によってまたは固体支持体またはプローブのいずれかまたは両方の分子の特定反応基の含有によって形成され得る。固定化はまた、共有結合と非共有結合相互作用の組合せを含み得る。

#### 【0098】

核酸プローブは、カップリング剤による共役などの共有結合によって、または静電的相互作用、水素結合または抗体-抗原複合などの共有結合または非共有結合によって、またはそれらの組合せによって固体支持体に結合し得る。典型的なカップリング剤は、ビオチン/アビジン、ビオチン/ストレプトアビジン、黄色ブドウ球菌プロテインA/IgG抗体Fcフラグメント、およびストレプトアビジン/プロテインAキメラ (T. Sano and C. R. Cantor, Bio/Technology 9: 1378 - 81 (1991))、またはこれらの物質の誘導体またはそれらの組合せを含む。核酸は、光開裂性結合、静電結合、ジスルフィド結合、ペプチド結合、ジエステル結合またはこれらの種類の結合の組合せによって固体支持体に結合し得る。アレイも、4, 4'-ジメトキシトリチルまたはその誘導体などの選択的に解離可能な結合によって固体支持体に結合し得る。有用であると認められた誘導体は、3または4 [ビス-(4-メトキシフェニル)]-メチル-安息香酸、N-スクシンイミジル-3または4 [ビス-(4-メトキシフェニル)]-メチル-安息香酸、N-スクシンイミジル-3または4 [ビス-(4-メトキシフェニル)]-ヒドロキシメチル-安息香酸、N-スクシンイミジル-3または4 [ビス-(4-メトキシフェニル)]-クロロメチル-安息香酸、およびこれらの酸の塩を含む。

#### 【0099】

プローブは、当業者に認識されるように、多種多様な方法でバイオチップに結合し得る。ここで述べるように、核酸は、最初に合成してその後バイオチップに結合するか、またはバイオチップ上で直接合成することができる。

#### 【0100】

バイオチップは適切な固体基質を含む。「基質」または[固体支持体]または他の文法的等価物とは、ここでは、核酸プローブの結合または会合のための適切な分離した個別部位を含むように修飾することができ、少なくとも1つの検出方法に適合させ得る何らかの物質を意味する。本発明の固相支持体は、ヌクレオチドのハイブリダイゼーションと合成を支持するのに適した何らかの固体物質および構造であり得る。好ましくは、固相支持体は、その表面にプライマーを固定し、逆転写酵素反応を実施することができる少なくとも1つの実質的に硬質な表面を含む。ポリヌクレオチドマイクロアレイの元素が安定に結合する基質は、プラスチック、セラミック、金属、アクリルアミド、セルロース、ニ

トロセルロース、ガラス、ポリスチレン、ポリエチレンビニルアセテート、ポリプロピレン、ポリメタクリレート、ポリエチレン、ポリエチレンオキシド、ポリシリケート、ポリカーボネート、Teflon（登録商標）、フルオロカーボン、ナイロン、シリコーンゴム、ポリ無水物、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリオルトエステル、ポリプロピル fumarate、コラーゲン、グルコサミノグリカンおよびポリアミノ酸を含む、様々な材料から製造し得る。基質ナ、ゲル、膜、薄膜、ガラス、プレート、シリンドー、ビーズ、磁気ビーズ、光ファイバー、繊維織物等のような、二次元または三次元の形態であり得る。各々の標識ビーズは、それに結合した異なるプライマーを有する。タグは、色（Luminescence, Illumina）および電磁場（Pharmaseq）などのシグナル伝達手段によって検出可能であり、標識ビーズ上のシグナルは、さらには、遠隔的に検出することができる（たとえば光ファイバーを用いて）。固体支持体の大きさは、DNA マイクロアレイ技術のために有用な、標準的マイクロアレイサイズのいずれかであり得、本発明の反応を実施するために使用される特定機器に適合するように大きさをあつらえ得る。一般に、基質は光学的検出を許容し、評価し得るほどに蛍光を発しない。

10

#### 【0101】

バイオチップの表面とプローブは、この2つのその後の結合のために化学的官能基で誘導体化し得る。そこで、たとえばバイオチップは、アミノ基、カルボキシ基、オキシ基およびチオール基を含む化学的官能基で誘導体化され、アミノ基が特に好ましい。これらの官能基を使用して、プローブ上の官能基を用いてプローブを結合できる。たとえばアミノ基を含む核酸は、たとえば当技術分野で公知のリンカーを用いて、アミノ基を含む表面に結合できる；たとえばホモまたはヘテロ二官能性リンカーが周知である（1994 Pierce Chemical Company カタログ、架橋剤に関する技術セクション、155～200 ページ参照）。加えて、一部の場合には、アルキル基（置換およびヘテロアルキル基を含む）などの付加的なリンカーを使用し得る。

20

#### 【0102】

オリゴヌクレオチドは、当技術分野で公知のように合成し、その後固体支持体の表面に結合し得る。当業者に認識されるように、5' または 3' 末端のいずれかを固体支持体に結合し得るか、または内部ヌクレオチドを通しての結合であり得る。付加的な実施形態では、固体支持体への固定化は、非常に強力であるが、非共有結合であり得る。たとえばストレプトアビジンで共有結合被覆した表面に結合する、ビオチニル化オリゴヌクレオチドを作製し、結合を生じさせ得る。

30

#### 【0103】

アレイは、ポリヌクレオチドマイクロアレイエレメントを前もって形成し、その後それらを表面と結合することなどの、従来の何らかの方法に従って作成し得る。あるいは、当技術分野で公知のように、オリゴヌクレオチドを表面上で合成し得る。それらの生産のための数多くの異なるアレイ形状および方法が当業者に公知であり、その開示全体が参照によりここに組み込まれる、国際公開番号第 WO 95 / 25116 号および同第 WO 95 / 35505 号（フォトリソグラフィー手法）、米国特許第 5,445,934 号（フォトリソグラフィーによるインサイチュー合成）、米国特許第 5,384,261 号（機械的指令流路によるインサイチュー合成）；および米国特許第 5,700,637 号（スポットティング、プリンティングまたはカップリングによる合成）に開示されている。DNA をビーズにカップリングするためのもう 1 つの方法は、ビーズに付着したリガンド結合分子に連結するために DNA の末端に結合する特異的リガンドを使用する。可能なりガンド結合パートナー対は、ビオチン / ストレプトアビジン、またはジゴキシゲニン - 抗ジゴキシゲニン抗体などの様々な抗体 / 抗原対を含む（Smith et al., "Direct Mechanical Measurements of the Elasticity of Single DNA Molecules by Using Magnetic Beads," Science 258: 1122 - 1126 (1992)）。支持体への DNA の共有化学結合は、ホスホアミデート結合を通して DNA の 5' リン酸を被覆マイクロスフェアに連結する標準カップリング剤を使用することによって達成

40

50



できる。固体基質へのオリゴヌクレオチドの固定化のための方法は広く確立されている。Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (11): 5022 - 5026 (1994) 参照。オリゴヌクレオチドを固体基質に結合する好ましい方法は、Guo et al., Nucleic Acids Res. 22: 5456 - 5465 (1994) によって述べられている。固定化は、ロボットアレイテクノロジーと組み合わせた、インサイチューDNA合成 (Maskos and Southern, Nucleic Acids Research, 20: 1679 - 1684 (1992) または化学合成したオリゴヌクレオチドの共有結合 (Guo et al., 前出) のいずれかによって実施できる。

#### 【0104】

(発現産物)

ここで使用する「発現産物」という用語は、たとえばmRNAを含む核酸と、tm-PTP 遺伝子の転写および/または翻訳によって生産されるポリペプチド産物の両方を指す。

#### 【0105】

ポリペプチドは、成熟タンパク質の形態であり得るか、または活性な成熟ポリペプチドを生産するためにプレ、プロまたはプレプロ部分の開裂によって活性化され得るプレ、プロまたはプレプロタンパク質であり得る。そのようなポリペプチドでは、プレ、プロまたはプレプロ配列は、リーダーまたは分泌配列であり得るか、または成熟ポリペプチド配列の精製のために使用される配列であり得る。そのようなポリペプチドは、「癌関連ポリペ

#### 【0106】

「癌関連ポリペプチド」という用語はまた、フラグメント、ホモログ、融合物および突然変異体などの変異型を含む。相同ポリペプチドは、ギャップオープンペナルティー12およびギャップ伸長ペナルティー2、BLOSUMマトリックス62でアフィンギャップ検索を用いたSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムによって判定するとき、上記で言及した癌関連ポリペプチドと少なくとも80%またはそれ以上(すなわち85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%またはそれ以上)の配列同一性を有する。Smith-Waterman相同性検索アルゴリズムは、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2: 482 - 489において教示される。変異型ポリペプチドは、天然にまたは非天然にグリコシル化され得る、すなわちポリペプチドは、対応する天然に生じるタンパク質において認められるグリコシル化パターンとは異なるグリコシル化パターンを有する。

#### 【0107】

突然変異体は、アミノ酸置換、付加または欠失を含み得る。アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換または、グリコシル化部位、リン酸化部位またはアセチル化部位を変化させるため、または機能のために必要ではない1またはそれ以上のシステイン残基の置換または欠失によってミスフォールディングを最小限に抑えるためなどの、非必須アミノ酸を除去するために置換であり得る。保存的アミノ酸置換は、全体的電荷、疎水性/親水性、および/または置換するアミノ酸の立体的かさを保存するものである。これらの産物の変異型は、タンパク質の特定領域(たとえば機能性ドメインおよび/またはポリペプチドがタンパク質ファミリーの成員である場合、コンセンサス配列に関連する領域)の生物学的活性を保持するまたは上昇させるように設計できる。そのような変異型は、その後、検出または治療の方法において使用し得る。変異型の生産のためのアミノ酸変化の選択は、アミノ酸のアクセス可能性(内部対外部)(たとえばGo et al, Int. J. Peptide Protein Res. (1980) 15: 211参照)、変異型ポリペプチドの熱安定性(たとえばQuerol et al., Prot. Eng. (1996) 9: 265参照)、所望グリコシル化部位(たとえばOlsen and Thomsen, J. Gen. Microbiol. (1991) 137: 579参照)、所望ジスルフィド架橋(たとえばClarke et al., Biochemistry (19

10

20

30

40

50

93)32:4322; および Wakarchuk et al., Protein Eng. (1994)7:1379 参照)、所望金属結合部位(たとえば Toma et al., Biochemistry (1991)30:97 および Haez erbrouck et al., Protein Eng. (1993)6:643)、およびプロリンループ内の所望置換(たとえば Masul et al., Appl. Env. Microbiol. (1994)60:3579 参照)に基づき得る。システイン除去ムテインは、米国特許第4,959,314号に開示されているように生産できる。

#### 【0108】

変異型はまた、ここで開示するポリペプチドのフラグメント、特に生物学的に活性なフラグメントおよび/または機能性ドメインに対応するフラグメントを含む。対象フラグメントは、典型的には少なくとも約8アミノ酸(aa)、10aa、15aa、20aa、25aa、30aa、35aa、40aa、少なくとも約45アミノ酸長、通常は少なくとも約50aa長、少なくとも約75aa、少なくとも約100aa、少なくとも約125aa、少なくとも約150aa長、少なくとも約200aa、少なくとも約300aa、少なくとも約400aaであり、500aaまたはそれ以上の長さであり得るが、フラグメントが、ここで提供するポリヌクレオチド配列のいずれか1つの配列を有するポリヌクレオチドまたはそのホモログによってコードされるポリペプチドに同一である一連のアミノ酸を有する場合は、通常約1000アミノ酸長を超えない。ここで記述されるタンパク変異体は、本発明の範囲においてポリヌクレオチドとコードされるものとする。対応する変異型を構築するための適切なコドンを選択するために遺伝暗号が使用できる。

#### 【0109】

tm-PTP 遺伝子によってコードされるポリペプチドの変化した発現レベルは、この遺伝子およびその産物が癌において役割を果たすことを示唆する。好ましくは、形成される複合体の量の2倍上昇が疾患を指示する。さらに一層好ましくは、形成される複合体の量の3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、さらには100倍の上昇または低下が疾患を指示する。

#### 【0110】

癌関連ポリペプチドは、野生型tm-PTP アミノ酸配列よりも短いかまたは長くてもよく、mRNAをコードする等価物は、野生型mRNAと比較して同様に修飾され得る。それゆえここでは、野生型配列の部分またはフラグメントは癌関連ポリペプチドの定義に含まれる。加えて、上記で概説したように、tm-PTP 遺伝子は、当技術分野で公知の手法を用いて、付加的なコード領域、およびそれゆえ付加的なタンパク質配列を得るために使用し得る。

#### 【0111】

もう1つの実施形態では、癌関連ポリペプチドは、野生型配列と比較して誘導体または変異型癌関連ポリペプチドである。すなわち、以下でより詳細に述べるように、誘導体癌関連ポリペプチドは、少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失または挿入を含み、アミノ酸置換が特に好ましい。アミノ酸置換、挿入または欠失は、癌関連ポリペプチド内のいずれの残基でも起こり得る。

#### 【0112】

また、アミノ酸配列変異型の癌関連ポリペプチドも含まれる。これらの変異型は3つのクラスの1またはそれ以上に属する:置換、挿入または欠失変異型。これらの変異型は通常、カセットまたはPCR突然変異誘発または当技術分野で周知の他の手法を用いて、癌関連タンパク質をコードするDNA内のヌクレオチドの部位特異的突然変異誘発によって変異型をコードするDNAを生成し、その後上記で概説したように組換え細胞培養物において前記DNAを発現することにより作製される。しかし、約100~150残基までを有する変異型癌関連ポリペプチドフラグメントは、確立された手法を用いてインビトロ合成によって作製し得る。アミノ酸配列変異型は、それらを癌関連ポリペプチドアミノ酸配列の天然に生じる対立遺伝子または種間変異型と区別する特徴である、あらかじめ定められた性質の変異によって特徴づけられる。変異型は、典型的には天然に生じる類似体と同

じ定性的生物活性を示すが、以下でより詳細に述べるように改変された特徴を有する変異型も選択できる。

#### 【0113】

アミノ酸配列変異を導入するための部位または領域はあらかじめ決定されるが、突然変異自体をあらかじめ決定する必要はない。たとえば所与の部位での突然変異の成績を最適化するために、標的コドンまたは領域でランダム突然変異誘発を実施し、発現された癌関連ポリペプチド変異型を所望活性の最適の組合せに関してスクリーニングし得る。公知の配列を有するDNA内のあらかじめ定められた部位で置換突然変異を作製するための手法は周知であり、たとえばM13プライマー突然変異誘発およびLAR突然変異誘発がある。突然変異体のスクリーニングは、癌関連タンパク質活性のアッセイを用いて実施される。

10

#### 【0114】

アミノ酸置換は、典型的には1個の残基であるが、言うまでもなく多数の残基でもよい；挿入は通常約1～20アミノ酸であるが、かなり大きな挿入も許容され得る。欠失は約1～約20残基の範囲であるが、一部の場合には、欠失ははるかに大きくてもよい。

#### 【0115】

置換、欠失、挿入またはそれらの何らかの組合せが、最終的な誘導体に到達するために使用し得る。一般にこれらの変化は、分子の変化を最小限に抑えるために数個のアミノ酸に関して実施される。しかし、ある種の状況ではより大きな変化も許容され得る。癌関連ポリペプチドの特徴の小さな変化を所望するときは、置換は一般に以下の表に従って作製される：

20

#### 【0116】

#### 【化1-1】

表1

| もとの残基 | 例示的な置換   |
|-------|----------|
| Ala   | Ser      |
| Arg   | Lys      |
| Asn   | Gln, His |
| Asp   | Glu      |
| Cys   | Ser      |
| Gln   | Asn      |
| Glu   | Asp      |
| Gly   | Pro      |

30

40

#### 【0117】

## 【化 1 - 2】

|     |               |
|-----|---------------|
| His | Asn, Gln      |
| Ile | Leu, Val      |
| Leu | Ile, Val      |
| Lys | Arg, Gln, Glu |
| Met | Leu, Ile      |
| Phe | Met, Leu, Tyr |
| Ser | Thr           |
| Thr | Ser           |
| Trp | Tyr           |
| Tyr | Trp, Phe      |
| Val | Ile, Leu      |

10

20

置換が表 I に示すものよりも保存的でないときには、機能または免疫学的同一性に実質的な変化が起こる。たとえば以下の 1 またはそれ以上により有意の影響を及ぼすために置換は完全長で行われ得る：変化の領域内のポリペプチド骨格の構造（たとえば ヘリックスまたは シート構造）；標的部位の分子の電荷または疎水性；および側鎖のバルク。一般にポリペプチドの性質に最大の変化を生じさせると予想される置換は、（a）親水性残基、たとえばセリルまたはトレオニルで疎水性残基、たとえばロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリルまたはアラニルを（または前者を後者によって）置換する；（b）システインまたはプロリンで何らかの他の残基を（または前者を後者によって）置換する；（c）電気陽性側鎖を有する残基、たとえばリシル、アルギニルまたはヒスチジルで電気陰性残基、たとえばグルタミルまたはアスパルチルを（または前者を後者によって）置換する；または（d）かさの高い側鎖を有する残基、たとえばフェニルアラニンで側鎖を持たない残基、たとえばグリシンを（または前者を後者によって）置換するものである。

30

## 【0118】

変異型は、典型的には天然に生じる類似体と同じ定性的生物活性を示し、同じ免疫応答を惹起するが、変異型はまた、改変された特徴を有し得る。

## 【0119】

癌関連ポリペプチドは、それ自体が発現され、検出および治療の方法において使用され得る。それらは、そのような方法における使用を助けるためにさらに修飾され得る。

## 【0120】

40

癌関連ポリペプチドの共有結合修飾は、たとえばスクリーニングにおいて利用し得る。1 つの種類の共有結合修飾は、癌関連ポリペプチドの選択側鎖あるいは N または C 末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と癌関連ポリペプチドの標的アミノ酸残基を反応させることを含む。二官能性試薬による誘導体化は、たとえば以下でより詳細に述べるように、抗癌関連抗体を精製するための方法またはスクリーニングアッセイにおける使用のために癌関連ポリペプチドを水不溶性支持体マトリックスに架橋するために有用である。一般的に使用される架橋剤は、たとえば 1, 1 - ビス（ジアゾアセチル）- 2 - フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、たとえば 4 - アジドサリチル酸とのエステル、3, 3' - ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）などのジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス - N -

50

マレイミド - 1 , 8 - オクタンなどの二官能性マレイミドおよびメチル - 3 - [ ( p - アジドフェニル ) ジチオ ] プロピオイミデートなどの物質を含む。

【 0 1 2 1 】

他の修飾は、グルタミニルおよびアスパラギニル残基の、それぞれ対応するグルタミルおよびアスパルチル残基への脱アミド化、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリル、トレオニルまたはチロシル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化 ( T . E . C r e i g h t o n , P r o t e i n s : S t r u c t u r e a n d M o l e c u l a r P r o p e r t i e s , W . H . F r e e m a n & C o . , S a n F r a n c i s c o , p p . 7 9 - 8 6 ( 1 9 8 3 ) ) 、 N 末端アミンのアセチル化、およびいずれかの C 末端カルボキシル基のアミド化を含む。

10

【 0 1 2 2 】

本発明の範囲内に含まれる癌関連ポリペプチドのもう 1 つの種類の共有結合修飾は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンを変化させることを含む。「天然グリコシル化パターンを変化させること」は、ここでの目的に関しては、天然配列癌関連ポリペプチド内に認められる 1 またはそれ以上の炭水化物部分を欠失させること、および / または天然配列癌関連ポリペプチド内には存在しない 1 またはそれ以上のグリコシル化部位を付加することを意味することが意図されている。

【 0 1 2 3 】

癌関連ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、そのアミノ酸配列を変化させることによって達成され得る。変化は、たとえば天然配列癌関連ポリペプチドへの 1 またはそれ以上のセリンまたはトレオニン残基の付加、または 1 またはそれ以上のセリンまたはトレオニン残基による置換 ( O - 結合グリコシル部位のため ) によって為され得る。癌関連アミノ酸配列は、場合により DNA レベルでの変化を通して、特に所望アミノ酸に翻訳されるコドンが生成されるようにあらかじめ選択した塩基において癌関連ポリペプチドをコードする DNA を突然変異させることによって、変化させ得る。

20

【 0 1 2 4 】

癌関連ポリペプチド上の炭水化物部分数を増加させるもう 1 つの手段は、ポリペプチドへのグリコシドの化学的または酵素的カップリングによる。そのような方法は当技術分野において、たとえば 1 9 8 7 年 9 月 1 1 日公開の国際公開番号第 W O 8 7 / 0 5 3 3 0 号、および A p l i n a n d W r i s t o n , L A C r i t . R e v . B i o c h e m . , p p . 2 5 9 - 3 0 6 ( 1 9 8 1 ) の中で述べられている。

30

【 0 1 2 5 】

癌関連ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的または酵素的に、あるいはグリコシル化のための標的として役立つアミノ酸残基をコードするコドンの突然変異置換によって達成され得る。化学的脱グリコシル化手法は当技術分野において公知であり、たとえば H a k i m u d d i n , e t a l . , A r c h . B i o c h e m . B i o p h y s . , 2 5 9 : 5 2 ( 1 9 8 7 ) および E d g e e t a l . , A n a l . B i o c h e m . , 1 1 8 : 1 3 1 ( 1 9 8 1 ) によって記述されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的開裂は、T h o t a k u r a e t a l . , M e t h . E n z y m o l . , 1 3 8 : 3 5 0 ( 1 9 8 7 ) によって述べられているように様々なエンドおよびエキソグリコシダーゼの使用によって達成できる。癌関連ポリペプチドのもう 1 つの種類の共有結合修飾は、米国特許第 4 , 6 4 0 , 8 3 5 号 ; 同第 4 , 4 9 6 , 6 8 9 号 ; 同第 4 , 3 0 1 , 1 4 4 号 ; 同第 4 , 6 7 0 , 4 1 7 号 ; 同第 4 , 7 9 1 , 1 9 2 号または同第 4 , 1 7 9 , 3 3 7 号に述べられているようにして、癌関連ポリペプチドを様々な非タンパク質性ポリマーの 1 つ、たとえばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンに連結することを含む。

40

【 0 1 2 6 】

癌関連ポリペプチドはまた、もう 1 つ別の異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合した癌関連ポリペプチドを含むキメラ分子を形成するように修飾し得る。 1 つの実施形態

50

では、そのようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合することができるエピトープを提供するタグポリペプチドと癌関連ポリペプチドの融合物を含む。エピトープタグは、一般に癌関連ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に位置するが、内部融合物も一部の場合には許容され得る。そのようなエピトープ標識した形態の癌関連ポリペプチドの存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの担持は、抗タグ抗体またはエピトープタグに結合する別のタイプの親和性マトリックスを用いたアフィニティー精製によって癌関連ポリペプチドを容易に精製することを可能にする。選択的实施形態では、キメラ分子は、免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定領域と癌関連ポリペプチドの融合物を含み得る。二価形態のキメラ分子に関しては、そのような融合はIgG分子のFc領域に対してであり得る。

10

#### 【0127】

様々なタグポリペプチドおよびそれらのそれぞれの抗体は当技術分野において周知である。例は、ポリ-ヒスチジン (poly-his) またはポリ-ヒスチジン-グリシン (poly-his-gly) タグ; インフルエンザHAタグポリペプチドおよびその抗体12CA5 (Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)); c-mycタグおよびその抗体8F9、3C7、6E10、G4、B7および9E10; (Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)); および単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD) タグおよびその抗体 (Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)) を含む。他のタグポリペプチドは、Flag-ポリペプチド (Hopp et al., Biotechnology, 6:1204-1210 (1988)); KT3 エピトープペプチド (Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)); チュープリンエピトープペプチド (Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)); およびT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ (Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)) を含む。

20

#### 【0128】

あるいは、癌関連タンパク質ファミリーの他の癌関連タンパク質および他の生物からの癌関連タンパク質を、以下で概説するようにクローニングして発現し得る。そこで、プローブまたは縮重ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) プライマー配列が、ヒトまたは他の生物からの他の関連する癌関連タンパク質を見出すために使用し得る。当業者に認識されるように、特に有用なプローブおよび/またはPCRプライマー配列は、癌関連核酸配列のユニーク領域を含む。当技術分野で一般的に知られるように、好ましいPCRプライマーは約15~約35ヌクレオチド長であり、約20~約30ヌクレオチドが好ましく、必要に応じてイノシンを含み得る。PCR反応のための条件は当技術分野において周知である。

30

#### 【0129】

加えて、ここで概説するように、たとえば付加的な配列の解明、エピトープまたは精製タグの付加、他の融合配列の付加等により、tm-PTP 遺伝子によってコードされるよりも長い癌関連タンパク質を作製することができる。

40

#### 【0130】

癌関連タンパク質はまた、癌関連核酸によってコードされると特定され得る。それ故、癌関連タンパク質は、ここで概説するように、上記で列挙したtm-PTP 遺伝子またはそれらの相補物にハイブリダイズする核酸によってコードされる。

#### 【0131】

(癌関連ポリペプチドの発現)

癌関連タンパク質をコードするtm-PTP 遺伝子に由来する核酸は、上述したように、その後スクリーニングアッセイにおいて使用できる癌関連タンパク質を発現する様々な発現ベクターを作製するために使用し得る。発現ベクターは、自己複製染色体外ベクタ

50

ーまたは宿主ゲノムに組み込まれるベクターのいずれかであり得る。一般に、これらの発現ベクターは、癌関連タンパク質をコードする核酸に作動可能に連結された転写および翻訳調節核酸を含む。「制御配列」という用語は、特定宿主生物における作動可能に連結されたコード配列の発現のために必要なDNA配列を指す。たとえば原核生物に適する制御配列は、プロモーター、場合によりオペレーター配列、およびリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを利用することが知られる。

#### 【0132】

核酸は、もう1つ別の核酸配列と機能的関係に配置されるとき、「作動可能に連結されて」いる。たとえばプレ配列または分泌リーダーについてのDNAは、ポリペプチドの分泌に参与するプレタンパク質として発現される場合、ポリペプチドについてのDNAに作動可能に連結されている；プロモーターまたはエンハンサーは、コード配列の転写に影響を及ぼす場合、コード配列に作動可能に連結されている；またはリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように位置づけられている場合、コード配列に作動可能に連結されている。一般に、「作動可能に連結された」とは、連結されているDNA配列が隣接していること、分泌リーダーの場合は、隣接して読み枠（reading phase）内にあることを意味する。しかし、エンハンサーは隣接している必要はない。連結は、好都合な制限部位での結合によって達成される。そのような部位が存在しない場合は、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを従来の慣例に従って使用する。転写および翻訳調節核酸は、癌関連タンパク質を発現するために使用される宿主細胞に適切である；たとえば *Bacillus* において癌関連タンパク質を発現するためには *Bacillus* からの転写および翻訳調節核酸配列が好ましくは使用される。数多くの種類の適切な発現ベクターおよび適切な調節配列が、様々な宿主細胞に関して当技術分野で公知である。

#### 【0133】

一般に、転写および翻訳調節配列は、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始および終結配列、翻訳開始および終結配列、およびエンハンサーまたはアクチベーター配列を含み得るが、これらに限定されない。もう1つの実施形態では、調節配列は、プロモーターおよび転写開始および終結配列を含む。

#### 【0134】

プロモーター配列は、構成的または誘導的プロモーターをコードする。プロモーターは、天然に生じるプロモーターまたはハイブリッドプロモーターであり得る。2個以上のプロモーターのエレメントを組み合わせる、ハイブリッドプロモーターも当技術分野において公知であり、本発明において有用である。

#### 【0135】

加えて、発現ベクターは付加的なエレメントを含み得る。たとえば発現ベクターは2つの複製系を有してもよく、それゆえ2つの生物において、たとえば発現のための哺乳動物または昆虫細胞とクローニングおよび増幅のための原核生物宿主において、保持されることが可能である。さらに、発現ベクターの組み込みのために、発現ベクターは宿主細胞ゲノムと相同な少なくとも1つの配列、好ましくは発現構築物に隣接する2つの相同配列を含む。組み込まれるベクターは、ベクターへの組み込みのために適切な相同配列を選択することによって宿主細胞内の特定遺伝子座へと向かい得る。ベクターを組み込むための構築物は当技術分野において周知である。

#### 【0136】

加えて、もう1つの実施形態では、発現ベクターは、形質転換した宿主細胞の選択を可能にする選択マーカー遺伝子を含む。抗生物質耐性遺伝子を含む選択遺伝子は当技術分野において周知であり、使用する宿主細胞に依存して異なる。

#### 【0137】

癌関連タンパク質は、癌関連タンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞を、癌関連タンパク質の発現を誘導するまたは生じさせるための適切な条件下で培養することによって生産し得る。癌関連タンパク質発現のための適切な条件は、

発現ベクターおよび宿主細胞の選択によって異なり、常套的な実験を通して当業者によって容易に確認される。たとえば発現ベクターにおける構成的プロモーターの使用は、宿主細胞の成長と増殖を最適化することを必要とするが、誘導的プロモーターの使用は誘導のための適切な増殖条件を必要とする。加えて、一部の実施形態では、収集の時期が重要である。たとえば昆虫細胞発現において使用されるバキュロウイルス系は溶解ウイルスであり、それ故収集時間の選択は産物の収率にとって決定的に重要である。

#### 【0138】

適切な宿主細胞は、酵母、細菌、古細菌、真菌、及び昆虫、植物および哺乳動物細胞を含む動物細胞を含む。特に興味深いのは、*Drosophila melanogaster* 細胞、*Saccharomyces cerevisiae* および他の酵母、大腸菌、*Bacillus subtilis*、Sf9細胞、C129細胞、293細胞、*Neurospora*、BHK、CHO、COS、HeLa細胞、THP1細胞系（マクロファージ細胞系）およびヒト細胞および細胞系である。

10

#### 【0139】

好ましくは、癌関連タンパク質は哺乳動物細胞において発現される。哺乳動物発現系も当技術分野において公知であり、レトロウイルス系を含む。好ましい発現ベクター系は、いずれも参照により明白にここに組み込まれる、国際公開番号第WO97/27212号（PCT/US97/01019号）および国際公開番号第WO97/27213号（PCT/US97/01048号）の中で一般的に述べられているようなレトロウイルスベクター系である。哺乳動物プロモーターとして特に有用であるのは、哺乳動物ウイルス遺伝子からのプロモーターであり、これは、ウイルス遺伝子がしばしば高発現され、広い宿主範囲を有するからである。例は、SV40初期プロモーター、マウス乳腺癌ウイルスLTRプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、単純ヘルペスウイルスプロモーター、およびCMVプロモーターを含む。典型的には、哺乳動物細胞によって認識される転写終結およびポリアデニル化配列は、翻訳終止コドンに対して3'側に位置する調節領域であり、それ故プロモーターエレメントと共に、コード配列に隣接する。転写ターミネーターおよびポリアデニル化シグナルの例は、SV40に由来するものを含む。

20

#### 【0140】

外来性核酸を哺乳動物宿主ならびに他の宿主に導入するための方法は当技術分野において周知であり、使用する宿主細胞によって異なる。手法は、デキストランを介したトランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿法、ポリブレンを介したトランスフェクション、電気穿孔法、ウイルス感染、リポソームへのポリヌクレオチドのカプセル化、および核内へのDNA直接微量注入を含む。

30

#### 【0141】

選択的实施形態では、癌関連タンパク質は細菌系において発現される。細菌発現系は当技術分野において周知である。バクテリオファージからのプロモーターも使用でき、当技術分野において公知である。加えて、合成プロモーターおよびハイブリッドプロモーターも有用である；たとえばtacプロモーターは、trpとlacプロモーター配列のハイブリッドである。さらに、細菌プロモーターは、細菌RNAポリメラーゼに結合して、転写を開始させる能力を有する非細菌起源の天然に生じるプロモーターを含み得る。機能性プロモーター配列に加えて、効率的なリポソーム結合部位が望ましい。発現ベクターはまた、細菌における癌関連タンパク質の分泌を提供するシグナルペプチド配列を含み得る。タンパク質は、増殖培地（グラム陽性細菌）または細胞の内膜と外膜の間に位置する細胞周辺腔（グラム陰性細菌）のいずれかに分泌される。細菌発現ベクターはまた、形質転換した細菌株の選択を可能にする選択マーカー遺伝子を含み得る。適切な選択遺伝子は、細菌を、アンピシリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、カナマイシン、ネオマイシンおよびテトラサイクリンなどの薬剤に対して耐性にする遺伝子を含む。選択マーカーはまた、ヒスチジン、トリプトファンおよびロイシン生合成経路におけるもののような、生合成遺伝子を含む。これらの成分は発現ベクターに構築される。細菌のための発現ベクターは当技術分野において周知であり、中でも特に、*Bacillus subtilis*

40

50



is、大腸菌、*Streptococcus cremoris*および*Streptococcus lividans*のためのベクターを含む。細菌発現ベクターは、塩化カルシウム処理、電気穿孔法等のような当技術分野で周知の手法を用いて細菌宿主細胞に形質転換される。

#### 【0142】

癌関連タンパク質は昆虫細胞において生産され得る。昆虫細胞の形質転換のための発現ベクター、特にバキュロウイルスに基づく発現ベクターは当技術分野において周知である。

#### 【0143】

さらなる実施形態では、癌関連タンパク質は酵母細胞において生産され得る。酵母発現系は当技術分野において周知であり、*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans*および*C. maltosa*、*Hansenula polymorpha*、*Kluyveromyces fragilis*および*K. lactis*、*Pichia guilliermondii*および*P. pastoris*、*Schizosaccharomyces pombe*および*Yarrowia lipolytica*を含む。

#### 【0144】

癌関連タンパク質はまた、当技術分野で周知の手法を用いて、融合タンパク質として作製され得る。そこで、たとえばそれはモノクローナル抗体の作製である。所望エピトープが小さい場合は、癌関連タンパク質を、免疫原を形成するためのキャリアタンパク質に融合し得る。あるいは、癌関連タンパク質は、発現を上昇させるためまたは他の理由のために融合タンパク質として作製し得る。たとえば癌関連タンパク質が癌関連ペプチドであるとき、ペプチドをコードする核酸を発現のために他の核酸に連結し得る。

#### 【0145】

(癌)

「癌」、「新生物」、「腫瘍」、「癌性」および「癌腫」という用語は、典型的には調節されない細胞増殖によって特徴づけられる、哺乳動物における生理的状态を指すまたは表わす。一般に、本出願における検出または治療のための対象細胞は、前癌（たとえば良性）、悪性、転移性および非転移性細胞を含む。癌細胞の検出は特に興味深い。癌の例は、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病またはリンパ球系悪性疾患を含むが、これらに限定されない。そのような癌のより詳細な例は、扁平上皮癌（たとえば上皮扁平上皮癌）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌を含む肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸癌を含む胃癌、膀胱癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、ならびに頭部及び頸部癌を含む。

#### 【0146】

好ましくは、本発明の方法によって診断または治療される癌は、腎癌（腎細胞癌、明細胞癌）、肺癌（非小細胞癌）、膀胱癌（膀胱の腺癌、膀胱管癌、膀胱細胞癌および粘液性腺癌）および膀胱癌（浸潤性膀胱）である。

#### 【0147】

(抗体)

本発明は、tm-PTP 遺伝子によって発現される癌関連ポリペプチドに結合する、好ましくはそのようなポリペプチドに特異的に結合する抗体を使用する。「特異的に結合する」という用語は、抗体が、それらの標的癌関連ポリペプチドに対して他の関連ポリペプチドに対するそれらの親和性よりも実質的に大きな親和性を有することを意味する。ここで使用する、「抗体」という用語は、対象とする抗原決定基に結合することができる、無傷分子ならびにFab、F(ab')<sub>2</sub>およびFvなどのそのフラグメントを指す。抗体のさらなる例は、完全構築された抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（たとえば二重特異性抗体）、一本鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト

10

20

30

40

50

工作 (human engineered) 抗体、ヒト抗体、ダイアボディ、トリボディ、テトラボディ、ミニ抗体、線状抗体、キレート組換え抗体、細胞内発現抗体、ナノ抗体、小モジュール免疫薬剤 (small modular immunopharmaceutical (SMIP))、抗原結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、ラクダ化抗体、 $V_{HH}$  含有抗体、または抗体の1またはそれ以上のCDR配列を含むこれらの抗体のいずれかのムテイン、および所望生物学的活性（たとえばtm-PTPの細胞外ドメインへの結合）を示すことを条件として前記を含む組換えペプチドを含む。「実質的により大きな親和性」とは、他の関連ポリペプチドに対する親和性と比較して、本発明の標的癌関連ポリペプチドに対する親和性の測定可能な上昇が存在することを意味する。好ましくは、親和性は、標的癌関連ポリペプチドに対して少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、100倍、 $10^3$ 倍、 $10^4$ 倍、 $10^5$ 倍、 $10^6$ 倍またはそれ以上である。

10

## 【0148】

好ましくは、抗体は、高い親和性で、好ましくは $10^{-4}$  M、 $10^{-5}$  M、 $10^{-6}$  Mまたはそれ以下、好ましくは $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  Mまたはそれ以下、最も好ましくは $10^{-9}$  Mまたは $10^{-10}$  Mまたはそれ以下の解離定数でtm-PTPに結合する；サブナノモルの親和性（0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 nMまたはさらにはそれ以下）が好ましい。抗体は、tm-PTPの細胞外ドメインに特異的に結合することができ、場合によりtm-PTPの二量体化を促進し得る。

## 【0149】

20

癌関連ポリペプチドを、たとえば免疫療法のために、抗体を作製するために使用しようとするとき、癌関連ポリペプチドは、完全長タンパク質と少なくとも1個のエピトープまたは抗原決定基を共有すべきである。「エピトープ」または「抗原決定基」とは、ここではMHCに関連して抗体またはT細胞受容体を生成および/または結合するタンパク質の部分を意味する。それゆえ、ほとんどの場合、より小さな癌関連ポリペプチドに対して作製される抗体は完全長タンパク質に結合することができる。もう1つの実施形態では、エピトープはユニークである；すなわちユニークエピトープに対して生成される抗体はほとんどあるいは全く交差反応性を示さない。

## 【0150】

tm-PTP遺伝子によってコードされるいかなるポリペプチド配列も、ポリペプチドのある好ましい領域を決定するために分析し得る。高い抗原性の領域は、免疫応答の開始過程で抗原認識が起こり得る環境でポリペプチドの表面に露出される可能性が高いポリペプチドの領域を表わす数値を選択することにより、DNASTAR分析によるデータから決定される。たとえばtm-PTP遺伝子によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、DNASTARコンピュータアルゴリズム (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.; <http://www.dnastar.com/>) のデフォルトパラメータを使用して分析し得る。

30

## 【0151】

好ましくは、本発明の抗体はtm-PTPの非保存領域に特異的である。「非保存領域」は、PTPファミリーの他の成員との相同性がより低い領域を指す。好ましくは、これらの非保存領域における他のPTPファミリーとの類似性は50%以下である。

40

## 【0152】

好ましくは、抗tm-PTP抗体はtm-PTPに特異的であり、PTPファミリーの他の成員と交差反応しない。

## 【0153】

DNASTARコンピュータアルゴリズムを用いて常套的に得られ得るポリペプチド特徴は、Garnier-Robsonの領域、領域、ターン領域及びコイル領域 (Garnier et al., J. Mol. Biol., 120: 97 (1978)); Chou-Fasmanの領域、領域及びターン領域 (Adv. in Enzymol., 47: 45-148 (1978)); Kyte-Doolittleの親水性領域及

50

び疎水性領域 (J. Mol. Biol., 157:105-132 (1982)); Eisenberg の および 両親媒性領域; Karplus-Schulz の可動性領域; Emini の表面形成領域 (J. Virol., 55(3):836-839 (1985)); および Jameson-Wolf の高抗原性指数領域 (CABIOS, 4(1):181-186 (1988)) を含むが、これらに限定されない。Kyte-Doolittle の親水性領域及び疎水性領域、Emini の表面形成領域、および Jameson-Wolf の高抗原性指数領域 (すなわち Jameson-Wolf プログラムのデフォルトパラメータを使用して特定される、1.5 またはそれ以上の抗原性指数を有する 4 またはそれ以上の隣接アミノ酸を含む) は、抗原性に関して高度の潜在的可能性を示すポリペプチド領域を決定するために常套的に使用できる。タンパク質に対する抗体を作製するための 1 つのアプローチは、タンパク質の全部または一部のアミノ酸配列を選択および作製し、その配列を化学合成して、適切な動物、典型的にはウサギ、ハムスターまたはマウスに注入することである。オリゴペプチドを、親水性領域に位置し、それゆえ成熟タンパク質において露出される可能性が高いオリゴペプチドに基づき、癌関連タンパク質に対する抗体の作製のための候補因子として選択することができる。付加的なオリゴペプチドは、たとえば参照によりここに組み込まれる、the Antigenicity Index, Welling, G.W. et al., FEBS Lett. 188:215-218 (1985) を用いて決定できる。

#### 【0154】

ここで使用する「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち集団を構成する個々の抗体は、少量で存在する可能性がある、天然に起こり得る突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一抗原部位を対象とする。さらに、典型的には種々の決定基 (エピトープ) に対する種々の抗体を含む従来の (ポリクローナル) 抗体試料と対照的に、各々のモノクローナル抗体は抗原上の単一決定基を対象とする。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、異なる特異性と特徴を有する他の免疫グロブリンによって汚染されない、均一な培養によって合成されるという点で有利である。

#### 【0155】

「モノクローナル」という修飾語は、抗体の実質的に均一な集団から得られるという抗体の特徴を指示し、何らかの特定方法による抗体の生産を必要とすると解釈されるべきではない。たとえば本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 [1975] によって最初に記述されたハイブリドーマ手法によって、または組換え DNA 法によって (たとえば米国特許第 4,816,567 号参照) 作製し得る。「モノクローナル抗体」はまた、たとえば Clackson et al., Nature, 352:624628 [1991] および Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) に述べられている手法を用いてファージ抗体ライブラリーから単離し得る。

#### 【0156】

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは種々のクラスに割り当てられる。5 つの主要クラス、IgA、IgD、IgE、IgG および IgM があり、これらのいくつかは、サブクラスまたはアイソタイプ、たとえば IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 および IgA2 にさらに分類され得る。種々のクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  および  $\mu$  と呼ばれる。種々のクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元立体配置は周知である。異なるアイソタイプは異なるエフェクター機能を有する; たとえば IgG1 および IgG3 アイソタイプは ADCC 活性を有する。

#### 【0157】

「抗体フラグメント」は、無傷完全長抗体の一部、好ましくは無傷抗体の抗原結合または可変領域を含む。抗体フラグメントの例は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> および Fv フラグメント; ダイアボディ; 線状抗体 (Zapata et al., Prote

10

20

30

40

50

in Eng., 8(10):1057-1062(1995)); 一本鎖抗体分子; および抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体を含む。抗体のパパイン消化は、各々が単一抗原結合部位を有する、「Fab」フラグメントと呼ばれる2個の同一の抗原結合フラグメント、および残りの「Fc」フラグメントを生成し、Fcフラグメントの名称は、容易に結晶化するその能力を反映する。ペプシン処理は、抗体のVHおよびVLドメインを含む2個の「一本鎖Fv」または「sFv」抗体フラグメントを有するF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを生じ、これらのドメインは一本のポリペプチド鎖内に存在する。好ましくは、Fvポリペプチドは、Fvが抗原結合のための所望構造を形成することを可能にする、VHとVLドメインの間のポリペプチドリンカーをさらに含む。sFvの総説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315(1994) 参照。

10

#### 【0158】

「超可変」領域という用語は、抗原結合の役割を担う抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、相補性決定領域またはCDRからのアミノ酸残基[すなわちKabate al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991)によって述べられているように、軽鎖可変ドメイン内の残基24-34(L1)、50-56(L2)および89-97(L3)、および重鎖可変ドメイン内の31-35(H1)、50-65(H2)および95-102(H3)]および/または超可変ループからの残基(すなわち[Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)]によって述べられているように、軽鎖可変ドメイン内の残基26-32(L1)、50-52(L2)および91-96(L3)、および重鎖可変ドメイン内の26-32(H1)、53-55(H2)および96-101(H3)を含む。

20

#### 【0159】

「骨格」またはFR残基は、超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

#### 【0160】

30

(ポリクローナル抗体)

