(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3682926号

(P3682926)

(45)発行日　平成17年8月17日(2005.8.17)　(24)登録日　平成17年6月3日(2005.6.3)

(51)Int.Cl.[7]	F I	
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA
A01K 67/027	A01K 67/027	
A61K 39/395	A61K 39/395	H
A61K 48/00	A61K 48/00	
C07K 14/47	C07K 14/47	

請求項の数 97　(全 63 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平6-510494
(86)(22)出願日　平成5年10月27日(1993.10.27)
(65)公表番号　特表平8-504323
(43)公表日　平成8年5月14日(1996.5.14)
(86)国際出願番号　PCT/CA1993/000439
(87)国際公開番号　WO1994/010303
(87)国際公開日　平成6年5月11日(1994.5.11)
審査請求日　平成12年10月25日(2000.10.25)
(31)優先権主張番号　07/966,923
(32)優先日　平成4年10月27日(1992.10.27)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　08/029,340
(32)優先日　平成5年3月8日(1993.3.8)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
クイーンズ　ユニバーシティ　アット　キングストン
カナダ国，オンタリオ　ケー７エル　３エヌ６，キングストン（番地なし）
(74)代理人
弁理士　清水　初志
(74)代理人
弁理士　橋本　一憲
(72)発明者　ディーリー，ロジャー　ジー.
カナダ国，オンタリオ　ケー７ブイ　５イー２，キングストン，カートライト　ポイント（番地なし）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】多薬物耐性遺伝子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列番号：１に示すヌクレオチド配列に対して高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸であって、前記核酸は、細胞中で発現される場合、薬物感受性哺乳類細胞に多薬物耐性を付与し、前記多薬物耐性がＰ－糖タンパク質仲介多薬物耐性を逆転する化学的感作物質により実質的に逆転されないタンパク質をコードする、核酸。

【請求項２】

配列番号：２に示されるアミノ酸配列を含んで成るタンパク質と少なくとも90％同一性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んで成る、請求の範囲第１項記載の単離された核酸。

【請求項３】

前記タンパク質が配列番号：２に示すアミノ酸配列を含む、請求の範囲第２項記載の単離された核酸。

【請求項４】

配列番号：１に示すヌクレオチド配列又は該ヌクレオチド配列の４％までが塩基の欠失、置換及び／又は付加により変化しているヌクレオチド配列を含んで成る、請求の範囲第１項記載の単離された核酸。