ポリクローナル抗体を作製する方法は当業者に公知である。ポリクローナル抗体は、たとえば免疫剤および、所望する場合は、アジュバントの1回またはそれ以上の注射によって、哺乳動物において惹起することができる。典型的には、免疫剤および/またはアジュバントを反復の皮下または腹腔内注射によって哺乳動物に注入する。免疫剤は、図面の核酸またはそのフラグメントによってコードされるタンパク質またはその融合タンパク質を含み得る。免疫剤を、免疫する哺乳動物において免疫原性であることが知られるタンパク質に複合することは有用であると考えられる。そのような免疫原性タンパク質の例は、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリンおよびダイズトリプシン阻害因子を含むが、これらに限定されない。使用し得るアジュバントの例は、フロイント完全アジュバントおよびMPL-TDMアジュバント(モノホスホリルリビドA、合成トレハロースジコリノミコレート)を含む。免疫プロトコールは、過度の実験を伴わずに当業者によって選択され得る。

40

#### 【0161】

(モノクローナル抗体)

好ましくは、抗体はモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, Nature, 256:495(1975)によって述べられているような、ハイブリドーマ法を用いて作製し得る。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスターまたは他の適切な宿主動物を、典型的には、免疫剤に特異的に結合する抗体を産生するまたは産生することができるリンパ球を惹起する免疫剤で免疫する。あるいは

50

は、リンパ球をインビトロで免疫し得る。免疫剤は、典型的には癌関連ポリペプチド、またはそのフラグメントまたはその融合タンパク質を含む。一般に、ヒト起源の細胞を所望する場合は末梢血リンパ球（「PBL」）を使用し、または非ヒト哺乳動物ソースを所望する場合は脾細胞またはリンパ節細胞を使用する。リンパ球を、次に、ハイブリドーマ細胞を形成するためにポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を用いて不死化細胞系と融合する（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) p p. 59 - 103）。不死化細胞系は通常、形質転換した哺乳動物細胞、特にげっ歯動物、ウシおよびヒト起源の骨髓腫細胞である。通常は、ラットまたはマウス骨髓腫細胞系が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは非融合不死化細胞の増殖または生存を阻害する1またはそれ以上の物質を含む、適切な培地で培養し得る。たとえば親細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRT）を欠く場合、ハイブリドーマのための培地は、典型的にはヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン（「HAT培地」）を含み、前記物質はHGPRT欠損細胞増殖を妨げる。

10

#### 【0162】

モノクローナル抗体テクノロジーは、研究、診断および治療を実施するうえで使用される。モノクローナル抗体は、インビトロ診断のために放射免疫測定法、固相酵素免疫検定法、免疫細胞病理学およびフローサイトメトリーにおいて、およびヒト疾患の診断および免疫療法のためにインビボで使用される。Waldmann, T. A. (1991) Science 252: 1657 - 1662。特に、モノクローナル抗体は、正常組織を避けながら悪性病変を標的することが望ましい、癌の診断および治療に広く適用されてきた。たとえばFrankel et al. への米国特許第4,753,894号；Ring et al. への米国特許第4,938,948号；およびBjorn et al. への米国特許第4,956,453号参照。

20

#### 【0163】

t m - P T P に対するモノクローナル抗体は、単独でまたは血清中のL1接着分子の検出のための方法と組み合わせて、腎臓、卵巣、子宮頸、肺、脾臓および/または皮膚癌の診断方法において使用し得る。

30

#### 【0164】

（抗体フラグメント）

ここで使用する「抗体」という用語は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> およびFvフラグメント；ダイアボディ；線状抗体；一本鎖抗体分子；二重特異性、三重特異性抗体等のような多重特異性抗体；ミニ抗体；キレート組換え抗体；トリボディ；バイボディ；細胞内発現抗体；ナノ抗体；小モジュール免疫薬剤（SMIP）、結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質；ラクダ化抗体；V<sub>H</sub>H含有抗体、キメラ抗体等、および完全抗体の修飾によって生産されるまたは組換えDNA技術を用いて新規合成される抗体フラグメントから形成される他のポリペプチドを含む、当技術分野において公知である抗体フラグメントを含む。

40

#### 【0165】

「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントを指し、前記フラグメントは、同じポリペプチド鎖（V<sub>H</sub> V<sub>L</sub>）内に軽鎖可変ドメイン（V<sub>L</sub>）に連結された重鎖可変ドメイン（V<sub>H</sub>）を含む。あまりに短すぎて同じ鎖上の2つのドメインの間の対合を許容しないリンカーを使用することにより、ドメインはもう1本の鎖の相補的ドメインと対合することを強いられ、2つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディは、たとえば欧州特許第EP404,097号；国際公開番号第WO93/11161号；および30 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444 - 6448 (1993) の中でより詳細に述べられている。

50

#### 【0166】

抗体のパパイン消化は、各々が単一抗原結合部位を有する  $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$  および  $C_H$  ドメインからなる一価フラグメントである、「F a b」フラグメントと呼ばれる2個の同一の抗原結合フラグメント、および残りの「F c」フラグメントを生成し、F c フラグメントの名称は、容易に結晶化するその能力を反映する。ペプシン処理は、抗体の  $V_H$  および  $V_L$  ドメインを含む2個の「一本鎖 F v」または「s c F v」抗体フラグメントを有する、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2個の F a b フラグメントを含む二価フラグメントである、 $F(a b')_2$  フラグメントを生じ、これらのドメインは一本のポリペプチド鎖内に存在する。好ましくは、F v ポリペプチドは、F v が抗原結合のための所望構造を形成し、一本鎖抗体 (s c F v) を生じることを可能にする  $V_H$  と  $V_L$  ドメインの間のポリペプチドリンカーをさらに含み、 $V_L$  と  $V_H$  領域は、それらが一本のタンパク質鎖として生成されることを可能にする合成リンカーによって一価分子を形成するように対合する (Bird et al., Science 242: 423 - 426, 1988、および Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879 - 5883, 1988)。s F v の総説については、Pluckhthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315 (1994) 参照。F d フラグメントは、 $V_H$  および  $C_H 1$  ドメインからなる。

10

## 【0167】

付加的な抗体フラグメントは、 $V_H$  ドメインからなるドメイン抗体 (d A b) フラグメント (Ward et al., Nature 341: 544 - 546, 1989) を含む。

20

## 【0168】

「線状抗体」は、一对の抗原結合領域を形成する一对の縦列 F d セグメント ( $V_H - C_H 1 - V_H - C_H 1$ ) を含む。線状抗体は二重特異性または単一特異性であり得る (Zapata et al. Protein Eng. 8: 1057 - 62 (1995))。

## 【0169】

ペプチドリンカーによって (ヒンジなし) または I g G ヒンジによって  $C_H 3$  に融合した s c F v からなる「ミニ抗体」は、Olafsen, et al., Protein Eng Des Sel. 2004 Apr; 17 (4): 315 - 23 の中で記述された。

30

## 【0170】

軽鎖を欠く機能性重鎖抗体は、テンジクザメ (nurse sharks) (Greenberg et al., Nature 374: 168 - 73, 1995)、ウォベゴングザメ (wobbegong sharks) (Nuttall et al., Mol Immunol. 38: 313 - 26, 2001) およびラクダ、ヒトコブラクダ、アルパカおよびラマなどのラクダ科 (Camelidae) (Hamers - Casterman et al., Nature 363: 446 - 8, 1993; Nguyen et al., J. Mol. Biol. 275: 413, 1998) において天然に生じる。抗原結合部位は、これらの動物では単一ドメイン、 $V_H$  ドメインに減じている。これらの抗体は、重鎖可変領域だけを用いて抗原結合領域を形成する、すなわちこれらの機能性抗体は、 $H_2 L_2$  構造を有する重鎖だけのホモ二量体である (「重鎖抗体」または「H C A b」と称される)。ラクダ化  $V_H$  は、報告によれば、ヒンジ、 $C_H 2$  および  $C_H 3$  ドメインを含み、 $C_H 1$  ドメインを欠く I g G 2 および I g G 3 定常領域と結合している (Hamers - Casterman et al., 前出)。たとえばラマ I g G 1 は、 $V_H$  が、ヒンジ、 $C_H 1$ 、 $C_H 2$  および  $C_H 3$  ドメインを含む定常領域と結合している通常の ( $H_2 L_2$ ) 抗体アイソタイプであるが、ラマ I g G 2 および I g G 3 は、 $C_H 1$  ドメインを欠き、軽鎖を含まない重鎖だけのアイソタイプである。古典的  $V_H$  単独フラグメントは可溶性形態で生産することが難しいが、骨格残基をより  $V_H$  様に変化させたとき、溶解度の改善と特異的結合が得られ得る。(たとえば Reichman, e

40

50

t al., J Immunol Methods 1999, 231:25-38 参照)。ラクダ化V<sub>H</sub>Hドメインは、高親和性で抗原に結合し(Desmyter et al., J. Biol. Chem. 276:26285-90, 2001)、溶液中で高い安定性を有する(Ewert et al., Biochemistry 41:3628-36, 2002)ことが認められた。ラクダ化重鎖を有する抗体を作成するための方法は、たとえば米国特許公開第20050136049および同第20050037421号に述べられている。

#### 【0171】

重鎖抗体の可変ドメインは、15kDaだけの分子量を有する最小完全機能性抗原結合フラグメントであるため、この実体はナノボディと称される(Cortez-Retamozo et al., Cancer Research 64:2853-57, 2004)。ナノボディライブラリーは、Conrath et al., (Antimicrob Agents Chemother 45:2807-12, 2001)に述べられているように免疫ヒトコブラクダからまたは に述べられている組換え法を用いて作製し得る。

10

#### 【0172】

二重特異性Fab-scFv(「バイボディ」)および三重特異性Fab-(scF)(2)(「トリボディ」)の作製は、Schoonjans et al. (J Immunol. 165:7050-57, 2000)およびWillems et al. (J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003)に述べられている。バイボディ又はトリボディのためには、scFv分子をVL-CL(L)およびVH-CH<sub>1</sub>(Fd)鎖の一方または両方に融合する、たとえばトリボディを生産するには2個のscFvをFabのC末端に融合し、一方バイボディでは1個のscFvをFabのC末端に融合する。

20

#### 【0173】

細胞内発現抗体は、細胞内発現を明らかにし、細胞内タンパク質機能を操作することができる一本鎖抗体である(Biocca, et al., EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby et al., Proc Natl Acad Sci USA. 101:17616-21, 2004)。細胞領域内に抗体構築物を保持する細胞シグナル配列を含む細胞内発現抗体は、Mhashilkar et al. (EMBO J. 14:1542-51, 1995)およびWheeler et al. (FASEB J. 17:1733-5, 2003)に述べられているように作製し得る。トランスボディは、タンパク質導入ドメイン(PTD)が一本鎖可変フラグメント(scFv)と融合している細胞透過性抗体である(Heng et al., Med Hypotheses. 64:1105-8, 2005)。

30

#### 【0174】

さらに、SMIPまたは標的タンパク質に特異的な結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質である抗体が考慮される。これらの構築物は、抗体のエフェクター機能を実行するために必要な免疫グロブリンドメインに融合した抗原結合ドメインを含む一本鎖ポリペプチドである。たとえば国際公開番号第WO03/041600号、米国特許公開第20030133939号および米国特許公開第20030118592号参照。

40

#### 【0175】

(多重特異性抗体)

一部の実施形態では、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する多重特異性(たとえば二重特異性、三重特異性等)モノクローナル抗体を生成することが望ましいと考えられる。例示的な二重特異性抗体は、tm-PTPの2つの異なるエピトープに結合し得る。あるいは、細胞防御機構をtm-PTP発現細胞に集中させるために、抗tm-PTP腕を、T細胞受容体分子(たとえばCD2またはCD3)などの白血球上の引き金分子、またはFcRI(CD64)、FcRII(CD32)およびFcRIII(CD16)などのIgG(FcR)についてのFc受容体に結合す

50

る腕と組み合わせ得る。

【0176】

もう1つの例では、結合特異性の一方が癌関連ポリペプチド、 $t m - P T P$  またはそのフラグメントに対してであり、他方が他の何らかの抗原、たとえば細胞表面タンパク質または受容体または受容体サブユニット、好ましくは腫瘍特異的または組織特異的であるものに対してである。例は、腎癌特異性抗原、卵巣癌特異性抗原、子宮頸癌特異性抗原、肺癌特異性抗原、膵癌特異性抗原または皮膚癌特異性抗原を含む。

【0177】

二重特異性抗体はまた、細胞傷害性薬剤を、 $t m - P T P$  を発現する細胞に局在化させるためにも使用し得る。これらの抗体は、 $t m - P T P$  結合腕と細胞傷害性薬剤（たとえばサポリン、抗インターフェロン60、ピンカルカロイド、リシンA鎖、メトトレキサートまたは放射性同位体ハプテン）に結合する腕を有する。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体フラグメントとして作製できる。

【0178】

二重特異性抗体を作製するためのもう1つのアプローチによれば、一对の抗体分子の間の界面を、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体のパーセンテージを最大化するように工作することができる。好ましい界面は、抗体定常ドメインの $C_H3$ ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第一抗体分子の界面からの1またはそれ以上の小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖（たとえばチロシンまたはトリプトファン）で置換する。第二抗体分子の界面では、大きなアミノ酸側鎖をより小さなアミノ酸側鎖（たとえばアラニンまたはトレオニン）で置換することにより、大きな側鎖と同一または類似の大きさの代償性の「腔」が創製される。これは、ホモ二量体などの他の望ましくない最終産物に比べてヘテロ二量体の収率を上昇させるための機構を提供する。1996年9月6日公開の国際公開番号第W096/27011号参照。

【0179】

二重特異性抗体は、架橋された抗体または「ヘテロ複合」抗体を含む。たとえばヘテロ複合体中の抗体の1つをアビジンに結合し、他方をビオチンに結合することができる。ヘテロ複合体は、何らかの好都合な架橋法を用いて作製し得る。適切な架橋剤は当技術分野において周知であり、米国特許第4,676,980号の中で数多くの架橋手法と共に開示されている。

【0180】

抗体フラグメントから二重特異性抗体を生成するための手法も文献に記述されている。たとえば二重特異性抗体は化学結合を用いて作製できる。Brennan et al., Science 229:81 (1985) は、 $F(a b')_2$  フラグメントを生成するために無傷抗体をタンパク質分解によって切断する手法を述べている。これらのフラグメントを、近接ジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を防ぐためにジチオール錯化剤、亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元する。生成される $F a b'$  フラグメントを、次に、チオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換する。次に $F a b' - T N B$  誘導体の1つをメルカプトエチルアミンで還元して $F a b'$  チオールに再変換し、等モル量の他方の $F a b' - T N B$  誘導体と混合して二重特異性抗体を形成する。生産された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための試薬として使用できる。さらなる実施形態では、大腸菌から直接回収される $F a b' - S H$  フラグメントを、二重特異性抗体を形成するためにインビトロで化学結合することができる (Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992))。

【0181】

Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) は、完全ヒト化二重特異性抗体 $F(a b')_2$  分子の生産を述べている。各々の $F a b'$  フラグメントを大腸菌から別々に分泌させ、二重特異性抗体を形成するためにインビトロで直接化学結合に供する。そのようにして形成された二重特異性抗体は、HER2受容体を過剰発現する細胞および正常ヒトT細胞に結合することができ、ならびにヒト乳



癌標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性の引き金を引くことができた。

#### 【0182】

組換え細胞培養物から直接二重特異性抗体フラグメントを作製し、単離するための様々な手法も記述されている。たとえばロイシンジッパーを用いて二重特異性抗体が生産された (K o s t e l n y e t a l . , J . I m m u n o l . 1 4 8 ( 5 ) : 1 5 4 7 - 1 5 5 3 ( 1 9 9 2 ) ) 。 F o s および J u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合によって2つの異なる抗体の F a b ' 部分に連結した。抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元して単量体を形成し、その後再酸化して抗体ヘテロ二量体を形成した。この方法はまた、抗体ホモ二量体の生産のためにも利用できる。H o l l i n g e r e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 0 : 6 4 4 4 - 6 4 4 8 ( 1 9 9 3 ) によって記述された「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体フラグメントを作製するための選択的機序を提供した。

10

#### 【0183】

フラグメントは、あまりに短すぎて同じ鎖上の2つのドメインの間の対合を許容しないリンカーによって軽鎖可変領域 ( V <sub>L</sub> ) に連結された重鎖可変領域 ( V <sub>H</sub> ) を含む。従って、1つのフラグメントの V <sub>H</sub> と V <sub>L</sub> ドメインはもう1つのフラグメントの相補的 V <sub>L</sub> および V <sub>H</sub> ドメインと対合することを強いられる。一本鎖 F v ( s F v ) 二量体の使用によって二重特異性抗体フラグメントを作製するためのもう1つの戦略も報告された。G r u b e r e t a l . , J . I m m u n o l . 1 5 2 : 5 3 6 8 ( 1 9 9 4 ) 参照。

20

#### 【0184】

あるいは、二重特異性抗体は、Z a p a t a e t a l . P r o t e i n E n g . 8 ( 1 0 ) : 1 0 5 7 - 1 0 6 2 ( 1 9 9 5 ) に述べられているように生産される「線状抗体」であり得る。簡単に述べると、これらの抗体は、一对の抗原結合領域を形成する一对の縦列 F d セグメント ( V <sub>H</sub> - C <sub>H</sub> 1 - V <sub>H</sub> - C <sub>H</sub> 1 ) を含む。線状抗体は二重特異性または単一特異性であり得る。

#### 【0185】

三価以上を有する抗体も考慮される。たとえば三重特異性抗体が作製できる ( T u t t e t a l . , J . I m m u n o l . 1 4 7 : 6 0 ( 1 9 9 1 ) ) 。 「キレート組換え抗体」は、標的抗原の隣接および非重複エピトープを認識する二重特異性抗体であり、両方のエピトープに同時に結合するのに十分なだけ柔軟である ( N e r i e t a l . , J M o l B i o l . 2 4 6 : 3 6 7 - 7 3 , 1 9 9 5 ) 。

30

#### 【0186】

もう1つの実施形態では、癌関連ポリペプチドに対する抗体は、以下で述べるように、癌関連ポリペプチドの生物学的機能を低下させるまたは排除することができる。すなわち、癌関連ポリペプチド (または癌関連ポリペプチドを含む細胞) への抗癌関連ポリペプチド抗体 (ポリクローナルまたは、好ましくはモノクローナル) の添加は、癌関連ポリペプチド活性を低下させ得るかまたは排除し得る。一般に、少なくとも25%の活性低下が好ましく、少なくとも約50%の低下が特に好ましく、約95~100%低下が特別に好ましい。t m - P T P の生物学的機能を阻害するために二量体化が提案されており、それゆえ t m - P T P 単量体の二量体化を促進するおよび/または t m - P T P 二量体の単量体への分離を促進する抗体が特に好ましい。たとえば抗N末端ペプチドポリクローナル抗体を用いて t m - P T P 受容体を架橋し得る。あるいは、トランスフェクトしたN末端 H A 標識 t m - P T P 単量体を、抗 H A 抗体を用いて架橋することができる (図5) 。この好ましい結果を達成する他の方法は当業者に明白である。

40

#### 【0187】

(抗体の組換え生産)

抗体の組換え生産のために、それをコードする核酸を単離し、さらなるクローニング (DNAの増幅) のためまたは発現のために複製可能ベクターに挿入する。モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来手法を用いて (たとえば抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用するこ

50

とによって)容易に単離され、配列決定される。多くのベクターが使用可能である。ベクターの成分は一般に以下の1またはそれ以上を含むが、これらに限定されない:その例が当技術分野において周知である、シグナル配列、複製起点、1またはそれ以上の選択マーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終結配列。

#### 【0188】

組換えポリペプチドの機能的発現のために、当業者に周知の様々な異種系が使用可能である。そのような系は、細菌 (Strosberg, et al., Trends in Pharmacological Sciences (1992) 13:95-98)、酵母 (Pausch, Trends in Biotechnology (1997) 15:487-494)、いくつかの種類の昆虫細胞 (Vanden Broeck, Int. Rev. Cytology (1996) 164:189-268)、両性動物細胞 (Jayawickreme et al., Current Opinion in Biotechnology (1997) 8:629-634) およびいくつかの哺乳動物細胞系 (CHO、HEK293、COS等; Gerhardt, et al., Eur. J. Pharmacology (1997) 334:1-23 参照)を含む。これらの例は、線虫から得られる細胞系 (PCT出願第WO98/37177号)を含む、他の可能な細胞発現系の使用を排除しない。

10

#### 【0189】

(キメラ、ヒト化、ヒト工作 (Human Engineered) (商標) およびヒト抗体)

20

単独または複合体としてヒトにおいてインビボ反復投与したげっ歯動物抗体は、受容者においてげっ歯動物抗体に対する免疫応答、いわゆるHAMMA (ヒト抗マウス抗体) 応答を生じさせる。HAMMA 応答は、反復投与が必要である場合、薬剤の有効性を制限し得る。抗体の免疫原性は、ポリエチレングリコールなどの親水性ポリマーによる抗体の化学修飾によって、または抗体結合構造をよりヒト様にするための遺伝子工学の方法を用いることによって低下させ得る。

#### 【0190】

もう1つの実施形態では、癌関連ポリペプチドに対する抗体はヒト化またはキメラ抗体である。「ヒト化」抗体は、非ヒト種からの免疫グロブリンに実質的に由来する抗原部位を有し、分子の残りの免疫グロブリン構造はヒト免疫グロブリンの構造および/または配列に基づく分子を指す。抗原結合部位は、定常ドメインに融合した完全な可変ドメインまたは可変ドメイン内の適切な骨格領域に移植された相補性決定領域 (CDR) だけを含み得る。抗原結合部位は、野生型であるかまたは1またはそれ以上のアミノ酸置換によって修飾されてもよく、たとえばヒト免疫グロブリンにより密接に類似するように修飾され得る。あるいは、ヒト化抗体は、親の非ヒト抗体の抗原結合特性を保持するまたは実質的に保持するが、ヒトに投与したとき親抗体に比べて低い免疫原性を示すキメラ抗体に由来し得る。ここで使用する、「キメラ抗体」という語句は、典型的には異なる種を起源とする2つの異なる抗体に由来する配列を含む抗体を指す (たとえば米国特許第4,816,567号参照)。典型的には、これらのキメラ抗体では、軽鎖と重鎖の両方の可変領域が1つの種の哺乳動物に由来する抗体の可変領域を模倣し、一方定常部分はもう1つの種に由来する抗体内の配列と相同である。最も典型的には、キメラ抗体はヒトおよびマウス抗体フラグメントを含み、一般にヒト定常領域とマウス可変領域を含む。げっ歯動物モノクローナル抗体の可変Igドメインがヒト定常Igドメインに融合しているキメラモノクローナル抗体は、当技術分野で公知の標準手法を用いて作製できる (Morrison, S. L., et al. (1984) Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human Constant Region Domains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855; および Boulianne, G. L., et al., Nature 312, 643-646 (1984) 参照)。一部のキメラモノクローナル抗体はヒトにおいてより低い免疫原性を明らかにした

30

40

50

が、マウス可変 I g ドメインはまだ有意のヒト抗マウス応答を導き得る。

【0191】

ヒト化抗体は、ヒト抗体（アクセプター抗体）の相補性決定領域（CDR）を、所望特異性、親和性および能力を有するマウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト抗体（ドナー抗体）からのもので置換することによって作製される。一部の場合には、ヒト「アクセプター」抗体の Fv 骨格残基を「ドナー」抗体からの対応する非ヒト残基によって置換する。ヒト化抗体はまた、受容者抗体または移入された CDR または骨格配列のいずれにおいても認められない残基を含むことがある。一般に、ヒト化抗体は、CDR 領域の全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、および骨格残基（FR）領域の全部または実質的に全部がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含む。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む（Jones et al., Nature, 321: 522 - 525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323 - 329 (1988); および Presta, Curr. Op. Struct. Biol, 2: 593 - 596 (1992)）。そのようなキメラ形態の1つの明らかな利点は、たとえば可変領域が、たとえばヒト細胞製剤に由来する定常領域と組み合わせて、容易に入手可能なハイブリドーマまたは非ヒト宿主生物からの B 細胞を使用して現在公知のソースから好都合に誘導できることである。可変領域が作製の容易さという利点を有し、特異性はそのソースによって影響されないが、ヒトである定常領域は、抗体を注入したときヒト被験者から免疫応答を惹起する可能性が非ヒトソースからの定常領域よりも低い。しかし、定義はこの特定例に限定されない。

10

20

30

40

【0192】

ヒト化抗体は親マウスモノクローナル抗体よりもヒトにおける免疫原性ははるかに低い。ため、それらは、はるかに低いアナフィラキシーの危険度でヒトの治療のために使用できる。それゆえ、これらの抗体は、たとえば新生物性疾患の治療のための放射線増感剤としての使用またはたとえば癌治療の副作用を軽減するための方法における使用などの、ヒトへのインビボ投与を含む治療適用において好ましいと考えられる。非ヒト抗体をヒト化するための方法は当技術分野において周知である。一般に、ヒト化抗体は、ヒト以外のソースから導入された1またはそれ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基はしばしばインポート残基と称され、典型的にはインポート可変ドメインから得られる。ヒト化は、げっ歯動物 CDR または CDR 配列とヒト抗体の対応配列を置換することにより、基本的には Winter とその共同研究者達の方法に従って実施できる（Jones et al., Nature 321: 522 - 525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323 - 327 (1988); Verhoeven et al., Science 239: 1534 - 1536 (1988)）。従って、そのようなヒト化抗体は、無傷ヒト可変ドメインより実質的に少ない部分が非ヒト種からの対応配列によって置換された、キメラ抗体である（米国特許第 4, 816, 567 号）。實際上、ヒト化抗体は、典型的には一部の CDR 残基およびおそらくいくつかの FR 残基がげっ歯動物抗体の類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。

30

40

【0193】

CDR 移植の難点は、しかしながら、骨格領域のアミノ酸が抗原結合に寄与し得るため、および CDR ループのアミノ酸が2つの可変 I g ドメインの結合に影響を及ぼし得るため、もとのマウス抗体よりも実質的に低い結合親和性を有するヒト化抗体を生じ得ることである。ヒト化モノクローナル抗体の親和性を維持するため、CDR 移植手法は、もとのマウス抗体の骨格領域に最も密接に類似するヒト骨格領域を選択することによって、および抗原結合部位のコンピュータモデリングによって支援される骨格または CDR 内の単一アミノ酸の部位指定突然変異誘発によって、改善できる（たとえば Co, M. S., et al. (1994) J. Immunol. 152, 2968 - 2976）。

50

## 【 0 1 9 4 】

抗体をヒト化する1つの方法は、ヒト重鎖および軽鎖配列に対して非ヒト重鎖および軽鎖配列を整列し、そのようなアラインメントに基づいて非ヒト骨格を選択し、ヒト骨格で置換して、ヒト化配列の立体配座を予測するために分子モデリングし、親抗体の立体配座と比較することを含む。この工程に続いて、ヒト化配列の予測立体配座が親非ヒト抗体の非ヒトCDRの立体配座に密接に近づくまで、CDRの構造を乱すCDR領域内の残基の復帰突然変異を反復する。

## 【 0 1 9 5 】

非ヒト免疫グロブリンに由来する抗原結合部位を含む多くの「ヒト化」抗体分子が記述されており、ヒト定常ドメインに融合されたげっ歯動物V領域およびそれらの関連CDR (Winter et al. (1991) Nature 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224; Shaw et al. (1987) J Immunol. 138:4534-4538; およびBrown et al. (1987) Cancer Res. 47:3577-3583)、適切なヒト抗体定常ドメインとの融合の前にヒト支持FRに移植されたげっ歯動物CDR (Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536; およびJones et al. (1986) Nature 321:522-525)、および組換えによって薄板化されたげっ歯動物FRによって支持されるげっ歯動物CDR (1992年12月23日公開の欧州特許公開第519,596号)を有するキメラ抗体を含む。

## 【 0 1 9 6 】

ヒト化抗体は、たとえば：(1)非ヒト相補性決定領域(CDR)をヒト骨格及び定常領域に移植すること(当技術分野で「ヒト化する」と称される工程)、またはその逆、(2)非ヒト可変ドメイン全体を移植するが、表面残基の置換によってそれらをヒト様表面で「覆うこと(cloaking)」(当技術分野で「薄板化(veneering)」と称される工程)を含む、様々な方法によって達成され得る。本発明において、ヒト化抗体は、「ヒト化」および「薄板化」抗体の両方を含む。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物、たとえば内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されたマウスに導入することによって作製できる。攻撃誘発後、ヒト抗体産生が認められ、これは、遺伝子再構成、構築および抗体レパートリーを含むすべての点でヒトにおいて見られるものと密接に類似する。このアプローチは、たとえば米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号および各々が参照によりここに組み込まれる以下の学術公表文献に述べられている：Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992)；Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994)；Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)；Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996)；Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996)；Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)；Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)；Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57:6851-6855 (1984)；Morrison and Oi, Adv. Immunol, 44:65-92 (1988)；Verhoeyer et al., Science 239:1534-1536 (1988)；Padlan, Molec. Immun. 25:489-498 (1991)；Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169-217 (1994)；およびKettleborough, C. A. et al., Protein Eng. 4(7):773-83 (1991)。「相補性決定領域」という語句は

10

20

30

40

50

、天然免疫グロブリン結合部位の天然Fv領域の結合親和性および特異性領域を共に規定するアミノ酸配列を指す。たとえばChothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services NIH Publication No. 91-3242 (1991) 参照。「定常領域」という語句は、エフェクター機能を与える抗体分子の部分の部分を指す。本発明では、マウス定常領域をヒト定常領域によって置換する。対象ヒト化抗体の定常領域はヒト免疫グロブリンに由来する。重鎖定常領域は5つのアイソタイプ： 、 、 、 またはμのいずれかから選択できる。抗体をヒト化する1つの方法は、ヒト重鎖および軽鎖配列に対して非ヒト重鎖および軽鎖配列を整列し、そのようなアラインメントに基づいて非ヒト骨格を選択し、ヒト骨格で置換して、ヒト化配列の立体配座を予測するために分子モデリングし、親抗体の立体配座と比較することを含む。この工程に続いて、ヒト化配列の予測立体配座が親非ヒト抗体の非ヒトCDRの立体配座に密接に近づくまで、CDRの構造を乱すCDR領域内の残基の復帰突然変異を反復する。そのようなヒト化抗体は、たとえばアシュウェル(Ashwell)受容体による、取込み及び清掃を促進するためにさらに融合体化し得る。たとえば参照によりここに組み込まれる、米国特許第5,530,101号および同第5,585,089号参照。

10

#### 【0197】

(Human Engineering) (商標)

抗体可変ドメインのHuman Engineering (商標) (ヒト工作) は、抗体分子の結合活性を維持しながら免疫原性を低下させるための方法としてStudnickaによって記述された[たとえばStudnicka et al., 米国特許第5,766,886号; Studnicka et al., Protein Engineering 7:805-814 (1994) 参照]。この方法によれば、各々の可変領域アミノ酸に置換の危険度が割り当てられる。アミノ酸置換は3つの危険度カテゴリーの1つによって識別される：(1) 低危険度変化は、免疫原性を低下させる最大の潜在的可能性を有し、抗原結合を妨げる可能性が最も低いものである；(2) 中危険度変化は、免疫原性をさらに低下させるが、抗原結合またはタンパク質の折りたたみに影響を及ぼす可能性がより大きいものである；(3) 高危険度残基は、抗体構造に結合するまたは抗体構造を維持するために重要であり、抗原結合またはタンパク質の折りたたみが影響を受ける危険度が最も高いものである。プロリンの三次元構造上の役割のゆえに、プロリンにおける修飾は、その位置が典型的には低危険度位置である場合でも、一般に少なくとも中危険度変化とみなされる。

20

30

#### 【0198】

げっ歯動物抗体の軽鎖および重鎖の可変領域は、抗原結合またはタンパク質の折りたたみに有害な作用を及ぼす可能性が低い、ヒト環境において免疫原性を低下させる可能性が高いと決定された位置でヒトアミノ酸を置換するために以下のようにヒト工作される。「低危険度」位置にあり、上記方法に従った修飾のための候補であるアミノ酸残基を、げっ歯動物可変領域のアミノ酸配列をヒト可変領域配列と整列することによって特定する。個別VHまたはVL配列、またはヒトコンセンサスVHまたはVL配列、または個別またはコンセンサスヒト生殖細胞系配列を含む、いかなるヒト可変領域も使用できる。どのような数の低危険度位置、またはすべての低危険度位置のアミノ酸残基も変化させ得る。たとえば整列したマウスとヒトアミノ酸残基が異なる各々の低危険度位置で、げっ歯動物残基をヒト残基で置換するアミノ酸修飾を導入する。あるいは、すべての低危険度位置および何らかの数の中危険度位置のアミノ酸残基を変化させ得る。理想的には、最小の免疫原性を達成するためにすべての低および中危険度位置をげっ歯動物からヒト配列に変更する。

40

#### 【0199】

修飾重鎖および/または軽鎖可変領域を含む合成遺伝子を構築し、ヒト重鎖および/または軽鎖定常領域に連結する。IgA (IgA1またはIgA2などの何らかのサブ

50

クラスの)、IgD、IgE、IgG(IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4などの何らかのサブクラスの)、またはIgMを含む、いかなるヒト重鎖及び軽鎖定常領域も、ヒト抗作(商標)抗体可変領域と組み合わせて使用し得る。ヒト重鎖および軽鎖遺伝子を哺乳動物細胞などの宿主細胞に導入し、生じた組換え免疫グロブリン産物を入手して、特性決定する。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー[Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381(1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581(1991)]を含む当技術分野で公知の様々な手法を用いて生産できる。Cole et al. および Boerner et al. の手法もヒトモノクローナル抗体の作製のために使用できる[Cole et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77(1985)およびBoerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95(1991)]。癌関連ポリペプチドに対するヒト抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むように工作したトランスジェニック動物を用いて生産できる。たとえば国際公開番号第WO98/24893号は、ヒトIg遺伝子座を有するトランスジェニック動物を開示しており、前記動物は、内因性重鎖および軽鎖遺伝子座の不活性化のために機能性内因性免疫グロブリンを生産しない。国際公開番号第WO91/10741号も、免疫原に対する免疫応答を開始させることができるトランスジェニック非霊長類哺乳動物宿主を開示しており、前記動物宿主では、抗体は霊長類定常および/または可変領域を有し、内因性免疫グロブリンをコードする遺伝子座は置換または不活性化されている。国際公開番号第WO96/30498号は、修飾抗体分子を形成するために定常または可変領域の全部または一部を置換することのような、哺乳動物における免疫グロブリン遺伝子座を修飾するためのCre/Lox系の使用を開示する。国際公開番号第WO94/02602号は、不活性化内因性Ig遺伝子座と機能性ヒトIg遺伝子座を有する非ヒト哺乳動物宿主を開示する。米国特許第5,939,598号は、マウスが内因性重鎖を欠き、1またはそれ以上の異種定常領域を含む外来性免疫グロブリン遺伝子座を発現するトランスジェニックマウスを作製する方法を開示する。

#### 【0200】

上述したトランスジェニック動物を使用して、選択抗原分子に対する免疫応答を生じさせることができ、抗体産生細胞を動物から取り出して、ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを生産するために使用できる。免疫プロトコール、アジュバント等は当技術分野において公知であり、たとえば国際公開番号第WO96/33735号に述べられているようにトランスジェニックマウスの免疫において使用される。モノクローナル抗体は、対応するタンパク質の生物学的活性または生理的作用を阻害するまたは中和する能力に関して試験することができる。Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551(1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258(1993); Bruggemann et al., Year in Immunol., 7:33(1993); および米国特許第5,591,669号、米国特許第5,589,369号、米国特許第5,545,807号; および米国特許出願第20020199213号、国際公開番号第WO96/34096号および米国特許出願第20030194404号; および米国特許出願第20030031667号も参照のこと。米国特許出願第20030092125号は、所望エピトープに対する動物の免疫応答にバイアスをかけるための方法を述べている。ヒト抗体はまた、インビトロで活性化B細胞によって作製し得る(米国特許第5,567,610および同第5,229,275号参照)。

#### 【0201】

モノクローナル抗体を作製するために有用な付加的なトランスジェニック動物は、米国特許第5,770,429号およびFishwild, et al. (Nat. Biotechnol., 14:845-851, 1996)に述べられている、Medarex HuMAb-MOUSE(登録商標)を含み、これは、ヒト抗体の重鎖および軽鎖をコー

ドする、再構成されていないヒト抗体遺伝子からの遺伝子配列を含む。HuMAb-MOUSE（登録商標）の免疫は、標的タンパク質に対するモノクローナル抗体の生産を可能にする。

#### 【0202】

また、Ishida et al. (Cloning Stem Cells, 4: 91-102, 2002) は、ヒトDNAのメガ塩基サイズのセグメントを含み、ヒト免疫グロブリン(hIg) 遺伝子座全体を組み込んだTransChromo Mouse (TCMOUSE (商標)) を述べている。TCMOUSEは、すべてのサブクラスのIgG (IgG1 - IgG4) を含む、hIgの十分に多様なレパートリーを有する。様々なヒト抗原によるTC Mouseの免疫は、ヒト抗体を含む抗体応答を生じさせる。

10

#### 【0203】

組換えヒト抗体遺伝子のレパートリーを作製するためのテクノロジーの開発、および糸状バクテリオファージの表面上でのコードされる抗体フラグメントの提示は、ヒト抗体を直接作製するための手段を提供した。ファージテクノロジーによって生産される抗体は、細菌において抗原結合フラグメント - 通常はFvまたはFabフラグメント - として生産され、それゆえエフェクター機能を欠く。エフェクター機能は2つの戦略のいずれかによって導入できる：フラグメントを、哺乳動物細胞における発現のために完全抗体に工作する、またはエフェクター機能の引き金を引くことができる第二結合部位を備えた二重特異性抗体フラグメントに工作することができる。

20

#### 【0204】

典型的には、抗体のFdフラグメント( $V_H - C_H1$ )と軽鎖( $V_L - C_L$ )をPCRによって別々にクローニングし、コンビナトリアルファージディスプレイライブラリーにおいて無作為に組換えて、次にそれらを特定抗原への結合に関して選択することができる。Fabフラグメントはファージ表面で発現される、すなわちそれらをコードする遺伝子に物理的に連結される。それゆえ、抗原結合によるFabの選択は、その後増幅することができる、Fabコード配列を同時選択する。パニングと称される工程、すなわち数回の抗原結合と再増幅により、抗原に特異的なFabを富化し、最終的に単離する。

#### 【0205】

1994年に、「ガイド選択(guided selection)」と呼ばれる抗体のヒト化のためのアプローチが記述された。ガイド選択は、マウスモノクローナル抗体のヒト化のためにファージディスプレイ手法の検出力を利用する(Jespers, L. S., et al., Bio/Technology 12, 899-903 (1994) 参照)。このために、マウスモノクローナル抗体のFdフラグメントをヒト軽鎖ライブラリーと組み合わせ提示することができ、生じたハイブリッドFabライブラリーを、次に、抗原で選択する。マウスFdフラグメントは、それにより、選択を導く(ガイドする)ための鋳型を提供する。その後、選択したヒト軽鎖をヒトFdフラグメントライブラリーと組み合わせる。生じたライブラリーの選択は全面的にヒトFabを生成する。

30

#### 【0206】

ファージディスプレイライブラリーからヒト抗体を誘導するための様々な手法が記述されている(たとえばHoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991); 米国特許第5, 565, 332号および同第5, 573, 905号; Clackson, T., and Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184 (1994) 参照)。特に、ファージディスプレイライブラリーから導かれる抗体のインビトロ選択と進化は強力なツールとなってきた(Burton, D. R., and Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); およびWinter, G., et al., Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994); 米国特許出願第20020004215号および国際公開番号第WO92/01047号; 2003年10月9日公開の米国特許出願第20030190317号および米国特許第6, 054, 287号

40

50

；米国特許第5,877,293号参照）。

【0207】

Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift," Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178:187-193, および2003年3月6日公開の米国特許出願第200120030044772号は、固体支持体への候補結合分子の固定化を含む方法である捕獲リフトによって、ファージ発現された抗体ライブラリーまたは他の結合分子をスクリーニングするための方法を述べている。

10

【0208】

抗体産物は、ここで「スクリーニング方法」と題する章において述べるアッセイを用いてまたは当技術分野で公知の何らかの適切なアッセイを用いて、活性および本発明の治療方法における適切性に関してスクリーニングし得る。

【0209】

本発明では、上記で列挙した癌関連ポリペプチドおよびその変異体を、上述したようなトランスジェニックマウスを免疫するために使用し得る。当技術分野で公知の方法を用いてモノクローナル抗体を作製し、単離した癌関連ポリペプチドを使用して抗体の特異性を試験する。ヒトまたは霊長動物癌関連ポリペプチドまたはそのエピトープの作製のための方法は、化学合成、組換えDNA手法または生物学的試料からの単離を含むが、これらに限定されない。ペプチドの化学合成は、たとえば固相ペプチド合成の古典的メリフィールド法（参照によりここに組み込まれる、Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149, 1963）またはRapid Automated Multiple Peptide Synthesis system (E. I. du Pont de Nemours Company, Wilmington, DE)でのFMOC戦略（参照によりここに組み込まれる、Caprino and Han, J. Org. Chem. 37:3404, 1972）によって実施することができる。

20

【0210】

ポリクローナル抗体は、ウサギまたは他の動物を抗原の注入によって免疫し、その後適切な間隔で追加免疫することによって作製できる。選択的な動物は、マウス、ラット、ニワトリ、モルモット、ヒツジ、ウマ、サル、ラクダおよびサメを含む。動物から採血し、通常はELISAによってまたは癌関連タンパク質の作用をブロックする能力に基づく生物学的検定によって、血清を精製癌関連タンパク質に対して検定する。鳥類種、たとえばニワトリ、シチメンチョウ等を使用するときは、抗体を卵黄から単離することができる。免疫マウスからの脾細胞を骨髓腫またはリンパ腫細胞などの持続的に複製する腫瘍細胞と融合することにより、ミルステインとケーラーの方法の後にモノクローナル抗体を作製することができる（参照によりここに組み込まれる、Milstein and Kohler, Nature 256:495-497, 1975; Gulfre and Milstein, Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques 73:1-46, Langone and Banatians eds., Academic Press, 1981）。そのようにして形成したハイブリドーマ細胞を、次に、制限希釈法によってクローニングし、ELISA、RIAまたは生物学的検定法によって上清を抗体産生に関して検定する。

30

40

【0211】

標的タンパク質を認識し、特異的に結合する抗体の独自の能力は、タンパク質の過剰発現を治療するためのアプローチを提供する。そこで、本発明のもう1つの態様は、癌関連タンパク質に対する特異性抗体で患者を治療することにより、癌関連ポリペプチドの過剰発現を含む疾患を予防するまたは治療するための方法を提供する。

【0212】

ポリクローナルまたはモノクローナルの、癌関連タンパク質に対する特異性抗体は、上

50



述したような当技術分野で公知の適切な方法によって作製することができる。たとえばマウスまたはヒトモノクローナル抗体をハイブリドーマテクノロジーによって生産することができ、あるいは、癌関連タンパク質を認識し、結合することができる抗体の産生を惹起するために癌関連タンパク質または免疫学的に活性なそのフラグメント、または抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントを動物に投与することができる。そのような抗体は、IgG、IgA、IgM、IgDおよびIgEまたは鳥類種の場合はIgYを含むがこれらに限定されない、抗体のいかなるクラスからでもよく、また抗体のいかなるサブクラスからでもよい。

#### 【0213】

(アミノ酸配列変異体)

突然変異誘発のために好ましい位置にある抗体のある種の残基または領域の特定のための有用な方法は、Cunningham and Wells Science, 244: 1081-1085 (1989) によって述べられた、「アラニンスキャニング法(alanine scanning mutagenesis)」と呼ばれる。ここでは、残基または標的残基の群を特定し(たとえばarg、asp、his、lysおよびgluなどの荷電残基)、アミノ酸と抗原の相互作用に影響を及ぼすために中性または負の電荷を有するアミノ酸(最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン)によって置換する。置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸位置を、置換部位にまたは置換部位の代わりにさらなるまたは他の変異体を導入することによって改良する。それゆえ、アミノ酸配列変異を導入するための部位はあらかじめ決定されているが、突然変異の性質自体が事前に決まっている必要はない。たとえば所与の部位の突然変異の成績を分析するために、標的コドンまたは領域でアラニンスキャニングまたはランダム突然変異誘発を実施し、発現された抗体変異体を所望活性に関してスクリーニングする。

#### 【0214】

アミノ酸配列挿入は、1個の残基から百個またはそれ以上の残基を含むポリペプチドまでにわたる長さのアミノおよび/またはカルボキシル末端融合、ならびに1個または複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例は、N末端メチオニル残基を有する抗体、またはエピトープタグまたはサルベージ受容体エピトープに融合した抗体(抗体フラグメントを含む)を含む。抗体分子の他の挿入変異体は、たとえばN末端またはC末端で、抗体の血清半減期を上昇させるポリペプチドへの融合を含む。

#### 【0215】

「エピトープ標識した」という用語は、エピトープタグに融合した抗体を指す。エピトープタグポリペプチドは、それに対する抗体を作製できるエピトープを提供するのに十分な残基を有するが、抗体の活性に干渉しないように十分に短い。エピトープタグは、好ましくは、それに対する抗体が他のエピトープと実質的に交差反応しないように十分にユニークである。適切なタグポリペプチドは、一般に少なくとも6個のアミノ酸残基、通常は約8~50個のアミノ酸残基(好ましくは約9~30個の残基)を有する。例は、インフルエンザHAタグポリペプチドおよびその抗体12CA5[Field et al., Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)]; c-mycタグおよびそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7および9E10抗体[Evans et al., Mol. Cell. Biol. 5(12): 3610-3616 (1985)]; および単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D(gD)タグおよびその抗体[Paborsky et al., Protein Engineering 3(6): 547-553 (1990)]を含む。他の例示的なタグは、一般に約6個のヒスチジン残基のポリヒスチジン配列であり、これは、ニッケルキレート化を用いてそのように標識された化合物を単離することを可能にする。当技術分野において周知であり、常套的に使用される、FLAG(登録商標)タグ(Eastman Kodak, Rochester, NY)などの他の標識およびタグも本発明に包含される。

#### 【0216】

もう1つの種類の変異体は、アミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、抗体分子

10

20

30

40

50

内の少なくとも 1 個のアミノ酸残基が除去され、異なる残基がその位置に挿入されている。超可変または C D R 領域または骨格領域のいずれかにおける置換突然変異誘発が考慮される。保存的置換を表 1 に示す。最も保存的な置換は、「好ましい置換」の見出しの下に示されている。そのような置換が生物学的活性の変化を生じさせない場合、表 1 に「例示アミノ酸」として示されている、またはアミノ酸クラスを参照して以下でさらに説明するような、より実質的な変化を導入し、産物をスクリーニングし得る。

【 0 2 1 7 】

【 化 2 】

表 1

| 原型      | 例示                                 | 好ましい残基置換      |
|---------|------------------------------------|---------------|
| Ala (A) | val; leu; ile                      | val           |
| Arg (R) | lys; gln; asn                      | lys           |
| Asn (N) | gln; his; asp, lys; gln            | arg           |
| Asp (D) | glu; asn                           | glu           |
| Cys (C) | ser; ala                           | ser           |
| Gln (Q) | asn; glu                           | asn           |
| Glu (E) | asp; gln                           | asp           |
| Gly (G) | ala                                |               |
| His (H) | asn; gln; lys; arg                 |               |
| Ile (I) | leu; val; met; ala;<br>phe;        | leu<br>ノルロイシン |
| Leu (L) | ノルロイシン; ile; val;<br>met; ala; phe | ile           |
| Lys (K) | arg; gln; asn                      | arg           |
| Met (M) | leu; phe; ile                      | leu           |
| Phe (F) | leu; val; ile; ala; tyr            |               |
| Pro (P) | ala                                |               |
| Ser (S) | thr                                |               |
| Thr (T) | ser                                | ser           |
| Trp (W) | tyr; phe                           | tyr           |
| Tyr (Y) | trp; phe; thr; ser                 | phe           |
| Val (V) | ile; leu; met; phe;                | leu           |

10

20

30

40

抗体の生物学的性質の実質的な改変は、( a ) たとえばシートまたはらせん立体配座としての、置換の領域内のポリペプチド骨格の構造、( b ) 標的部位の分子の電荷または疎

50

水性、または(c)側鎖のかさを維持することへの作用が有意に異なる置換を選択することによって達成される。天然に生じる残基は、共通側鎖特性に基づく群に分けられる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；
- (2) 中性親水性：cys、ser、thr；
- (3) 酸性：asp、glu；
- (4) 塩基性：asn、gln、his、lys、arg；
- (5) 鎖の方向に影響を及ぼす残基：gly、pro；および
- (6) 芳香族：trp、tyr、phe。

#### 【0218】

保存的置換は、アミノ酸をそのクラスのもう1つ別の成員で置換することを含む。非保存的置換は、これらのクラスの1つの成員をもう1つ別のクラスの成員で置換することを含む。

10

#### 【0219】

モノクローナル、ヒト、ヒト化または変異抗体の正しい立体配座を維持することに関与しないシステイン残基も、分子の酸化安定性を改善し、異常な架橋を防ぐために、一般にセリンで置換し得る。逆に、抗体の安定性を改善するために(特に抗体がFvフラグメントなどの抗体フラグメントである場合)システイン結合を抗体に付加し得る。

#### 【0220】

親和性成熟は、親抗体のCDR内に置換を有する抗体変異体を作製し、スクリーニングして、親抗体に比べて改善された結合親和性などの生物学的性質を有する変異体を選択することを含む。そのような置換変異体を生成するための好都合な方法は、ファージディスプレイを用いた親和性成熟である。簡単に述べると、いくつかの超可変領域部位(たとえば6~7部位)を、各々の部位ですべての可能なアミノ置換を生じるように突然変異させる。そのようにして生成した抗体変異体を、各々の粒子内にパッケージされたM13の遺伝子III産物への融合物として系状ファージ粒子から一価様式で提示する。ファージ提示された変異体を、その後、それらの生物学的活性(たとえば結合親和性)に関してスクリーニングする。

20

#### 【0221】

アラニンスキャニング法は、抗原結合に有意に寄与する超可変領域残基を特定するために実施できる。あるいは、またはそれに加えて、抗体と抗原の接触点を特定するために抗原-抗体複合体の結晶構造を分析することは有益であると考えられる。そのような接触残基および隣接残基は、ここで詳述する手法に従った置換のための候補である。ひとたびそのような変異体が生成されれば、変異体のパネルをここで述べるようなスクリーニングに供し、1またはそれ以上の関連アッセイにおいてより優れた性質を有する抗体をさらなる開発のために選択し得る。

30

#### 【0222】

親抗体に比べて改変されたグリコシル化パターンを有する、たとえば親抗体で認められる1またはそれ以上の炭水化物部分を欠失している、および/または親抗体には存在しない1またはそれ以上のグリコシル化部位が付加されている抗体変異体も生産することができる。

40

#### 【0223】

抗体のグリコシル化は、典型的にはN結合型またはO結合型である。N結合型は、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を指す。トリペプチド配列、アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン[式中、Xはプロリン以外の何らかのアミノ酸である]は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素結合のための認識配列である。ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在が潜在的グリコシル化部位を創製する。それゆえ、N結合型グリコシル化部位は、これらのトリペプチド配列の1またはそれ以上を含むようにアミノ酸配列を変化させることによって抗体に付加し得る。O結合型グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンへの糖類、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの1つ

50

の結合を指すが、5 - ヒドロキシプロリンまたは5 - ヒドロキシリシンも使用し得る。O 結合型グリコシル化部位は、もとの抗体の配列に1またはそれ以上のセリンまたはトレオニン残基を挿入するまたは置換することによって抗体に付加し得る。

#### 【0224】

(変化したエフェクター機能)

抗体の他の修飾も考慮される。たとえば癌を治療する上での抗体の有効性を高めるために、たとえばエフェクター機能に関して、たとえば半減期、CDCまたはADCC活性に関して本発明の抗体を修飾することが望ましいと考えられる。たとえばシステイン残基をFc領域に導入してもよく、それによってこの領域内での鎖間ジスルフィド結合形成を可能にし得る。このようにして生成されたホモ二量体抗体は、改善されたインターナリゼーション能力および/または高い補体媒介性細胞致死作用および抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)を有し得る。Caron et al., J. Exp. Med. 176: 1191 - 1195 (1992) および Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918 - 2922 (1992) 参照。高い抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体はまた、Wolff et al., Cancer Research 53: 2560 - 2565 (1993) に述べられているようにヘテロ二官能性架橋剤を用いて製造し得る。あるいは、2つのFc領域を有し、それゆえ高い補体融解およびADCC能力を有し得る抗体が工作できる。Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3: 219 - 230 (1989) 参照。加えて、CDR内の配列は抗体をMHCクラスIIに結合させ、望ましくないヘルパーT細胞応答の引き金を引かせ得ることが示された。保存的置換は、抗体に、結合活性は保持するが、望ましくないT細胞応答の引き金を引く能力を喪失させることができる。マウス可変領域をヒト1、2、3および4定常領域と連結したキメラ抗体を述べた、参照によりここに組み込まれる、Steplewski et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1988; 85(13): 4852 - 6も参照のこと。また、IgG1のFc領域内のいくつかの位置が、特定Fc受容体(R)に対する結合だけを改善するまたはある型のFcRに対する結合を改善し、同時にもう1つの別の型に対する結合を低下させることが認められたと述べた、その全体が参照によりここに組み込まれる、Presta et al., Biochem Soc Trans. 2002; 30(4): 487 - 90も参照のこと。FcRIIIaに対して改善された結合を有する選択IgG1変異体を、次に、インビトロでの抗体依存性細胞傷害(ADCC)アッセイにおいて試験し、末梢血単核細胞またはナチュラルキラー細胞を使用したときADCCの増強を示した。

#### 【0225】

本発明のある実施形態では、たとえば腫瘍浸透を上昇させるために、無傷抗体ではなく抗体フラグメントを使用することが望ましいと考えられる。この場合、たとえば半減期を上昇させるためにPEGまたは多糖高分子を含む他の水溶性ポリマーなどの分子を抗体フラグメントに付加することによって、抗体の血清半減期を上昇させるために抗体フラグメントを修飾することが望ましいと考えられる。これはまた、たとえば抗体フラグメントへのサルベージ受容体結合エピトープの組込みによって(たとえば抗体フラグメント内の適切な領域の突然変異によってまたはエピトープをペプチドタグに組み込み、次に、たとえばDNAまたはペプチド合成によって、それを末端または中央で抗体フラグメントに融合することによって)達成され得る(たとえば国際公開番号第WO96/32478号参照)。

#### 【0226】

加えて、抗体は、たとえばそれらの循環半減期を上昇させるためにポリマーへの共有結合複合によって化学修飾することができる。各々の抗体分子を1またはそれ以上(すなわち1、2、3、4、5またはそれ以上)のポリマー分子に結合し得る。ポリマー分子は、好ましくはリンカー分子によって抗体に結合する。ポリマーは、一般に、合成または天然に生じるポリマー、たとえば場合により直鎖または分枝ポリアルケン、ポリアルケニレンまたはポリオキシアルキレンポリマーあるいは分枝または非分枝多糖、たとえばホモまた

はヘテロ多糖であり得る。好ましいポリマーは、ポリオキシエチレンポリオールおよびポリエチレングリコール ( P E G ) である。P E G は室温で水に可溶性であり、一般式： $R ( O - - C H _ 2 - - C H _ 2 ) _ n O - - R$  [ 式中、R は、水素あるいはアルキルまたはアルカノール基などの保護基であり得る ] を有する。好ましくは、保護基は 1 ~ 8 個の炭素有し、より好ましくはメチルである。n の記号は正の整数であり、好ましくは 1 ~ 1 , 0 0 0、より好ましくは 2 ~ 5 0 0 である。P E G は、1 0 0 0 ~ 4 0 , 0 0 0 の好ましい平均分子量を有し、より好ましくは 2 0 0 0 ~ 2 0 , 0 0 0、最も好ましくは 3 , 0 0 0 ~ 1 2 , 0 0 0 の平均分子量を有する。好ましくは、P E G は少なくとも 1 個のヒドロキシ基を有し、より好ましくは、前記ヒドロキシ基は末端ヒドロキシ基である。好ましくは阻害剤の遊離アミノ基と反応するように活性化されるのは、このヒドロキシ基である。しかし、反応性基の種類および量は、本発明の共有結合複合 P E G / 抗体を実現するように変化させ得ることが了解される。好ましいポリマーおよびそれらをペプチドに結合する方法は、すべてその全体が参照によりここに組み込まれる、米国特許第 4 , 7 6 6 , 1 0 6 号 ; 同第 4 , 1 7 9 , 3 3 7 号 ; 同第 4 , 4 9 5 , 2 8 5 号 ; および同第 4 , 6 0 9 , 5 4 6 号に示されている。

#### 【 0 2 2 7 】

ここで使用する、「サルベージ受容体結合エピトープ」は、I g G 分子のインビボでの血清半減期を上昇させる責任を担う I g G 分子 (たとえば I g G <sub>1</sub>、I g G <sub>2</sub>、I g G <sub>3</sub> または I g G <sub>4</sub>) の F c 領域のエピトープを指す。

#### 【 0 2 2 8 】

サルベージ受容体結合エピトープは、好ましくは、F c ドメインの 1 または 2 個のループからの 1 またはそれ以上のアミノ酸残基が抗体フラグメントの類似位置に転移している領域を構成する。さらに一層好ましくは、F c ドメインの 1 または 2 個のループからの 3 またはそれ以上のアミノ酸残基が転移している。なお一層好ましくは、エピトープは F c 領域 (たとえば I g G の) の C H 2 ドメインからであり、抗体の C H 1、C H 3 または V H 領域、または 2 以上のそのような領域に転移している。あるいは、エピトープは F c 領域の C H 2 ドメインからであり、抗体フラグメントの C<sub>L</sub> 領域または V<sub>L</sub> 領域またはその両方に転移している。F c 変異体およびサルベージ受容体とのそれらの相互作用を述べる国際公開番号第 W O 9 7 / 3 4 6 3 1 および同第 W O 9 6 / 3 2 4 7 8 号も参照のこと。

#### 【 0 2 2 9 】

そこで、本発明の抗体は、ヒト F c 部分、ヒトコンセンサス F c 部分、またはジスルフィド結合に関与するシステインが修飾されているまたは除去されている、および / または N 末端にメチオニンが付加されているおよび / または N 末端の 2 0 アミノ酸の 1 またはそれ以上が除去されている、および / または C 1 q 結合部位などの補体と相互作用領域が変化しているまたは除去されている、および / または A D C C 部位が変化しているまたは除去されている変異体を含む、F c サルベージ受容体と相互作用する能力を保持するその変異体を含み得る [たとえば M o l e c . I m m u n o l . 2 9 ( 5 ) : 6 3 3 - 9 ( 1 9 9 2 ) 参照]。

#### 【 0 2 3 0 】

これまでの試験は、F c R についてのヒトおよびマウス I g G 上の結合部位を、主として I g G 残基 2 3 3 - 2 3 9 からなるヒンジ領域下部に位置づけた。他の試験は、付加的な広いセグメント、たとえばヒト F c 受容体 I についての G l y 3 1 6 - L y s 3 3 8、ヒト F c 受容体 I I I についての L y s 2 7 4 - A r g 3 0 1 および T y r 4 0 7 - A r g 4 1 6 を提案するか、またはヒンジ下部の外側のいくつかの特異的残基、たとえばマウス F c 受容体 I I と相互作用するマウス I g G 2 b についての A s n 2 9 7 および G l u 3 1 8 を認めた。ヒト F c 受容体 I I I A とヒト I g G 1 F c フラグメントの 3 . 2 結晶構造の報告は、I g G 1 残基 L e u 2 3 4 - S e r 2 3 9、A s p 2 6 5 - G l u 2 6 9、A s n 2 9 7 - T h r 2 9 9、および A l a 3 2 7 - I l e 3 3 2 を F c 受容体 I I I A への結合に関与すると記述した。ヒンジ下部 ( L e u 2 3 4 - G l y 2 3 7 ) に加えて、I g G C H 2 ドメインループ F G (残基 3 2 6 - 3 3 0) および B C (残基 2 6

10

20

30

40

50

5 - 271) 内の残基がFc受容体IIAへの結合において役割を果たし得ることが結晶構造に基づいて示唆された。その全体が参照によりここに組み込まれる、Shields et al., J. Biol. Chem., 276(9): 6591-6604 (2001) 参照。Fc受容体結合部位内の残基の突然変異は、変化したADCCまたはCDC活性、または変化した半減期などの変化したエフェクター機能を生じさせ得る。上述したように、潜在的突然変異は、挿入、欠失、またはアラニンによる置換、保存的置換、非保存的置換、または異なるIgGサブクラスからの同じ位置の対応するアミノ酸残基による置換(たとえばIgG1残基をその位置の対応するIgG2残基で置換する)を含む、1またはそれ以上の残基の置換を含む。

#### 【0231】

Shields et al. は、すべてのヒトFc受容体への結合に關与するIgG1残基がヒンジに近位のCH2ドメインに位置し、以下のような2つのカテゴリーに属することを報告した: 1) すべてのFcRと直接相互作用し得る位置は、Leu234-Pro238、Ala327およびPro329(およびおそらくAsp265); 2) 炭水化物の性質または位置に影響を及ぼす位置は、Asp265およびAsn297を含む。Fc受容体IIへの結合に影響する付加的なIgG1残基は以下のとおりである: (最大作用) Arg255、Thr256、Glu258、Ser267、Asp270、Glu272、Asp280、Arg292、Ser298、および(より小さい作用) His268、Asn276、His285、Asn286、Lys290、Gln295、Arg301、Thr307、Leu309、Asn315、Lys322、Lys326、Pro331、Ser337、Ala339、Ala378、およびLys414。A327Q、A327S、P329A、D265AおよびD270Aは結合を低下させた。すべてのFcRについて上記で特定された残基に加えて、Fc受容体IIIAへの結合を40%またはそれ以上低下させた付加的なIgG1残基は次のとおりである: Ser239、Ser267(Glyのみ)、His268、Glu293、Gln295、Tyr296、Arg301、Val303、Lys338およびAsp376。FcRIIAへの結合を改善した変異体は、T256A、K290A、S298A、E333A、K334AおよびA339Tを含む。Lys414は、FcRIIAおよびFcRIIBについての結合の40%低下を示し、Arg416は、FcRIIAおよびFcRIIAについての30%低下、Gln419は、FcRIIAへの30%低下およびFcRIIBへの40%低下を示し、およびLys360はFcRIIAへの23%の改善を示した。Presta et al., Biochem. Soc. Trans. (2001) 30, 487-490も参照のこと。

#### 【0232】

たとえばその全体が参照によりここに組み込まれる、米国特許第6,194,551号は、ヒトIgGFc領域内でアミノ酸位置329、331または322に(Kabat numberingを使用)突然変異を含む、変化したエフェクター機能を有する変異体を述べており、それらのうちの一部は低いC1q結合またはCDC活性を示す。もう1つの例として、その全体が参照によりここに組み込まれる、米国特許第6,737,056号は、ヒトIgGFc領域内でアミノ酸位置238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438または439で(Kabat numberingを使用)に突然変異を含む、変化したエフェクター機能またはFc受容体結合を有する変異体を述べており、その一部は、低いADCCまたはCDC活性に結びつく受容体結合プロフィールを示す。これらのうちで、アミノ酸位置238、265、269、270、327または329の突然変異はF

10

20

30

40

50

c R I への結合を低下させると述べられており、アミノ酸位置 238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、43 または 439 の突然変異は F c R I I への結合を低下させると述べられており、およびアミノ酸位置 238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、293、294、295、296、301、303、322、327、329、338、340、373、376、382、388、389、416、434、435 または 437 における突然変異は F c R I I I への結合を低下させると述べられている。

#### 【0233】

10

その全体が参照によりここに組み込まれる、米国特許第 5,624,821 号は、重鎖のアミノ酸残基 318、320 または 322 を突然変異させることによってマウス抗体の C1q 結合活性を変化させることができ、残基 297 (Asn) を置換することは溶解活性の除去を生じさせると報告している。

#### 【0234】

その全体が参照によりここに組み込まれる、米国特許出願 20040132101 号は、アミノ酸位置 240、244、245、247、262、263、266、299、313、325、328 または 332 (Kabat numbering を使用) またはアミノ酸位置 234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330 または 332 (Kabat numbering を使用) に突然変異を有する変異体を述べており、そのうちアミノ酸位置 234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330 または 332 の突然変異は、A D C C 活性を低下させ得るまたは F c 受容体への結合を低下させ得る。

20

#### 【0235】

その全体が参照によりここに組み込まれる、Chappel et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1991; 88(20): 9036-40 は、IgG1 の細胞親和作用がその重鎖 CH2 ドメインの内在特性であることを報告する。IgG1 のアミノ酸残基 234 - 237 のいずれかにおける単一点突然変異は、その活性を有意に低下させたまたは排除した。完全な結合活性を回復するには IgG1 の残基 234 - 237 (LLGG) の全部の IgG2 および IgG4 への置換が必要であった。E L L G G P 配列全体 (残基 233 - 238) を含む IgG2 抗体は、野生型 IgG1 よりも活性であることが認められた。

30

#### 【0236】

その全体が参照によりここに組み込まれる、Isaacs et al., J Immunol. 1998; 161(8): 3862-9 は、F c R 結合のために決定的に重要なモチーフ内の突然変異が (グルタミン酸 233 がプロリンに、ロイシン/フェニルアラニン 234 がバリンに、およびロイシン 235 がアラニンに) 標的細胞の除去を完全に妨げたことを報告する。グルタミン酸 318 のアラニンへの突然変異は、マウス IgG2b のエフェクター機能を排除し、同時にヒト IgG4 の効力を低下させた。

40

#### 【0237】

その全体が参照によりここに組み込まれる、Armour et al., Mol Immunol. 2003; 40(9): 585-93 は、野生型 IgG1 より少なくとも 10 倍低い効率で活性化受容体、F c R I I a と反応するが、阻害性受容体 F c R I I b への結合は 4 倍だけ低い、IgG1 変異体を特定した。アミノ酸 233 - 236 の領域内および/またはアミノ酸位置 327、330 および 331 において突然変異を作製した。その全体が参照によりここに組み込まれる、国際公開番号第 WO99/58572 号参照。

50

## 【0238】

その全体が参照によりここに組み込まれる、Xu et al., J Biol Chem. 1994; 269(5): 3469-74は、IgG1 Pro331をSerに突然変異させることはC1q活性を著明に低下させ、溶解活性を実質的に排除したと報告する。これに対し、IgG4内のSer331のProへの置換は、IgG4 Pro331変異体に部分的溶解活性(40%)を与えた。

## 【0239】

その全体が参照によりここに組み込まれる、Schuurman et al., Mol Immunol. 2001; 38(1): 1-8は、重鎖間結合形成に關与するヒンジシステインの1個、Cys226をセリンに突然変異させることはより安定な重鎖間結合を生じさせたと報告している。IgG4ヒンジ配列Cys-Pro-Ser-CysをIgG1ヒンジ配列Cys-Pro-Pro-Cysに突然変異させることも、重鎖間の共有結合相互作用を著明に安定化する。

## 【0240】

その全体が参照によりここに組み込まれる、Angal et al., Mol Immunol. 1993; 30(1): 105-8は、IgG4内のアミノ酸位置214のセリンをプロリン(IgG1およびIgG2内のその位置に認められる)に突然変異させることは、均一な抗体の産生、ならびにもとのキメラIgG4と比較して血清半減期の延長および組織分布の改善を導いた。

## 【0241】

本発明はまた、改善されたADCC活性を示す、フコシル化の不在または低下を有する抗体分子を含む、変化したエフェクター活性を生じさせる変化した炭水化物構造を有する抗体分子の生産を考慮する。これを達成するための様々な方法が当技術分野において公知である。たとえばADCCエフェクター活性は、CH2ドメインのAsn297におけるN結合型グリコシル化の炭水化物構造に依存することが示された、FcRIII受容体への抗体分子の結合によって媒介される。非フコシル化抗体は高い親和性でこの受容体に結合し、天然のフコシル化抗体よりも効率的にFcRIII媒介性エフェクター機能の引き金を引く。たとえば、6-フコシルトランスフェラーゼ酵素がノックアウトされたCHO細胞における非フコシル化抗体の組換え生産は、100倍高いADCC活性を有する抗体を生じさせる[Yamane-Ohnuki et al., Biotechnol Bioeng. 2004 Sep 5; 87(5): 614-22]。同様の作用は、たとえばsiRNAまたはアンチセンスRNA処理を通して、フコシル化経路内のこの酵素または他の酵素の活性を低下させること、前記酵素をノックアウトするための細胞系を工作すること、または選択的グリコシル化阻害剤と共に培養することを通して達成できる[Rothman et al., Mol Immunol. 1989 Dec; 26(12): 1113-23]。一部の宿主細胞株、たとえばLec13またはラットハイブリドーマYB2/0細胞系は、より低いフコシル化レベルを有する抗体を天然で生産する。Shields et al., J Biol Chem. 2002 Jul 26; 277(30): 26733-40; Shinkawa et al., J Biol Chem. 2003 Jan 31; 278(5): 3466-73。たとえばGnTIII酵素を過剰発現する細胞において抗体を組換え生産することを通して、二分岐炭水化物のレベルの上昇もADCC活性を上昇させることが測定された。Umana et al., Nat Biotechnol. 1999 Feb; 17(2): 176-80。2個のフコース残基の1個だけの欠如がADCC活性を上昇させるのに十分であり得ると予測された

。Ferrara et al., J Biol Chem. 2005 Dec 5; [印刷に先立つウェブでの公開]。

## 【0242】

(他の共有結合修飾)

抗体の共有結合修飾も本発明の範囲内に含まれる。それらは、適用できる場合は、化学

10

20

30

40

50



合成によってあるいは抗体の酵素的または化学的切断によって作製し得る。抗体の他の種類の共有結合修飾は、抗体の標的アミノ酸残基を、選択側鎖あるいはNまたはC末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることによって分子に導入される。

#### 【0243】

システイニル残基は、最も一般的には、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を与えるために、クロロ酢酸またはクロロアセトアミドなどの  $\alpha$ -ハロアセテート（及び対応するアミン）と反応させる。システイニル残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、 $\alpha$ - $\beta$ -プロモ- $\gamma$ -(5-イミドゾイル)プロピオン酸、リン酸クロロアセチル、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフィド、p-クロロマーキュリア安息香酸塩、2-クロロマーキュリ-4-ニトロフェノールまたはクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールとの反応によって誘導体化される。

10

#### 【0244】

ヒスチジル残基は、pH 5.5 - 7.0 でジエチルピロカルボン酸塩と反応させることによって誘導体化される。この物質がヒスチジル側鎖に比較的特異的であるためである。パラ-プロモフェナシルプロミドも有用である；反応は、好ましくはpH 6.0 の0.1 M カコジル酸ナトリウム中で実施される。

#### 【0245】

リシニルおよびアミノ末端残基は、コハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させる。これらの物質による誘導体化は、リシニル残基の電荷を逆にする作用を有する。 $\alpha$ - $\beta$ -アミノ含有残基を誘導体化するための他の適切な試薬は、メチルピコリンイミデートなどのイミドエステル、リン酸ピリドキサル、ピリドキサル、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、O-メチルイソ尿素、2,4-ペンタンジオン、およびグリコキシレートとのトランスアミナーゼ触媒反応を含む。

20

#### 【0246】

アルギニル残基は、1またはいくつかの従来試薬、中でも特にフェニルグリオキサル、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサジオンおよびニンヒドリンとの反応によって修飾される。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高いpK<sub>a</sub>のため、反応がアルカリ条件下で実施されることを必要とする。さらに、これらの試薬はリシンの基ならびにアルギニン-アミノ基と反応し得る。

30

#### 【0247】

チロシル残基の特異的修飾は、特にチロシル残基へのスペクトル標識の導入を対象として、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によって作製し得る。最も一般的には、N-アセチルイミダゾールおよびテトラニトロメタンが、それぞれO-アセチルチロシル種および3-ニトロ誘導体を形成するために使用される。チロシル残基は、放射免疫測定法における使用のための標識タンパク質を調製するために<sup>125</sup>Iまたは<sup>131</sup>Iを用いてヨウ素化される。

#### 【0248】

カルボキシル側鎖基（アスパルチルまたはグルタミル）は、カルボジイミド（R-N<sub>2</sub>-C(=O)-R' [式中、RおよびR'は、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-4-エチル)カルボジイミドまたは1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドなどの、異なるアルキル基である]）との反応によって選択的に修飾される。さらに、アスパルチルおよびグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニルおよびグルタミニル残基に変換される。

40

#### 【0249】

グルタミニルおよびアスパラギニル残基は、それぞれ対応するグルタミルおよびアスパルチル残基へと頻繁に脱アミド化される。これらの残基は、中性または塩基性条件下で脱アミド化される。これらの残基の脱アミド化形態は本発明の範囲内に含まれる。

#### 【0250】

50

他の修飾は、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖の、 $\epsilon$ -アミノ基のメチル化 (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79 - 86 (1983))、N-末端アミンのアセチル化、および何らかのC-末端カルボキシル基のアミド化を含む。

#### 【0251】

もう1つの種類の共有結合修飾は、配糖体を化学的または酵素的に抗体に結合することを含む。これらの工程は、NまたはO結合型グリコシル化のためのグリコシル化能力を有する宿主細胞における抗体の生産を必要としないという点で有利である。使用する結合様式に依存して、糖を、(a)アルギニンおよびヒスチジン、(b)遊離カルボキシル基、(c)システインのもののような遊離スルフヒドリル基、(d)セリン、トレオニンまたはヒドロキシプロリンのもののような遊離ヒドロキシル基、(e)フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファンのもののような芳香族残基、または(f)グルタミンのアミド基に結合し得る。これらの方法は、1987年9月11日公開の国際公開番号第WO 87/05330号、およびApelin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259 - 306 (1981)に述べられている。

#### 【0252】

抗体上に存在する何らかの炭水化物部分の除去は、化学的または酵素的に実施し得る。化学的脱グリコシル化は、トリフルオロメタンスルホン酸化合物、または等価化合物への抗体の暴露を必要とする。この処理は、抗体を無傷のまま残しながら、連結糖(N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン)以外の大部分または全部の糖の切断を生じさせる。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin, et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 52 (1987)およびEdge et al. *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981)によって述べられている。抗体上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura et al. *Methods Enzymol.* 138: 350 (1987)によって述べられているように様々なエンドおよびエキソグリコシダーゼの使用によって達成できる。

#### 【0253】

抗体のもう1つの種類の共有結合修飾は、抗体を様々な非タンパク質性ポリマー、たとえばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリオキシエチル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グルコース、ポリオキシエチル化グリセロール、ポリオキシアルキレン、またはデキストランなどの多糖ポリマーの1つに連結することを含む。そのような方法は当技術分野において公知であり、たとえば米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号、同第4,179,337号、同第4,766,106号、同第4,179,337号、同第4,495,285号、同第4,609,546号または欧州特許第EP 315456号参照。

#### 【0254】

##### (遺伝子療法)

適切な細胞への治療用抗体の送達は、物理的DNA導入法(たとえばリポソームまたは化学処理)の使用またはウイルスベクター(たとえばアデノウイルス、アデノ関連ウイルスまたはレトロウイルス)の使用を含む、当技術分野で公知の何らかの適切なアプローチの使用によってエキスピボ、インサイチューまたはインビボでの遺伝子治療によって実施することができる。たとえばインビボ治療のためには、所望抗体をコードする核酸を、単独であるいはベクター、リポソームまたは沈殿物と組み合わせて、直接被験者に注入でき、一部の実施形態では、抗体化合物の発現が望ましい部位に注入してもよい。エキスピボ治療のためには、被験者の細胞を取り出し、核酸をこれらの細胞に導入して、改変細胞を直接または、たとえば患者に移植する多孔膜に被包して被験者に戻す。たとえば米国特許第4,892,538号および同第5,283,187号参照。核酸を生存可能細胞に導

10

20

30

40

50

入するために使用可能な様々な手法がある。手法は、核酸を、インビトロで培養細胞に、またはインビボで意図する宿主の細胞に導入するかどうかによって異なる。インビトロでの哺乳動物細胞への核酸の導入に適する手法は、リボソームの使用、電気穿孔法、微量注入法、細胞融合、DEAE-デキストラン法、およびリン酸カルシウム沈殿法を含む。核酸のエクスピボ送達のために一般的に使用されるベクターはレトロウイルスである。

#### 【0255】

他のインビボでの核酸導入手法は、ウイルスベクター（アデノウイルス、単純ヘルペス I 型ウイルスまたはアデノ関連ウイルス）および脂質に基づくシステムによるトランスフェクションを含む。核酸およびトランスフェクション試薬は、場合によりマイクロ粒子と結合される。例示的なトランスフェクション試薬は、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストランを介したトランスフェクション、第四級アンモニウム両親媒物質 DOTMA (GIBCO-BRL により Lipofectin として市販されている、(ジオレオイルオキシプロピル)トリメチルアンモニウムブロミド) (Felgner et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417; Malone et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6077-6081); ペンデントトリメチルアンモニウム頭部を有する親油性グルタミン酸ジエステル (Ito et al., (1990) Biochem. Biophys. Acta 1023, 124-132); カチオン脂質ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン (DOGS, Transfectam, Promega) およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミルスベルミン (DPPEs) (J. P. Behr (1986) Tetrahedron Lett. 27, 5861-5864; J. P. Behr et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6982-6986) などの代謝性親脂質; 代謝性第四級アンモニウム塩 (DOTB、N-(1-[2,3-ジオレオイルオキシ]プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルスルフェート (DOTAP) (Boehringer Mannheim)、ポリエチレンイミン (PEI)、ジオレオイルエステル、ChoTB、ChoSC、DOSC) (Leventis et al., (1990) Biochim. Inter: 22, 235-241); 3 [N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル] コレステロール (DC-Chol)、1:1 混合物中のジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) / 3 [N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル] コレステロール DC-Chol (Gao et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 1065, 8-14)、スベルミン、スベルミジン、リボポリアミン (Behr et al., Bioconjugate Chem, 1994, 5:382-389)、親油性ポリリシン (LPLL) (Zhou et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18)、過剰のホスファチジルコリン/コレステロールと [[ (1,1,3,3-テトラメチルブチル)クレゾキシ]エトキシ]エチル]ジメチルベンジルアンモニウムヒドロキシド (DEBDA ヒドロキシド) (Ballas et al., (1988) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18)、セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) / DOPE 混合物 (Pinnaduwaage et al., (1989) Biochim. Biophys. Acta 985, 33-37)、DOPE とグルタミン酸 (TMAG) の親油性ジエステル、CTAB、DEBDA、ジドデシルアンモニウムブロミド (DDAB)、およびホスファチジルエタノールアミンと混合したステアリルアミン (Rose et al., (1991) Biotechnique 10, 520-525)、DDAB / DOPE (Transfect ACE, GIBCO-BRL)、およびオリゴガラクトース担持脂質を含む。導入の効率を高める例示的なトランスフェクションエンハンサー試薬は、たとえば DEAE-デキストラン、ポリブレン、リソソーム破壊ペプチド (lysosome-disruptive peptide) (Ohmori N I et al., Biochem Biophys Res Commun Jun. 27, 1997; 235 (3

10

20

30

40

50

) : 726 - 9 )、コンドロイタンに基づくプロテオグリカン、硫酸化プロテオグリカン、ポリエチレンイミン、ポリリシン (Pollard H et al. J Biol Chem, 1998 273 (13) : 7507 - 11)、インテグリン結合ペプチド CYGGRGDT P、線状デキストランノナサッカリド、グリセロール、オリゴヌクレオチドの 3' 末端ヌクレオシド間結合で連結されたコレステリル基 (Lettinger, R. L. 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86 : (17) : 6553 - 6)、リソホスファチド、リソホスファチジルコリン、リソホスファチジルエタノールアミン、および 1 - オレオイルリソホスファチジルコリンを含む。

#### 【0256】

一部の状況では、核酸含有ベクターを標的細胞に向かわせる物質と共に核酸を送達することが望ましいと考えられる。そのような「ターゲティング」分子は、標的細胞上の細胞表面膜タンパク質に特異的な抗体、または標的細胞上の受容体についてのリガンドを含む。リポソームを使用する場合は、ターゲティングのためおよび/または取込みを促進するためにエンドサイトーシスに関連する細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質を使用し得る。そのようなタンパク質の例は、特定細胞型に親和性のキャプシドタンパク質およびそのフラグメント、サイクリンにおいてインターナリゼーションを受けるタンパク質についての抗体、および細胞内局在を標的し、細胞内半減期を上昇させるタンパク質を含む。他の実施形態では、受容体を介したエンドサイトーシスが使用できる。そのような方法は、たとえば Wu et al., 1987 または Wagner et al., 1990 に述べられている。現在公知の遺伝子マーキングおよび遺伝子治療プロトコルの総説については、Anderson 1992 参照。また、国際公開番号第 WO93/25673 号およびその中で引用される参考文献も参照のこと。遺伝子治療テクノロジーのさらなる総説については、Friedmann, Science, 244 : 1275 - 1281 (1989) ; Anderson, Nature, supplement to vol. 392, no 6679, pp. 25 - 30 (1998) ; Verma, Scientific American : 68 - 84 (1990) ; および Miller, Nature, 357 : 455460 (1992) 参照。

#### 【0257】

(スクリーニング方法)

有効な治療は、重大な毒性を持たない有効な物質を特定することに依存する。抗体は、当技術分野で公知の方法によって結合親和性に関してスクリーニングし得る。たとえばゲルシフトアッセイ、ウエスタンブロット法、放射標識競合アッセイ、クロマトグラフィーによる共分画、共沈、架橋、ELISA 等が使用でき、これらは、たとえばその全体が参照によりここに組み込まれる、Molecular Biology (1999) John Wiley & Sons, NY に述べられている。

#### 【0258】

最初に tm - PTP 上の所望エピトープ (たとえば tm - PTP の細胞外ドメイン) に結合する抗体に関してスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988) に述べられているような常套的なクロスブロッキングアッセイを実施することができる。未知の抗体を、本発明の tm - PTP 特異的抗体への tm - PTP の結合を阻害する能力によって特性決定する、常套的な競合結合アッセイも使用し得る。エピトープマッピングは、Champe et al., J. Biol. Chem. 270 : 1388 - 1394 (1995) に述べられている。

#### 【0259】

インビトロ結合アッセイの 1 つの変法では、本発明は、(a) 固定化した tm - PTP を候補抗体と接触させること、および (b) tm - PTP への候補抗体の結合を検出すること、の工程を含む方法を提供する。選択的实施形態では、候補抗体を固定化し、tm - PTP の結合を検出する。固定化は、支持体、ビーズまたはクロマトグラフィー樹

脂への共有結合、ならびに抗体結合などの非共有結合の高親和性相互作用、または固定化化合物がビオチン部分を含む、ストレプトアビジン/ビオチン結合の使用を含む、当技術分野で周知の方法のいずれかを用いて達成される。結合の検出は、(i)固定化されていない化合物上の放射性標識を使用して、(ii)非固定化化合物の蛍光標識を使用して、(iii)非固定化化合物に免疫特異的な抗体を使用して、(iv)固定化化合物が結合している蛍光支持体を励起する非固定化化合物上の標識を使用して、ならびに当技術分野において周知であり、常套的に実施される他の手法を用いて達成できる。

#### 【0260】

t m - P T P の活性または発現を調節する(すなわち上昇させる、低下させるまたはブロックする)抗体は、推定上の調節剤を、t m - P T P を発現する細胞と共にインキュベートし、t m - P T P の活性または発現への推定上の調節剤の作用を測定することによって特定し得る。t m - P T P ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性を調節する抗体の選択性は、t m - P T P ポリペプチドまたはポリヌクレオチドへのその作用を他の関連化合物へのその作用と比較することによって評価できる。選択的調節剤は、たとえばt m - P T P ポリペプチドまたはt m - P T P ポリペプチドをコードする核酸に特異的に結合する抗体および他のタンパク質、ペプチドまたは有機分子を含み得る。t m - P T P 活性の調節剤は、t m - P T P ポリペプチドの正常または異常活性が関与する疾患および生理的状態の処置において治療上有用である。

10

#### 【0261】

癌を予防するまたは治療する上で潜在的に有用な化合物は様々なアッセイを用いてスクリーニングし得る。たとえば候補アンタゴニストを、最初に、t m - P T P の二量体化を誘導するその能力および/またはS r c脱リン酸化を誘導するときにt m - P T P を中和するその能力を測定するための培養細胞系において特性決定し得る。

20

#### 【0262】

特定t m - P T P 抗体またはt m - P T P 抗体の組合せの抗腫瘍活性は、適切な動物モデルを使用してインビボで評価し得る(Loukopoulos et al., P a n c r e a s , 29(3):193-203(2004))。加えて、特定t m - P T P 抗体の抗腫瘍活性は、たとえばc - S r c脱リン酸化またはバキシリンリン酸化、S r cキナーゼ活性、またはt m - P T P シグナル伝達の他の指標を検定することによって評価し得る。加えて、ここで述べるような増殖アッセイ、軟寒天アッセイおよび/または細胞傷害アッセイを含む細胞アッセイが、特定t m - P T P 抗体を評価するために使用し得る。

30

#### 【0263】

本発明はまた、t m - P T P ポリペプチドの生物学的活性と相互作用するまたは生物学的活性を阻害する(たとえば酵素活性、結合活性等を阻害する)抗体を特定するためのハイスループットスクリーニング(H T S)アッセイを包含する。H T Sアッセイは多数の化合物を効率的にスクリーニングすることを可能にする。細胞ベースのH T Sシステムは、t m - P T P ポリペプチドとそれらの結合パートナーの間の相互作用を検討するために考慮される。H T Sアッセイは、それらから所望特性を改善するための修飾を設計することができる、「ヒット」または「先導」化合物を特定するように設計される。「ヒット」または「先導」化合物の化学修飾は、しばしば「ヒット」とt m - P T P ポリペプチドの間の特定可能な構造/活性関係に基づく。

40

#### 【0264】

本発明のもう1つの態様は、t m - P T P を抗体と接触させること、および抗体がt m - P T P の活性を変化させるかどうかを判定することを含む、t m - P T P の活性を調節する(すなわち低下させる)抗体を特定する方法を対象とする。試験抗体の存在下での活性を試験抗体の不在下での活性と比較する。試験抗体を含む試料の活性が試験抗体を欠く試料における活性よりも低い場合、抗体は阻害活性を有する。

#### 【0265】

(抗体複合体)

50

抗 t m - P T P 抗体は、それらの「裸の」または非複合形態で投与してもよく、または他の治療薬または診断薬と直接複合してもよく、またはそのような他の治療薬または診断薬を含む担体ポリマーに間接的に複合してもよい。

【0266】

抗体は、放射性同位体、親和性標識（ビオチン、アビジン等）、酵素標識（ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等）、蛍光または発光または生物発光標識（F I T Cまたはローダミン等）、常磁性原子等の使用を通して検出可能に標識することができる。そのような標識化を達成するための手順は当技術分野において周知である；たとえば（S t e r n b e r g e r , L . A . e t a l . , J . H i s t o c h e m . C y t o c h e m . 18 : 315 (1970) ; B a y e r , E . A . e t a l . , M e t h . E n z y m . 62 : 308 (1979) ; E n g v a l , E . e t a l . , I m m u n o l . 109 : 129 (1972) ; G o d i n g , J . W . J . I m m u n o l . M e t h . 13 : 215 (1976) ) 参照。

10

【0267】

抗体部分の複合は、米国特許第6,306,393号に述べられている。一般的手法も、S h i h e t . a l . , I n t . J . C a n c e r 41 : 832 - 839 (1988) ; S h i h e t . a l . , I n t . J . C a n c e r 46 : 1101 - 1106 (1990) ; および S h i h e t . a l . , 米国特許第5,057,313号に記述されている。この一般的方法は、酸化炭水化物部分を有する抗体成分を、少なくとも1個の遊離アミン官能基を有し、複数の薬剤、毒素、キレート化剤、ホウ素付加物（b o r o n a d d e n d s ） 、 または他の治療薬が負荷されている担体ポリマーと反応させることを含む。この反応は最初のシッフ塩基（イミン）結合を生じさせ、それを第二級アミンに還元することによって安定化して、最終複合体を形成することができる。