【請求項５】

配列番号：１に示すヌクレオチド配列のコード領域を含んでなる請求の範囲第１項記載の

単離された核酸。
【請求項６】
式
Ｖ－Ｗ－Ｘ－Ｙ－Ｚ
式中Ｖは配列番号：２の１～660のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基であり、Ｗは配列番号：２の661～810のアミノ酸残基と少なくとも９０％同一性のヌクレオチド結合性折りたたみのアミノ酸残基であり、Ｘは配列番号：２の811～1309のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基であり、Ｙは配列番号：２の1310～1469のアミノ酸残基と少なくとも９０％同一性のヌクレオチド結合性折りたたみのアミノ酸残基であり、そしてＺは配列番号：２の1470～1531のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基である、
により表されるアミノ酸配列を含んでなるタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する、単離された核酸であって、前記タンパク質は、細胞中で発現される場合、薬物感受性哺乳類細胞に多薬物耐性を付与し、前記多薬物耐性がＰ－糖タンパク質仲介多薬物耐性を逆転する化学的感作物質により実質的に逆転されない、核酸。
【請求項７】
請求の範囲第４項記載の核酸の一部に対してアンチセンスであり、該アンチセンス配列が前記核酸の発現を阻害する、少なくとも50ヌクレオチドの長さを有する単離された核酸又はオリゴヌクレオチド。
【請求項８】
核酸のコード領域に対してアンチセンスである、請求の範囲第７項記載の単離された核酸又はオリゴヌクレオチド。
【請求項９】
核酸の非コード領域に対してアンチセンスである、請求の範囲第７項記載の単離された核酸又はオリゴヌクレオチド。
【請求項１０】
配列番号：１に示すヌクレオチド配列を有する核酸の一部に対してアンチセンスである、請求の範囲第７項記載の少なくとも50ヌクレオチドの長さを有する単離された核酸又はオリゴヌクレオチド。
【請求項１１】
配列番号：１に示すヌクレオチド配列を有する核酸のコード領域に対してアンチセンスである、請求の範囲第10項記載の単離された核酸又はオリゴヌクレオチド。
【請求項１２】
配列番号：１に示すヌクレオチド配列を有する核酸の非コード領域に対してアンチセンスである、請求の範囲第10項記載の単離された核酸又はオリゴヌクレオチド。
【請求項１３】
請求の範囲第１項～第12項のいずれか１項記載の核酸および前記核酸に作用可能に連結された調節配列を含んでなる、宿主細胞の形質転換に適当な組換え発現ベクター。
【請求項１４】
配列番号：１に示すヌクレオチド配列を有するDNA分子および前記DNA分子に作用可能に連結された調節配列を含んでなる、宿主細胞の形質転換に適当な組換え発現ベクター。
【請求項１５】
前記DNA分子が調節配列に作用可能に連結しており、配列番号：１に示すヌクレオチド配列に対してアンチセンスであるRNA分子の発現を可能とする、請求の範囲第13項又は第14項記載の組換え発現ベクター。
【請求項１６】
請求の範囲第13項、第14項又は第15項記載の組換え発現ベクターを含む形質転換体宿主細胞。
【請求項１７】
形質転換の前に薬物感受性である請求の範囲第16項記載の形質転換体宿主細胞。
【請求項１８】