20

【0268】

担体ポリマーは、たとえばアミノデキストランまたは少なくとも50アミノ酸残基のポリペプチドであり得る。薬剤または他の物質を担体ポリマーに複合するための様々な手法が当技術分野において公知である。ポリペプチド担体を網のデキストランの代わりに使用することができるが、ポリペプチド担体は、鎖内に少なくとも50アミノ酸残基、好ましくは100 - 5000アミノ酸残基を有するべきである。アミノ酸の少なくとも一部は、リシン残基あるいはグルタミン酸またはアスパラギン酸残基であるべきである。リシン残基のペンダントアミンおよびグルタミン酸およびアスパラギン酸のペンダントカルボキシレートは、薬剤、毒素、免疫調節剤、キレート化剤、ホウ素付加物または他の治療物質を結合するために好都合である。適切なポリペプチド担体の例は、ポリリシン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、それらのコポリマー、および生じる負荷担体と複合物に望ましい溶解特性を与える、これらのアミノ酸と他の物質、たとえばセリンの混合ポリマーを含む。

30

【0269】

あるいは、複合抗体は、抗体成分を治療物質と直接複合することによって製造できる。一般的な手順は、治療物質を酸化抗体成分に直接結合することを除き、間接複合方法と同様である。たとえば抗体の炭水化物部分を、半減期を延長させるためにポリエチレングリコールに結合することができる。

40

【0270】

あるいは、治療物質を、ジスルフィド結合形成によってまたはN - スクシニル3 - (2 - ピリジルジチオ)プロピオネート（S P D P ）などのヘテロ二官能性架橋剤を用いて還元抗体成分のヒンジ領域で結合することができる。Y u e t a l . , I n t . J . C a n c e r 56 : 244 (1994) 。そのような複合のための一般的な手法は当技術分野において周知である。たとえばW o n g , C h e m i s t r y O f P r o t e i n C o n j u g a t i o n a n d C r o s s - L i n k i n g ( C R C P r e s s 1991) ; U p e s l a c i s e t a l . , " M o d i f i c a t i o n o f A n t i b o d i e s b y C h e m i c a l M e t h o d s , " i n M o n

50

oclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), pages 187 - 230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), pages 60 - 84 (Cambridge University Press 1995) 参照。様々な二官能性タンパク質カップリング剤が当技術分野で公知であり、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオール) プロピオネート (SPDP)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (ジメチルアジピミデート HCL など)、活性エステル (ジスクシンイミジルスベレート など)、アルデヒド (グルタルアルデヒド など)、ビス - アジド化合物 (ビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン など)、ビス - ジアゾニウム誘導体 (ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン など) ジイソシアネート (トリエン、2, 6 - ジイソシアネート など)、およびビス活性フッ素化合物 (1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼン など) などがある。

#### 【0271】

最後に、1 またはそれ以上の抗 t m - P T P 抗体部分ともう 1 つ別のポリペプチドを含む融合タンパク質を構築することができる。抗体融合タンパク質を作製する方法は当技術分野において周知である。たとえば米国特許第 6, 306, 393 号参照。インターロイキン - 2 部分を含む抗体融合タンパク質が、Boletti et al., Ann. Oncol. 6: 945 (1995), Nicolet et al., Cancer Gene Ther. 2: 161 (1995), Becker et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 93: 7826 (1996), Hank et al., Clin. Cancer Res. 2: 1951 (1996), および Hu et al., Cancer Res. 56: 4998 (1996) によって記述されている。

#### 【0272】

##### (免疫複合体)

本発明はまた、化学療法剤、毒素 (たとえば、そのフラグメントおよび / または変異体を含む、酵素的に活性な毒素または細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的に活性な毒素)、プロドラッグなどの細胞傷害性物質、または免疫調節剤、ホルモンまたはホルモンアンタゴニスト、および酵素または酵素阻害剤などのもう 1 つ別の作用物質、色素原または染料などの光活性治療物質、血管新生阻害剤、代替抗体またはそのフラグメント、または放射性同位体 (すなわち放射性複合体) に複合した抗体を含む免疫複合体に関する (総説については、Schrama et al., (2006) Nature Reviews 5: 147 - 159 参照)。

#### 【0273】

そのような免疫複合体の生成において有用な化学療法剤は上述したとおりである。抗体と、カリケマイシン、メイタンシン (米国特許第 5, 208, 020 号)、トリコテン、デュオカルマイシン (「超強力毒素 (Ultra Potent Toxins)」としても知られる; 一般に Lillo et al., (2004) Chemistry and Biology 11; p. 897 - 906 参照) および CC - 1065 などの 1 またはそれ以上の低分子毒素の複合体もここで考慮される。

#### 【0274】

本発明の 1 つの好ましい実施形態では、抗体を 1 またはそれ以上のメイタンシン分子に複合する (たとえば 1 抗体分子につき約 1 - 約 10 メイタンシン分子)。メイタンシンは、たとえば May - SS - Me に変換することができ、それを May - SH3 に還元し、修飾抗体と反応させて (Chari et al. Cancer Research 52: 127 - 131 (1992))、メイタンシノイド - 抗体免疫複合体を生成し得る

。あるいは、選択される薬剤は、約  $10^{-11}$  M の IC<sub>50</sub> を有する（総説については Payne (2003) Cancer Cell 3: 207 - 212 参照）極めて強力なメイトンシン誘導体 DM1 (N<sup>2</sup>' - デアセチル - N<sup>2</sup>' - (3 - メルカプト - 1 - オキソプロピル) - メイトンシン) (たとえば 2002 年 12 月 12 日公開の国際公開番号第 WO 02 / 098883 号参照)、または DM4 (N<sup>2</sup>' - デアセチル - N<sup>2</sup>' (4 - メチル - 4 - メルカプト - 1 - オキソペンチル) - メイトンシン) (たとえば 2004 年 12 月 2 日公開の国際公開番号第 WO 2004 / 103272 号参照) であり得る。

#### 【0275】

興味深いもう 1 つの免疫複合体は、1 またはそれ以上のカリケアマイシン分子に複合した抗腫瘍細胞抗原抗体を含む。カリケアマイシンファミリーの抗生物質は、ピコモル以下の濃度で二本鎖 DNA 切断を生じさせることができる。使用し得るカリケアマイシンの構造的類似体は、<sub>1</sub><sup>I</sup>、<sub>2</sub><sup>I</sup>、<sub>3</sub><sup>I</sup>、N - アセチル - <sub>1</sub><sup>I</sup>、PSAG および <sub>1</sub><sup>I</sup> を含むが、これらに限定されない (Hinman et al. Cancer Research 53: 3336 - 3342 (1993) および Lode et al. Cancer Research 58: 2925 - 2928 (1998))。また、参照により明白にここに組み込まれる米国特許第 5,714,586 号; 同第 5,712,374 号; 同第 5,264,586 号; および同第 5,773,001 号も参照のこと。

#### 【0276】

さらにもう 1 つのアプローチは、腫瘍細胞抗原抗体を、多くの癌において過剰産生される酵素によってその活性形態で放出され得るプロドラッグに複合することを含む。たとえば抗体複合体は、活性成分がプラスミンによって複合体から放出される、ドキソルビシンのプロドラッグ形態と共に作製することができる。プラスミンは多くの癌組織において過剰産生されることが知られている (Decy et al., (2004) FASEB Journal 18 (3): 565 - 567 参照)。

#### 【0277】

使用できる酵素的に活性な毒素およびそのフラグメントは、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素 A 鎖 (緑膿菌から)、シュードモナス外毒素、リシン A 鎖、アプリン A 鎖、モデクシン A 鎖、 $\alpha$  - サルシン、Aleurites fordii タンパク質、ジアンチンタンパク質、Phytolacca americana タンパク質 (PAPI、PAPII および PAP - S)、リボヌクレアーゼ (Rnase)、デオキシリボヌクレアーゼ (Dnase)、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、Momordica charantia 阻害剤、クルシン、クロチン、Saponaia officinalis 阻害剤、ゲロニン、マイトジェリン、レストリクトシン、フェノマイシン、ネオマイシンおよびトリコセセンを含む。たとえば 1993 年 10 月 28 日公開の国際公開番号第 WO 93 / 21232 号参照。低い内因性免疫原性および癌細胞が毒素に対して耐性になる可能性を低下させる作用機構 (たとえば細胞傷害性機構対細胞増殖抑制性機構) を有する毒素が特に好ましい。

#### 【0278】

本発明の抗体と免疫調節剤の間で形成される複合体が考慮される。たとえば免疫刺激性オリゴヌクレオチドが使用できる。これらの分子は、抗原特異的抗体応答を惹起することができる強力な免疫原である (Datta et al., (2003) Ann N.Y. Acad. Sci 1002: 105 - 111 参照)。付加的な免疫調節化合物は、「S1 因子」などの幹細胞増殖因子、腫瘍壊死因子 (TNF) などのリンホトキシン、インターロイキンなどの造血因子、顆粒球 - コロニー刺激因子 (G - CSF) または顆粒球マクロファージ刺激因子 (GM - CSF) などのコロニー刺激因子 (CSF)、インターフェロン、または  $\alpha$  などのインターフェロン (IFN)、エリスロポエチン、およびトロポエチンを含み得る。

#### 【0279】

様々な放射性同位体が放射複合抗腫瘍細胞抗原抗体の生産のために使用可能である。治療用放射複合体は、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、<sup>47</sup>Sc、<sup>59</sup>Fe、<sup>64</sup>Cu、<sup>67</sup>Cu、<sup>75</sup>S

10

20

30

40

50



e、<sup>77</sup>As、<sup>89</sup>Sr、<sup>90</sup>Y、<sup>99</sup>Mo、<sup>105</sup>Rh、<sup>109</sup>Pd、Ag - I 1 1、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>142</sup>Pr、<sup>143</sup>Pr、<sup>149</sup>Pm、<sup>153</sup>Sm、<sup>161</sup>Th、<sup>166</sup>Ho、<sup>169</sup>Er、<sup>177</sup>Lu、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>189</sup>Re、<sup>194</sup>Ir、<sup>198</sup>Au、<sup>199</sup>Au、<sup>211</sup>Pb、<sup>212</sup>Pb、および<sup>213</sup>Bi、<sup>58</sup>Co、<sup>67</sup>Ga、<sup>80</sup>Brm、<sup>99</sup>Tcm、<sup>103</sup>Rhm、<sup>109</sup>Pt、In - ill、<sup>119</sup>Sb、<sup>1125</sup>、<sup>161</sup>Ho、<sup>189</sup>Osm、<sup>192</sup>Ir、<sup>152</sup>Dy、<sup>211</sup>At、<sup>212</sup>Bi、<sup>223</sup>Ra、<sup>219</sup>Rn、<sup>215</sup>Po、<sup>211</sup>Bi、<sup>225</sup>Ac、<sup>221</sup>Fr、<sup>217</sup>At、<sup>213</sup>Bi、<sup>255</sup>Fmおよびそれらの組合せを用いて作製できる。加えて、ホウ素、ガドリニウムまたはウラン原子が使用でき、ホウ素原子は、好ましくは<sup>10</sup>B、ガドリニウム原子は<sup>157</sup>Gd、およびウラン原子は<sup>235</sup>Uである。

10

#### 【0280】

好ましくは、治療用放射性核種複合体は、20 ~ 10,000 keVのエネルギーを備えた放射性核種を有する。放射性核種は、1000 keV以下のエネルギーを有するオージェ放射体、20 ~ 5000 keVのエネルギーを有するP放射体、あるいは2000 ~ 10,000 keVのエネルギーを有するアルファまたは「 $\gamma$ 」放射体であり得る。

#### 【0281】

診断用放射複合体は、放射性核種が20 ~ 10,000 keVのエネルギーを有する、 $\gamma$ または陽電子放射性同位体である放射性核種を含み得る。放射性核種は、<sup>18</sup>F、<sup>51</sup>Mn、<sup>52m</sup>Mn、<sup>52</sup>Fe、<sup>55</sup>Co、<sup>62</sup>Cu、<sup>64</sup>Cu、<sup>68</sup>Ga、<sup>72</sup>As、<sup>75</sup>Br、<sup>76</sup>Br、<sup>82m</sup>Rb、<sup>83</sup>Sr、<sup>86</sup>Y、<sup>89</sup>Zr、<sup>94m</sup>Tc、<sup>119</sup>In、<sup>120</sup>I、<sup>124</sup>I、<sup>51</sup>Cr、<sup>57</sup>Co、<sup>58</sup>Co、<sup>59</sup>Fe、<sup>67</sup>Cu、<sup>67</sup>Ga、<sup>75</sup>Se、<sup>97</sup>Ru、<sup>99m</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>114m</sup>In、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>169</sup>、<sup>197</sup>Hgおよび<sup>211</sup>Tlの群から選択され得る。

20

#### 【0282】

さらなる種類の診断用免疫複合体が考慮される。本発明の抗体またはフラグメントは、光活性である診断薬または造影剤に連結し得る。光活性化合物は、色素原または染料などの化合物を含み得る。造影剤は、たとえば常磁性イオンであり得、前記イオンは、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジム(III)、サマリウム(III)、イットルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)およびエルビウム(III)の群から選択される金属を含む。造影剤はまた、ヨウ素、イリジウム、バリウム、ガリウムおよびタリウム化合物などの、X線手技またはコンピュータ断層撮影法において使用される放射線不透過性化合物でもよい。放射線不透過性化合物は、バリウム、ジアトリゾエート、エチオダイズド油、クエン酸ガリウム、イオカルム酸、イオセタム酸、ヨードミド、ヨージバミド、ヨードキサム酸、イオグラミド、イオヘキソール、イオパミドール、イオパノ酸、イオプロセム酸、イオセファム酸、イオセル酸、イオスラミドメグルミン、イオスメト酸、イオタスル、イオテトル酸、イオタラム酸、イオトロクス酸、イオキサグル酸、イオキソトリゾ酸、イボダート、メグルミン、メトリザミド、メトリゾエート、プロピリオドンおよび塩化タリウムの群から選択され得る。あるいは、診断用免疫複合体は、本発明の抗体に複合したガス充填リポソームなどの超音波増強剤を含み得る。診断用免疫複合体は、腫瘍または癌の診断および検出の術中、内視鏡または脈管内方法を含むが、これらに限定されない様々な手法のために使用し得る。

30

40

#### 【0283】

抗体と細胞傷害性薬剤の複合体は、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ビリジルジチオール)プロピオネート(SPD P)、スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCLなど)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレートなど)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)、ビス - アジド化合物(ビス(p - アジドベンゾイル)ヘキサジアミンなど)、ビス - ジアゾニウム誘導体(ビス

50

- (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミンなど) ジイソシアネート (トリエン、2, 6 - ジイソシアネートなど)、およびビス活性フッ素化合物 (1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼンなど) などの様々な二官能性タンパク質カップリング剤を用いて作製し得る。たとえばリシン免疫毒素は、V i t t e t t a e t a l . S c i e n c e 238: 1098 (1987) に述べられているように製造できる。炭素14標識1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミン五酢酸 (M X - D T P A) は、抗体への放射性核種の複合のための例示的なキレート化剤である。国際公開番号第W O 94 / 11026号参照。リンカーは、細胞内での細胞傷害性薬剤の放出を促進する「開裂性リンカー」であり得る。たとえば酸不安定リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー (C h a r i e t a l . C a n c e r R e s e a r c h 52: 127 - 131 (1992)) が使用し得る。薬剤は、さらに、炭水化物部分を通して本発明の抗体に連結し得る。

10

#### 【0284】

あるいは、抗腫瘍細胞抗原抗体と細胞傷害性薬剤を含む融合タンパク質は、たとえば組換え手法またはペプチド合成によって作製し得る。

#### 【0285】

さらにもう1つの実施形態では、腫瘍のプレターゲティングにおける使用のために抗体を「受容体」(ストレプトアビジンなど)に複合してもよく、この場合、抗体 - 受容体複合体を患者に投与し、次に清澄化剤を用いて非結合複合体を循環から除去して、その後細胞傷害性薬剤(たとえば放射性核種)に複合したリガンド(たとえばアビジン)を投与する。

20

#### 【0286】

抗腫瘍細胞抗原抗体は、さらに、標的細胞リソソーム内でのみ放出される細胞傷害性分子に複合し得る。たとえば薬剤モノメチルオーリスチン(M M A E)を、抗体複合体のインターナリゼーション後にタンパク質分解性リソソーム酵素カテプシンBによって開裂される、バリン - シトルリン結合によって複合することができる(たとえば2003年4月3日公開の国際公開番号第W O 03 / 026577号参照)。あるいは、ヒドラゾン官能基を開裂性部分として含む酸不安定リンカーを用いてM M A Eを抗体に結合することができる(たとえば2002年11月11日公開の国際公開番号第W O 02 / 088172号参照)。

30

#### 【0287】

(併用療法)

動物モデルにおいて有効な2つ以上のt m - P T P 抗体を特定したため、癌に対するさらに改善された効果を提供するために2またはそれ以上のそのようなt m - P T P 抗体を混合することはさらに有利であると考えられる。1またはそれ以上のt m - P T P 抗体を含む組成物は、癌に罹患している、または癌に罹患する素因がある人または哺乳動物に投与し得る。t m - P T P 抗体はまた、細胞傷害性薬剤または癌化学療法剤などのもう1つ別の治療薬と共に投与し得る。2つの治療薬の同時投与は、薬剤がそれらの治療作用を及ぼしている期間に重複がある限り、薬剤を同時にまたは同じ経路で投与することを必要としない。異なる日数または週数での投与と同様に、同時または連続投与が考慮される。

40

#### 【0288】

本発明の方法は、単一抗t m - P T P 抗体の投与ならびに種々の抗体の組合せまたは「カクテル」を考慮する。そのような抗体カクテルは、それらが異なるエフェクター機構を利用する抗体を含む、または細胞傷害性抗体を免疫エフェクター機能に基づく抗体と直接組み合わせるため、ある種の利点を有すると考えられる。併用でのそのような抗体は、相乗治療作用を示し得る。

#### 【0289】

細胞傷害性薬剤は、細胞の機能を阻害するまたは妨げるおよび/または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射性同位体(たとえば $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$

50

および Re<sup>186</sup> )、化学療法剤、および細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的に活性な毒素または合成毒素などの毒素、またはそれらのフラグメントを含むことが意図されている。非細胞傷害性薬剤は、細胞の機能を阻害しないまたは妨げないおよび/または細胞の破壊を引き起こさない物質を指す。非細胞傷害性薬剤は、ビーズ、リボソーム、マトリックスまたは粒子を含み得る(たとえば参照によりここに組み込まれる、米国特許公開第2003/0028071号および同第2003/0032995号参照)。そのような薬剤は、本発明に従った抗体と複合、共役、連結または結合し得る。

#### 【0290】

癌化学療法剤は、限定を伴わずに、カルボプラチンおよびシスプラチンなどのアルキル化剤；ナイトロジェンマスタードアルキル化剤；カルムスチン(BCNU)などのニトロソ尿素アルキル化剤；メトトレキサートなどの代謝拮抗物質；フォリン酸；プリン類似体代謝拮抗物質、メルカプトプリン；フルオロウラシル(5-FU)およびゲンシタビン(Gemzar(登録商標))などのピリミジン類似体代謝拮抗物質；ゴセレリン、ロイプロリドおよびタモキシフェンなどのホルモン抗腫瘍薬；アルデスロイキン、インターロイキン-2、ドセタキセル、エトポシド(VP-16)、インターフェロン、パクリタキセル(Taxol(登録商標))およびトレチノイン(ATRA)などの天然抗腫瘍薬；ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ダウノマイシンおよびミトマイシンCを含むミトマイシンなどの抗生物質天然抗腫瘍薬；およびビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシンなどのピンカアルカロイド天然抗腫瘍薬；アセグラトン、アドリアマイシン、イフォスファミド、エノシタビン、エピチオスタノール、アクラルビシン、アンシタビン、ニムスチン、塩酸プロカルバシン、カルボコン、カルボプラチン、カルモフル、クロモマイシンA3、抗腫瘍性多糖類、抗腫瘍性血小板因子、シクロホスファミド(Cytosin(登録商標))、スキゾフィラン、シタラビン(シトシンアラビノシド)、ダカルバジン、チオイノシン、チオテバ、テガフル、ドラスタチン、オーリスタチンなどのドラスタチン類似体、CPT-11(イリノテカン)、ミトザントロン、ビノレルビン、テニポシド、アミノプテリン、カルミノマイシン、エスベラミシン(たとえば米国特許第4,675,187号参照)、ネオカルジノスタチン、OK-432、ブレオマイシン、フルツロン、プロクスウリジン、ブスルファン、ホンバン、ペブロマイシン、ベスタチン(Ubenimex(登録商標))、インターフェロン、メピチオスタン、ミトブロニトール、メルファラン、ラミニンペプチド、レンチナン、Coriolus versicolor(カワラタケ)抽出物、テガフル/ウラシル、エストラムスチン(エストロゲン/メクロレタミン)を含む。

#### 【0291】

さらに、癌患者のための治療薬として使用される付加的な薬剤は、EPO、G-CSF、ガンシクロビル；抗生物質、ロイプロリド；メペリジン、ジドブジン(AZT)；突然変異体および類似体を含む、インターロイキン1-18；インターフェロン、およびなどのインターフェロンまたはサイトカイン；黄体化ホルモン放出ホルモン(LHRH)および類似体および性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)などのホルモン；トランスフォーミング増殖因子(TGF-)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、神経成長因子(NGF)、成長ホルモン放出因子(GHRF)、上皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子相同因子(FGFHF)、肝細胞増殖因子(HGF)およびインスリン増殖因子(IGF)などの増殖因子；腫瘍壊死因子&(TNF-&)；浸潤抑制因子-2(IIF-2)；骨誘導因子1-7(BMP1-7)；ソマトスタチン；サイモシン-1；-グロブリン；スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)；補体因子；抗血管新生因子；抗原性物質；およびプロドラッグを含む。

#### 【0292】

プロドラッグは、親薬剤に比べて腫瘍細胞に対する細胞傷害性が低いまたは非細胞傷害性であり、活性なまたはより活性な親形態へと酵素的に活性化され得るまたは変換され得る、医薬的に活性な物質の前駆体または誘導体を指す。たとえばWilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical

10

20

30

40

50

Society Transactions, 14, pp. 375 - 382, 615th Meeting Belfast (1986) および Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247 - 267, Humana Press (1985) 参照。プロドラッグは、リン酸含有プロドラッグ、チオリン酸含有プロドラッグ、硫酸含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、Dアミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、 $\beta$ -ラクタム含有プロドラッグ、場合により置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグまたは場合により置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、より活性な細胞傷害性遊離薬剤に変換され得る5-フルオロシトシンおよび他の5-フルオロウリジンプロドラッグを含むが、これらに限定されない。ここでの使用のためにプロドラッグ形態に誘導退化することができる細胞傷害性薬剤の例は、上述した化学療法剤を含むが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

#### 【0293】

(投与および製剤)

本発明の方法の実施において使用される抗 t m - P T P 抗体は、所望送達方法に適した担体を含む医薬組成物に製剤し得る。適切な担体は、抗 t m - P T P 抗体と組み合わせたとき、抗体の抗腫瘍機能を保持し、被験者の免疫系と非反応性であるいかなる物質も含む。例は、滅菌リン酸緩衝食塩水、静菌水等のような多くの標準医薬担体のいずれかを含むが、これらに限定されない。様々な水性担体、たとえば水、緩衝水、0.4%食塩水、0.3%グリシン等が使用でき、および軽度の化学修飾等に従事される、アルブミン、リポタンパク質、グロブリン等のような安定性上昇のための他のタンパク質を含み得る。

#### 【0294】

抗体の治療用製剤は、所望純度を有する抗体を任意の生理的に許容される担体、賦形剤または安定剤と混合することにより、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、保存のために調製される (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))。許容される担体、賦形剤または安定剤は、使用される用量および濃度で受容者に非毒性であり、およびリン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基以下）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリシンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類およびグルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTAなどのキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（たとえばZn-タンパク質錯体）；および/またはTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含む。

#### 【0295】

ここでの製剤はまた、治療される特定適応症のための必要に応じて2以上の活性化合物、好ましくは互いに有害な作用を及ぼさない補足的な活性を有するものを含み得る。たとえば免疫抑制剤をさらに提供することが望ましいと考えられる。そのような分子は、意図される目的のために有効な量で組み合わせられて適切に存在する。

#### 【0296】

有効成分はまた、たとえばコアセルベーション手法によってまたは界面重合によって製造されるマイクロカプセル、たとえばそれぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル、コロイド状

薬剤送達システム（たとえばリボソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）またはマクロエマルジョンに封入し得る。そのような手法は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

【0297】

インビボ投与のために使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌ろ過膜を通したる過によって容易に達成される。

【0298】

抗体は、非経口的、皮下、腹腔内、肺内および鼻内、および所望する場合は局所治療のための、病巣内投与を含む、何らかの適切な手段によって投与される。非経口的注入は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮内または皮下投与を含む。加えて、抗体はパルス注入によって、特に抗体の漸減用量で、適切に投与される。好ましくは、投与は注射によって、最も好ましくは、一部には投与が短期であるか慢性的であるかに依存して、静脈内または皮下注射によって行われる。局所、特に経皮、経粘膜、直腸、経口または、たとえば所望部位の近くに設置されたカテーテルを通しての、局所投与を含む、他の投与方法も考慮される。

【0299】

本発明のための組成物は、たとえば顆粒、粉末、錠剤、カプセル、シロップ、坐薬、注射、乳剤、エリキシル、懸濁液または溶液に形態であり得る。本発明の組成物は、様々な投与経路用に、たとえば経口投与、鼻投与、直腸投与、皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射または腹腔内注射による投与用に製剤することができる。以下の剤型は例として示すものであり、本発明を限定すると解釈されるべきではない。

【0300】

注射用剤型は、一般に適切な分散剤または湿潤剤と懸濁化剤を用いて製造し得る水性懸濁液または油性懸濁液を含む。注射用形態は、溶媒または希釈剤で製造される、溶液相または懸濁液の形態であり得る。許容される溶媒または賦形剤は、滅菌水、リンガー液または等張食塩水を含む。あるいは、滅菌油を溶媒または懸濁化剤として使用し得る。好ましくは、天然または合成油、脂肪酸、モノ、ジまたはトリグリセリドを含む、油または脂肪酸は非揮発性である。

【0301】

注射のために、医薬製剤および/または薬剤は、上述したような適切な溶液による再溶解に適した粉末であり得る。これらの例は、凍結乾燥、回転乾燥または噴霧乾燥粉末、無定形粉末、顆粒、沈殿物または微粒子を含むが、これらに限定されない。注射のために、製剤は、場合により安定剤、pH調整剤、界面活性剤、バイオアベイラビリティ-調整剤およびこれらの組合せを含み得る。

【0302】

持続放出製剤を製造し得る。持続放出製剤の適切な例は、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、前記マトリックスは、成形品、たとえばフィルムまたはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリックスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（たとえばポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とイルエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-ビニルアセテート、Lupron Depot（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸ロイプロリドからなる注射用ミクロスフェア）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、およびポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸を含む。エチレン-ビニルアセテートおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは100日間以上にわたる分子の放出を可能にするが、ある種のヒドロゲルはより短い期間タンパク質を放出する。封入された抗体が長期間体内にとどまるとき、37℃で湿気に暴露される結果として変性または凝集し、生物学的活性の喪失および免疫原性の変化を生じさせ得る。関与する機序に依存して、安定化のために合理的な戦略を講じることができる。たとえば凝集機序が、チオ-ジスルフィド交換を通しての分

子間 S - S 結合形成であることが発見された場合、スルフヒドリル残基を修飾すること、酸性溶液から凍結乾燥すること、水分含量を制御すること、適切な添加物を使用すること、および特異的ポリマーマトリックス組成物を開発することによって安定化を達成し得る。

#### 【0303】

本発明の製剤は、短時間作用性、迅速放出性、長時間作用性、またはここで述べるような持続放出性に設計し得る。それゆえ、医薬製剤はまた、制御放出用または徐放用に製剤し得る。

#### 【0304】

本発明の組成物はまた、たとえばミセルまたはリボソーム、または他の何らかの封入形態を含み得るか、または長期間の保存および/または送達作用を与えるために長期放出形態で投与し得る。それゆえ、医薬製剤および薬剤は、ペレットまたはシリンダーに圧縮し、デポー注射としてまたはステントなどの移植片として筋肉内または皮下的に移植し得る。そのような移植片は、シリコーンおよび生分解性ポリマーなどの公知の不活性材料を使用し得る。

10

#### 【0305】

上述した代表的剤型のほかに、医薬的に許容される賦形剤および担体は一般に当業者に公知であり、それゆえ本発明に包含される。そのような賦形剤および担体は、たとえば参照によりここに組み込まれる、“Remington's Pharmaceutical Sciences” Mack Pub. Co., New Jersey (1991) に

20

#### 【0306】

詳細な用量は、疾患の状態、被験者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別および食事、投与間隔、投与経路、排泄速度、および薬剤の併用に依存して調整し得る。有効量を含む上記剤型のいずれもが十分に常套的実験の範囲内であり、それゆえ、十分に本発明の範囲内である。

#### 【0307】

治療薬として有用な t m - P T P 抗体は、しばしば他の天然に生じる免疫グロブリンまたは他の生物学的分子を実質的に含まずに製造される。好ましい t m - P T P 抗体はまた、その必要のある被験者に投与したとき最小限の毒性を示す。

30

#### 【0308】

本発明の組成物は、従来の周知の滅菌手法によって滅菌され得る。生じた溶液は、使用のために包装されるか、または無菌条件下でろ過され、凍結乾燥されてもよく、凍結乾燥製剤は投与前に滅菌溶液と組み合わせられる。組成物は、pH調整剤および緩衝剤、張度調整剤等のような、生理的条件に近づけるために必要とされる、医薬的に許容される補助物質、たとえば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムおよび安定剤（たとえば1 - 20%マルトース等）を含み得る。

#### 【0309】

本発明の t m - P T P 抗体はまた、リボソームによって投与してもよく、前記リボソームは、薬剤（ここで開示する抗体および、場合により、化学療法剤など）の送達のために有用な様々な種類の脂質および/またはリン脂質および/または界面活性剤からなる小胞である。リボソームは、乳剤、泡、ミセル、不溶性単層、リン脂質分散、ラメラ層等を含み、t m - P T P 抗体を特定組織に標的するためならびにその半減期を上昇させるための媒体として使用できる。たとえば参照によりここに組み込まれる、米国特許第4,837,028号および同第5,019,369号に述べられているような、様々な方法がリボソームを製造するために使用可能である。

40

#### 【0310】

抗体を含むリボソームは、Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); および米国

50

特許第4,485,045号および同第4,544,545号に述べられているような、当技術分野で公知の方法によって製造される。高い循環時間を有するリボソームが米国特許第5,013,556号に開示されている。特に有用なリボソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法によって生成できる。規定細孔径のフィルターを通してリボソームを押出し、所望直径を有するリボソームを生成する。本発明の抗体のFab'フラグメントは、ジスルフィド交換反応によってMartin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に述べられているようにリボソームに複合することができる。化学療法剤(たとえばドキソルビシン)が場合によりリボソーム内に含まれる[たとえばGabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484(1989)参照]。 10

#### 【0311】

これらの組成物中のtm-PTP 抗体の濃度は広く変化し得る、すなわち約10重量%未満、通常は少なくとも約25重量%から75重量%または90重量%まで変化することができ、選択される特定投与様式に従って、主として液体容積、粘度等によって選択される。経口的、局所的および非経口的に投与可能な組成物を製造するための実際の方法は当業者に公知であるかまたは明白であり、たとえば参照によりここに組み込まれる、Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA(1995)に詳細に述べられている。 20

#### 【0312】

本発明の組成物は、既に癌に罹患しているまたは癌の素因がある哺乳動物に、癌の発症を予防するまたは少なくとも部分的に停止させるのに十分な量で投与される。これを達成するための適切な量は「治療有効量」と定義される。tm-PTP 抗体の有効量は多様であり、疾患の重症度および治療される患者の体重と全身状態に依存するが、一般に約1.0μg/kg~約100mg/kg体重、または約10μg/kg~約30mg/kgの範囲であり、各適用あたり約0.1mg/kg~約10mg/kgまたは約1mg/kg~約10mg/kgの用量がより一般的に使用される。たとえば約10μg/kg~5mg/kgまたは約30μg/kg~1mg/kgの抗体が、たとえば1回またはそれ以上の別々の投与によるまたは持続注入による、患者への投与のための初期候補用量である 30。投与は、疾患に対する応答および患者の治療忍容性に依存して必要に応じて、毎日、1日おき、週に1回またはそれ以下の頻度である。4、5、6、7、8、10または12週間またはそれ以上のようなより長期間にわたる維持用量が、所望する疾患症状の抑制が生じるまで必要とされることがあり、用量は必要に応じて調節され得る。この治療の経過は従来の手法およびアッセイによって容易に監視される。

#### 【0313】

組成物の単回または反復投与は、治療する医師によって選択される用量レベルとパターンで実施され得る。疾患の予防または治療に関して、抗体の適切な用量は、上記で定義したように、治療する疾患の種類、疾患の重症度と経過、抗体を予防のために投与するかまたは治療のために投与するか、過去の治療、患者の病歴および抗体に対する応答、および主治医の裁量に依存する。抗体は、1回でまたは一連の治療で患者に適切に投与される。 40

#### 【0314】

抗体組成物は、医療実施基準(good medical practice)に合致するように製剤され、用量決定され、投与される。これに関する考慮因子は、治療される特定疾患、治療される特定哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、および医師に既知の他の因子を含む。投与する抗体の治療有効量はそのような考慮によって決定され、tm-PTP を介した疾患、状態または障害を予防する、改善するまたは治療するため、特に癌細胞を治療するため、最も詳細には腫瘍細胞転移を治療するために必要な最小量である。そのような量は、好ましくは宿 50

主に対して毒性であるまたは宿主を感染に対して有意により感受性にする量以下である。

【0315】

抗体は、必ずしもその必要はないが、場合により、対象とする疾患を予防するまたは治療するために現在使用される1またはそれ以上の薬剤と共に製剤される。たとえば癌では、抗体は、上述した化学療法剤と共にまたはA D E P Tにおいて投与され得る。そのような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、疾患、状態または障害または治療の種類、および上記で論じた他の因子に依存する。これらは一般に、これまで使用されているのと同じ用量および投与経路で、またはこれまで用いられた用量の約1~99%で使用される。

【0316】

本発明のもう1つの実施形態では、癌の治療を含む、上述した疾患、障害または状態の治療のために有用な物質を含む製品が提供される。製品は容器およびラベルを含む。適切な容器は、たとえばビン、バイアル、注射器および試験管を含む。容器はガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から作られ得る。容器は、状態を治療するために有効な組成物を保持し、無菌アクセス口（たとえば容器は、皮下注射針によって貫通できる栓を備えた静脈溶液バッグまたはバイアルであり得る）を有し得る。組成物中の有効成分は本発明の抗体である。容器上のまたは容器と結合したラベルは、組成物が選択状態を治療するために使用されることを表示する。製品は、リン酸緩衝食塩水、リンガー液およびデキストロース溶液などの医薬的に許容される緩衝液を含む第二容器をさらに含み得る。製品は、他の緩衝液、希釈剤、充填剤、針、注射器、および使用のための指示を伴う添付文書を含む、商業上および使用者の見地から望ましい他の物質をさらに含み得る。

【0317】

（標識化）

1つの実施形態では、本発明の癌関連核酸、タンパク質および抗体は標識される。ここでは「標識された」とは、化合物が、化合物の検出を可能にするために結合された少なくとも1つの元素、同位体または化合物を有することを意味する。一般に、標識は3つのクラスに分類される：a)放射性または重同位体であり得る、同位体標識；b)抗体または抗原であり得る、免疫標識；およびc)着色または蛍光染料。標識は、いかなる位置でも癌関連核酸、タンパク質および抗体に組み込み得る。たとえば標識は、検出可能なシグナルを、直接または間接的に、生じることができべきである。検出可能部分は、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^{125}\text{I}$ などの放射性同位体、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミンまたはルシフェリンなどの蛍光または化学発光化合物、またはアルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼまたはホースラディッシュペルオキシダーゼなどの酵素であり得る。Hunter et al., Nature, 144:945 (1962); David et al., Biochemistry, 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40:219 (1981); および Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982) によって述べられている方法を含む、抗体を標識に複合するための当技術分野で公知のいかなる方法も使用し得る。

【0318】

（癌表現型の検出）

ひとたび発現され、必要であれば、精製されると、癌関連タンパク質および核酸は数多くの適用において有用である。1つの態様では、遺伝子の発現レベルが癌表現型における種々の細胞状態に関して測定される；すなわち正常組織と癌組織における（及び一部の場合には、以下で概説するように予後に関連する様々な重症度のリンパ腫に関して）遺伝子の発現レベルが、発現プロファイルを提供するために評価される。特定細胞状態または発生源の発現プロファイルは基本的にその状態の「フィンガープリント」である；2つの状態が同様に発現される何らかの特定遺伝子を有することがあるが、多くの遺伝子を同時に評価することは細胞状態に固有の遺伝子発現プロファイルの作成を可能にする。種々の状態の細胞の発現プロファイルを比較することにより、これらの状態の各々においてどの遺



伝子が重要であるかに関する情報（遺伝子の上方および下方調節を含む）が得られる。その後、特定患者からの組織が正常または癌組織の遺伝子発現プロファイルを有しているかどうかの診断が為され得るまたは確認され得る。

#### 【0319】

ここで使用する「差次的発現」または等価物は、細胞内および細胞間の、遺伝子の一過性および/または細胞発現パターンの定性的ならびに定量的相違を指す。それゆえ、差次的に発現される遺伝子は、たとえば正常対癌組織において、活性化または不活性化を含む、変化したその発現を定性的に有し得る。すなわち、遺伝子は、もう1つ別の状態と比べて、特定状態でスイッチがオンであったりまたはオフであったりし得る。当業者に明白であるように、2またはそれ以上の状態の比較を行うことができる。そのような定性的に調節された遺伝子は、1つのそのような状態または細胞型における標準手法によって検出できる、ある状態または細胞型内での発現パターンを示す。あるいは、発現が上昇するまたは低下するという点で、測定は定量的である；すなわち遺伝子の発現は、上方調節されて高い量の転写産物を生じるか、または下方調節されて低い量の転写産物を生じる。発現が異なる度合いは、参照により明白にここに組み込まれる、Affymetrix GeneChip（登録商標）発現アレイ、Lockhart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996)の使用などの、以下で概説するような標準特性決定手法によって定量するのに十分なほど大きいことだけを必要とする。他の手法は、定量的逆転写酵素PCR、ノーザン分析およびRNAアーゼ保護を含むが、これらに限定されない。上記で概説したように、好ましくは、発現の変化（すなわち上方調節または下方調節）は少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約100%、より好ましくは少なくとも約150%、より好ましくは少なくとも約200%であり、300から少なくとも1000%が特に好ましい。

#### 【0320】

当業者に認識されるように、これは、遺伝子転写産物またはタンパク質レベルでの評価によって為され得る；すなわち、遺伝子発現の量を遺伝子転写産物のDNAまたはRNA等価物に対する核酸プローブを用いて監視でき、また遺伝子発現レベル、あるいは最終遺伝子産物自体（タンパク質）の定量化を、癌関連タンパク質に対する抗体および標準免疫測定法（ELISA等）または質量分析法、二次元ゲル電気泳動等を含む他の手法の使用を通して監視し得る。それゆえ、tm-PTP 遺伝子に対応するタンパク質、すなわち特定癌表現型、すなわちリンパ腫において重要と特定されたものを、その癌に特異的な診断試験において評価することができる。

#### 【0321】

もう1つの実施形態では、遺伝子発現の監視を行い、多くの遺伝子を同時に監視する。しかし、多数のタンパク質発現の監視はまた、発現プロファイルを作成するためにも実施できる。あるいは、これらのアッセイを個体ベースで実施し得る。

#### 【0322】

1つの実施形態では、癌関連核酸プローブを、特定細胞における癌関連配列の検出と定量化のためにここで概説するようにバイオチップに結合し得る。アッセイは当技術分野において公知のように実施される。当業者に認識されるように、あらゆる癌関連配列がプローブとして使用でき、一部の場合には単一配列アッセイが使用され、また別の実施形態ではここで述べる複数の配列が使用される。加えて、固相アッセイを説明するが、様々な溶液ベースのアッセイも実施し得る。

#### 【0323】

もう1つの実施形態では、固体と溶液の両方に基づくアッセイを、正常組織と比較して癌において上方調節または下方調節される癌関連配列を検出するために使用し得る。癌関連配列が変化しているが、同じ発現プロファイルまたは変化した発現プロファイルを示す場合、タンパク質は以下で概説するように検出される。

#### 【0324】

もう1つの実施形態では、癌関連タンパク質をコードする核酸を検出する。癌関連タン

パク質をコードするDNAまたはRNAを検出し得るが、特に興味深いのは、癌関連タンパク質をコードするmRNAを検出する方法である。試料中のmRNAの存在は、tm-PTP遺伝子が転写されてmRNAを形成したことの指標であり、タンパク質が発現されることを示唆する。mRNAを検出するためのプローブは、mRNAに相補的であり、mRNAと塩基対合する何らかのヌクレオチド/デオキシヌクレオチドプローブであり得、オリゴヌクレオチド、cDNAまたはRNAを含むが、これらに限定されない。プローブはまた、ここで定義するような、検出可能標識を含むべきである。1つの方法では、検査する核酸をナイロン膜などの固体支持体に固定化し、プローブを試料とハイブリダイズした後、mRNAを検出する。非特異的結合したプローブを除去するための洗浄後、標識を検出する。もう1つの方法では、mRNAの検出をインサイチューで実施する。この方法では、透過性を上げた細胞または組織試料を、検出可能に標識した核酸プローブと、プローブが標的mRNAとハイブリダイズするのに十分な時間接触させる。非特異的結合プローブを除去するための洗浄後、標識を検出する。たとえば癌関連タンパク質をコードするmRNAに相補的なジゴキシゲニン標識リボプローブ(RNAプローブ)を、抗ジゴキシゲニン二次抗体とジゴキシゲニンの結合によって検出し、ニトロブルーテトラゾリウムおよび5-プロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェートで展開する。

10

20

30

40

50

#### 【0325】

ここで述べる3つのクラスのタンパク質(分泌、膜貫通または細胞内タンパク質)のいずれもが診断アッセイにおいて使用し得る。癌関連配列を含む癌関連タンパク質、抗体、核酸、修飾タンパク質および細胞が診断アッセイにおいて使用される。これは、個々の遺伝子または対応するポリペプチドレベルで、またはアッセイのセットとして実施できる。

#### 【0326】

ここで説明し、定義するように、癌関連タンパク質は、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫などの、しかしこれらに限定されないリンパ腫を含む、癌のマーカーとして利用できる。推定上の癌組織または患者におけるこれらのタンパク質の検出は、癌の種類の判定または診断を可能にする。当業者に公知の数多くの方法が癌を検出する上で有用である。

#### 【0327】

抗体は、癌関連タンパク質を検出するために使用し得る。好ましい方法は、ゲル(典型的には変性・還元タンパク質ゲルであるが、等電点焦点化ゲル等を含む他のいかなる種類のゲルでもよい)での電気泳動によって試料または患者からタンパク質を分離する。タンパク質の分離後、癌関連タンパク質に対して惹起した抗体での免疫プロット法によって癌関連タンパク質を検出する。免疫プロットの方法は当業者に周知である。そのような方法において使用する抗体は上述したように標識し得る。

#### 【0328】

もう1つの方法では、癌関連タンパク質に対する抗体をインサイチュー画像化手法において使用できる。この方法では、細胞を、癌関連タンパク質に対する1個の抗体から多くの抗体までと接触させる。非特異的抗体結合を除去するための洗浄後、抗体(1個またはそれ以上)の存在を検出する。1つの実施形態では、検出可能標識を含む二次抗体と共にインキュベートすることによって抗体を検出する。もう1つの方法では、癌関連タンパク質に対する一次抗体が検出可能標識を含む。もう1つの方法では、多数の一次抗体の各々1個が異なる検出可能標識を含む。この方法は、複数の癌関連タンパク質の同時スクリーニングにおいて特に有用である。当業者に認識されるように、数多くの他の組織学的画像化手法が本発明において有用である。

#### 【0329】

標識は、異なる波長の放出を検出し、識別する能力を有する蛍光光度計で検出し得る。加えて、蛍光活性化セルソーター(FACS)が前記方法において使用できる。

#### 【0330】

抗体は、血液試料から癌を診断するときに使用し得る。先に述べたように、ある種の癌関連タンパク質は分泌/循環分子である。血液試料は、それゆえ、分泌癌関連タンパク質の存在に関してプローブするまたは試験するための試料として有用である。抗体は、当業

者に認識されるように、E L I S A、免疫ブロット法（ウエスタンブロット法）、免疫沈降法、B I A C O R Eテクノロジー等を含む先に述べた免疫測定手法のいずれかによって癌関連タンパク質を検出するために使用できる。

#### 【0331】

組織アレイへの標識癌関連核酸プローブのインサイチューハイブリダイゼーションを実施し得る。たとえば癌関連組織および/または正常組織を含む組織試料のアレイを作製する。その後、当技術分野において公知のようにインサイチューハイブリダイゼーションを実施することができる。

#### 【0332】

個体と標準品の間での発現フィンガープリントを比較するとき、当業者は診断ならびに予後判定を下すことができることは了解される。診断を指示する遺伝子が予後を指示する遺伝子とは異なり得ることがさらに了解される。

10

#### 【0333】

上述したように、癌関連配列を含む癌関連タンパク質、抗体、核酸、修飾タンパク質および細胞は、予後判定アッセイにおいて使用できる。上記のように、長期的予後の見地から癌、特にリンパ腫の重症度に相関する遺伝子発現プロファイルを作成することができる。やはりこれは、タンパク質または遺伝子レベルで実施でき、遺伝子の使用が好ましい。上記のように、癌関連プローブを組織または患者における癌関連配列の検出および定量化のためにバイオチップに結合する。診断に関して概説したようにアッセイを進める。

#### 【0334】

20

（t m - P T P 遺伝子および発現産物を標的する薬剤のスクリーニング）

ここで述べる t m - P T P 遺伝子配列のいずれもが薬剤スクリーニングアッセイにおいて使用し得る。t m - P T P 遺伝子配列を含む癌関連タンパク質、抗体、核酸、修飾タンパク質および細胞は、薬剤スクリーニングアッセイにおいてまたは「遺伝子発現プロファイル」またはポリペプチドの発現プロファイルへの薬剤候補因子の作用を評価することによって使用される。1つの方法では、好ましくは候補因子による処理後の遺伝子を発現プロファイルに関して観測できるハイスループットスクリーニング手法と組み合わせて、発現プロファイルを使用する、Z l o k a r n i k , e t a l . , S c i e n c e 279, 84-8 (1998), H e i d , e t a l . , G e n o m e R e s . , 6: 986-994 (1996)。

30

#### 【0335】

もう1つの方法では、天然または修飾癌関連タンパク質を含む癌関連タンパク質、抗体、核酸、修飾タンパク質および細胞をスクリーニングアッセイにおいて使用する。すなわち、本発明は、癌表現型を調節する組成物をスクリーニングするための新規方法を提供する。上記のように、これは、遺伝子発現の調節剤またはタンパク質活性の調節剤をスクリーニングすることによって実施できる。同様に、これは、個々の遺伝子またはタンパク質レベルでまたは「遺伝子発現プロファイル」への薬剤候補因子の作用を評価することによって実施し得る。もう1つの実施形態では、好ましくは候補因子による処理後の遺伝子を発現プロファイルに関して観測できるハイスループットスクリーニング手法と組み合わせて、発現プロファイルを使用する、Z l o k a r n i k、前出参照。

40

#### 【0336】

t m - P T P 遺伝子が特定されれば、遺伝子発現への物質の作用を評価するための様々なアッセイを実施し得る。もう1つの実施形態では、個々の遺伝子またはタンパク質レベルでアッセイを実施し得る。すなわち、特定遺伝子が癌において異常調節されると特定されれば、候補生物活性物質を、遺伝子の調節を変化させるようにスクリーニングし得る。「調節」は、それゆえ、遺伝子の発現または活性の上昇および低下の両方を含む。調節の好ましい量は、正常対腫瘍組織における遺伝子発現の最初の変化に依存し、変化は少なくとも10%、好ましくは50%、より好ましくは100~300%、一部の実施形態では300~1000%またはそれ以上である。そこで、遺伝子が正常組織と比較して腫瘍組織において4倍の上昇を示す場合、約4倍の低下が望ましい；正常組織に比べて腫瘍に

50

おける10倍の低下は、候補因子に対して10倍の発現上昇が望ましいことを示す、等々。あるいは、癌関連配列が変化しているが、同じ発現プロファイルまたは変化した発現プロファイルを示す場合、タンパク質は以下で概説するように検出される。

#### 【0337】

当業者に認識されるように、これは、遺伝子またはタンパク質レベルのいずれかでの評価によって実施し得る；すなわち、核酸プローブを用いて遺伝子発現の量を観測することができ、遺伝子発現レベル、あるいは遺伝子産物自体のレベルの定量化を、たとえば癌関連タンパク質に対する抗体と標準免疫測定法の使用を通して、観測することができる。あるいは、タンパク質に関する結合および生物活性アッセイを以下で概説するように実施し得る。

10

#### 【0338】

もう1つの実施形態では、多くの遺伝子を同時に観測する、すなわち発現プロファイルを作成するが、多数のタンパク質発現の観測も実施できる。

#### 【0339】

この実施形態では、癌関連核酸プローブを、特定細胞における癌関連配列の検出および定量化のためにここで概説するようにバイオチップに結合する。アッセイを以下でさらに説明する。

#### 【0340】

一般に、好ましい方法では、分析の前に候補生物活性物質を細胞に添加する。さらに、特定の型の癌を調節する、癌関連タンパク質を調節する、癌関連タンパク質に結合する、または癌関連タンパク質と抗体の結合に干渉する候補生物活性物質を特定するためのスクリーニングが提供される。

20

#### 【0341】

ここで使用する「候補生物活性物質」または「薬剤候補因子」という用語または文法的等価物は、癌表現型、癌関連タンパク質への結合および/または癌関連タンパク質の生物活性の調節、または核酸配列およびタンパク質配列の両方を含む癌関連配列の発現のいずれかを直接または間接的に変化させることができる生物活性物質に関して試験される、何らかの分子、たとえばタンパク質、オリゴペプチド、有機または無機低分子、多糖、ポリヌクレオチド等を表わす。もう1つの実施形態では、候補因子は、癌関連表現型を、たとえば正常組織フィンガープリントに、抑制する。同様に、候補因子は、好ましくは重症癌関連表現型を抑制する。一般に、様々な濃度に対する差次的応答を得るために複数のアッセイ混合物を種々の物質濃度で平行して試験する。典型的には、これらの濃度の1つを陰性対照として、すなわちゼロ濃度でまたは検出レベル以下で使用する。

30

#### 【0342】

好ましくは、候補因子は癌関連タンパク質の作用を中和する。「中和する」とは、タンパク質の活性が、細胞に対して実質的に作用を及ぼさず、それゆえ癌の重症度を低下させるまたは癌の発生を予防するように、阻害されるまたは反対の作用を受けることを意味する。

#### 【0343】

候補因子は数多くの化学物質クラスを含むが、典型的には有機または無機分子、好ましくは100以上約2,500ダルトン未満の分子量を有する低分子有機化合物である。好ましい低分子は、2000未満、または1500未満または1000未満または500Da未満である。候補因子は、タンパク質との構造的相互作用、特に水素結合のために必要官能基を含み、典型的には少なくとも1個のアミン、カルボニル、ヒドロキシルまたはカルボキシル基、好ましくは前記官能性化学基の少なくとも2個を含む。候補因子はしばしば、上記官能基の1またはそれ以上で置換された、環状炭素または複素環式構造および/または芳香族または多環芳香族構造を含む。候補因子はまた、ペプチド、サッカリド、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造的類似体またはそれらの組合せを含む生体分子の中に認められる。ペプチドが特に好ましい。

40

#### 【0344】

50

候補因子は、合成または天然化合物のライブラリーを含む多種多様なソースから得られる。たとえば、ランダム化オリゴヌクレオチドの発現を含む数多くの手段が、多種多様な有機化合物および生体分子のランダムな合成および指定合成のために利用できる。あるいは、細菌、真菌、植物および動物抽出物の形態の天然化合物のライブラリーが利用できるかまたは容易に作製される。加えて、天然のまたは合成によって作製されたライブラリーおよび化合物は、従来の化学的、物理的および生化学的手段を通して容易に修飾される。既知の薬理的物質は、構造的類似体を生成するためにアシル化、アルキル化、エステル化またはアミド化などの指定またはランダム化学修飾に供し得る。

#### 【0345】

本発明の方法における使用に適する、低分子を含む他の t m - P T P アンタゴニストは当業者に明らかである。しかし、本発明の方法における抗体の使用は、単一ファミリー成員に対する抗体の高い特異性のゆえに低分子の使用よりも好ましいと考えられる。このタンパク質が主として細胞表面発現されると予測されるという事実が、考慮に入れるべきもう1つの因子である。

#### 【0346】

1つの実施形態では、候補生物活性物質はタンパク質である。ここでは「タンパク質」とは、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチドおよびペプチドを含む、少なくとも2個の共有結合したアミノ酸を意味する。タンパク質は、天然に生じるアミノ酸およびペプチド結合から、または合成ペプチドミメティック構造から作られ得る。それゆえ「アミノ酸」または「ペプチド残基」は、ここで使用するとき、天然に生じるアミノ酸と合成アミノ酸の両方を意味する。たとえばホモフェニルアラニン、シトルリンおよびノルロイシンは本発明のためのアミノ酸とみなされる。「アミノ酸」はまた、プロリンおよびヒドロキシプロリンなどのイミノ酸残基を含む。側鎖は、(R)または(S)立体配置のいずれかであり得る。もう1つの実施形態では、アミノ酸は、(S)またはL-立体配置である。非天然に生じる側鎖を使用する場合は、たとえばインビボでの分解を防ぐまたは遅延させるために、非アミノ酸置換を使用し得る。

#### 【0347】

もう1つの実施形態では、候補生物活性物質は、天然に生じるタンパク質または天然に生じるタンパク質のフラグメントである。それゆえ、たとえばタンパク質を含む細胞抽出物、またはタンパク質性細胞抽出物のランダムまたは指定消化物を使用し得る。このようにして原核生物および真核生物タンパク質のライブラリーを本発明の方法におけるスクリーニングのために作製し得る。この実施形態において特に好ましいのは細菌、真菌、ウイルス、および哺乳動物タンパク質のライブラリーであり、後者が好ましく、ヒトタンパク質が特に好ましい。

#### 【0348】

もう1つの実施形態では、候補生物活性物質は約5～約30アミノ酸のペプチドであり、約5～約20アミノ酸が好ましく、約7～約15アミノ酸が特に好ましい。ペプチドは、上記で概説した天然に生じるタンパク質の消化物、ランダムペプチド、または「バイアスをかけた」ランダムペプチドであり得る。「無作為化」または文法的等価物は、ここでは、各々の核酸およびペプチドがそれぞれ基本的にランダムなヌクレオチドおよびアミノ酸からなることを意味する。一般にこれらのランダムなペプチド(または以下で論じる核酸)は化学合成されるため、それらは、いかなる位置にいかなるヌクレオチドまたはアミノ酸も組み込み得る。合成工程は、配列の長さ全体にわたって可能な組合せのすべてまたは大部分の形成を可能にするために、ランダム化タンパク質または核酸を生成するように設計でき、それゆえ無作為化候補生物活性タンパク質性物質のライブラリーを形成する。

#### 【0349】

1つの実施形態では、ライブラリーは完全に無作為化されており、いかなる位置でも配列の選択性または不変性は存在しない。もう1つの実施形態では、ライブラリーにバイアスをかける。すなわち、配列内の一部の位置を一定に保持するか、または限られた数の可能性から選択する。たとえばもう1つの実施形態では、ヌクレオチドまたはアミノ酸残基

を、たとえば疎水性アミノ酸、親水性残基、核酸結合ドメインの創製、架橋のためのシステム、SH-3ドメインのためのプロリン、リン酸化部位のためのセリン、トレオニン、チロシンまたはヒスチジン等の創製、またはプリン等の方へ、立体的にバイアスをかけた（小さいまたは大きい）残基の規定クラス内で無作為化される。

#### 【0350】

1つの実施形態では、候補生物活性物質は核酸である。タンパク質に関して一般的に述べたように、核酸候補生物活性物質は、天然に生じる核酸、ランダムな核酸、または「バイアスをかけた」ランダム核酸であり得る。もう1つの実施形態では、候補生物活性物質は有機化学成分であり、多種多様な有機化学成分が文献において入手可能である。

#### 【0351】

t m - P T P 遺伝子の発現プロファイルの変化を試験するためのアッセイにおいて、候補因子を添加し、細胞を一定期間インキュベートした後、分析する標的配列を含む核酸試料を調製する。標的配列を、公知の手法を用いて（たとえば上述したように、RNAから標識cDNAに変換する）作製し、適切なマイクロアレイに添加する。たとえばヌクレオシドに共有結合した標識でインビトロ逆転写を実施する。一般に、核酸はここで定義する標識で、特にビオチン-FITCまたはPE、Cy3およびCy5で標識される。

#### 【0352】

当業者に認識されるように、これらのアッセイは、直接ハイブリダイゼーションアッセイであり得るか、または、すべてが参照によりここに組み込まれる、米国特許第5,681,702号、同第5,597,909号、同第5,545,730号、同第5,594,117号、同第5,591,584号、同第5,571,670号、同第5,580,731号、同第5,571,670号、同第5,591,584号、同第5,624,802号、同第5,635,352号、同第5,594,118号、同第5,359,100号、同第5,124,246号および同第5,681,697号において一般的に概説されているように、多数のプロブの使用を含む「サンドイッチアッセイ」を含み得る。この実施形態では、一般に、標的核酸を上記で概説したように作製し、次に、ハイブリダイゼーション複合体の形成を許容する条件下で、複数の核酸プロブを含むバイオチップに添加する。

#### 【0353】

以下で概説するような高、中および低ストリンジェンシー条件を含む、様々なハイブリダイゼーション条件が本発明において使用し得る。アッセイは一般に、標的の存在下でのみ標識プロブハイブリダイゼーション複合体の形成を許容するストリンジェンシー条件下で実施される。ストリンジェンシーは、温度、ホルムアミド濃度、塩濃度、カオトロピック塩濃度、pH、有機溶媒濃度等を含むがこれらに限定されない、熱力学変数である工程パラメータを変化させることによって制御できる。これらのパラメータはまた、米国特許第5,681,697号において一般的に概説されているように、非特異的結合を制御するためにも使用し得る。それゆえ、非特異的結合を低下させるために一部の工程をより高いストリンジェンシー条件で実施することが望ましいと考えられる。

#### 【0354】

ここで概説する反応は、当業者に認識されるように、様々な方法で実施し得る。以下で概説する実施形態に関して、反応の成分は、同時にまたはいかなる順序でも連続的に添加し得る。加えて、反応はアッセイにおける様々な他の試薬を含み得る。これらは、最適ハイブリダイゼーションおよび検出を促進するため、および/または非特異的またはバックグラウンド相互作用を低減するために使用し得る塩、緩衝剤、中性タンパク質、たとえばアルブミン、界面活性剤等のような試薬を含む。また、プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗菌剤等のようなアッセイの効率を改善する試薬も、試料の調製方法および標的の純度に依存して使用し得る。加えて、固相または溶液に基づく（すなわち動的PCR）アッセイのいずれかを使用し得る。

#### 【0355】

ひとたびアッセイが実施されれば、個々の遺伝子の発現レベルおよび個々の遺伝子の状

10

20

30

40

50

態間の発現レベルの変化を判定するためにデータを分析し、遺伝子発現プロファイルを形成する。

【0356】

もう1つの実施形態では、診断および予後判定適用に関して、差次的に発言される遺伝子または突然変異遺伝子がある1つの状態において重要と特定されれば、癌関連遺伝子の発現の変化を個別に調べるためにスクリーニングを実施することができる。すなわち、単一遺伝子の発現の調節の変化に関するスクリーニングを実施できる。それゆえ、たとえばその存在または不在が2つの状態の間でユニークである標的遺伝子の場合、標的遺伝子発現の調節剤に関してスクリーニングを実施する。

【0357】

加えて、候補因子に応答して誘導される新規遺伝子に関してスクリーニングを実施することができる。癌関連発現パターンを抑制し、正常発現パターンを導くその能力、または正常組織からの遺伝子の発現を模倣するように1個のtm-PTP 遺伝子の発現プロファイルを調節するその能力に基づいて候補因子を特定した後、その物質に応答して特異的に調節される遺伝子を特定するために上述したようなスクリーニングを実施することができる。正常組織と前記物質で処置された癌関連組織の間での発現プロファイルを比較して、正常組織または癌関連組織では発現されないが、前記物質で処置した組織では発現される遺伝子を明らかにする。tm-PTP 遺伝子またはタンパク質に関してここで述べた方法のいずれかによってこれらの物質の特異的配列を特定し、使用することができる。特にこれらの配列およびそれらがコードするタンパク質は、物質処置細胞を印付けるまたは

10

20

【0358】

そこで、1つの実施形態では、候補因子を、関係する癌関連発現プロファイルを有する癌関連細胞の集団に投与する。ここでは「投与する」または「接触させる」とは、候補因子を、その物質が取込みと細胞内作用によってまたは細胞表面での作用によって細胞に作用することを可能にするように、細胞に添加することを意味する。一部の実施形態では、タンパク質性候補因子(すなわちペプチド)をコードする核酸を、ペプチド物質の発現が実現されるように、レトロウイルス構築物などのウイルス構築物に組み込み、細胞に添加し得る；参照により明白にここに組み込まれる、国際公開番号第PCT US 97/01019号参照。

30

【0359】

ひとたび候補因子が細胞に投与されれば、所望に応じて細胞を洗浄し、好ましくは生理的条件下で一定期間インキュベートする。その後細胞を採集し、ここで概説するように新しい遺伝子発現プロファイルを作成する。

【0360】

そこで、たとえば癌関連組織を、癌関連表現型を低減するまたは抑制する物質に関してスクリーニングし得る。少なくとも1個の遺伝子における発現プロファイルの変化は、その物質が癌関連活性に作用を及ぼすことを指示する。癌関連表現型についてのそのようなサインを定義することにより、表現型を変化させる新しい薬剤に関するスクリーニングを

40

【0361】

もう1つの実施形態では、上記で概説したように、個々の遺伝子および遺伝子産物(タンパク質)に関してスクリーニングを実施し得る。すなわち、特定の差次的に発現される遺伝子が特定状態において重要と特定されれば、遺伝子の発現または遺伝子産物自体の調節剤のスクリーニングを実施できる。癌関連タンパク質は、上記で列挙したtm-PTP 遺伝子によってコードされるフラグメントであり得るか、あるいはフラグメントに対する完全長タンパク質であり得る。

50

## 【0362】

好ましくは、癌関連タンパク質は約14 - 24アミノ酸の長さのフラグメントである。より好ましくは、フラグメントは可溶性フラグメントである。好ましくは、フラグメントは非膜貫通領域を含む。もう1つの実施形態では、フラグメントは、溶解を助けるためにN末端Cysを有する。1つの実施形態では、フラグメントのC末端は遊離酸として保持され、N末端は、たとえばシステインへの結合を助けるために遊離アミンである。

## 【0363】

1つの実施形態では、癌関連タンパク質は、ここで論じるような免疫原性物質に複合される。1つの実施形態では、癌関連タンパク質はBSAに複合される。

## 【0364】

もう1つの実施形態では、tm-PTP 遺伝子の発現産物の生物学的機能を変化させるためにスクリーニングを実施する。やはり、特定状態における遺伝子の重要性が特定されれば、遺伝子産物に結合するおよび/または遺伝子産物の生物学的活性を調節する物質に関するスクリーニングを、以下でより詳細に述べるように実施することができる。

## 【0365】

もう1つの実施形態では、最初に、癌関連タンパク質に結合できる候補因子を見出すためにスクリーニングを設計し、次にこれらの物質を、癌関連タンパク質活性および癌表現型を調節する候補因子の能力を評価するアッセイにおいて使用し得る。それゆえ、当業者に認識されるように、結合アッセイおよび活性アッセイなどの、実施し得る数多くの異なるアッセイがある。

## 【0366】

もう1つの実施形態では、結合アッセイを実施する。一般に、精製または単離遺伝子産物を使用する；すなわち、1またはそれ以上の癌関連核酸の遺伝子産物を作製する。一般に、これは当技術分野において公知のように行われる。たとえばタンパク質遺伝子産物に対する抗体を作製し、存在するタンパク質の量を測定するために標準免疫測定法を実施する。あるいは、癌関連タンパク質を含む細胞をアッセイにおいて使用することができる。

## 【0367】

そこで、もう1つの実施形態では、本発明の方法は、癌関連タンパク質と候補生物活性物質を組み合わせ、癌関連タンパク質への候補因子の結合を測定することを含む。他の実施形態は、ヒトまたはマウス癌関連タンパク質を使用するが、たとえばヒト疾患の動物モデルの開発のために、他の哺乳動物タンパク質も使用し得る。一部の実施形態では、ここで概説するように、変異型または誘導体癌関連タンパク質を使用し得る。

## 【0368】

一般に、ここでの方法の他の実施形態では、癌関連タンパク質または候補因子は、単離試料を受け取る領域（たとえばマイクロタイタープレート、アレイ等）を有する不溶性支持体に拡散不能に結合される。不溶性支持体は、組成物が結合できるいかなる組成物で作られてもよく、可溶性物質から容易に分離され、スクリーニングの方法全体と適合性である。そのような支持体の表面は固形または多孔性であり得、いかなる好都合な形状でもよい。適切な不溶性支持体の例は、マイクロタイタープレート、アレイ、膜およびビーズを含む。これらは、典型的にはガラス、プラスチック（たとえばポリスチレン）多糖類、ナイロンまたはニトロセルロース、Teflon（登録商標）等で作られる。マイクロタイタープレートおよびアレイは、少量の試薬と試料を使用して、多数のアッセイを同時に実施することができるため、特に好都合である。

## 【0369】

その結合の特定様式は、本発明の試薬および方法全体と適合性であり、組成物の活性を保持し、非拡散性である限り、決定的に重要ではない。結合の好ましい方法は、抗体（タンパク質が支持体に結合するとき、リガンド結合部位または活性化配列を立体的にブロックしない）の使用、「粘着性」またはイオン性支持体への直接結合、化学的架橋、表面上でのタンパク質または物質の合成等を含む。タンパク質または物質の結合後、過剰の非結合物質を洗浄によって除去する。試料受け取り領域を、次に、ウシ血清アルブミン（BS

10

20

30

40

50



A)、カゼインまたは他の無害なタンパク質または他の成分とのインキュベーションを通してブロックし得る。

【0370】

もう1つの実施形態では、癌関連タンパク質を支持体に結合し、候補生物活性物質をアッセイに添加する。あるいは、候補因子を支持体に結合し、癌関連タンパク質を添加する。新規結合物質は、特異的抗体、化学物質ライブラリーのスクリーニングにおいて特定される非天然結合物質またはペプチド類似体を含む。特に興味深いのは、ヒト細胞に対して低い毒性を有する物質のスクリーニングアッセイである。標識インビトロタンパク質-タンパク質結合アッセイ、電気泳動移動度シフトアッセイ、タンパク質結合についての免疫測定法、機能的アッセイ（リン酸化アッセイ等）等を含む、多種多様なアッセイをこの目的のために使用し得る。

10

【0371】

癌関連タンパク質への候補生物活性物質の結合の測定は多くの方法で実施し得る。もう1つの実施形態では、候補生物活性物質を標識し、結合を直接測定する。たとえばこれは、癌関連タンパク質の全部または一部を固体支持体に付着させ、標識候補因子（たとえば蛍光標識）を添加して、過剰の試薬を洗い流し、固体支持体上に標識が存在するかどうかを判定することによって実施し得る。様々なブロッキングおよび洗浄工程が、当技術分野において公知のように利用し得る。

【0372】

一部の実施形態では、成分の1つだけを標識する。たとえばタンパク質（またはタンパク質性候補因子）を、<sup>125</sup>Iを用いてまたは発蛍光団によってチロシン位置で標識し得る。あるいは、2つ以上の成分を異なる標識で標識し得る；たとえばタンパク質には<sup>125</sup>Iを使用し、候補因子には発蛍光団を用いる。

20

【0373】

もう1つの実施形態では、候補生物活性物質の結合を、競合結合アッセイの使用を通して測定する。この実施形態では、競合物質は、抗体、ペプチド、結合パートナー、リガンド等のような、標的分子（すなわち癌関連タンパク質）に結合することが知られる結合成分である。ある種の状況下では、生物活性物質と結合成分の間に競合的結合が存在し、結合成分が生物活性物質を置換し得る。

【0374】

1つの実施形態では、候補生物活性物質を標識する。候補生物活性物質または競合物質またはその両方を、最初に、タンパク質が存在する場合にはそれに結合するのに十分な期間、タンパク質に添加する。最適の活性を促進する何らかの温度、典型的には4～40でインキュベーションを実施し得る。インキュベーション期間是最適の活性に合わせて選択されるが、高速ハイスループットスクリーニングを促進するように最適化し得る。典型的には0.1～1時間で十分である。過剰の試薬は、一般に除去するかまたは洗い流す。次に2番目の成分を添加し、結合を指示する、標識成分の存在または不在を追跡する。

30

【0375】

もう1つの実施形態では、競合物質を最初に添加し、次に候補生物活性物質を添加する。競合物質の置換は、候補生物活性物質が癌関連タンパク質に結合しており、それゆえ癌関連タンパク質に結合して、癌関連タンパク質の活性を潜在的に調節できることの指標である。この実施形態では、いずれの成分も標識できる。それゆえ、たとえば競合物質を標識する場合は、洗浄液中の標識の存在が物質による置換を指示する。あるいは、候補生物活性物質を標識する場合は、支持体上の標識の存在が置換を指示する。

40

【0376】

選択的实施形態では、候補生物活性物質を最初に添加し、インキュベーションと洗浄を実施して、次に競合物質を添加する。競合物質による結合の不在は、生物活性物質がより高い親和性で癌関連タンパク質に結合することを指示し得る。それゆえ、候補生物活性物質を標識する場合は、支持体上の標識の存在が、競合物質結合の不在と共に、候補因子が癌関連タンパク質に結合できることを指示し得る。

50

## 【0377】

もう1つの実施形態では、本発明の方法は、癌関連タンパク質の活性を調節することができる生物活性物質を特定するための差次的スクリーニングを含む。この実施形態では、前記方法は、第一試料中で癌関連タンパク質と競合物質を組み合わせることを含む。第二試料は、候補生物活性物質、癌関連タンパク質および競合物質を含む。競合物質の結合を両方の試料に関して測定し、2つの試料の間での結合の変化または相違が、癌関連タンパク質に結合して、その活性を潜在的に調節することができる物質の存在を指示する。すなわち、競合物質の結合が第一試料と比較して第二試料で異なる場合、候補因子は癌関連タンパク質に結合することができる。

## 【0378】

あるいは、もう1つの実施形態は、天然癌関連タンパク質に結合するが、修飾癌関連タンパク質には結合できない薬剤候補物を特定するために差次的スクリーニングを利用する。癌関連タンパク質の構造をモデル化し、その部位と相互作用する物質を合成するための合理的薬剤設計において使用し得る。癌関連生物活性に影響を及ぼす薬剤候補物はまた、タンパク質の活性を高めるまたは低下させる能力に関して薬剤をスクリーニングすることによっても特定される。

## 【0379】

陽性対照および陰性対照をアッセイにおいて使用し得る。好ましくは、統計的に有意の結果を得るためにすべての対照および試験試料を少なくとも3回試験する。すべての試料のインキュベーションは、物質のタンパク質への結合のために十分な時間である。インキュベーション後、すべての試料を洗浄して非特異的結合物質を除去し、一般に標識した、結合物質の量を測定する。たとえば放射性標識を使用する場合は、結合化合物の量を測定するために試料をシンチレーションカウンターで計数し得る。

## 【0380】

様々な他の試薬がスクリーニングアッセイに含まれ得る。これらは、最適タンパク質 - タンパク質結合を促進するためおよび/または非特異的またはバックグラウンド相互作用を低減するために使用し得る塩、中性タンパク質、たとえばアルブミン、界面活性剤等のような試薬を含む。また、プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗菌剤等のようなアッセイの効率を改善する試薬も使用し得る。成分の混合物は、必要な結合を与えるいかなる順序で添加してもよい。

## 【0381】

癌関連タンパク質の活性を調節する物質のスクリーニングも実施し得る。もう1つの実施形態では、癌関連タンパク質の活性を調節することができる生物活性物質のスクリーニングのための方法は、上記のように、候補生物活性物質を癌関連タンパク質の試料に添加し、癌関連タンパク質の生物学的活性の変化を測定する工程を含む。「癌関連タンパク質の活性を調節すること」は、活性の上昇、活性の低下、または存在する活性のタイプまたは種類の変化を含む。それゆえこの実施形態では、候補因子は、癌関連タンパク質に結合し（これは必ずしも必要ではないが）、且つここで定義するその生物学的または生化学的活性を変化させるべきである。前記方法は、上記で一般的に概説したような、インビトロスクリーニング方法、および癌関連タンパク質の存在、分布、活性または量の変化に関する細胞のインビボスクリーニングの両方を含む。

## 【0382】

そこで、この実施形態では、本発明の方法は、癌関連試料を候補生物活性物質と組み合わせることおよび癌関連活性への作用を評価することを含む。ここでは「癌関連活性」または文法的等価物は、好ましくはリンパ組織における、細胞分裂、細胞増殖、腫瘍増殖および細胞の形質転換を含む、腫瘍形成における癌関連タンパク質の役割を含むがこれに限定されない、癌関連タンパク質の生物学的活性の1つを意味する。1つの実施形態では、癌関連活性は、上記で特定する *t m* - *P T P* 遺伝子に由来する核酸によってコードされるタンパク質の活性化または前記タンパク質による活性化を含む。癌関連活性の阻害剤は、癌関連活性のいずれか1つまたはそれ以上の阻害剤である。

10

20

30

40

50

## 【0383】

もう1つの実施形態では、癌関連タンパク質の活性が上昇する；もう1つの実施形態では、癌関連タンパク質の活性が低下する。それゆえ、一部の実施形態ではアンタゴニストである生物活性物質が好ましく、また別の実施形態ではアゴニストである生物活性物質が好ましいと考えられる。

## 【0384】

もう1つの実施形態では、本発明は、癌関連タンパク質の活性を調節することができる生物活性物質についてのスクリーニングのための方法を提供する。前記方法は、上記で定義する候補生物活性物質を、癌関連タンパク質を含む細胞に添加することを含む。好ましい細胞型はほとんどすべての細胞を含む。細胞は、癌関連タンパク質をコードする組換え核酸を含む。もう1つの実施形態では、候補因子のライブラリーを複数の細胞に関して試験する。

10

## 【0385】

1つの態様では、アッセイは、生理的シグナル、たとえばホルモン、抗体、ペプチド、抗原、サイトカイン、増殖因子、活動電位、化学療法剤を含む薬理学的物質、放射線、発癌性物質、または他の細胞（すなわち細胞-細胞接触）の存在下または不在下または事前のまたはその後の暴露下で評価する。もう1つの例では、判定は細胞周期過程の種々の段階で行われる。

## 【0386】

このようにして、生物活性物質が特定される。薬理学的活性を有する化合物は、癌関連タンパク質の活性を増強するまたは活性を妨げることができる。

20

## 【0387】

（癌の診断と治療）

癌細胞分裂を抑制する方法が本発明によって提供される。もう1つの実施形態では、腫瘍増殖を抑制する方法が提供される。さらなる実施形態では、癌を有する細胞または個体を治療する方法が提供される。

## 【0388】

本発明の方法は、癌抑制剤の投与を含み得る。特定実施形態では、癌抑制剤は、アンチセンス分子、医薬組成物、治療薬または低分子、あるいはモノクローナル、ポリクローナル、キメラまたはヒト化抗体である。特定実施形態では、治療薬を抗体と、好ましくはモノクローナル抗体と組み合わせる。

30

## 【0389】

個体における癌細胞の検出または診断のための方法も提供される。特定実施形態では、診断/検出薬は、本発明に従って癌関連タンパク質に選択的に結合する低分子である。1つの実施形態では、診断/検出薬は、抗体、好ましくはモノクローナル抗体であり、好ましくは検出可能物質の連結されている。

## 【0390】

本発明の他の実施形態では、癌、特にリンパ腫および癌腫の動物モデルを作製する上で有用である、動物モデルおよびトランスジェニック動物が提供される。

## 【0391】

40

（a）アンチセンス分子

使用される癌抑制剤はアンチセンス分子であり得る。ここで使用するアンチセンス分子は、癌分子についての標的mRNA（センス）またはDNA（アンチセンス）配列に結合することができる一本鎖核酸配列（RNAまたはDNAのいずれか）を含むアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを含む。アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドは、本発明によれば、一般に少なくとも約14ヌクレオチド、好ましくは約14-30ヌクレオチドのフラグメントを含む。所与のタンパク質をコードするcDNA配列に基づき、アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを導く能力は、たとえばStein and Cohen, Cancer Res. 48:2659, (1988)およびvan der Kroel et al., BioTechniques 6:958, (19

50

88) に述べられている。

#### 【0392】

アンチセンス分子は、修飾または非修飾RNA、DNAまたは混合ポリマーオリゴヌクレオチドであり得る。これらの分子は、マッチする配列に特異的に結合することによって機能し、立体的ブロックングによるまたはRNAアーゼH酵素を活性化することによるペプチド合成の障害を生じさせる(Wu - Pong, Nov 1994, BioPharm, 20-33)。アンチセンス分子はまた、RNAプロセッシングまたは核から細胞質への輸送に干渉することによってタンパク質合成を変化させ得る(Mukhopadhyay & Roth, 1996, Crit. Rev. in Oncogenesis 7, 151-190)。加えて、一本鎖DNAのRNAへの結合は、ヌクレアーゼを介したヘテロ二本鎖の分解を生じさせ得る(Wu - Pong、前出)。これまでのところ、RNAアーゼHについての基質として働くことが示されている骨格修飾DNA化学は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボロントリフルオリデート、および2'-アラビノおよび2'-フルオロアラビノ含有オリゴヌクレオチドである。

10

#### 【0393】

アンチセンス分子は、国際公開番号第WO91/04753号に述べられているように、リガンド結合分子との複合体の形成によって標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入し得る。適切なリガンド結合分子は、細胞表面受容体、増殖因子、他のサイトカイン、または細胞表面受容体に結合する他のリガンドを含むが、これらに限定されない。好ましくは、リガンド結合分子の複合は、リガンド結合分子がその対応する分子または受容体に結合する能力に実質的に干渉しない、またはセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその複合体型の細胞への進入をブロックしない。あるいは、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開番号第WO90/10448号に述べられているように、オリゴヌクレオチド-脂質複合体の形成によって標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入し得る。アンチセンス分子またはノックアウトおよびノックインモデルの使用はまた、治療の方法に加えて、上記で論じたスクリーニングアッセイにおいても使用し得ることは了解される。

20

#### 【0394】

##### (b) RNA干渉

RNA干渉は、短い干渉RNA(sRNA)によって媒介される、動物における配列特異的な転写後遺伝子サイレンシングの過程を指す(Fire et al., Nature, 391, 806(1998))。植物における対応過程は、転写後遺伝子サイレンシングまたはRNAサイレンシングと称され、真菌ではquelling(鎮圧現象)とも称される。細胞におけるdsRNAの存在は、まだ十分には特性決定されていない気候を通してRNAi応答の引き金を引く。この機構は、リボヌクレアーゼLによるmRNAの非特異的切断を生じさせるプロテインキナーゼPKRおよび2', 5'-オリゴアデニレートシンターゼのdsRNAを介した活性化から生じるインターフェロン応答とは異なるとされる(Sharp, P. A., RNA interference - 2001, Genes & Development 15: 485-490(2001)において総説されている)。

30

40

#### 【0395】

低分子干渉RNA(sRNA)は、RNA干渉(RNAi)として知られる工程を通して培養哺乳動物細胞における遺伝子の発現を抑制するために設計された強力な配列特異的試薬である。Elbashir, S. M. et al. Nature 411: 494-498(2001); Caplen, N. J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 9742-9747(2001); Harborth, J. et al. J. Cell Sci. 114: 4557-4565(2001)。「短い干渉RNA」または「sRNA」という用語は、RNA干渉「RNAi」を行うことができる二本鎖核酸分子を指す(Kreutzer et al., 国際公開番号第WO00/44895号; Zernicka-Goetz et al., 国際公開番号第WO

50

01/36646号; Fire, 国際公開番号第WO99/32619号; Mellor and Fire, 国際公開番号第WO01/29058号参照)。ここで使用するとき、siRNA分子はRNA分子に限定されず、化学修飾ヌクレオチドおよび非ヌクレオチドをさらに包含する。siRNA遺伝子ターゲティング実験は、細胞への一過性siRNA導入によって実施された(リボソームを介したトランスフェクション、電気穿孔法または微量注入法などの古典的方法によって達成された)。

【0396】

siRNAの分子は、通常RNAiを開始させる長い二本鎖RNA(dsRNA)のRNアーゼIIIプロセシング産物に類似した特徴的な2-3ヌクレオチドの3'突出末端を有する、21-23ヌクレオチドのRNAである。細胞に導入したとき、それらはエンドヌクレアーゼ複合体(RNA誘導サイレンシング複合体)のまだ特定されていないタンパク質と会合し、その後標的mRNAの切断を導く。標的mRNAの分解の結果として、対応するタンパク質産物の抑制の特徴である特定表現型を有する細胞が得られる。siRNAの小さなサイズは、伝統的なアンチセンス分子と比較して、哺乳動物細胞に存在するdsRNA誘導のインターフェロン系の活性化を妨げる。これは、体細胞において30塩基対以上のdsRNAによって通常生成される非特異的表現型を回避する。

10

【0397】

小さなRNA分子の細胞内転写は、通常核内低分子RNA(snRNA)U6またはヒトRNアーゼP RNA H1をコードする、RNAポリメラーゼIII(Pol III)転写単位にsiRNA鋳型をクローニングすることによって達成される。siRNAを発現するために2つのアプローチが開発された: 最初のアプローチでは、siRNA二本鎖を構成するセンスおよびアンチセンス鎖を個々のプロモーターによって転写する(Lee, N. S. et al. Nat. Biotechnol. 20, 500-505 (2002); Miyagishi, M. & Taira, K. Nat. Biotechnol. 20, 497-500 (2002)); 2番目のアプローチでは、siRNAを、細胞内プロセシング後にsiRNAを生じる折り返しステム-ループ構造として発現させる(Paul, C. P. et al. Nat. Biotechnol. 20: 505-508 (2002))。導入したDNA鋳型からのsiRNAの内因性発現は、外来性siRNA送達のいくつかの制限、特に表現型の一過性の喪失を克服すると思われる。U6およびH1 RNAプロモーターは、Pol IIIプロモーターのIII型クラスの成員である(Paule, M. R. & White, R. J. Nucleic Acids Res. 28, 1283-1298 (2000))。

20

30

【0398】

センスおよびアンチセンスsiRNAの共発現は標的遺伝子の沈黙化を媒介するが、センスまたはアンチセンスsiRNA単独での発現は標的遺伝子発現に大きく影響しない。合成siRNAではなく、プラスミドDNAのトランスフェクションは、RNアーゼ汚染の危険性および化学合成siRNAまたはsiRNA転写キットの費用を考慮すると、好都合であると思われる。siRNAの安定発現は、持続性ウイルス感染の治療などの新しい遺伝子治療適用を可能にする。siRNAの高い特異性を考慮すると、このアプローチはまた、残りの野生型対立遺伝子の変化を伴わずに、RASまたはTP53癌遺伝子転写産物などの、点突然変異を有する疾患由来の転写産物のターゲティングを可能にする。最後に、様々なゲノムのハイスループット配列分析により、DNAに基づく方法も、特に小型化アレイに基づく表現型スクリーニングと組み合わせるとき、自動化ゲノム全域機能喪失表現型分析のための費用効果の高い選択であり得る。(Ziauddin, J. & Sabatini, D. M. Nature 411: 107-110 (2001))。

40

【0399】

細胞における長いdsRNAの存在は、ダイサーと称されるリボヌクレアーゼIII酵素の活性を刺激する。ダイサーは、dsRNAを、低分子干渉RNA(siRNA)として知られるdsRNAの短い断片に処理することに関与する(Berstein et al., 2001, Nature, 409: 363 (2001))。ダイサー活性に由来す

50

る低分子干渉RNAは、典型的には約21 - 23ヌクレオチド長であり、約19塩基対の二本鎖を含む。ダイサーはまた、転写制御に関わる保存された構造の前駆体RNAからの21および22ヌクレオチドの一過性低分子RNA ( siRNA ) の切り出しに関係づけられてきた ( Hutvagner et al. , Science , 293 , 834 ( 2001 ) ) 。 RNAi 応答はまた、 siRNA に相同な配列を有する一本鎖RNAの切断を媒介する、一般にRNA誘導サイレンシング複合体 ( RISC ) と称される、 siRNA を含むエンドヌクレアーゼ複合体を特徴とする。標的RNAの切断は、 siRNA 二本鎖のガイド配列に相補的な領域の中央で起こる ( Elbashir et al. , Genes Dev. , 15 , 188 ( 2001 ) ) 。

#### 【0400】

本発明は、癌関連配列に特異的にハイブリダイズすることができる配列を含む単離核酸分子を含む発現系を提供する。1つの実施形態では、核酸分子は癌関連タンパク質の発現を阻害することができる。tm-PTP 遺伝子の発現を阻害する方法は、低分子RNAがそれ自体でフォールディングすることができ、癌関連mRNA配列同一性を有する二本鎖RNAを創製して、細胞の内部でtm-PTP 遺伝子の転写後遺伝子サイレンシングまたはRNA干渉 ( RNAi ) の引き金を引くことができる、低分子RNAのベクター指定発現 ( vector-directed expression ) による細胞内での発現である。もう1つの方法では、癌関連mRNA配列同一性を有する低分子二本鎖RNAを、tm-PTP 遺伝子の転写後遺伝子サイレンシングまたはRNAiの引き金を引くために細胞内に送達する。様々な実施形態において、核酸分子は少なくとも7量体、少なくとも10量体、または少なくとも20量体である。さらなる実施形態では、配列はユニークである。

#### 【0401】

ここで図10および11に示す結果において、tm-PTP に対する機能性 siRNA がヒト腫瘍細胞系における増殖および細胞移動をブロックすることが示された。これは上述した本発明の態様を支持する。 siRNA のブロック作用はErk1/2リン酸化状態の喪失に相関し、それゆえRasシグナル伝達経路の調節におけるtm-PTP の潜在的役割を指し示し、この遺伝子の作用機構への洞察を提供する。

#### 【0402】

##### (c) 医薬組成物

本発明に包含される医薬組成物は、活性物質として、治療有効量のここで開示する本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは抗体を含む。「有効量」は、臨床成績を含む、有益なまたは望ましい結果を生じさせるのに十分な量である。有効量は、1回またはそれ以上の投与で投与することができる。本発明のために、アデノウイルスベクターの有効量は、疾患状態を緩和する、改善する、安定化する、逆転させる、進行を緩慢化または遅延させるのに十分な量である。

#### 【0403】

本発明の組成物は、癌ならびに原発癌の転移を治療するために使用できる。加えて、医薬組成物は、たとえば腫瘍を放射線または従来の化学療法に対して感作するために、癌治療の従来の方法と共に使用することができる。「治療」、「治療すること」、「治療する」等の用語は、ここでは一般に所望薬理学的および/または生理的作用を得ることを指すために使用される。作用は、疾患またはその症状を完全にまたは部分的に予防するという見地から予防的であり得、および/または疾患および/または疾患に起因する有害作用についての部分的または完全な安定化または治癒という見地から治療的であり得る。ここで使用する「治療」は、哺乳動物、特にヒトにおける疾患のいかなる治療もカバーし、および ( a ) 疾患または症状に対する素因があると考えられるが、まだそれを有していると診断されていない被験者において疾患または症状が起こるのを予防すること； ( b ) 疾患症状を阻害する、すなわちその発現を停止させること；または ( c ) 疾患症状を軽減する、すなわち疾患または症状の後退を生じさせること、を含む。

#### 【0404】

医薬組成物が、差次的に発現されるポリヌクレオチドによってコードされる遺伝子産物に特異的に結合する抗体を含む場合、抗体は、治療部位への送達のために薬剤に結合するかまたは前立腺癌細胞などの癌細胞を含む部位の画像化を容易にするために検出可能標識に結合することができる。抗体を薬剤および検出可能標識に結合するための方法は、検出可能標識を用いた画像化のための方法と同様に、当技術分野において周知である。

#### 【0405】

本発明のための「患者」は、ヒトおよび他の動物、特に哺乳動物、および生物を含む。それゆえ本発明の方法はヒト治療および動物適用の両方に適用し得る。1つの実施形態では、患者は哺乳動物であり、好ましくは患者はヒトである。1つの標的患者集団は、現在、癌、特にここで言及する特定型の癌のための治療を受けているすべての患者を含む。これらの患者集団のサブセットは、過去6ヶ月以内に以前に治療されたこの型の癌の再発を経験した患者および過去6ヶ月間に疾患の進行があった患者を含む。

10

#### 【0406】

ここで使用する「治療有効量」という用語は、所望疾患または状態を治療する、改善するまたは予防するため、または検出可能な治療または予防効果を示すための治療薬の量を指す。効果は、たとえば化学的マーカーまたは抗原レベルによって検出することができる。治療効果はまた、体温の低下などの身体症状の軽減を含む。被験者についての正確な有効量は、被験者の大きさおよび健康状態、状態の性質および程度、および投与のために選択される治療薬または治療薬の組合せに依存する。所与の状況のための有効量は常套の実験によって決定され、臨床医の判断の範囲内である。本発明のために、有効量は一般に、投与する個体において本発明の組成物約0.01mg/kg～約5mg/kg、または約0.01mg/kg～約50mg/kgまたは約0.05mg/kg～約10mg/kgである。

20

#### 【0407】

医薬組成物はまた、医薬的に許容される担体を含み得る。「医薬的に許容される担体」という用語は、抗体またはポリペプチド、遺伝子および他の治療薬などの、治療薬の投与のための担体を指す。この用語は、それ自体が、組成物を受容する個体に対して有害な抗体の産生を誘導せず、および過度の毒性を伴わずに投与することができる医薬担体を指す。適切な担体は、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、高分子アミノ酸、アミノ酸コポリマーおよび不活性ウイルス粒子などの大きな、緩やかに代謝される高分子であり得る。そのような担体は当業者に周知である。治療組成物中の医薬的に許容される担体は、水、生理食塩水、グリセロールおよびエタノールなどの液体を含み得る。湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質等のような補助物質もそのような賦形剤中に存在し得る。典型的には、治療組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかで、注射用製剤として製造される；注射の前に液体賦形剤に溶解または懸濁するのに適した固体形態も製造できる。リポソームは、医薬的に許容される担体の定義に包含される。医薬的に許容される塩、たとえば塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩等のような鉱酸塩；および酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩等のような有機酸の塩も、医薬組成物中に存在し得る。医薬的に許容される賦形剤についての詳細な検討は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (1995) Alfonso Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkinsにおいて入手可能である。

30

40

#### 【0408】

医薬組成物は、顆粒、錠剤、丸剤、坐薬、カプセル、懸濁液、軟膏、ローション剤等のような様々な形態で製造することができる。経口および局所使用に適する医薬品グレードの有機または無機担体および/または希釈剤は、治療的に活性な化合物を含有する組成物を作製するために使用できる。当技術分野で公知の希釈剤は、水性媒質、植物および動物油および脂肪を含む。安定剤、湿潤剤および乳化剤、浸透圧を変化させるための塩または適切なpH値を確保するための緩衝剤、および皮膚浸透促進剤が助剤として使用できる。

50

#### 【0409】

本発明の医薬組成物は、患者への投与に適する形態の癌関連タンパク質を含有する。1つの実施形態では、医薬組成物は、酸および塩基付加塩の両方を含むことが意図される、医薬的に許容される塩として存在するような、水溶性形態である。「医薬的に許容される酸付加塩」は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等のような無機酸、および酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸等のような有機酸で形成される、遊離塩基の生物学的有効性を保持し、生物学的またはさもなければ有害でない、塩を指す。「医薬的に許容される塩基付加塩」は、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウム塩等のような無機塩から誘導されるものを含む。アンモニウム、カリウム、ナトリウム、カルシウムおよびマグネシウム塩が特に好ましい。医薬的に許容される有機非毒性塩基から誘導される塩は、第一級、第二級および第三級アミン、天然に生じる置換アミンを含む置換アミン、環状アミン、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミンおよびエタノールアミンなどの塩基性イオン交換樹脂の塩を含む。

10

#### 【0410】

医薬組成物はまた、以下の1またはそれ以上を含み得る：血清アルブミンなどの担体タンパク質；緩衝剤；微結晶セルロース、ラクトース、トウモロコシおよび他のデンプン；結合剤；甘味料および他の香味料；着色剤；およびポリエチレングリコール。添加物は当技術分野において周知であり、様々な製剤において使用される。

20

#### 【0411】

所望薬理活性を有する化合物は、先に述べたように、生理的に許容される担体中で宿主に投与し得る。医薬組成物は、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、脳室内、経皮(transdermal or transcutaneous)適用(たとえば国際公開番号第WO98/20734号参照)、皮下、腹腔内、鼻内、経腸的、局所的、舌下、腔内または経直腸手段を含むがこれらに限定されない、様々な経路で投与し得る。導入の方式に依存して、化合物は様々な方法で製剤され得る。製剤中の治療的に活性な化合物の濃度は、約0.1~100%重量/容積の範囲をとり得る。ひとたび製剤されれば、本発明によって考慮される組成物は、(1)直接被験者に投与され得るか(たとえばポリヌクレオチド、ポリペプチド、低分子アゴニストまたはアンタゴニスト等として)；または(2)被験者に由来する細胞にエクスピボで送達され得る(たとえばエクスピボ遺伝子治療におけるように)。組成物の直接送達は、一般に非経口的注射、たとえば皮下、腹腔内、静脈内または筋肉内、腫瘍内または組織の間隙への注射によって達成される。他の投与方式は、経口および肺投与、坐薬、および経皮適用、針、および遺伝子銃(ワールドワイドウェブサイトのpowderject.com参照)またはハイボスプレーを含む。投薬治療は、単回投与スケジュールまたは反復投与スケジュールであり得る。

30

#### 【0412】

被験者への形質転換細胞のエクスピボ送達および再移植のための方法は当技術分野において公知であり、たとえば国際公開番号第WO93/14778号に述べられている。エクスピボ適用において有用な細胞の例は、たとえば幹細胞、特に造血幹細胞、リンパ細胞、マクロファージ、樹状細胞または腫瘍細胞を含む。一般に、エクスピボおよびインスピボ適用のための核酸の送達は、たとえば、すべて当技術分野において周知である、デキストランを介したトランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿法、ポリブレンを介したトランスフェクション、プロトプラスト融合、電気穿孔、リボソームへのポリヌクレオチドの封入、および核内へのDNAの直接微量注入によって達成できる。

40

#### 【0413】

ここで述べる癌関連ポリヌクレオチドに対応する遺伝子の差次的発現が、新生物、異形成および過形成などの増殖性疾患と相関することが認められれば、その疾患は、提供されたポリヌクレオチド、対応ポリペプチドまたは他の対応分子(たとえばアンチセンス、リ

50



ボザイム等)に基づく治療薬の投与に適し得る。他の実施形態では、前記疾患は、たとえば正常細胞に比べて癌細胞において高発現を有する遺伝子のコードされる遺伝子産物の機能の阻害剤(アンタゴニスト)として、または癌細胞において低発現である遺伝子産物についてのアゴニストとして(たとえば腫瘍抑制剤として働く遺伝子産物の活性を促進するため)機能を果たす低分子薬剤の投与による治療に適し得る。

#### 【0414】

本発明の組成物の用量および投与手段は、治療組成物の特定品質、患者の状態、年齢および体重、疾患の進行度および他の関連因子に基づいて決定される。たとえばポリヌクレオチド治療組成物の投与は、注射、経口投与、パーティクルガンまたはカテーテル投与を含む局所(local)または全身投与、および局所(topical)投与を含む。好ましくは、治療用ポリヌクレオチド組成物は、ここで開示するポリヌクレオチドの少なくとも12、22、25、30または35隣接ヌクレオチドのポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現構築物を含有する。治療組成物を体内の特定部位に直接投与するために様々な方法が使用できる。たとえば小さな転移病巣の位置を特定し、治療組成物を腫瘍の本体内のいくつかの異なる位置に数回注入する。あるいは、腫瘍に寄与する動脈を特定し、組成物を腫瘍に直接送達するためにそのような動脈に治療組成物を注入する。壊死中心を有する腫瘍を吸引し、今や空になった腫瘍の中心に組成物を直接注入する。アンチセンス組成物は、たとえば組成物の局所適用によって、腫瘍の表面に直接投与される。X線画像化が上記送達方法の一部を助けるために使用される。

#### 【0415】

アンチセンスポリヌクレオチド、サブゲノムポリヌクレオチドまたは特定組織に対する抗体を含有する治療組成物の標的送達も使用できる。受容体を介したDNA送達手法が、たとえばFindenis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11:202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J. A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 57:3655; Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338に述べられている。ポリヌクレオチドを含有する治療組成物は、遺伝子治療プロトコールにおける局所投与のためにはDNA約100ng~約200mgの範囲内で投与される。DNA約500ng~約50mg、約1μg~約2mg、約5μg~約500μg、および約20μg~約100μgの濃度範囲も遺伝子治療プロトコールにおいて使用できる。作用方法(たとえばコードされる遺伝子産物のレベルを上昇させるまたは阻害するための)および形質転換および発現の効果などの因子が、アンチセンスサブゲノムポリヌクレオチドの最終的な効果のために必要な用量に影響を及ぼす考慮事項である。組織のより大きな面積にわたってより高い発現を所望する場合は、明確な治療結果を生じさせるためにより多量のアンチセンスサブゲノムポリヌクレオチドまたは投与の連続プロトコールにおける同じ量の再投与、またはたとえば腫瘍部位の異なる隣接または近接組織部分への数回の投与を必要とし得る。すべての場合に、臨床試験における常套的実験が最適治療効果のための特定範囲を決定する。

#### 【0416】

本発明の治療用ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、遺伝子送達ビヒクルを使用して送達できる。遺伝子送達ビヒクルはウイルスまたは非ウイルス起源であり得る(一般に、Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185; およびKaplit, Nature Genetics (1994) 6:148参照)。そのようなコード配列の発現は、内在性哺乳動物プロモーターまたは異種プロモーターを用いて誘導す

ることができる。コード配列の発現は構成的であり得るかまたは調節され得る。

#### 【0417】

所望細胞における所望ポリヌクレオチドの送達および発現のためのウイルスベースのベクターは当技術分野において周知である。例示的なウイルスベースのビヒクルは、組換えレトロウイルス（たとえば国際公開番号第WO90/07936号；同第WO94/03622号；同第WO93/25698号；同第WO93/25234号；米国特許第5,219,740号；国際公開番号第WO93/11230号；同第WO93/10218号；米国特許第4,777,127号；イギリス特許第2,200,651号；欧州特許第0345242号；および国際公開番号第WO91/02805号参照）、アルファウイルスに基づくベクター（たとえばシンドビスウイルスベクター、セムリキ森林ウイルス（ATCC VR-67；ATCC VR-1247）、ロス川ウイルスR（ATCC VR-373；ATCC VR-1246）およびベネズエラウマ脳炎ウイルス（ATCC VR-923；ATCC VR-1250；ATCC VR-1249；ATCC VR-532））、およびアデノ関連ウイルス（AAV）ベクター（たとえば国際公開番号第WO94/12649号、同第WO93/03769号；同第WO93/19191号；同第WO94/28938号；同第WO95/11984号および同第WO95/00655号参照）を含むが、これらに限定されない。Curriel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147に述べられているような死滅アデノウイルスに連結されたDNAの投与も使用できる。

10

#### 【0418】

死滅アデノウイルスに連結されたまたは連結されていないポリカチオン縮合DNA単独（たとえばCurriel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147参照）；リガンド結合DNA（たとえばWu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985参照）；真核細胞送達ビヒクル細胞（たとえば米国特許第5,814,482号；国際公開番号第WO95/07994号；同第WO96/17072号；同第WO95/30763号；および同第WO97/42338号参照）および核電荷の中和または細胞膜との融合を含むがこれらに限定されない、非ウイルス送達ビヒクルおよび方法も使用できる。裸のDNAも使用できる。例示的な裸のDNA導入法は、国際公開番号第WO90/11092号および米国特許第5,580,859号に述べられている。遺伝子送達ビヒクルとして働き得るリポソームは、米国特許第5,422,120号；国際公開番号第WO95/13796号；同第WO94/23697号；同第WO91/14445号；および欧州特許第0524968号に述べられている。さらなるアプローチが、Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411、およびWoffendingin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581に述べられている。

20

30

#### 【0419】

使用に適するさらなる非ウイルス送達は、Woffendingin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91(24):11581に述べられているアプローチのような機械的送達系を含む。さらに、コード配列およびその発現産物は、光重合ヒドロゲル材料の沈着または電離放射線の使用を通して送達できる（たとえば米国特許第5,206,152号および国際公開番号第WO92/11033号参照）。コード配列の送達に使用できる遺伝子送達のための他の慣例的な方法は、たとえばハンドヘルド(hand-held)遺伝子導入パーティクルガンの使用（たとえば米国特許第5,149,655号参照）；導入遺伝子を活性化するための電離放射線の使用（たとえば米国特許第5,206,152号および国際公開番号第WO92/11033号参照）を含む。

40

#### 【0420】

もう1つの実施形態では、癌関連タンパク質および調節剤を治療薬として投与し、上記で概説したように製剤することができる。同様に、tm-PTP遺伝子（完全長配列、部分配列、または癌関連コード領域の調節配列を含む）を、当技術分野において公知のよ

50

うに、遺伝子治療適用において投与することができる。これらの t m - P T P 遺伝子は、当業者に認識されるように、遺伝子治療として（すなわちゲノムへの組み込みのため）またはアンチセンス組成物としての、アンチセンス適用を含み得る。

#### 【0421】

そこで、1つの実施形態では、細胞または生物において t m - P T P 遺伝子活性を調節する方法が提供される。1つの実施形態では、その方法は、内因性癌関連タンパク質の生物学的活性を低下させるまたは排除する抗癌関連抗体を細胞に投与することを含む。あるいは、前記方法は、癌関連タンパク質をコードする組換え核酸を細胞または生物に投与することを含む。当業者に認識されるように、これは多くの方法で達成し得る。もう1つの実施形態では、たとえば癌関連配列が癌において下方調節されるときは、公知の遺伝子治療手法を用いて、細胞における癌関連発現の量を上昇させることにより、たとえば内因性 t m - P T P を過剰発現させることによってまたは癌関連配列をコードする遺伝子を投与することによって、癌関連発現産物の活性を上昇させる。もう1つの実施形態では、遺伝子治療手法は、たとえばその全体が参照によりここに組み込まれる、国際公開番号第 P C T / U S 9 3 / 0 3 8 6 8 号に述べられているように、相同的組換え増強 ( e n h a n c e d h o m o l o g o u s r e c o m b i n a t i o n ) ( E H R ) を用いた外来性遺伝子の組み込みを含む。あるいは、たとえば癌関連配列が癌において上方調節されるときは、たとえば癌関連アンチセンス核酸の投与によって、内因性 t m - P T P 遺伝子の活性を低下させる。

10

#### 【0422】

20

##### (d) ワクチン

もう1つの実施形態では、t m - P T P 遺伝子を、単独でまたは他の癌関連遺伝子と組み合わせて、DNA ワクチンとして投与する。裸の DNA ワクチンは一般に当技術分野において公知である。B r o w e r , N a t u r e B i o t e c h n o l o g y , 1 6 : 1 3 0 4 - 1 3 0 5 ( 1 9 9 8 ) 。

#### 【0423】

1つの実施形態では、本発明の t m - P T P 遺伝子を DNA ワクチンとして使用する。DNA ワクチンとしての遺伝子の使用のための方法は当業者に周知であり、t m - P T P 遺伝子または t m - P T P 遺伝子の一部を、癌を有する患者における発現のためにプロモーターの制御下に置くことを含む。DNA ワクチンのために使用される t m - P T P 遺伝子は、完全長癌関連タンパク質をコードし得るが、より好ましくは、癌関連タンパク質に由来するペプチドを含む癌関連タンパク質の部分をコードする。もう1つの実施形態では、t m - P T P 遺伝子に由来する複数のヌクレオチド配列を含む DNA ワクチンで患者を免疫する。同様に、複数の t m - P T P 遺伝子またはその部分で患者を免疫することが可能である。理論に縛られることなく、癌関連タンパク質を発現する細胞を認識し、破壊するまたは排除する、DNA ワクチンによってコードされるポリペプチド、細胞傷害性 T 細胞、ヘルパー T 細胞および抗体の発現が誘導される。

30

#### 【0424】

もう1つの実施形態では、DNA ワクチンは、アジュバント分子をコードする遺伝子を DNA ワクチンと共に含む。そのようなアジュバント分子は、DNA ワクチンによってコードされる癌関連ポリペプチドに対する免疫原性応答を上昇させるサイトカインを含む。付加的または選択的なアジュバントは当業者に公知であり、本発明において有用である。

40

#### 【0425】

##### (e) 抗体

上述した癌関連抗体は多くの適用において有用である。たとえば癌関連抗体は、標準アフィニティークロマトグラフィーカラムに結合して、癌関連タンパク質を精製するために使用し得る。抗体はまた、癌関連タンパク質に特異的に結合するため、上記で概説したように、ブロックポリペプチドとして治療的に使用し得る。

#### 【0426】

本発明はさらに、癌関連ポリペプチドが癌細胞において差次的に発現される癌関連ポリ

50

ヌクレオチドによってコードされる、生物学的試料中のポリペプチドの存在またはレベルを、コードされるポリペプチドに特異的な抗体を使用して検出するための方法を提供する。前記方法は一般に、a) 試料を、前立腺癌細胞において差次的に発現される癌関連ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに特異的な抗体と接触させること；およびb) 抗体と試料の分子の間の結合を検出すること、を含む。

#### 【0427】

コードされる癌関連ポリペプチドに特異的な抗体の特異的結合の検出は、適切な対照と比較するとき、コードされるポリペプチドが試料中に存在することの指標である。適切な対照は、正常組織などの、コードされる癌関連ポリペプチドを含有しないことが既知であるかまたは高レベルのポリペプチドを含有しないことが既知である試料、およびコードされるポリペプチドに特異的でない抗体、たとえば抗イディオタイプ抗体と接触させた試料を含む。標準免疫組織学的方法、免疫沈降法、酵素免疫測定法、および放射免疫測定法を含むが、これらに限定されない、特異的抗体-抗原相互作用を検出するための様々な方法が当技術分野で公知であり、前記方法において使用できる。一般に、特異的抗体は、直接または間接的に、検出可能に標識される。直接標識は、放射性同位体；その生成物が検出可能である酵素（たとえばルシフェラーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ等）；蛍光標識（たとえばフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン等）；EDTAなどの金属キレート化基を通して抗体に結合した、蛍光放出金属、たとえば $^{152}\text{Eu}$ またはランタニドシリーズの他の物質；化学発光化合物、たとえばルミノール、イソルミノール、アクリジニウム塩等；生物発光化合物、たとえばルシフェリン、エクオリン（グリーン蛍光タンパク質）等を含む。抗体は、ポリスチレンプレートまたはビーズなどの不溶性支持体に付着（結合）し得る。間接標識は、コードされるポリペプチドに特異的な抗体（「一次特異的抗体」）に特異的な、上述したように標識される二次抗体；および特異的結合対の成員、たとえばビオチン-アビジン等を含む。生物学的試料を、細胞、細胞粒子または可溶性タンパク質を固定化することができる、ニトロセルロースなどの固体支持体または担体と接触させ、その上に固定化し得る。次に支持体を適切な緩衝液で洗浄し、その後、検出可能に標識した一次特異的抗体と接触させ得る。検出方法は当技術分野において公知であり、検出可能標識によって放出されるシグナルに適切であるように選択される。検出は一般に、適切な対照および適切な標準と比較して実施される。

#### 【0428】

一部の実施形態では、前記方法は、たとえば癌細胞が存在する部位を位置決定するまたは特定するために、インビボでの使用に適合される。これらの実施形態では、検出可能標識部分、たとえば癌関連ポリペプチドに特異的な抗体を個体に投与し（たとえば注射によって）、磁気共鳴画像化法、コンピュータ断層撮影走査法等を含むがこれらに限定されない、標準画像化手法を用いて標識細胞を位置決定する。このようにして、癌細胞が差次的に標識される。

#### 【0429】

##### (f) 癌の検出および診断のための他の方法

理論に縛られることなく、 $t_m$ -PTP 遺伝子は癌において重要であると思われる。従って、突然変異型または変異型  $t_m$ -PTP 遺伝子に基づく疾患を判定し得る。1つの実施形態では、本発明は、細胞における少なくとも1個の内因性  $t_m$ -PTP 遺伝子の配列の全部または一部を決定することを含む、変異型  $t_m$ -PTP 遺伝子を含む細胞を特定するための方法を提供する。当業者に認識されるように、これは多くの配列決定手法を用いて実施し得る。もう1つの実施形態では、本発明は、個体の少なくとも1個の  $t_m$ -PTP 遺伝子の配列の全部または一部を決定することを含む、個体の癌関連遺伝子型を特定する方法を提供する。これは一般に、個体の少なくとも1つの組織において実施され、多くの組織の評価または同じ組織の異なる試料の評価を含み得る。前記方法は、配列決定した  $t_m$ -PTP 遺伝子の配列を公知の  $t_m$ -PTP 遺伝子、すなわち野生型遺伝子と比較することを含み得る。当業者に認識されるように、 $t_m$ -PTP 遺伝子の配列の変化は、疾患の存在または疾患を発症する傾向または予後評価の指標であり得る。

## 【0430】

t m - P T P 遺伝子の全部または一部の配列を、次に、何らかの相違が存在するかどうかを判定するために公知の t m - P T P 遺伝子の配列と比較することができる。これは、B e s t i f t 当技術分野のような数多くの公知のホモロジープログラムを用いて実施できる。もう1つの実施形態では、患者の t m - P T P 遺伝子と公知の t m - P T P 遺伝子の間での配列の相違の存在は、ここで概説するように、疾患状態または疾患状態への傾向を示唆する。

## 【0431】

もう1つの実施形態では、t m - P T P 遺伝子を、ゲノム内の t m - P T P 遺伝子のコピー数を測定するためのプローブとして使用する。たとえば一部の癌は染色体欠失または挿入を示し、遺伝子のコピー数の変化を生じさせる。

10

## 【0432】

本発明は、癌細胞を検出するためのここで述べるポリヌクレオチドを使用し、被験者における癌および癌の重症度（たとえば腫瘍分類、腫瘍量等）の診断を容易にし、被験者の予後の判定を容易にし、および治療に対する被験者の応答性を評価する（たとえば化学療法レジメンの間またはその後に腫瘍量を評価することを通して治療効果の測定を提供することによって）方法を提供する。検出は、癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドの検出、および/または癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの検出に基づき得る。本発明の検出方法は、単離細胞に関して、または全組織または体液（たとえば血液、血漿、血清、尿等）において、インビトロまたはインビボで実施できる。

20

## 【0433】

一部の実施形態では、癌細胞において差次的に発現される転写産物の当該細胞における発現を検出することによって癌細胞を検出するための方法が提供される。前立腺癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによる転写産物の検出；特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応による転写産物の検出；前立腺癌細胞において差次的に発現される遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドをプローブとして使用する、細胞のインサイチューハイブリダイゼーションを含むが、これらに限定されない、様々な公知の方法のいずれかが検出のために使用できる。前記方法は、癌細胞において差次的に発現される遺伝子を検出するおよび/または前記遺伝子のmRNAレベルを測定するために使用できる。一部の実施形態では、前記方法は、a) 試料を、ここで述べる差次的に発現される遺伝子に対応するポリヌクレオチドと、ハイブリダイゼーションを許容する条件下で接触させること；およびb) もし存在する場合は、ハイブリダイゼーションを検出することを含む。

30

## 【0434】

ディファレンシャルハイブリダイゼーションの検出は、適切な対照と比較するとき、癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドが試料中に存在することの指標である。適切な対照は、たとえば癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドを含有しないことが既知である試料、および癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドと同じ「センス」の標識ポリヌクレオチドの使用を含む。ハイブリダイゼーションを許容する条件は当技術分野において公知であり、上記で詳細に説明した。検出はまた、適切に標識されたポリヌクレオチドを使用して、インサイチューハイブリダイゼーション、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）、RT-PCR（逆転写PCR）、TMA、bDNA、およびNasbaおよび「ノーザン」またはRNAプロット法、またはそのような手法の組合せを含むが、これらに限定されない、何らかの公知の方法によって達成できる。ポリヌクレオチドのための様々な標識および標識化法が当技術分野で公知であり、本発明のアッセイ方法において使用できる。ハイブリダイゼーションの特異性は、適切な対照との比較によって測定できる。

40

## 【0435】

50

一般に、ここで提供するポリヌクレオチドの少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも12ヌクレオチドまたは少なくとも15隣接ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドは、前立腺癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドの検出および/または転写レベルの測定のためのプローブなどの、多様な目的のために使用される。当業者には容易に認識されるように、プローブを検出可能に標識し、たとえば被験試料(たとえばmRNA)から得られた固定化ポリヌクレオチドを含むアレイと接触させることができる。あるいは、プローブをアレイに固定化し、被験試料を検出可能に標識することができる。これらや本発明の方法の他の変法は、十分に当業者の技術範囲内であり、本発明の範囲内である。

#### 【0436】

ヌクレオチドプローブは、提供されるポリヌクレオチドに対応する遺伝子の発現を検出するために使用される。ノーザンブロット法では、mRNAを電気泳動によって分離し、プローブと接触させる。特定の大きさのmRNA種にハイブリダイズさせてプローブを検出する。たとえばある特定条件下で、発現の相対量を測定するためにハイブリダイゼーションの量を定量化することができる。プローブは、発現を検出するために細胞へのインサイチュハイブリダイゼーションに使用される。プローブはまた、ハイブリダイズする配列の診断検出のためにインビボで使用できる。プローブは、典型的には放射性同位体で標識される。発色団、発蛍光団および酵素などの他の種類の検出可能標識も使用できる。ヌクレオチドハイブリダイゼーションアッセイの他の例は、国際公開番号第WO92/02526号および米国特許第5,124,246号に述べられている。

#### 【0437】

PCRは、少量の標的核酸を検出するためのもう1つの手段である(たとえばMullis et al., Meth. Enzymol. (1987) 155:335; 米国特許第4,683,195号; および米国特許第4,683,202号参照)。反応を開始させるために、標的核酸とハイブリダイズする2個のプライマーオリゴヌクレオチドを使用する。プライマーは、ここで開示する癌関連ポリヌクレオチド内の配列または3'側と5'側の配列で構成され得る。あるいは、プライマーがこれらのポリヌクレオチドの3'側と5'側である場合、プライマーは、それらまたはその相補物にハイブリダイズする必要はない。熱安定なポリメラーゼによる標識の増幅後、増幅された標的核酸は、当技術分野で公知の方法、たとえばサザンブロット法によって検出できる。mRNAまたはcDNAも、Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)に述べられている伝統的なブロッティング手法(たとえばサザンブロット法、ノーザンブロット法等)によって(たとえばPCR増幅を伴わずに)検出することができる。一般に、ポリメラーゼ酵素を使用してmRNAから作製されたmRNAまたはcDNAは、ゲル電気泳動を用いて精製し、分離して、ニトロセルロースなどの固体支持体に移すことができる。固体支持体を標識プローブに暴露し、ハイブリダイズしていないプローブを除去するために洗浄して、標識プローブを含む二本鎖を検出する。

#### 【0438】

PCR増幅を用いる方法は、1個の細胞からのDNAに関して実施できるが、少なくとも約 $10^5$ 細胞を使用することが好都合である。ポリメラーゼ連鎖反応の使用はSaiki et al. (1985) Science 239:487に述べられており、現在の手法の総説はSambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press 1989, pp. 14.2-14.33に認められる。検出可能標識を増幅反応に含めてもよい。適切な検出可能標識は、蛍光色素(たとえばフルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミン、テキサスレッド、フィコエリトリン、アロフィコシアニン、6-カルボキシフルオレセイン(6-FAM)、2',7'-ジメトキシ-4',5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、6-カルボキシ-2',4',7',4,7-ヘキサクロロフルオレセイン(HEX)、5-カルボキシフル

10

20

30

40

50

オレセイン ( 5 - F A M ) または N , N , N ' , N ' - テトラメチル - 6 - カルボキシローダミン ( T A M R A ) ) 、放射性標識 ( たとえば  $^{32}\text{P}$  、  $^{35}\text{S}$  、  $^3\text{H}$  等 ) 等を含む。標識は、ポリヌクレオチドが、高親和性結合パートナー、たとえばアビジン、特異的抗体等を有するビオチン、ハプテン等に複合し、結合パートナーが検出可能標識に複合する、2 段階システムであり得る。標識はプライマーの一方または両方に複合し得る。あるいは、増幅産物に標識を組み込むために、増幅に使用されるヌクレオチドのプールを標識する。

#### 【 0 4 3 9 】

検出方法において使用される試薬はキットの一部として提供され得る。そこで、本発明はさらに、生物学的試料中の、癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチド、および / またはそれによってコードされるポリペプチドの存在またはレベルを検出する ( たとえば対象とする差次的に発現される遺伝子によってコードされる mRNA の検出によって ) ためのキットを提供する。これらのキットを使用する手順は、臨床検査室、実験室、開業医または私的個人によって実施され得る。癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを検出するための本発明のキットは、ポリペプチドまたはそのフラグメントに結合する抗体であり得る、ポリペプチドに特異的に結合する成分を含み得る。前立腺癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドを検出するために使用される本発明のキットは、そのようなポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする成分を含み得る。キットは、場合により、緩衝液、展開試薬、標識、反応性表面、検出のための手段、対照試料、標準品、指示書、および解釈のための情報を含むが、これらに限定されない、手順において有用である付加的な成分を提供する。

#### 【 0 4 4 0 】

本発明はさらに、哺乳動物 ( たとえばヒト ) における新生物形成または前新生物形成状態を診断 / 検出する方法に関する。ここで使用する「診断」は、一般に、疾患または障害に対する被験者の罹病性の判定、被験者が現在疾患または障害に罹患しているかどうかの判定、疾患または障害に罹患している被験者の予後判定 ( たとえば前転移性または転移性癌状態、癌の病期または治療に対する癌の応答性の特定 ) 、および治療測定 ( t h e r a p e u t i c s ) ( たとえば治療の作用または効果に関する情報を提供するために被験者の状態を観測すること ) を含む。

#### 【 0 4 4 1 】

「有効量」は、臨床成績を含む、有益なまたは所望の結果を生じさせるのに十分な量である。有効量は、1 回またはそれ以上の投与で投与することができる。

#### 【 0 4 4 2 】

「細胞試料」は、個体から得られる様々な種類の試料を包含し、診断または観測アッセイにおいて使用できる。この定義は、血液および生物学的起源の他の液体試料、生検標本または組織培養物などの固体組織試料、またはそれらに由来する細胞およびその子孫を包含する。この定義はまた、入手後に、試薬による処理、可溶化、あるいはタンパク質またはポリヌクレオチドなどのある種の成分の富化などの何らかの方法で操作された試料を含む。「細胞試料」という用語は臨床試料を含み、また培養下の細胞、細胞上清、細胞溶解産物、血清、血漿、生物学的液体、および組織試料も包含する。

#### 【 0 4 4 3 】

ここで使用する、「新生物細胞」、「新生物」、「腫瘍」、「腫瘍細胞」、「癌」および「癌細胞」という用語 ( 交換可能に使用される ) は、細胞増殖の制御の重大な喪失 ( すなわち調節不能の細胞分裂 ) によって特徴づけられる異常増殖表現型を示すように、相対的に自律性の増殖を示す細胞を指す。新生物細胞は悪性または良性であり得る。

#### 【 0 4 4 4 】

「個体」、「被験者」、「宿主」および「患者」という用語は、ここでは交換可能に使用され、診断、処置または治療が所望される哺乳動物被験者、特にヒトを指す。他の被験者は、ウシ、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ等を含み得る。これらの方法に従って検出 / 診断できる状態の例は癌を含む。適切な発現パターンを示す遺

伝子に対応するポリヌクレオチドが、被験者において癌を検出するために使用できる。癌のマーカーの総説については、たとえば Hanahan et al. Cell 100: 57-70 (2000) 参照。

#### 【0445】

一部の検出/診断方法は、(a)哺乳動物(たとえばヒト)から生物学的試料を得ること、(b)試料中の癌関連タンパク質の存在を検出すること、および(c)存在する生成物の量を対照試料における量と比較することを含む。これらの方法によれば、試料中の高レベルの癌関連遺伝子産物の存在は、被験者が新生物形成または前新生物形成状態を有することを指示する。

#### 【0446】

この方法における使用に適する生物学的試料は、血清、血漿、胸水、尿などの生物学的液体を含み、また生検に由来する試料を含む、脳脊髄液、CSF、組織試料(たとえば乳癌または前立腺組織切片)も本発明の方法において使用できる。たとえば組織生検に由来する、細胞培養物または細胞抽出物も使用できる。

#### 【0447】

本発明の化合物は、好ましくは、検出可能マーカー(たとえば発蛍光団、発色団または同位体等)で標識することができる、結合タンパク質、たとえばポリクローナルまたはモノクローナル抗体、またはその抗原結合フラグメントである。適切な場合は、化合物をビーズ、プレート、フィルター、樹脂等のような固体支持体に結合することができる。複合体の形成の判定は、複合体を、最初の化合物(または複合体)に特異的に結合するさらなる化合物(たとえば抗体)と接触させることによって実施できる。最初の化合物と同様に、さらなる化合物も固体支持体に結合するおよび/または検出可能マーカーで標識することができる。

#### 【0448】

本発明に従った癌関連タンパク質のレベル上昇の特定は、アジュバント療法から恩恵を受ける可能性が高い被験者(患者)の特定を可能にする。たとえば一次療法後の被験者(たとえば手術を受けた被験者)からの生物学的試料を循環癌関連タンパク質の存在に関してスクリーニングすることができ、健常集団の試験によって決定される、前記タンパク質のレベル上昇の存在は、残存腫瘍組織を指示する。同様に、外科的に切除された腫瘍の切断日からの組織を検査することができ(たとえば免疫蛍光によって)、高レベルの(周囲の組織と比較して)生成物の存在は、腫瘍の不完全な切除の指標である。そのような被験者を特定できることは、治療を特定被験者の必要に適合させることを可能にする。非手術療法、たとえば化学療法または放射線療法を受けている患者も監視することができ、そのような被験者からの試料における高レベルの癌関連タンパク質の存在は、治療継続の必要性を指示する。疾患の病期判定(たとえば治療レジメンを最適化するため)も、たとえば生検によって、たとえば癌関連タンパク質に特異的な抗体で実施できる。

#### 【0449】

##### (g)動物モデルおよびトランスジェニック動物

癌関連タンパク質は癌において過剰発現されると予測される。それ自体、tm-PTPタンパク質を過剰発現するトランスジェニック動物が作製できる。所望発現レベルに依存して、様々な強さのプロモーターが導入遺伝子を発現するために使用できる。また、組み込む導入遺伝子のコピー数も決定することができ、導入遺伝子の発現レベルの測定のために比較できる。そのような方法によって作製された動物は、癌関連の動物モデルとして使用でき、付加的に、癌を治療するための生物活性分子に関するスクリーニングにおいて有用である。

#### 【0450】

特に、N末端HA標識tm-PTPタンパク質を発現するトランスジェニック動物は、腫瘍形成へのtm-PTP二量体化の影響を検討するために使用できる。

#### 【0451】

加えて、tm-PTPを過剰発現する膵、腎または膀胱癌細胞系(たとえばHs70

10

20

30

40

50



0 T、A 4 9 8 等) または D U 1 4 5 (前立腺) または N C I - H 5 0 (肺) などの t m - P T P を発現することが示されている他の組織からの細胞系を用いた異種移植モデルを使用し得る。あるいは、たとえばマウス脾臓、腎臓または膀胱組織にヒト癌細胞を移植し、腫瘍に成長させた、正所性ヒト腫瘍を用いた異種移植モデルを使用し得る。適切な膀胱正所性モデルの報告は、Chong et al. 2006. Cancer Biol Ther. ; 5 (4). In press ; Dinney et al. 2004. Cancer Cell ; 6 : 111 - 116 ; および Watanabe et al. 2000 Gen Cancer Therapy ; 7 : 1575 - 1580 を含むが、これらに限定されない。適切な脾臓ヒト細胞系正所性モデルの報告は、Katz et al. 2004. Clin Exp Metastasis. ; 21 (1) : 7 - 12 ; Fleming and Brekken 2003. J Cell Biochem. ; 90 (3) : 492 - 501 ; Grimm et al. 2003. Int J Cancer. 106 (5) : 806 - 11 ; および Bouvet et al. 2002. Cancer Research ; 62 , 1534 - 1540 を含むが、これらに限定されない。適切な脾細胞異種移植モデルの報告は、Blanquicett et al. 2005 Clin Cancer Res. ; 11 (24 Pt 1) : 8773 - 81 ; Jia et al. 2005 World J Gastroenterol. ; 11 (3) : 447 - 50 を含むが、これらに限定されない。

#### 【実施例】

#### 【0452】

以下の実施例は、本発明をどのようにして実施し、使用するかについての完全な開示と説明を当業者に提供するために述べるものであり、発明人が自らの発明とみなすものの範囲を限定することを意図せず、以下の実験が実施されるすべておよび唯一の実験であることを意図しない。使用する数(たとえば量、温度等)に関して正確さを保証するべく努力したが、ある程度の実験誤差および偏差が存在するはずである。異なる指示がない限り、割合は重量比であり、分子量は重量平均分子量であり、温度はセルシウス温度であり、圧は大気圧またはほぼ大気圧である。

#### 【0453】

##### (実施例1)

マウスにおける腫瘍誘発後の挿入部位分析

マウス乳腺癌ウイルス(MMTV)またはマウス白血病ウイルス(MLV)のいずれかを使用してマウスにおいて腫瘍を誘発した。MMTVは乳房腺癌を引き起こし、MLVは様々な異なる造血器悪性疾患(主としてTまたはB細胞リンパ腫)を生じさせる。

#### 【0454】

3つの感染経路を用いた:(1)精製ウイルス製剤による新生児の注射、(2)授乳期間中の乳汁媒介性ウイルスによる感染、および(3)生殖細胞系(Akvr1および/またはMtv2)による病原性プロウイルスの遺伝的伝播。各々の罹患マウスにおいて存在する悪性疾患の種類を、ホルマリン固定・パラフィン包埋生検試料のH&E染色薄切片の組織学的分析によって判定した。各々の腫瘍にクローニングによって組み込んだすべてのプロウイルスに隣接する宿主DNA配列を、2個のウイルス特異的プライマーおよび制限酵素消化した腫瘍DNAに連結した40bpの二本鎖DNAアンカーに特異的な2個のプライマーを使用して、入れ子型アンカーPCRによって回収した。宿主/ウイルス接合フラグメントを示す増幅バンドをクローニングし、配列決定した。その後、マウスゲノム配列をBLAST解析するために宿主配列(「タグ」と呼ばれる)を使用した。

#### 【0455】

抽出したマウスゲノムタグ配列を、次に、www.ensembl.orgからダウンロードしたドラフトマウスゲノムアセンブリ(NCBIリリースm33)にマッピングした。45bpまたはそれ以上のタグ配列を、TimeLogicの加速blastアルゴリズム、terablastを以下のパラメータ設定で使用してゲノムにマッピングした:  
- t = 10    - X = 1 e - 10    - v = 20    - b = 20    - R。短いタグ配列(< 4

5 b p ) を、以下のパラメータ設定で N C B I b l a s t a l l アルゴリズムによってゲノムにマッピングした： - e 1 0 0 0 - F F - W 9 - v 2 0 - b 2 0。次に結合 b l a s t 結果を、典型的にはタグ配列長の少なくとも 3 0 % にわたって最低限 9 5 % の同一性を必要とする、各々のタグ配列についてのベストマッチに関してフィルタリングした。ユニークな染色体位置を有するタグを遺伝子呼び出し ( g e n e c a l l ) 工程に進めた。

#### 【 0 4 5 6 】

各々の個別タグに関して、3つのパラメータを記録した：(1) マウス染色体配置、(2) 組込みが起こった塩基対座標、および(3) プロウイルスの方向。この情報を用いて、全分析腫瘍からすべての使用可能なタグをマウスゲノムにマッピングした。プロウイルス挿入突然変異の癌原遺伝子標的を特定するため、組込み体の各クラスターにおけるプロウイルス組込みパターンを、トランスクリプトーム内の全ての公知遺伝子の位置に対して解析した。2 またはそれ以上の無関係な腫瘍における同じ遺伝子座のプロウイルスの存在は、プロウイルス組込み部位またはそのすぐ近くに癌原遺伝子が存在することの一見証拠である。これは、ゲノムがランダムな組込みのためには大きすぎて観察可能なクラスター形成を生じないためである。検出されたいかなるクラスター形成も、腫瘍形成の間の生物学的選択についての明瞭な証拠を提供する。プロウイルス挿入突然変異の癌原遺伝子標的のヒトオーソログを特定するため、マウスとヒトゲノムの相同領域の比較分析を実施した。

10

#### 【 0 4 5 7 】

マウストランスクリプトームを示すために E n s e m b l マウス遺伝子モデルと U C S C r e f s e q および k n o w n g e n e セットを使用した。上記のように、タグ染色体位置および隣接遺伝子に対するプロウイルスの挿入方向に基づき、各々のタグをその最も近接する遺伝子に割り当てた。遺伝子に連結されたプロウイルス挿入を2つのカテゴリー：I 型挿入または I I 型挿入に分類した。挿入がイントロンまたはエクソンの遺伝子座内である場合、I I 型挿入と命名した。そうでない場合は、挿入が以下の3つの追加判定基準を満たすことを条件として、挿入を I 型挿入と称した：1) 遺伝子座の外側であるが、遺伝子の開始または終結位置から 1 0 0 キロ塩基内である、2) 上流挿入については、プロウイルス方向が遺伝子の方向と反対である、および 3) 下流挿入については、プロウイルス方向が遺伝子と同じである。この工程において発見された遺伝子または転写産物に N C B I L o c u s L i n k 注釈からの遺伝子座 I D を割り当てた。少なくとも2つのウイルス挿入物を有するユニークマウス遺伝子座 I D が現在の O n c o g e n o m e ( 商標 ) を構成する。

20

30

#### 【 0 4 5 8 】

O n c o g e n o m e ( 商標 ) におけるマウス遺伝子についてのヒトオーソログを割り当てるため、ヒトオーソログ注釈および N C B I の相同遺伝子注釈に対する M G I マウスを使用した。オーソログの注釈に不一致または欠落があるときは、U C S C または E n s e m b l ゲノムブラウザを使用して、マウスとヒトゲノムの相同領域の比較分析を実施した。オーソログヒト遺伝子に N C B I L o c u s L i n k からの遺伝子座 I D を割り当て、これらのヒト遺伝子を、ここで述べる癌治療薬のための潜在的標的としてさらに評価した。

40

#### 【 0 4 5 9 】

宿主/ウイルス接合フラグメントの P C R 増幅の一例を図 1 に示す。レーン 1 は正常対照 D N A からの増幅産物を含み、レーン 2 は腫瘍 D N A からの増幅産物を含む。バンドは、D N A 試料中に存在する 5 ' 宿主/ウイルス接合フラグメントから生じる。レーン 1 は、この特定マウス系統に存在するすべてのプロウイルスからの e n v / 3 ' L T R 接合部 ( 上部 ) および病原性内在性 M t v 2 プロウイルスからの宿主 / 5 ' L T R からのバンドを有する。この内在性プロウイルスは、その配列が新たにクローニングによって腫瘍に組み込まれたプロウイルスと同一であることから検出される。この腫瘍に存在することが既知なのである 4 個の新たにクローニングによって組み込まれたプロウイルス全部が容易に

50

検出される。

【0460】

(実施例2)

定量的RT-PCRの分析：比較C<sub>T</sub>法。

【0461】

RT-PCR分析を4つの主要工程に分けた：1)一次正常および腫瘍組織からのRNA精製；2)リアルタイム定量的PCRのための、精製組織RNAからの一本鎖cDNAの作製；3)384穴反応に適合させたABI PRISM 7900HT Sequence Detection Systemを使用して遺伝子発現のためのRT-PCRを開始する；4)癌において差次的に発現される(上方調節される)遺伝子を特定するために統計的方法によってRT-PCRデータを解析する。

10

【0462】

これらの工程を以下でより詳細に説明する。

【0463】

A)一次正常および腫瘍組織からのRNA精製

これは、Qiagen RNeasy mini Kit、カタログ番号74106を用いて実施した。組織チャック(tissue chunks)は、典型的にはRNA約30μgを生成し、溶出緩衝液150μLを使用した場合約200ng/μLの最終濃度を生じさせた。

【0464】

Qiagenのプロトコルを用いてRNAを抽出した後、RNAの収率と濃度を測定するためにMolecular ProbesからのRibogreen定量化試薬を製造者のプロトコルに従って使用した。

20

【0465】

28Sと18Sのバンドが等しい強度を有するかどうかを判定するために、抽出したRNAの完全性をEtBr染色アガロースゲルで評価した。加えて、試料のバンドは明瞭で可視であるべきである。バンドが可視でないかまたはゲルを通して汚れている場合は、試料を廃棄した。

【0466】

抽出RNAの完全性をまた、Agilent 2100を製造者のプロトコルに従って使用して評価した。Agilent Bioanalyzer/“Lab-On-A-Chip”は、RNA試料の電気泳動図を作成する微小流体制御システムである。18Sと28Sバンドの比率および基線の平坦さを観察することにより、RNA分解のレベルの測定を実施した。1より低い28S：18S比を有する試料を廃棄した。

30

【0467】

RNA試料をまた、抽出の間のゲノムDNA汚染のレベルを測定するためにRT-PCRによって検査した。一般に、RNA試料は、逆転写酵素の存在下と不在下で有効性確認したTaqmanプライマーおよび対象遺伝子のプローブを用いて直接検定した。各穴につき5μLの容量で(RNA2μL+RT+またはRT-マスターミックス3μL)384穴方式にて、4回の反応の各々につきRNA12.5ngを使用した。以下の熱サイクルパラメータを使用した(2段階PCR)：

40

熱サイクリングパラメータ

【0468】

## 【化 3】

| 工程 | 逆転写   | Amp. Gold<br>活性化 | PCR                          |      |
|----|-------|------------------|------------------------------|------|
|    | 保持    | 保持               | 40 サイクル<br>変性      アニーリング／伸長 |      |
| 温度 | 48 C  | 95 C             | 95 C                         | 60 C |
| 時間 | 30 分間 | 10 分間            | 15 秒間                        | 1 分間 |

RNA 試料は、QC に適格とみなすためには以下の判定基準を有するべきである。

10

## 【0469】

Ct 差は、適格のためには 7 Ct またはそれ以上でなければならない。それ未満は「不適格」であり、再精製すべきである。

## 【0470】

平均試料 Ct は、適格の平均（すべての試料）から 2 S T D E V（すべての試料）以内でなければならない。試料群の外れ値を見出すために条件付き様式設定を使用する。\* 外れ値を RNA パネルに含めてはならない。

## 【0471】

- RT 増幅または (Ct) は > 34 サイクルでなければならないかまたは「不適格」である。

20

## 【0472】

ヒトゲノム DNA は 23 ~ 27 . 6 Ct でなければならない。

## 【0473】

試料がすべての QC 工程（ゲル泳動、Agilent およびゲノム DNA についての RT - PCR）に適格であった場合のみ RNA をパネルに構築した。cDNA 合成のために RNA を整列した。一般に、各々の腫瘍型について最小限 10 の正常および 20 の腫瘍試料が必要であった（すなわち組織型が扁平上皮癌および腺癌を有し得る場合は、各々の腫瘍型の 20 試料を使用しなければならない（各腫瘍型について同じ 10 の正常試料を使用する）。一般に、パネルあたり RNA 11 μg が必要であった。少なくとも 2 μg のファジファクターが許容されるべきである：すなわちデータベース内の試料は 13 μg を有していなければならないか、またはそれらは cDNA アッセイの間に低下する。試料番号は、増加順序に配置し、ウエル A 1 から始まって 96 穴様式でカラムを下降させた。4 つの対照試料をパネルの最後に位置づける：hFB、hrRNA、hgDNA および水（この順序で）。付加的な NTC 対照（水）をウエル A 2 に位置づけた。対照のすべてのロット番号を記録した。RNA 試料を、ヌクレアーゼ不含水中 100 ng / μL に正規化した。RNA 11 μg を使用し、総容量は 110 μL であった。注意；必要な RNA 濃度は使用する特定 cDNA 合成キットに依存して異なり得る。100 ng / μL 以下であった RNA 試料を純粋として負荷した（loaded pure）。正規化が完了した後、容易にはがせるホイルと共にヒートシーラーを 2 秒間に @ 175 で使用してブロックを密封した。ホイルが完全に密封されたことを確認するためにブロックを目視検査した。次に手動シーラーをホイル上で走行させた。cDNA 合成に使用できる状態で、ブロックを - 80 の冷凍庫で保存した。

30

40

## 【0474】

B) リアルタイム定量的 PCR のための、精製組織 RNA からの一本鎖 cDNA の作製：

以下の反応混合物をあらかじめ用意する：

## 【0475】

## 【化 4】

| 試薬                       | 1 RXN 容量 (ul) | RXN |
|--------------------------|---------------|-----|
| 10X Taqman RT 緩衝液        | 1             |     |
| 25mM 塩化マグネシウム            | 2.2           |     |
| 10mM デオキシNTPS混合物         | 2             |     |
| 50uM ランダム六量体             | 0.5           |     |
| Rnase阻害剤                 | 0.2           |     |
| 50u/ul MultiScribe 逆転写酵素 | 0.25          |     |
| 水                        | 0.85          |     |

96穴ブロック(11μg)中の整列RNAを、96穴プレートにつきcDNA合成1μgを創製するためにHydraを使用して娘プレートに分配した。これらの娘プレートの各々を、以下の熱サイクルパラメータを用いてRT反応を開始させるために使用した：

【0476】

## 【化 5】

| 工程 | インキュベーション | RT   | RT 不活性化 |
|----|-----------|------|---------|
|    | 保持        | 保持   | 保持      |
| 時間 | 10分間      | 30分間 | 5分間     |
| 温度 | 25 C      | 48 C | 95 C    |

熱サイクリングの完了時に、Hydraピペットを用いてプレートをサイクラーから取り出し、0.016M EDTA溶液60μLをcDNAプレートの各穴にピペットで分注した。各cDNAプレートを保存のために2mL-96穴ブロックにプールした。

【0477】

C) 384穴反応に適合させたABI PRISM 7900HT Sequence Detection Systemを使用して遺伝子発現のためのRT-PCRを開始する：

カクテルを創製する

1. このプロトコルは、96試料を含むパネルのためのカクテルを創製するために設計した：これは前パネルについて470rxnである。

【0478】

2. FRT(正および逆プライマーおよび標的プローブ)混合物を-20から取り出し、4の冷蔵庫での解凍に供した。

【0479】

3. 作製する最初の10FRTを取り出し、低温金属ラックまたは氷上のラックに置いた。

【0480】

4. 新しい1.5mLカクテルチューブのふたに、合成の日付(FRTチューブ上に認められる、合成の日付がない場合は当日の日付を表示する)のある面に、標的番号および実施科学者の署名を含むラベルを貼付し、各FRTにつき1つのチューブを作製した。

【0481】

5. FRTチューブとカクテルチューブを、順序正しく、覚えやすいようにラックに配置した。

【0482】

6. ピペット分注するときは、p200を6の速度で使用した。液体の表面で吸引を実施し、チューブの内側の上部付近に分注した。各々の吸引/分配工程後に先端を取り替えた。

【0483】

6. 1 すべてのカクテルチューブを開け、Ambion水94μL(毎日新鮮注入した)を添加して、その後チューブにふたをした。

【0484】

10

20

30

40

50

6.2 FRTを15回パルスボルテックスし、その後10秒間遠心分離した。FRT 141  $\mu$ Lを1つずつ対応するカクテルチューブに添加した。

【0485】

6.3 最初の10FRTを直ちに-20にもどした（容量が10  $\mu$ L未満である場合は廃棄した）。

【0486】

6.4 実施の準備が整うまでカクテルを4（1日以上置く場合は-20）で保存した。

【0487】

6.5 カクテルを使用する準備ができたときにマスターミックスをカクテルに添加した（工程2.7参照）。

【0488】

7. 次の10カクテルに関して工程1.3 - 1.6.5を反復し、すべてのカクテルが作製されるまでこれを反復した。

【0489】

【化6】

| TaqMan マスターミックス            | 1 rxn 容量    | 470 RXNS     |
|----------------------------|-------------|--------------|
| TaqMan ユニバーサルマスターミックスロット番号 | 2.5 ul      | 1175 ul      |
| 順プライマー作業用ストック              | 0.1 $\mu$ l | 47 $\mu$ l   |
| 逆プライマー作業用ストック              | 0.1 $\mu$ l | 47 $\mu$ l   |
| プローブ作業用ストック                | 0.1 $\mu$ l | 47 $\mu$ l   |
| 水                          | 0.2 $\mu$ l | 94 $\mu$ l   |
| 最終容量                       | 3.0 $\mu$ l | 1410 $\mu$ l |

20

整列した96穴プレートからのcDNA 2  $\mu$ LをTaqmanマスターミックス3  $\mu$ Lに添加して、QPCR反応物5  $\mu$ Lを作製した。

30

【0490】

t m - PTP 遺伝子に関するQPCRにおいて使用したプライマーおよびプローブを以下の表2に示す。

【0491】

【化7】

表2

| PTP $\epsilon$ 特異的プライマー/プローブセットの表 |                               |                                      |   |  |
|-----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|---|--|
| プライマー<br>プローブID                   | 特異性                           | 順プライマー                               | 逆プライマー                                      | プローブ配列                                   |
| 255                               | 膜+<br>サイトゾル<br>PTP $\epsilon$ | CATTGATAGCCCTCAGC<br>AACATT (配列番号 3) | CGTAAACTCTTCACAGC<br>TTGAAATACA<br>(配列番号 4) | AAGTCCCTCGGCTTTTACT<br>CGCTCCAA (配列番号 5) |
| 1158                              | 膜<br>PTP $\epsilon$           | CACTCCTGCTGGTGGGT<br>TTT (配列番号 6)    | TGAGGTCGTGGTTGTCT<br>CGTT (配列番号 7)          | CGCTCGCCAGGGCTCTCA<br>GG (配列番号 8)        |

40

D) 癌において差次的に発現される（上方調節される）遺伝子を特定するために統計的

50

方法によってRT-PCRデータを解析する：

正常と腫瘍の両方の試料における標的遺伝子の発現レベルを、ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, California) を用いた定量的RT-PCRによって測定した。この方法は、標準（正規化群）ハウスキーパー遺伝子（Pre-Developed TaqMan（登録商標） Assay Reagents Gene Expression Quantification Protocol, Applied Biosystems, 2001）のものと比較した標的鋳型の初期コピー数の定量に基づく。各PCRサイクルによるDNA産物の蓄積は、アンプリコン効率および初期鋳型濃度に関係する。それゆえ、標的と正規化群の両方の増幅効率は同様でなければならない。出 10  
発鋳型コピー数およびDNA増幅効率に依存する、閾値サイクル（ $C_T$ ）は、PCR産物増殖が対数期である間のPCRサイクルである。各々のアッセイを4回ずつ実施した；それゆえ、所与の試料中の標的遺伝子について4つの $C_T$ 値を得た。同時に、ハウスキーパー遺伝子の群の発現レベルも同じようにして測定した。4回のうちの外れ値を検出し、残りの3回の標準偏差がもとの4回の標準偏差と比較して30%またはそれ以下である場合は除去する。残りの $C_T$ 値の平均値（ $C_t$ または $C_n$ と称する）を算定し、以下の計算において使用した：

データの正規化。

【0492】

正規化のために、分析のために使用可能なハウスキーパー遺伝子のセット（5～8遺伝子）に基づく「万能正規化群（universal normalizer）」を開発した。簡単に述べると、ハウスキーパー遺伝子を、組織試料のパネル全体にわたる発現レベルの変動に従って加重した。同じ組織型のn個の試料について、kthハウスキーパー遺伝子に関する加重（w）を以下の式で算定した： 20

【0493】

【化8】

方程式 1

$$w_k = \frac{1/S_k^2}{\sum_{k=1}^n 1/S_k^2}$$

30

[式中、 $S_k$ は、パネル内の同じ組織型のすべての試料にわたるkthハウスキーパー遺伝子の標準偏差を表わす]。 $i$ th試料中のすべてのハウスキーパー遺伝子の平均発現（ $M_i$ ）を、加重最小二乗法を用いて評価し、その $M_i$ と全 $M_i$ の平均との差を、 $i$ th試料についての正規化係数 $N_i$ として計算する（方程式2）。次に、 $i$ th試料中の標的遺伝子の平均 $C_T$ 値を、正規化係数 $N_i$ を差し引くことによって正規化した。上記正規化法の性能を、同じ試料セットから生成したRT-PCRとマイクロアレイデータの間の相関を比較することによって確認した：上記正規化法を適用した後、RT-PCRデータとマイクロアレイデータの間の相関上昇が認められた。

【0494】

40

【化9】

方程式 2

$$N_i = M_i - \frac{\sum_{i=1}^n M_i}{n}$$

有意に調節不全である遺伝子の特定。遺伝子が正常試料に比べて腫瘍において有意に上方調節されるかどうかを測定するため、2つの統計値、t（方程式3）および受信者動作特性（Receiver Operating Characteristic）（ROC；方程式4）を算定した：

【0495】

50

【化 1 0】

方程式 3

$$t = \frac{\bar{C}_t - \bar{C}_n}{\sqrt{\frac{S_t^2}{n_t} + \frac{S_n^2}{n_n}}}$$

方程式 4

$$ROC(t_0) = P[C_t \leq C_n(t_0)]$$

[式中、 $\bar{C}_t$  は腫瘍試料群における  $C_t$  の平均値であり、 $\bar{C}_n$  は

正常試料群における  $C_n$  の平均値であり、 $S_t$ 、 $S_n$  は腫瘍および正常対照群の標準偏差であり、および  $n_t$ 、 $n_n$  は分析において使用した腫瘍および正常試料の数である]。  $t$  の自由度  $v'$  は以下のように算定する：

【0 4 9 6】

【化 1 1】

方程式 5

$$v' = \frac{\left(\frac{S_t^2}{n_t} + \frac{S_n^2}{n_n}\right)^2}{\frac{\left(\frac{S_t^2}{n_t}\right)^2}{n_t - 1} + \frac{\left(\frac{S_n^2}{n_n}\right)^2}{n_n - 1}}$$

R O C 方程式において、 $t_0$  は正常母集団において許容される偽陽性率であり、我々の試験では 0 . 1 に設定する。それゆえ、 $C_n(t_0)$  は正常試料における  $C_n$  の 1 0 パーセンタイルであり、 $R O C(0.1)$  は、正常試料の 1 0 パーセンタイルより低い  $C_t$  を有する腫瘍試料のパーセンテージである。 $t$  統計は、正常試料と比較して腫瘍試料においてより高い平均発現レベルを示す遺伝子を特定し、 $R O C$  統計は、腫瘍のサブセットにおいてのみ高い発現レベルを示す遺伝子を特定するのにより適する。 $R O C$  統計を使用することの理論的根拠は、P e p e , e t a l ( 2 0 0 3 ) B i o m e t r i c s 5 9 , 1 3 3 - 1 4 2 において詳細に論じられている。我々が正常または腫瘍ラベルを試料に無作為に割り当てる、正規分布仮説を回避するための並べ替えによって、帰無仮説下での  $t$  の分布を経験的に推定し、その後  $t$  統計値 ( $t^p$ ) を 2 0 0 0 回について上記のように算定した。次に  $p$  値を、実際の試料からの  $t$  未満の  $t^p$  の数を 2 0 0 0 で除して算定した。 $R O C$  の変動性にアクセスするため、試料を 2 0 0 0 回ブートストラップし、各回に、ブートストラップ  $R O C (R O C^b)$  を上記のように算定した。2 0 0 0  $R O C^b$  の 9 7 . 5 % が、我々が正常母集団について設定した許容偽陽性率である 0 . 1 を上回る場合、実際の試料からの  $R O C$  は統計的に有意とみなした。有意性を決定する閾値は、 $R O C$  に関しては  $> 2 0 \%$  の発生率に設定し、 $T$  検定  $P$  値に関しては  $< 0.05$  に設定した。

【0 4 9 7】

上記方法の適用により、我々は、正常と試料セットの間で 3 つの仮説分布をモデリングすることができた (図 2)。

【0 4 9 8】

シナリオ I では、2 つの試料母集団 (対照および疾患) の間には基本的に完全な分離が存在した。 $R O C$  と  $T$  検定の両方が、このシナリオを高い有意性で採点する。シナリオ I I では、試料は重複分布を示し、疾患試料のサブセットだけが対照 (正常) 母集団と異なる。 $R O C$  法だけがこのシナリオを有意と採点する。シナリオ I I I では、疾患試料母集団は対照母集団と完全に重複する。シナリオ I および I I と異なり、 $T$  検定法だけがこのシナリオを有意と採点する。要約すると、2 つの統計方法の組合せが試料母集団内の標的遺伝子の発現パターンを正確に特性決定することを可能にする。

【0 4 9 9】

この試験の結果を以下の表 3 に示す。  $t m - P T P$  過剰発現は、腎臓および膵癌組織

10

20

30

40

50



において認められた。tm-PTP 特異的プライマー—プローブセットを使用して結腸および子宮癌における過剰発現が認められなかったことは、細胞質PTP スプライシング変異体が結腸および子宮ガン組織において過剰発現される腫瘍変異体であることを示唆する。

【0500】

【化12】

表 3

| プライマー—<br>プローブ | 特異性   | 癌の型、対応正常組織に対する発生率% |     |     |     |
|----------------|-------|--------------------|-----|-----|-----|
|                |       | 結腸                 | 子宮  | 腎臓  | 脾臓  |
| 255            | 膜+細胞質 | 41%                | 24% | 60% | 80% |
| 1158           | 膜     | ns                 | ns  | 80% | 85% |

個々の癌性および非癌性腎臓および脾臓組織におけるtm-PTP の遺伝子調節不全に関する結果を図6に示す。正常組織における発現プロファイリングを図7に示す。

【0501】

(実施例3)

ヒト癌細胞および組織における癌関連配列の検出

前立腺癌及び乳癌組織および他のヒト癌組織、ヒト結腸、非癌性前立腺を含む正常ヒト組織、および他のヒト細胞系からのDNAを、Delli Bovi et al. (1986, Cancer Res. 46:6333-6338) の手順に従って抽出する。0.05M トリスHCl 緩衝液、pH 7.8 および0.1mM EDTAを含む溶液にDNAを再懸濁し、回収されたDNAの量を、Hoechst 33258染料を用いた微量蛍光定量法によって測定する。Cesarone, C. et al., Anal Biochem 100:188-197 (1979)。

【0502】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を、緩衝液、 $Mg^{2+}$  およびヌクレオチド濃度に関して製造者(Perkin Elmer Cetus)の推奨する条件に従い、Taqポリメラーゼを使用して実施する。熱サイクリングを、94、3分間の変性、次に94、1.5分間、50、2分間および72、3分間の35または50サイクルにより、DNAサイクラーにおいて実施する。癌関連遺伝子の選択領域を増幅するPCRの能力を、クローン化癌関連ポリヌクレオチドを陽性鋳型として使用して試験する。最適 $Mg^{2+}$ 、プライマー濃度および種々のサイクリング温度についての必要条件をこれらの鋳型に関して決定する。マスターミックス成分の起こり得る汚染を検出するため、鋳型なしでの反応を常套的に試験する。

【0503】

サザンブロット法およびハイブリダイゼーションは、ランダムプライマー手法(Feinberg, A. P., et al., 1983, Anal. Biochem. 132:6-13)によって標識したクローン化配列を用いて、Southern, E. M., (J. Mol. Biol. 98:503-517, 1975)によって述べられているように実施する。プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを、6×SSPE、5%デンハルト溶液、0.5%SDS、50%ホルムアミド、100μg/mL 変性サケ精巢DNAを含む溶液中で実施し、42で18時間インキュベートして、次に室温および37で2×SSCおよび0.5%SDSによって洗浄し、最後に68で30分間0.1×SSCおよび0.5%SDS中で洗浄する(Sambrook et al., 1989, in "Molecular Cloning: A Laboratory

Manual", Cold Spring Harbor Lab. Press)。パラフィン包埋組織切片に関しては、250bp配列を検出するために設計されたプライマーを使用して、Wright and Manos (1990, in "PCR Protocols", Innis et al., eds., Academic Press, pp. 153 - 158) に述べられている条件に従う。

#### 【0504】

##### (実施例4)

宿主細胞におけるクローン化ポリヌクレオチドの発現

癌関連遺伝子のタンパク質産物を検討するため、癌関連DNAからの制限フラグメントを発現ベクターpMT2にクローニングし (Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press pp. 16.17 - 16.22 (1989))、10% FCS を添加したDMEMにおいて増殖させたCOS細胞にトランスフェクトする。トランスフェクションはリン酸カルシウム法 (Sambrook, et al (1989) pp. 16.32 - 16.40, 前出) を用いて実施し、トランスフェクションの48時間後に、トランスフェクトおよび非トランスフェクトCOS細胞から細胞溶解産物を調製する。細胞溶解産物を、抗ペプチド抗体を用いた免疫ブロット法による分析に供する。

#### 【0505】

免疫ブロット実験では、細胞溶解産物の調製と電気泳動を標準手法に従って実施する。BioRadタンパク質アッセイ溶液を用いてタンパク質濃度を測定する。セミドライ電気泳動によってニトロセルロースに移した後、膜を、5%粉乳を含む500mM NaCl、20mMトリス、pH7.5、0.05%トウイーン20 (TTBS) 中でブロックする。TTBS中で洗浄し、二次抗体 (Amersham) と共にインキュベートした後、増強化学発光 (ECL) プロトコール (Amersham) を、検出を容易にするために製造者によって述べられているように実施する。

#### 【0506】

##### (実施例5)

ポリペプチドに対する抗体の作製

癌関連遺伝子に固有のポリペプチドを合成するかあるいは細菌または他の (たとえば酵母、バキュロウイルス) 発現系から単離し、m-マレイミド安息香酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) (Pierce, Rockford, Ill.) でウサギ血清アルブミン (RSA) に複合する。これらのペプチドによる免疫プロトコールを標準方法に従って実施する。最初に、免疫の前にウサギの予備採血を実施する。1回目の免疫は、フロイント完全アジュバントおよび複合ペプチド500μgまたは精製ペプチド100μgを含む。前の免疫後4週間目に実施する、その後のすべての免疫は、同じ量のタンパク質とフロイント不完全アジュバントを含む。免疫の7-10日後に採血を行う。

#### 【0507】

抗体のアフィニティー精製のために、対応する癌関連ポリペプチドをMBSでRSAに複合し、CNBr活性化セファロース (Pharmacia, Uppsala, Sweden) に結合する。抗血清を10mMトリス-HCl、pH7.5中で10倍希釈し、アフィニティマトリックスと共に一晚インキュベートする。洗浄後、結合抗体を100mMグリシン、pH2.5で樹脂から溶出する。

#### 【0508】

##### (実施例6)

癌関連ポリペプチドに対するモノクローナル抗体の作製

非変性アジュバント (Ribi, R730, Corixa, Hamilton MT) を、リン酸緩衝食塩水中で4mLに再水和する。次にこの再水和したアジュバント100μLをハンスバランス塩溶液400μLで希釈し、その後、免疫のために使用する細胞ペレットと静かに混合する。複合ペプチド約500μgまたは精製ペプチド100μgお

よびフロイント完全アジュバントを週に1回、フットパッドを通してB a l b / c マウスに注射する。週1回6週間の注射後、F A C S 分析を用いて癌関連ポリペプチドに対する抗体の力価を調べるために、各免疫動物の尾から血液1滴を採取する。力価が少なくとも1 : 2 0 0 0 に達したとき、マウスをC O<sub>2</sub>室において頸部脱臼させて犠死させる。ハイブリドーマの作製のためにリンパ節を採取する。最も高い力価を有するマウスからのリンパ球を、35%ポリエチレングリコール4000を用いてマウス骨髓腫細胞系X63-Ag8.653と融合する。融合後10日目に、ハイブリドーマ上清を、蛍光活性化セルソーティング(FACS)によってC A P 特異的モノクローナル抗体の存在に関してスクリーニングする。各々のハイブリドーマからの馴化培地を、P C 3、C o l o - 2 0 5、L n C a p またはP a n c - 1 細胞の混合アリコートと共に30分間インキュベートする。インキュベーション後、細胞試料を洗浄し、希釈液0.1 mLに再懸濁して、ヤギ抗マウスI g G のF I T C 複合F ( a b ' )<sub>2</sub>フラグメント1 μg / mLと共に4 で30分間インキュベートする。細胞を洗浄し、F A C S 希釈液0.5 mLに再懸濁して、F A C S c a n 細胞分析器(B e c t o n D i c k i n s o n ; S a n J o s e , C A )を用いて分析する。ハイブリドーマクローンをさらなる増殖、クローニング、およびF A C S によって評価される、癌関連ポリペプチドを発現する細胞系の1またはそれ以上の表面へのそれらの結合に基づく特性決定のために選択する。A g - C A . x と称される抗原およびA g - C A . x . 1 と称されるその抗原上のエピトープに結合する、m A b C A と称されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する。

10

20

【0509】

(実施例7)

癌関連抗原を検出するためのE L I S A アッセイ

血液試料を、組換え生産した癌関連抗原に特異的に結合する抗体に関して試験するために、以下の手順を用いる。組換えタンパク質を精製した後、組換えタンパク質をP B S 中で5 μg / mL ( 5 0 0 n g / 1 0 0 μL ) の濃度に希釈する。希釈抗原溶液100 μLを96穴Immulon 1プレート(D y n a t e c h L a b o r a t o r i e s , C h a n t i l l y , V a . ) の各々の穴に添加し、その後プレートを室温で1時間または4 で一晩インキュベートして、P B S 中の0.05%トゥイーン20で3回洗浄する。抗体の非特異的結合を低減するためのブロッキングを、P B S / トゥイーン20中のウシ血清アルブミンの1%溶液200 μLを各穴に添加し、1時間インキュベートすることによって実施する。ブロッキング溶液の吸引後、ブロッキング溶液中で1 / 1 6 - 1 / 2 0 4 8 の範囲内に希釈した一次抗体溶液(抗凝固剤を添加した全血、血漿または血清)100 μLを添加し、室温で1時間または4 で一晩インキュベートする。次に穴を3回洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼに複合したヤギ抗ヒトI g G 抗体(O r g a n o n T e k n i k a , D u r h a m , N . C . ) 100 μL、P B S / トゥイーン20で1 / 5 0 0 - 1 / 1 0 0 0 の範囲内に希釈し、o - フェニレンジアミン二塩酸塩(O P D , S i g m a ) 溶液100 μLを各穴に添加して、5 ~ 15分間インキュベートする。O P D 溶液は、5 m g O P D 錠をH<sub>2</sub>O中1%メタノール50 mLに溶解し、使用の直前に30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μLを添加することによって調製する。4 M H<sub>2</sub>S O<sub>4</sub> 25 Lを添加して反応を停止させる。マイクロプレートリーダー(B i o - R a d ) において490 nmで吸光度を読み取る。

30

40

【0510】

(実施例8)

癌細胞表面の癌関連抗原の特定と特性決定

癌細胞製剤の充填赤血球量約25 μLの細胞ペレットを、細胞を水中で0.5 mLに希釈し、その後3回凍結・解凍することによって溶解する。溶液を14,000 rpmで遠心分離する。細胞膜フラグメントを含む、生じたペレットを、S D S 試料緩衝液(I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A ) 50 μLに再懸濁する。試料を80 で5分間加熱し、次に不溶性物質を除去するために14,000 rpmで2分間遠心分離する。

【0511】

50

試料を、製造者の指示に従ってトリス - グリシン SDS (Invitrogen; Carlscbad CA) 中の 4 ~ 20 % ポリアクリルアミド勾配ゲルを用いたウエスタンブロット法によって分析する。膜試料 10  $\mu$ L をポリアクリルアミドゲルの 1 つのレーンに適用する。別の 10  $\mu$ L 試料を、最初に 80 で加熱しながらジチオトレイトール (100 mM) 2  $\mu$ L を添加することによって還元し、その後もう 1 つのレーンに負荷する。あらかじめ染色した分子量マーカー See Blue Plus 2 (Invitrogen; Carlscbad, CA) を、ゲル上で分子量を評価するために使用する。14.4 g / L グリシン、3 g / L トリス塩基、10 % メタノールおよび 0.05 % SDS の転移緩衝液を用いてゲルタンパク質をニトロセルロース膜に移す。膜をブロックし、CAP 特異的モノクローナル抗体 (0.5  $\mu$ g / mL の濃度) でブローブして、製造者の指示に従って Invitrogen Western Breeze Chromogenic Kit - Anti Mouse を使用して展開する。腫瘍細胞膜試料の還元試料において、対応する癌関連タンパク質の予測分子量の約 10 % の範囲内の分子量で移動する著明なバンドが認められる。

#### 【0512】

(実施例 9)

##### ワクチンの製造

本発明はまた、悪性細胞によって産生されるまたは悪性細胞に関連する抗原として働く本発明の癌関連ポリペプチドを使用して、患者において癌関連ポリペプチドを発現する細胞に対する免疫応答を刺激する方法に関する。本発明のこの態様は、癌細胞または癌関連ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを発現する細胞に対し、ヒトにおいて免疫応答を刺激する方法を提供する。前記方法は、(a) ヒト癌関連タンパク質のアミノ酸配列または (b) ヒト内在性レトロウイルス癌関連タンパク質のアミノ酸配列を含むポリペプチドのムテインまたは変異体、を含むポリペプチドの免疫量をヒトに投与する工程を含む。

#### 【0513】

(実施例 10)

治療薬を試験するための手段としての、ポリペプチドを発現するトランスジェニック動物の作製

前立腺腫瘍関連遺伝子の機能または調節の検討のために、遺伝的に修飾された非ヒト動物または細胞系におけるその部位特異的遺伝子修飾を生成する、あるいは前立腺癌を含む疾患の動物モデルを創製するために癌関連核酸を使用する。「トランスジェニック」という用語は、遺伝子が修飾タンパク質を生産するように配列が変化している宿主細胞において安定に伝達される外来性 tm - PTP 遺伝子を有する、またはレポーター遺伝子に作動可能に連結された外来性癌関連LTRプロモーターを有する、遺伝的に修飾された動物を包含することが意図されている。トランスジェニック動物は、ゲノムにランダムに組み込まれた核酸構築物を通して作製され得る。安定な組込みのためのベクターは、プラスミド、レトロウイルスおよび他の動物ウイルス、YAC 等を含む。興味深いのは、トランスジェニック哺乳動物、たとえばウシ、ブタ、ヤギ、ウマ等であり、特にげっ歯動物、たとえばラット、マウス等である。

#### 【0514】

修飾細胞または動物は、tm - PTP 遺伝子の機能および調節の検討において有用である。たとえば腫瘍形成における種々の遺伝子の役割を決定するために、一連の小さな欠失および / または置換を tm - PTP 内に作製し得る。興味深い特異的構築物は、tm - PTP 遺伝子発現をブロックするためのアンチセンス構築物、ドミナントネガティブ tm - PTP 遺伝子突然変異の発現、および tm - PTP 遺伝子の過剰発現を含むが、これらに限定されない。正常では発現されない細胞または組織における、または発生の異常な時点での tm - PTP 遺伝子またはその変異体の発現が提供される。加えて、正常では生産されない細胞における癌関連ポリペプチドに由来するタンパク質の発現を提供することにより、細胞行動の変化を誘導することができる。

#### 【0515】

ランダムな組込みのためのDNA構築物は、組換えを媒介するための相同領域を含む必要はない。好都合には、陽性および陰性選択のためのマーカーが含まれる。哺乳動物細胞をトランスフェクトするための様々な手法に関しては、Keown et al., Methods in Enzymology 185: 527-537 (1990) 参照。  
【0516】

胚幹(ES)細胞に関しては、ES細胞系を使用するか、または宿主、たとえばマウス、ラット、モルモット等から新鮮胚細胞を入手する。そのような細胞を適切な線維芽細胞支持細胞層で増殖させるかまたは白血病阻害因子(LIF)などの適切な増殖因子の存在下で増殖させる。ES細胞が形質転換したとき、それらはトランスジェニック動物を生産するために使用し得る。形質転換後、細胞を適切な培地中の支持細胞層にプレートする。選択培地を用いることによって構築物を含む細胞を検出し得る。コロニーが増殖するために十分な時間後、コロニーを採取し、構築物の組込みの発生に関して分析する。陽性のコロニーは、その後胚の操作および胚盤胞の注入のために使用し得る。胚盤胞は、4-6週齢の過剰排卵雌性動物から入手する。ES細胞をトリプシン処理し、修飾細胞を胚盤胞の胞胚腔に注入する。注入後、胚盤胞を偽妊娠雌性動物の各々の子宮角に戻す。その後雌性動物を出産まで進ませ、生じたキメラ動物を、構築物を担持する細胞に関してスクリーニングする。種々の表現型の胚盤胞およびES細胞を提供することにより、キメラ子孫を容易に検出することができる。

【0517】

キメラ動物を修飾遺伝子の存在に関してスクリーニングし、修飾を有する雄性和雌性動物を交配してホモ接合子孫を生産する。遺伝子変化が発生のある時点で死亡を引き起こす場合は、組織または器官を同種異系移植片または類遺伝子性移植片または移植組織として、またはインビトロ培養中に保持する。トランスジェニック動物は、実験動物、家畜等のようないかなる非ヒト哺乳動物でもよい。トランスジェニック動物は、たとえば前立腺癌への候補薬剤の作用を測定する、潜在的治療薬または治療レジメンを試験する等のために、機能的試験、薬剤スクリーニング等において使用される。

【0518】

(実施例11)

癌関連特異的抗体を使用した診断イメージング

本発明は、初期症状発現時の癌患者を正確に病期判定するためおよび癌の転移拡散の早期検出のための、癌関連ポリペプチドに対する抗体の使用を包含する。癌関連ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を使用した放射免疫シンチグラフィーは付加的な癌特異的診断試験を提供することができる。本発明のこの態様のモノクローナル抗体は、癌の組織病理学的診断のために使用される。

【0519】

本発明のテクネチウム $^{99m}$ Tc( $^{99m}\text{Tc}$ )標識モノクローナル抗体が、Marks, et al., Brit. J. Urol. 75: 225 (1995) によって精上皮腫細胞に関して述べられたように外部シンチフォトグラフィーによって異種移植癌を成功裏に画像化できるかどうかを調べるため、ヌードマウスにおける癌細胞の皮下ヒト異種移植片を使用する。癌関連ポリペプチドに特異的な各々のモノクローナル抗体を、ハイブリドーマ腫瘍を担持するBALB/cマウスの腹水からプロテインA-セファロースでのアフィニティークロマトグラフィーによって精製する。アビジン特異的モノクローナル抗体(Skea, et al., J. Immunol. 151: 3557 (1993))などの対照モノクローナル抗体を含む、精製抗体を、Mather, et al., J. Nucl. Med. 31: 692 (1990) およびZhang et al., Nucl. Med. Biol. 19: 607 (1992) の方法を用いて、還元後に $^{99m}\text{Tc}$ で標識する。ヒト癌細胞を担持するヌードマウスに、 $^{99m}\text{Tc}$ 標識抗体200~500  $\mu\text{Ci}$ を腹腔内注入する。注入の24時間後に、動物から約8cmに設定した6mmピンホールコリメーターを備えるSiemens ZLC3700ガンマカメラを使用してマウスの画像を得る。画像化後のモノクローナル抗体の生体分布を測定するため、正常器官および

腫瘍を切除し、計量して、組織および注入物の試料の放射能を測定する。加えて、抗腫瘍化合物に複合したC A特異的抗体を癌特異的化学療法のために使用する。

#### 【0520】

(実施例12)

##### 免疫組織化学的方法

癌患者からの凍結組織試料を最適切断温度(OCT)化合物に包埋し、イソペンタン中ドライアイスで急速凍結する。凍結切片をLeica 3050CMミクロトームで5 μmの厚さに切断し、ベクタバウンド(vectabound)被覆スライドガラスで解凍封入する。切片を-20℃にてエタノールで固定し、室温で一晩空気乾燥させる。固定した切片を使用時まで-80℃で保存する。免疫組織化学のために、組織切片を取り出し、最初にブロッキング緩衝液(PBS、5%正常ヤギ血清、0.1%トゥーン20)中で室温にて30分間インキュベートし、次にブロッキング緩衝液(1 μg/mL)に希釈した癌関連タンパク質特異的モノクローナル抗体および対照モノクローナル抗体と共に120分間インキュベートする。その後切片をブロッキング緩衝液で3回洗浄する。結合モノクローナル抗体を、ヤギ抗マウスIgG+IgM(H+L)F(ab')<sup>2</sup>-ペルオキシダーゼ複合体および1M酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.05および0.003%過酸化水素(Sigmaカタログ番号H1009)中のペルオキシダーゼ基質ジアミノベンジジン(1 mg/mL、Sigmaカタログ番号D5637)で検出する。染色スライドガラスをヘマトキシリンで対比染色し、Nikon顕微鏡下で検査する。

10

20

#### 【0521】

結果を病理学者が分析し、各々の染色に強度評点を割り当てる。

#### 【0522】

癌関連タンパク質(抗原)に対するモノクローナル抗体を、種々の組織型からの様々な細胞系との反応性を調べるために使用する。種々の樹立細胞系からの細胞を、プロテアーゼを使用せずに増殖表面から取り出して、OCT化合物に充填し、包埋する。細胞を凍結して切片にし、標準IHCプロトコールを使用して染色する。Cell Array(商標)テクノロジーは、国際公開番号第WO01/43869号に述べられている。外科的切除によって得た正常組織(ヒト)を凍結し、封入する。凍結切片をLeica 3050CMミクロトームで5 μmの厚さに切断し、ベクタバウンド被覆スライドガラスで解凍封入する。切片を-20℃にてエタノールで固定し、室温で一晩空気乾燥させる。PolyMICA(商標)Detectionキットを、正常組織へのC A特異的モノクローナル抗体の結合を測定するために使用する。一次モノクローナル抗体を1 μg/mLの最終濃度で使用する。

30

40

#### 【0523】

この分析の結果を図8~13に示す。図8は、肺組織(扁平上皮癌)についての免疫組織化学結果を示す。病理学的検討は、85%の上皮細胞染色を2+強度で特定した。有意の間質染色は存在せず、3/10のNSCLC(非小細胞肺癌)が有意の染色を示した。図9は、膵臓組織(膵島細胞腫瘍)についての免疫組織化学結果を示す。図10は、膵臓組織(膵管細胞癌)についての免疫組織化学結果を示す。図11は、膵臓組織(膵管細胞癌)についての免疫組織化学結果を示す。この図は膵管細胞癌における膜染色を示し、8/8の腫瘍が有意の染色を示す。図12は、腎臓組織(腎細胞癌)についての免疫組織化学結果を示す。5/5の標本が有意の染色を示した。図13は、膀胱組織(正常および癌)についての免疫組織化学結果を示す。正常膀胱組織は1+の強度で染まったのに対し、浸潤性膀胱腫瘍組織は3+の強度で染まった。3/4の腫瘍が有意の染色を示した。

#### 【0524】

(実施例13)

##### siRNAトランスフェクション

tm-PTPについてのsiRNAを、PTP遺伝子配列に相補的であるように設計し、遺伝子発現の低下をA549細胞において試験した。PPTREのために使用したsiRNAオリゴヌクレオチドを表4に示す。PTPに対するsiRNA二本鎖は、腫

50

瘍細胞系における mRNA およびタンパク質発現を低下させた。トランスフェクション試薬販売者 (Invitrogen) の推奨に従って siRNA トランスフェクションを実施した。細胞をトランスフェクトするために使用した最終 siRNA 濃度は、異なる記載がない限り、100 nM であった。一般に、細胞をトランスフェクションの当日に 30 ~ 50 % の集密度まで増殖させた (たとえば 48 穴プレートに関して各穴あたり 5000 ~ 20000 細胞)。

【0525】

【化13】

表 4

| siRNA オリゴヌクレオチドの表 |         |           |                                    |
|-------------------|---------|-----------|------------------------------------|
| 遺伝子               | Sgrs ID | siRNA の名称 | 標的配列                               |
| PTPε              | 340     | HSI0340-3 | AAGCCTTACTCGAGTACTACC<br>(配列番号 9)  |
|                   |         | HSI0340-6 | AAGGCATGATTGACCTCATCG<br>(配列番号 10) |
|                   |         | HSI0340-9 | AAGAATGATACCCCTTCAGAA<br>(配列番号 11) |
|                   |         | 2038      | CAGGAAGCAGAGGAAAGCTGT<br>(配列番号 12) |
|                   |         | 2132      | CAGGGCCCAAGAAGTATTTTC<br>(配列番号 13) |
|                   |         | 2220      | GAGGGACTTTTAGATGTATTT<br>(配列番号 14) |

Opti-MEM I (Invitrogen)、siRNA オリゴおよび Plus Reagent (Invitrogen) の混合物を Invitrogen によって推奨されるように調製し、室温で 15 - 20 分間インキュベートした。次にこの混合物を、Opti-MEM / siRNA / Plus Reagent 混合物中で適切な容量の Oligofectamine (Invitrogen) と組み合わせ、室温で 15 分間インキュベートした。細胞を含む穴から細胞培養培地を取り出し、適切な容量の Opti-MEM I と交換した。適切な容量の siRNA / Oligofectamine 混合物を細胞に添加した。次に細胞を 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> で 4 時間インキュベートし、その後増殖培地を添加した。0 日目のプレートを直ちに分析する。その後の時点については、トランスフェクション試薬 / 培地混合物を新鮮細胞培養培地と交換し、細胞を 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> でインキュベートする。トランスフェクション混合物の容量は、組織培養プレート、すなわち 6、48、96 穴プレートに依存して増大または減少させた。

【0526】

(実施例 14)

siRNA トランスフェクト細胞の QPCR 分析のための RNA 抽出

QPCR 分析を実施するため、RNAeasy 96 キット (Qiagen) を用いて RNA をトランスフェクト細胞から抽出し、製造者の推奨に従って実施した。一般に、48 穴プレートの 1 つの穴から細胞を収集し、溶解して、RNA を 96 穴 RNAeasy プレートの 1 つの穴に収集した。

【0527】

(実施例 15)

siRNA トランスフェクト細胞の細胞増殖アッセイ

Cell Titer Glo (Promega) または WST-1 (Roche Applied Science) などの一般的アッセイを使用して増殖アッセイを実施し、製造者の推奨に従って実施した。一般に、アッセイは3回実施した。増殖の阻害パーセントを、あらかじめ無作為に混合した siRNA 対照オリゴでトランスフェクトしておいた細胞と比較して算定した。

#### 【0528】

図14は、DU-145およびMCF-7ヒト癌細胞系増殖へのPTP 特異的 siRNA の作用を示す。DU-145 (PTP +) およびMCF-7 (PTP -) 細胞系を、PTPE 特異的な陽性対照 (Eg5) または陰性対照 (Eg5s) siRNA のいずれかでトランスフェクトした。トランスフェクションの3日後にCell Titer Glo アッセイによって細胞増殖を測定した。これらの結果は、tm-PTP ノックダウンはtm-PTP タンパク質を発現する細胞系 (DU-145) の増殖を特異的に損傷するが、tm-PTP 陰性細胞系 (MCF-7) の増殖は損なわないことを明らかにする。図15は、無作為混合 siRNA 対照と比較したときの、siRNA 2130および2220処理細胞における細胞増殖の低下を示す。Rat-1/PTPE No. 11-4 およびNIH3T3/PTPE No. 2-1クローンを、3つの異なるPTPE 特異的 siRNA または陰性対照 siRNA (Eg5s) でトランスフェクトした。図15に示すように、3つのPTPE 特異的 siRNA は対照と比較してPTPE タンパク質をノックダウンする。2132および2220オリゴヌクレオチドは2038に比べてより劇的な作用を及ぼす。

10

20

#### 【0529】

(実施例16)

細胞遊走アッセイの siRNA 阻害

QCM (商標) フィブロネクチン被覆細胞遊走アッセイ (Chemicon International INC.) を使用し、製造者の指示に従って細胞遊走を測定する。

#### 【0530】

(実施例17)

Rat-1 安定細胞系の作製

細胞をトリプシン処理し、PBSで1回洗って、細胞培養培地 [DMEM (グルタミンを含む) + 10% FBS (ウシ胎仔血清)] に再懸濁し、 $2 \times 10^6$  細胞/穴を総容量 2 mL で6穴培養プレートに接種した。プラスミドDNA (2  $\mu$ g) を無血清培地 100  $\mu$ L と混合し、次いでSuperfect トランスフェクション試薬 (Qiagen) 10  $\mu$ L を添加して、10秒間ボルテックスし、室温で10分間インキュベートした。複合体が形成されつつある間、細胞をPBSで2回洗浄した。次にDMEM 600  $\mu$ L + 10% FBS を複合体に添加し、混合して、細胞を含む穴に移し、37 °C で4時間インキュベートした。その後DMEM 2 mL + 10% FBS を添加し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> で48時間インキュベートした。

30

#### 【0531】

次に細胞をトリプシン処理し、DMEM 1 mL + 10% FBS + 800  $\mu$ g/mL G418で再懸濁して、10 cm皿に種々の密度 (1:10、1:20 から 1:100 まで) で接種した。G418 耐性コロニーが形成されるまで皿を37 °C、5% CO<sub>2</sub> でインキュベートし、その後個々のクローンを採取して、DMEM 1 mL + 10% FBS + 800  $\mu$ g/mL G418を含む24穴皿に移した。

40

#### 【0532】

クローン化した細胞をさらに増殖させ、一般にウエスタンブロット分析によって、プラスミド発現の遺伝子産物の存在に関してスクリーニングした。

#### 【0533】

(実施例18)

軟寒天形質転換アッセイ

0.7% および 1% 低温融解アガロース (DNA グレード、J. T. Baker) 溶液

50



を滅菌水中で調製し、加熱沸騰させ、水浴で40℃に冷却した。2×DMEM溶液を、水中の10×粉末DMEM (Invitrogen)と混合することによって調製し、混合して、次にNaHCO<sub>3</sub> 3.7g/L容量を添加し、続いてFBSを20%まで添加した。培地0.75mL(あらかじめ40℃に加温しておいた)を1%アガロース溶液0.75mLと混合し、各穴について最終的に1.5mLの0.5%アガロース溶液を6穴皿に添加した。Rat-1安定細胞をトリプシン処理し、PBSで2回洗って、1×DMEM+10%FBS mLあたり50000細胞に希釈した。この細胞懸濁液0.1mLを2×DMEM+20%FBS 1mLおよび0.7%アガロース溶液1mLと静かに混合し、最終的に1.5mLの懸濁液を、固体0.5%寒天を含む6穴皿に添加した。これらの寒天プレートに37℃、5%CO<sub>2</sub>で加湿インキュベーター内に10~14日間置き、細胞に新鮮1×DMEM+10%FBSを3~4日ごとに再供給した。

10

## 【0534】

Rat-1およびRat-1/tm-PTP 軟寒天アッセイの結果を図16に示す。これらの結果からわかるように、Rat-1細胞におけるtm-PTP の発現は細胞の増殖を上昇させる。

## 【0535】

## (実施例19)

## マウス腫瘍形成性アッセイ

Rat-1安定細胞系を2つのT150フラスコにおいて70~80%の集密度に増殖させた。細胞をトリプシン処理し、PBSで2回洗って、10<sup>7</sup>、10<sup>6</sup>および10<sup>5</sup>細胞/mLになるようにPBSで再懸濁した。マウスへの注入時まで細胞懸濁液を氷上に保持した。3~5週齢の雌性NOD.CB-17-Prkdc<scid>/JマウスをJAX WestのM-3施設(UC Davis)から入手し、JAX West's West Sacramento施設の隔離ユニット内にケージあたり4匹ずつ収容した。25ゲージ針を使用して、マウスの胸腔領域(マウスにつき2部位)に細胞懸濁液0.1mLを皮下注入した。ひとたび腫瘍の形成が始まれば、腫瘍の成長を週に2回カリパーを用いて測定した。腫瘍を、吻側-尾側および内側-外側の2つの方向で測定した。測定を幅×長さとして記録し、変換式(長さ×幅<sup>2</sup>)/2を用いて腫瘍容積を計算した。

20

## 【0536】

Rat-1細胞系の腫瘍形成性アッセイの結果を図17に示す。tm-PTP 遺伝子(ここではコード340.c1によって示す)のトランスフェクションが細胞の腫瘍形成性の著明な上昇を生じさせることは明らかである。

30

## 【0537】

## (実施例20)

tm-PTP はNIH/3T3およびRat-1細胞においてTyR-529上のSrcを脱リン酸化する

NIH/3T3およびRat-1細胞をtm-PTP 発現ベクターでトランスフェクトし、安定発現tm-PTP 細胞系を選択した。いくつかの独立した安定クローンならびにベクター対照細胞系から全細胞溶解産物を調製し、Src-Y529リン酸化特異的抗体でプローブすることにより、Src-Y529リン酸化レベルに関して免疫プロットした(図18、上のパネル)。全Srcはこれらの溶解産物中に等量で存在した(図18、したのパネル)。これらのデータは、tm-PTP 過剰発現がNIH/3T3およびRat-1細胞においてSrc-TyR-529の脱リン酸化を引き起こすことを明らかにし、Srcがtm-PTP の直接基質であることを示唆する。

40

## 【0538】

## (実施例21)

tm-PTP はインビボでホモタイプ相互作用を形成する

293T細胞を6穴皿に接種した。その翌日、細胞を以下のいずれかでトランスフェクトした:

1/pDisplay空ベクター4μg

50

2 / p D E S T S E M A 4 D - V 5 2  $\mu$  g + p D i s p l a y 空ベクター 2  $\mu$  g  
 3 / p D E S T t m - P T P - V 5 2  $\mu$  g + p D i s p l a y 空ベクター 2  $\mu$  g  
 4 / p D i s p l a y H A t m - P T P - F L N o . 9 2  $\mu$  g + p D i s p l a y 空ベクター 2  $\mu$  g  
 5 / p D E S T S E M A 4 D - V 5 2  $\mu$  g + p D i s p l a y H A t m - P T P - F L N o . 9 2  $\mu$  g  
 6 / p D E S T t m - P T P - V 5 2  $\mu$  g + p D i s p l a y H A t m - P T P - F L N o . 9 2  $\mu$  g

DNAを無血清培地 250  $\mu$  Lに希釈し、リポフェクタミン 2000 10  $\mu$  Lを無血清培地 250  $\mu$  Lに希釈した。両方の溶液を混合し、室温で20分間インキュベートした。

10

#### 【0539】

前記インキュベーション期間中に、DMEM - 10% FBS 1 mLを細胞に添加し、37 でインキュベートした。20分後、DNA + リポフェクタミンの混合物を細胞に添加した。その翌日、細胞をトリプシン処理し、10 cm皿に接種した。細胞を回復させるために72時間放置した。

#### 【0540】

72時間後に細胞を削り取ってPBS 1 mL中に収集した。ペレットを、溶解緩衝液 500  $\mu$  L : 50 mM トリス - HCl ; pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% NP40、0.25% デオキシコレート 50 mM NaF、20 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> およびプロテアーゼ阻害剤中にて、氷上で60分間溶解した。1 mM PMSF (DMSO中の0.3 M保存溶液) を使用前に溶解緩衝液に添加した。DNAを針でせん断した。次に溶解産物を14,000 rpmで10分間遠心した。細胞溶解産物 200  $\mu$  LをHAまたはV5エピトプタグに対するウサギポリクローナル抗体 1  $\mu$  g (Abcam; それぞれ ab9110 - 100 および ab9116 - 100) と共に、静かに揺り動かしながら4 で一晩インキュベートした。

20

#### 【0541】

その翌朝、懸濁液プロテインA/G (50:50) アガロースビーズをPBS中で2回、次いで溶解緩衝液中で洗った。ビーズ (50% スラリー) を溶解緩衝液中、氷上で1時間インキュベートした。プロテインA/G懸濁液 30  $\mu$  Lを溶解産物に添加し、混合物を静かに揺り動かしながら4 で4時間インキュベートした。その後ビーズを溶解緩衝液 1 mLで3回洗った。ビーズを試料緩衝液 30  $\mu$  Lに再懸濁した。

30

#### 【0542】

各々の試料 15  $\mu$  Lを90 で3分間煮沸し、10% SDS - PAGE ゲルに負荷した。

#### 【0543】

タンパク質を膜プロットに移した後、膜をPBST - 5% 乳中で一晩ブロックした。翌日、V5抗体による免疫沈降法のプロットをHAハイブリドーマ上清 (1:1000希釈) と共に1時間インキュベートし、一方HA抗体による免疫沈降法のプロットをV5 - HRP (1:5000希釈) と共にインキュベートした。

40

#### 【0544】

プロットをTBST中で洗った (4 x 15 分間)。HAプロットを二次抗体 (ヤギ抗マウスHRP 1:30,000、Santa Cruz) 中でインキュベートした。プロットをTBST中で洗い (4 x 15 分間)、展開した。

#### 【0545】

結果を図17に示す。

#### 【0546】

SEMA4D - V5 および HA - t m - P T P とコトランスフェクトした細胞において、Ip / ウエスタンプロットは、SEMA4DとHA - t m - P T P が共沈できなかったことを示す。これに対し、HA - t m - P T P および t m - P T P - V5 でトラ

50

ンスフェクトした細胞では、H A - t m - P T P が t m - P T P - V 5 との複合対中に認められる。この結果は、t m - P T P 分子が形質膜上でホモタイプ結合を形成できることを示唆する。

【 0 5 4 7 】

( 実施例 2 2 )

一部の t m - P T P 突然変異型は二量体を形成し、不活性化される。

【 0 5 4 8 】

この実施例は、t m - P T P 突然変異型の構築、前記突然変異型が二量体を形成する能力、および生物学的活性への二量体化の影響を述べる。

【 0 5 4 9 】

A . t m - P T P 突然変異型の構築

8 個の t m - P T P 突然変異型を作製した。8 つの選択部位にシステイン修飾（下線を付している）を組み込むために以下に列挙するプライマー対を設計した：

【 0 5 5 0 】

## 【化 1 4】

Q26C5'-CGGACCCGGGCGCCTCCTTGTCCGCTGCTGGCCTGG-3' ( 配列番号 15)5'-CCAGGCCAGCAGCGGACAGGAGGCGCCCGGGTCCG-3' ( 配列番号 16)S25C5'-CCGGACCCGGGCGCCTTGTCAGCCGCTGCTGGCC-3' ( 配列番号 17)

10

5'-GGCCAGCAGCGGCTGACAGCGCCCGGGTCCGG-3' ( 配列番号 18)A24C5'-CTCCGGACCCGGGCTTGTTCCCAGCCGCTGCT-3' ( 配列番号 19)5'-AGCAGCGGCTGGGAACAGCCCCGGGTCCGGAG-3' ( 配列番号 20)

20

G23C5'-GGCCCTCCGGACCCGTGTGCCTCCCAGCCGCTG-3' ( 配列番号 21)5'-CAGCGGCTGGGAGGCACAGCGGTCCGGAGGGCC-3' ( 配列番号 22)P22C5'-CAGGCCCTCCGGACTTGTGGCGCCTCCCAGCC-3' ( 配列番号 23)

30

5'-GGCTGGGAGGCGCCACAGTCCGGAGGGCCTG-3' ( 配列番号 24)D21C5'-CCTCAGGCCCTCCGTGTCCGGGCGCCTCCC-3' ( 配列番号 25)5'-GGGAGGCGCCCGGACAGAGGGCCTGAGG-3' ( 配列番号 26)

40

## 【 0 5 5 1 】

## 【化 15】

## P20C

5'-CGACCTCAGGCCCTTGTGACCCGGGCGCCTCC-3' ( 配列番号 27)

5'-GGAGGCGCCCGGGTCACAAGGGCCTGAGGTCG-3' ( 配列番号 28)

## P19C

5'-CCACGACCTCAGGCTGTCCGGACCCGGGCGCC-3' ( 配列番号 29)

5'-GGCGCCCGGGTCCGGACAGCCTGAGGTCGTGG-3' ( 配列番号 :30)

10

PCR 突然変異誘発の間に鋳型プラスミドの同じ鎖を異なる方向でアニーリングするためにプライマー対を設計した。反応のために使用した鋳型は、p c D N A 3 . 2 - D E S T ( I n v i t r o g e n ) にクローニングした t m - P T P 完全長遺伝子であった。

## 【0552】

PCR 突然変異誘発反応物は、総反応物容量 50  $\mu$  L 中に各々のプライマー 150 ng、QuikSolution (Stratagene) 3  $\mu$  L、鋳型 20 ng、PfuUltra (商標) Hotstart PCR Master Mix (Stratagene) 25  $\mu$  L を含んだ。反応のためのサイクリング条件は以下のとおりである：95、1 分間；18 サイクル；95、50 秒間；60、50 秒間；68、8 分間；68、7 分間。

20

## 【0553】

メチル化 DNA (バックグラウンド) を除去するために反応物全体を DpnI 1  $\mu$  L で 4 時間消化した。PCR 反応混合物 0.5 - 1  $\mu$  L を大腸菌 XL-10 Gold に形質転換した。突然変異を確認するために反応あたり 4 個のコロニーを配列決定した。最終選択クローンに関しては、望ましくない突然変異が組み込まれていないことを確認するために両方の鎖の完全長配列決定を実施した。

## 【0554】

B. t m - P T P シス테인突然変異型はインビボで二量体を形成する。

30

## 【0555】

V5 標識野生型 P T P R または P T P R P 20C、D 21C、P 22C、G 23C、A 24C、S 25C、Q 26C 突然変異型のいずれかを発現するベクターで一過性にトランスフェクトした NIH / 3 T 3 から、ならびに空ベクター対照細胞系から、全細胞溶解産物を調製した。細胞溶解は 20 mM ヨードアセトアミドの存在下で実施した。ヨードアセトアミドは、二量体開裂を最小限に抑えるために、インビボでジスルフィド架橋還元役割を担う酵素であるグルタチオンレダクターゼを阻害する。構築物はすべて V5 標識タンパク質をコードする。試料を還元および非還元条件下で分析し、V5 特異的抗体でプローブすることにより野生型または t m - P T P 突然変異型タンパク質発現に関して免疫プロットした。還元条件下ではすべてのタンパク質が単量体として発現される (図 20A)。非還元条件下では、しかし、野生型 t m - P T P は二量体を形成することができなかった (その細胞外ドメインにシス테인を欠くため) のに対し、t m - P T P 突然変異型はすべて二量体を形成した (図 20B)。

40

## 【0556】

C. t m - P T P ホスファターゼ活性は二量体化によって阻害される。

## 【0557】

野生型 t m - P T P、または t m - P T P A 24C No. 8 および No. 26 クローンのいずれかを発現する Rat - 1 安定細胞系から、ならびにベクター対照細胞系から全細胞溶解産物を調製し、Src - Y 529 (図 21A) またはパキシリン - Y 11

50

8 (図21B) リン酸化特異的抗体でプローブすることにより、S r t - Y 5 2 9またはパキシリン - Y 1 1 8リン酸化レベルに関して免疫プロットした。これらの溶解産物中の総S r cおよびパキシリンも分析した。すべての溶解産物が等しい量で存在することを示すため、g - アクチンを対照として使用した。t m - P T P A 2 4 C突然変異型の両方のクローンがS r c - Y 5 2 9を脱リン酸化することができず、パキシリン - Y 1 1 8リン酸化を誘導することができなかった。P T P R A 2 4 Cクローンを、実施例19で述べたように、軟寒天アッセイにおいても試験した(図21C)。R a t - 1細胞を発現する野生型t m - P T P は軟寒天上でクローンを形成することができたが、2つのP T P R A 2 4 Cクローンはクローンを形成できなかった。これらの結果は、二量体化がt m - P T P ホスファターゼ活性を不活化することを示唆する。

10

【0558】

D . t m - P T P Q 2 6 C突然変異型は二量体化によって不活性化されない。

【0559】

野生型t m - P T P 、またはt m - P T P Q 2 6 C N o . 1およびN o . 39クローンのいずれかを発現するR a t - 1安定細胞系から、ならびにベクター対照細胞系から全細胞溶解産物を調製し、S r c - Y 5 2 9またはパキシリン - Y 1 1 8リン酸化特異的抗体でプローブすることにより、S r t - Y 5 2 9またはパキシリン - Y 1 1 8リン酸化レベルに関して免疫プロットした(図22)。これらの溶解産物中の総S r cおよびパキシリンも分析した。すべての溶解産物が等しい量で存在することを示すため、チューブリンを対照として使用した。野生型t m - P T P と同様に、P T P R Q 2 6 C突然変異型はS r c - Y 5 2 9を脱リン酸化し(図22A)、パキシリン - Y 1 1 8リン酸化を誘導することができた(図22B)。加えて、t m - P T P Q 2 6 CはR a t - 1細胞を形質転換する上で野生型t m - P T P と同程度に強力であった(図22C)。これらの結果は、P T P R が二量体化によって不活性化されるためには、特定立体配座の二量体が必要であることを示唆する。t m - P T P Q 2 6 Cの幾何学的配向はc - S r cが不活性化されることを妨げなかった。

20

【0560】

(実施例23)

腎および膀胱細胞における増殖のs i R N A 阻害

この実施例は、t m - P T P 特異的s i R N Aが軟寒天でのA 4 9 8腎細胞系増殖およびH s 7 0 0 T膀胱細胞系増殖を阻害することを示す。

30

【0561】

C e l l T i t e r G l o ( P r o m e g a ) を使用して製造者の推奨に従って増殖アッセイを3回実施した。図23は、軟寒天における498細胞系増殖(A)およびH s 7 0 0 T増殖(B)へのt m - P T P 特異的s i R N Aの作用を示す。細胞系は、未処置であるか(U T)、t m - P T P 特異的s i R N A ( C C - 5 6 8 - 1 & S t e a l t h - S i )、陽性対照(E g 5)または陰性対照(Q i a R e f & S t e a l t h ( - )) s i R N Aのいずれかでトランスフェクトした。細胞増殖(図23A)を4日間にわたって追跡した。t m - P T P 特異的s i R N Aは、A 4 9 8細胞系の増殖をE g 5と同じ程度に阻害した。両方のt m - P T P 特異的s i R N Aがこのタンパク質を時間依存的にノックダウンする(図23B)。S t e a l t h - S i オリゴヌクレオチドは、C C - 5 6 8 - 1 オリゴヌクレオチドと比較してt m - P T P タンパク質のノックダウンにおいておよび増殖を阻害する上でより強力であった。

40

【0562】

軟寒天アッセイでは(図23C)、両方のs i R N Aが、対照オリゴヌクレオチド(Q i a R e f & S t e a l t h ( - ))と比較して、H s 7 0 0 T膀胱細胞系の増殖を鈍化させることができた。

【0563】

本明細書において引用するすべての出版物、特許および特許出願は、各々個々の出版物または特許出願が参照により組み込まれることを特定して個別に示されているかのごとく

50

に、参照によりここに組み込まれる。

【0564】

本発明は単なる例として述べたものであり、本発明の範囲および精神の範囲内から逸脱することなく変更を施し得ることは了解される。

【図面の簡単な説明】

【0565】

【図1】宿主/ウイルス結合フラグメントのPCR増幅を示すゲル。

【図2】対照と疾患試料の間での仮説上の分布プロフィール。Pepe et al. より提供された図。

【図3】tm-PTP の膜貫通および細胞質スプライシング変異体。

【図4】二量体化によるtm-PTP 活性の調節。

【図5】抗体の架橋。

【図6】腎臓および膵臓におけるtm-PTP の発現プロファイリング。

【図7】正常組織における遺伝子発現プロファイリング。

【図8】図8は、肺組織についての免疫組織化学の結果を示す（扁平上皮癌）。病理学検査は、2+強度で染色する上皮細胞を85%特定した。有意の間質染色は存在せず、3/10のNSCLC（非小細胞肺癌）が有意の染色を示した。

【図9】図9は、膵組織についての免疫組織化学の結果を示す（膵島細胞腫瘍）。

【図10】図10は、膵組織についての免疫組織化学の結果を示す（膵管細胞癌）。

【図11】図11は、膵組織についての免疫組織化学の結果を示す（膵管細胞癌）。図は、膵管細胞癌における膜染色を示し、8/8の腫瘍が有意の染色を示す。

【図12】図12は、腎組織についての免疫組織化学の結果を示す（腎細胞癌）。5/5の標本が有意の染色を示した。

【図13】図13は、膀胱組織についての免疫組織化学の結果を示す（正常および癌）。正常膀胱組織は1+の強度で染色し、一方浸潤性膀胱腫瘍組織は3+の強度で染色した。3/4の腫瘍が有意の染色を示した。

【図14】図14は、tm-PTP 特異的siRNAがDU-145ヒト癌細胞系における増殖を阻害することを示す。

【図15】図15は、tm-PTP 特異的siRNAによる、NIH/3T3/tm-PTP およびRat-1/tm-PTP 安定細胞系におけるtm-PTP タンパク質のノックダウンを示す。

【図16】図16は、Rat-1細胞系の軟寒天アッセイの結果を示す。

【図17】図17は、Rat-1細胞系の腫瘍発生能アッセイの結果を示す。

【図18】図18は、tm-PTP が、NIH/3T3およびRat-1細胞においてTyr-529上のSrcを脱リン酸化することを示す。

【図19】図19は、tm-PTP がインビボでホモタイプ相互作用を形成することを示す。

【図20】図20は、tm-PTP システイン突然変異型が還元条件下で単量体として発現されること（図20A）、およびtm-PTP システイン突然変異型が非還元条件下で二量体を形成したこと（図20B）を示す。

【図21】図21は、A24C tm-PTP システイン突然変異型に関するホスファターゼ活性分析の結果を示す。

【図22】図22は、Q26C tm-PTP システイン突然変異型に関するホスファターゼ活性分析の結果を示す。

【図23-1】図23は、A498腎癌細胞系（図23Aおよび23B）およびHs700T膵癌細胞系（図23C）におけるsiRNA阻害分析の結果を示す。

【図23-2】図23は、A498腎癌細胞系（図23Aおよび23B）およびHs700T膵癌細胞系（図23C）におけるsiRNA阻害分析の結果を示す。

10

20

30

40

【図 1】

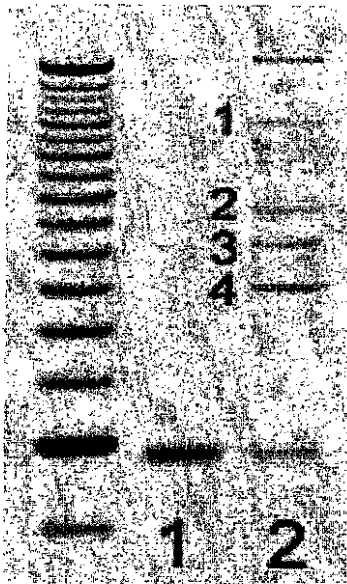


Figure 1

【図 3】

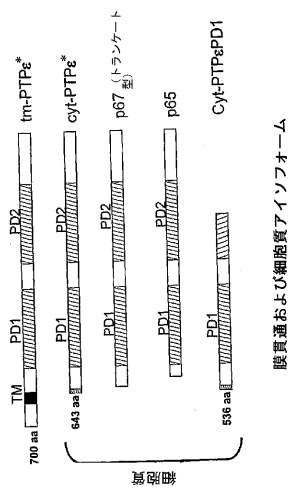


Figure 3

【図 2】

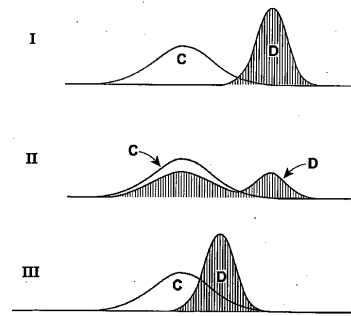


Figure 2

【図 4】

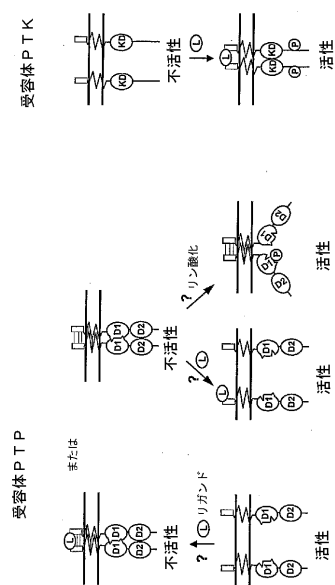


Figure 4A

Figure 4B



【図 5】

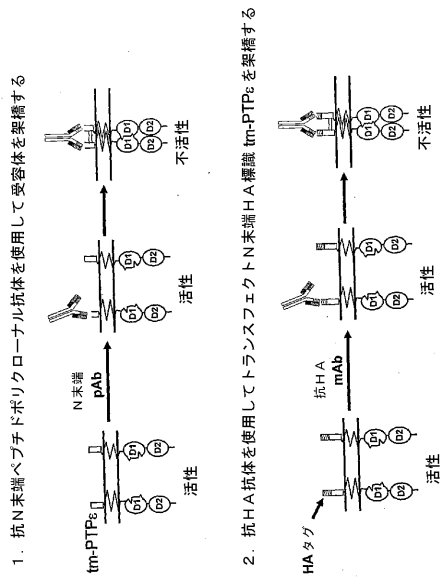


Figure 5

【図 6】

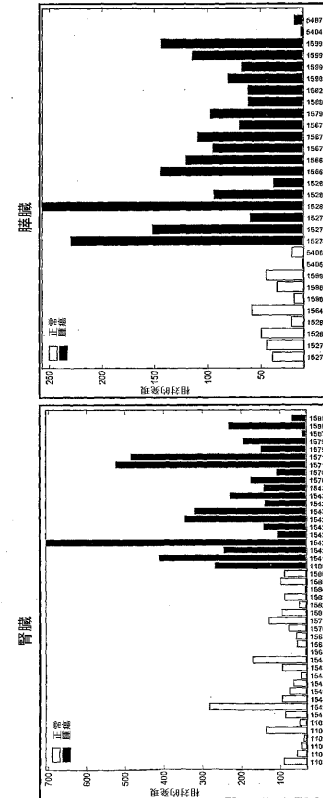


Figure 6

【図 7】

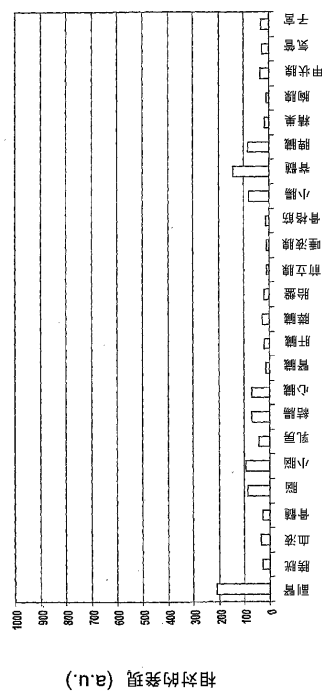


Figure 7

【図 8】

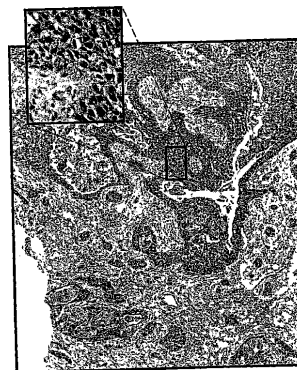


Figure 8

【図 9】



Figure 9

【図 10】



Figure 10

【図 11】



Figure 11

【図 12】

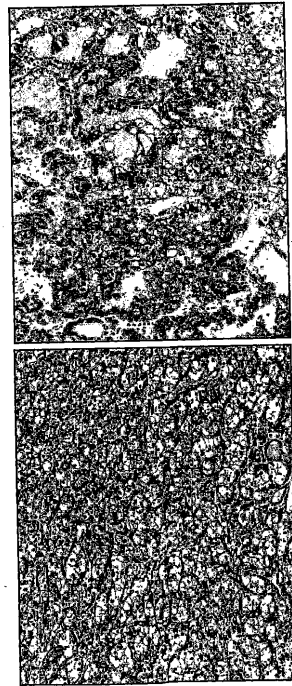


Figure 12

【図 13】

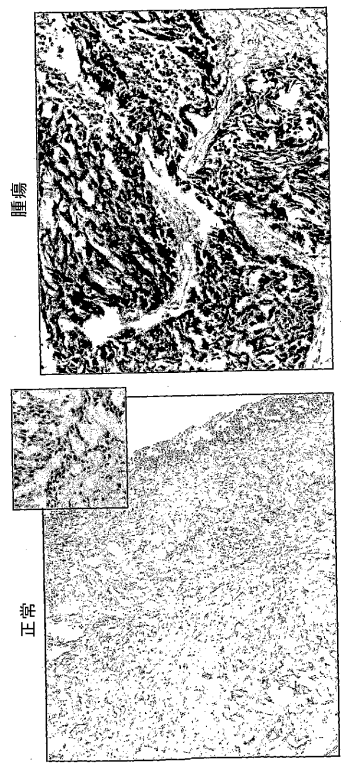


Figure 13

【図 14】

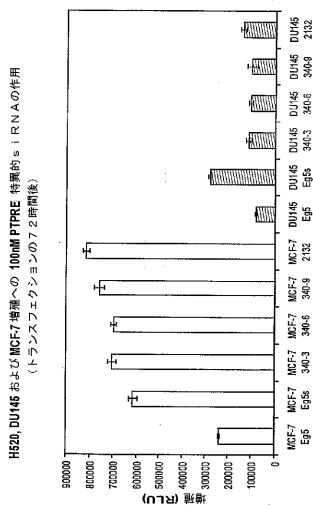


Figure 14

【図 15】

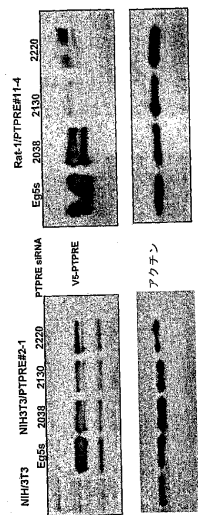


Figure 15

【図 16】

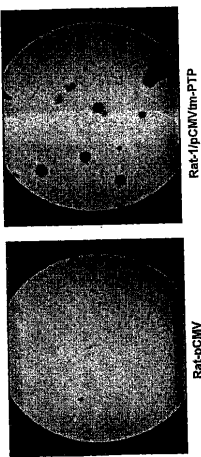


Figure 16

【図 17】

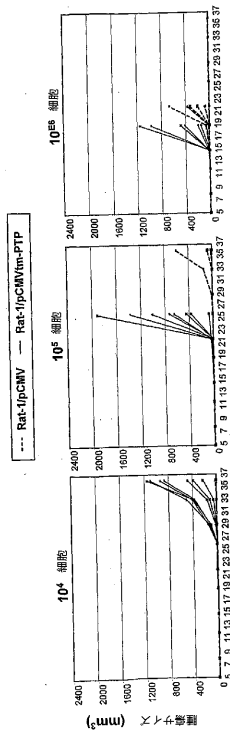


Figure 17

【図 18】

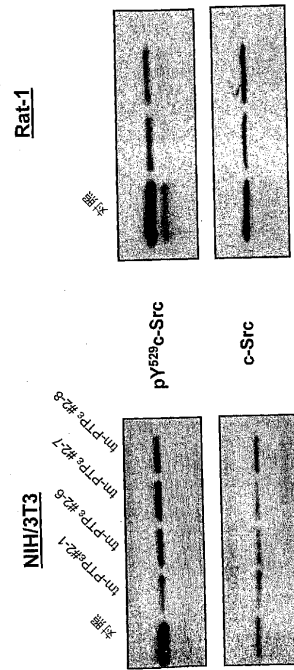


Figure 18

【図 19】

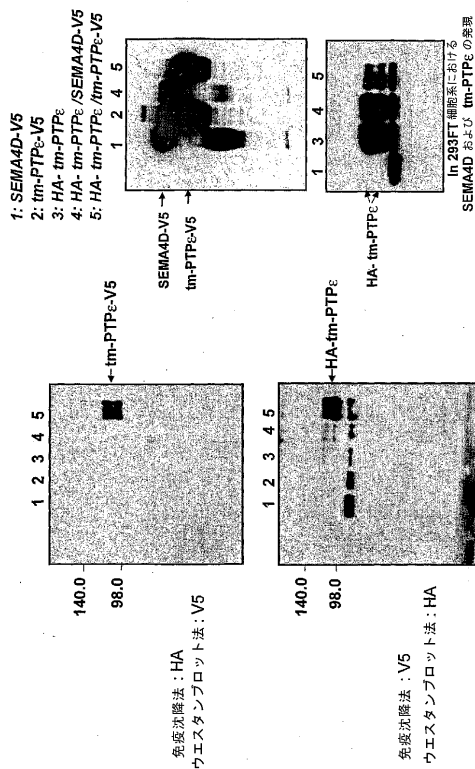


Figure 19

【図 20】

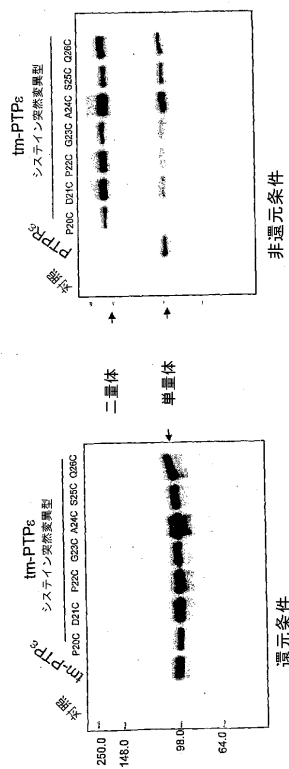
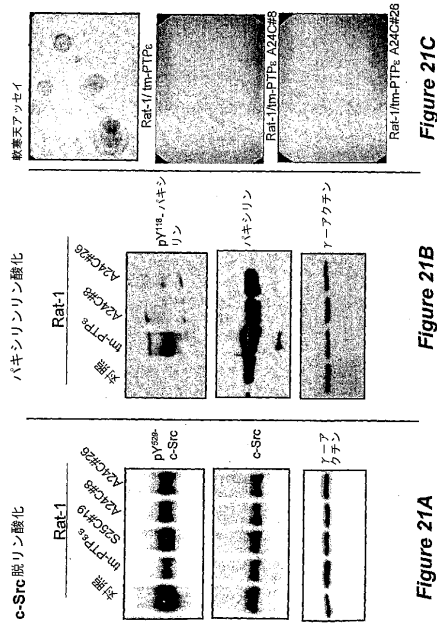


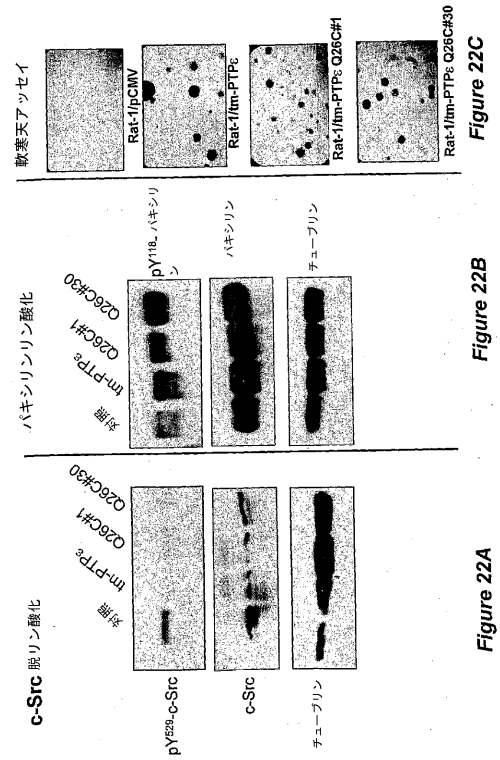
Figure 20A

Figure 20B

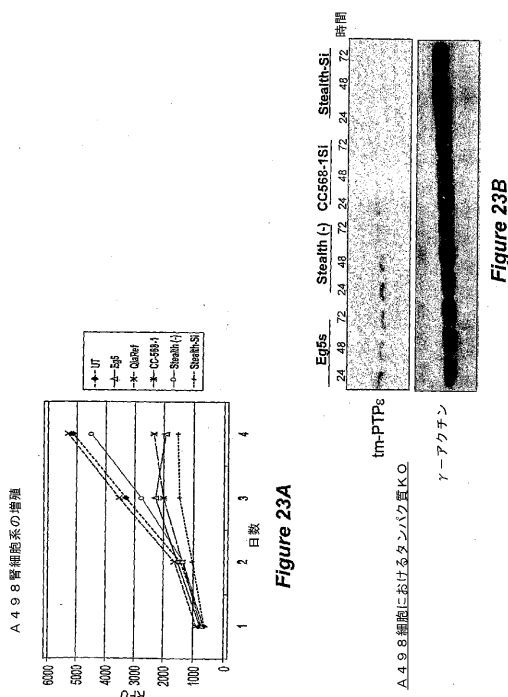
【図 2 1】



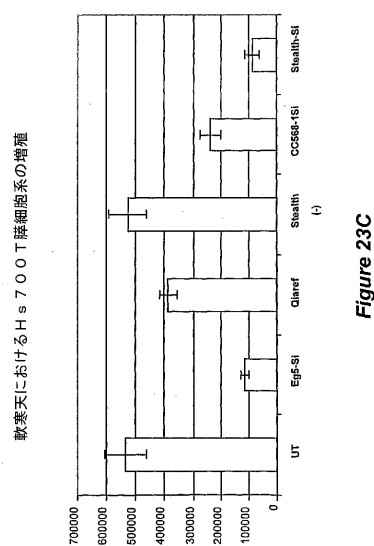
【図 2 2】



【図 2 3 - 1】



【図 2 3 - 2】



【配列表】

2008535491000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成20年3月7日(2008.3.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2008535491000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |  |
|---|--|
| International application No<br>PCT/US2006/012863   |  |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER<br>INV. C12Q1/68  |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |  |
| B. FIELDS SEARCHED<br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C12Q   |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PAJ, WPI Data  |  |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  |  |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   |
|   | Relevant to claim No.  |
| X   | ELSON A ET AL: "Protein tyrosine phosphatase epsilon cytoplasmic isoform (Fragment)"<br>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,<br>vol. 270, no. 44,<br>3 November 1995 (1995-11-03), pages<br>26116-26122, XP002310973 |
| Y   | page 26117, column 1, lines 56-63<br>page 26117, column 2, lines 18-39<br>page 26121, column 2, lines 3-5<br>figures 1-4,7   |
|   | 1-7,9,<br>10,12,<br>13,<br>35-43,<br>57,58   |
|   | 46-56  |
|   | -----<br>-/--  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.   |  |
| * Special categories of cited documents :<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |  |
| Date of the actual completion of the international search   | Date of mailing of the international search report   |
| 6 November 2006   | 01/12/2006   |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL-2200 LB Dordrecht  | Authorized officer   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/012863

| G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |  |
|--|---|--|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.                      |
| X  | <p>US 2003/054387 A1 (CHEN ET AL.)<br/>20 March 2003 (2003-03-20)</p> <p>paragraphs [0026], [0051], [0052],<br/>[0054], [0066], [0067]; claim 15<br/>table III</p>  | <p>1-7,9,<br/>10,<br/>12-22,<br/>29-35</p> |
| X  | <p>US 2003/225026 A1 (ELSON A. AND LEDER P.)<br/>4 December 2003 (2003-12-04)</p>   | <p>15-27,<br/>29,<br/>32-34,<br/>43-45</p> |
| Y  | <p>paragraphs [0002], [0009], [0011],<br/>[0012], [0017], [0025], [0078]</p>  | <p>46-56,<br/>59,60</p>                    |
| Y  | <p>TOLEDANO-KATCHALSKI HILA ET AL:<br/>"Dimerization in vivo and inhibition of<br/>the nonreceptor form of protein tyrosine<br/>phosphatase epsilon."<br/>August 2003 (2003-08), MOLECULAR AND<br/>CELLULAR BIOLOGY, VOL. 23, NR. 15, PAGE(S)<br/>5460-5471 , XP002401010<br/>ISSN: 0270-7306<br/>page 5460, column 1, paragraph 2<br/>figure 2</p> | <p>59,60</p>                               |



International Application No. PCT/US2006 /012863

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## Continuation of Box II.1

1- Although claims 18-19, 21-29 are directed to a method for treating cancer in a patient, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2- Although claims 46-49 and 54-56 are directed to a method for treating a subject suffering from bladder, renal or pancreatic cancer, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

3- Although claims 57-60 are directed to a method for screening an antibody comprising a step practised on the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.

## Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 18-19, 21-27, 29, 46-49, 54-60

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

## Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 28

Present claim 28 lacks clarity because its formulation does not have any meaning which could allow a meaningful search. In the case wherein the said claim would have to be read as "a method according to any one of claims 18-26, wherein the patient is receiving radiotherapy or chemotherapy", the scope of a such claim would fall within the scope of the present claim 27. A such claim 28 would therefore appear to be superfluous.

The applicant's attention is drawn to the fact that 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. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO. (See EPO Guidelines, Part A, 5.1.1)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2006/012863

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

International Application No. PCT/US2006 /012863

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

overcome.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2006/012863**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 18-19, 21-27, 29, 46-49, 54-60  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.: 28  
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 III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

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/US2006/012863

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 2003054387                             | A1                  | 20-03-2003                 | NONE                |
| US 2003225026                             | A1                  | 04-12-2003                 | NONE                |

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl.               | F I              | テーマコード (参考) |
|---------------------------|------------------|-------------|
| G 0 1 N 33/50 (2006.01)   | G 0 1 N 33/15 Z  | 4 C 0 8 6   |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01)  | G 0 1 N 33/50 Z  | 4 H 0 4 5   |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01)   | A 6 1 K 39/395 E |             |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01)   | A 6 1 K 45/00    |             |
| A 6 1 K 31/7088 (2006.01) | A 6 1 P 35/00    |             |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01)   | A 6 1 K 31/7088  |             |
| A 6 1 K 38/00 (2006.01)   | A 6 1 K 48/00    |             |
| A 6 1 K 31/7105 (2006.01) | A 6 1 K 37/02    |             |
| A 6 1 P 13/10 (2006.01)   | A 6 1 K 31/7105  |             |
| A 6 1 P 13/12 (2006.01)   | A 6 1 K 39/395 T |             |
| A 6 1 P 1/18 (2006.01)    | A 6 1 P 13/10    |             |
| A 6 1 P 11/00 (2006.01)   | A 6 1 P 13/12    |             |
| A 6 1 P 15/00 (2006.01)   | A 6 1 P 1/18     |             |
| A 6 1 P 13/08 (2006.01)   | A 6 1 P 11/00    |             |
| A 6 1 P 1/04 (2006.01)    | A 6 1 P 15/00    |             |
|                           | A 6 1 P 13/08    |             |
|                           | A 6 1 P 1/04     |             |

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

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ファニディ, アブダラ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7, インテレクチュアル プロパティー - アール 4 4 0

(72)発明者 ブーハー, ロバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7, インテレクチュアル プロパティー - アール 4 4 0

(72)発明者 レイ, アルバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7, インテレクチュアル プロパティー - アール 4 4 0

(72)発明者 チェ, クリスティン

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 0 4 8, リバティービル, セント ウィリアム ドライブ 1 3 2 1

F ターム(参考) 2G045 AA26 AA40 BB20 CB01 DA12 DA20 DA36 DA37 DA78 FB01

FB02 FB03

4B024 AA12 CA09 HA12

|       |      |      |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 4B063 | QA01 | QA18 | QA19  | QQ02  | QQ53  | QQ79  | QQ96  | QR08  | QR32  | QR42  |
|       | QR48 | QR55 | QR62  | QS25  | QS33  | QS34  | QX02  |       |       |       |
| 4C084 | AA02 | AA03 | AA13  | AA19  | BA44  | MA17  | MA22  | MA23  | MA31  | MA35  |
|       | MA37 | MA38 | MA41  | MA43  | MA44  | MA52  | MA55  | MA56  | MA59  | MA60  |
|       | MA63 | MA66 | ZA591 | ZA592 | ZA661 | ZA662 | ZA811 | ZA812 | ZB261 | ZB262 |
| 4C085 | AA13 | AA14 | BB01  | BB31  | CC22  | CC23  | EE01  | EE03  | GG01  | GG08  |
|       | GG10 |      |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 4C086 | AA01 | AA02 | EA16  | MA01  | MA02  | MA04  | NA14  | ZA59  | ZA66  | ZA81  |
|       | ZB26 |      |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 4H045 | AA11 | BA10 | CA40  | DA76  | EA28  | EA51  | FA74  |       |       |       |