造血幹細胞又は心筋細胞である請求の範囲第16項記載の形質転換体宿主細胞。
【請求項１９】
請求の範囲第13項又は第14項記載の組換え発現ベクターを含む形質転換体宿主細胞を適当な培地の中で多薬物耐性関連タンパク質が形成するまで培養し、そしてタンパク質を単離することを含んでなる、配列番号：２に示すアミノ酸配列を含んでタンパク質に対して少なくとも90％の同一性を有する単離された多薬物耐性関連タンパク質を製造する方法。
【請求項２０】
配列番号：１に示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸に対して高いストリンジェンシーの条件下にハイブリダイズする核酸によりコードされている単離されたタンパク質であって、前記タンパク質が、細胞中で発現される場合、薬物感受性哺乳類細胞に多薬物耐性を付与し、前記多薬物耐性がＰ－糖タンパク質仲介多薬物耐性を逆転する化学的感作物質により実質的に逆転されない、タンパク質。
【請求項２１】
配列番号：２に示されるアミノ酸配列を含んで成るタンパク質と少なくとも90％同一性を有する、請求の範囲第20項記載の単離されたタンパク質。
【請求項２２】
配列番号：２に示すアミノ酸配列を含んでなるか、又は配列番号：１に示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸によりコードされている、請求の範囲第20項または21項記載の単離されたタンパク質。
【請求項２３】
免疫原性である請求の範囲第22項記載の単離されたタンパク質、又は免疫原性であり、少なくとも12アミノ酸の長さを有し、配列番号：２の661から810までのアミノ酸残基に対応するヌクレオチド結合性折りたたみに含まれず、且つ配列番号：２の1310から1469までのアミノ酸残基に対応するヌクレオチド結合性折りたたみに含まれない、該単離されたタンパク質の一部。
【請求項２４】
請求の範囲第20項または第21項記載のタンパク質のエピトープに対して特異的な抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号：２の661から810までのアミノ酸残基に対応するヌクレオチド結合性折りたたみ以外且つ配列番号：２の1310から1469までのアミノ酸残基に対応するヌクレオチド結合性折りたたみ以外のタンパク質の部分に結合する抗体もしくはその抗原結合断片。
【請求項２５】
モノクローナル抗体である請求の範囲第24項記載の抗体またはその抗原結合断片。
【請求項２６】
検出可能な物質に連結されている請求の範囲第25項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。
【請求項２７】
前記検出可能な物質が、蛍光性物質、酵素もしくは放射性物質である、請求の範囲第26項記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。
【請求項２８】
毒性または治療活性を有する物質に連結されている請求の範囲第25項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。
【請求項２９】
配列番号：２に示すアミノ酸配列を有するタンパク質のエピトープに対して特異的な抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号：２の661から810までのアミノ酸残基に対応するヌクレオチド結合性折りたたみ以外且つ配列番号：２の1310から1469までのアミノ酸残基に対応するヌクレオチド結合性折りたたみ以外のタンパク質の部分に結合する抗体もしくはその抗原結合断片。
【請求項３０】
モノクローナル抗体である請求の範囲第29項記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項３１】
検出可能な物質に連結されている請求の範囲第30項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。
【請求項３２】
前記検出可能な物質が、蛍光性物質、酵素もしくは放射性物質である、請求の範囲第31項記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。
【請求項３３】
毒性または治療活性を有する物質に連結されている請求の範囲第30項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。
【請求項３４】
請求の範囲第25項、第28項、第30項または第33項に記載のモノクローナル抗体を医薬として許容されるキャリヤー中に含んで成る、多薬物耐性細胞の薬物耐性を阻害するための医薬組成物。
【請求項３５】
配列番号：１に示されるヌクレオチド配列と高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む遺伝子が、相同組換えにより変更されており、請求の範囲第20項記載のタンパク質を発現できないことを特徴とする非ヒトトランスジェニックノックアウト動物。
【請求項３６】
配列番号：２に示されるアミノ酸配列と少なくとも90％同一性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む遺伝子が、相同組換えにより変更されており、請求の範囲第21項記載のタンパク質を発現できないことを特徴とする非ヒトトランスジェニックノックアウト動物。
【請求項３７】
マウスである請求の範囲第35項または36項記載の非ヒトトランスジェニックノックアウト動物。
【請求項３８】
請求の範囲第20項または21項記載のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離された核酸分子によりトランスフェクトされた細胞を含む非－ヒトトランスジェニック動物。
【請求項３９】
実験室動物としてさらに定義される、請求の範囲第35、36項または第38項記載の非－ヒトトランスジェニック動物。
【請求項４０】
前記核酸分子が、センス配向で発現され、そして前記動物が請求の範囲第20項または21項記載のタンパク質を発現しそして多薬物耐性表現型を示し、この表現型はＰ－糖タンパク質仲介多薬物耐性を逆転する化学的感作物質により実質的に逆転されない、請求の範囲第38項または第39項記載の非－ヒトトランスジェニック動物。
【請求項４１】
前記核酸分子が、アンチセンス配向で発現され、これにより前記タンパク質の内因性発現又は活性が、少なくとも、前記核酸分子を発現する前記動物の細胞中で阻害される、請求の範囲第38項または第39項記載の非－ヒトトランスジェニック動物。
【請求項４２】
腫瘍細胞を配列番号：２に示すアミノ酸配列を有するタンパク質に結合する抗体と接触させ、ここで前記抗体は検出可能な物質で標識化されており、そして腫瘍細胞に結合した検出可能な物質と検出することを含んでなる、多薬物耐性腫瘍細胞を同定する方法。
【請求項４３】
前記抗体が、モノクローナル抗体である請求の範囲第42項記載の方法。
【請求項４４】
前記検出可能な物質が蛍光性物質、酵素および放射性物質から成る群より選択される、請

求の範囲第42項又は第43項記載の方法。
【請求項４５】
インビトロにおいて多薬物耐性細胞の薬剤耐性を阻害する方法において、請求の範囲第20項または21項記載のタンパク質の発現又は活性を、請求の範囲第７項に記載の単離された核酸分子もしくはオリゴヌクレオチド又は請求の範囲第24項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片を用いて阻害することを含んで成る方法。
【請求項４６】
前記タンパク質の活性が該タンパク質に結合する抗体により阻害される請求の範囲第45項記載の方法。
【請求項４７】
前記タンパク質に結合する抗体がモノクローナル抗体又はその抗原結合断片である請求の範囲第46項記載の方法。
【請求項４８】
前記タンパク質をコードする遺伝子配列にハイブリダイズすることができる単離された核酸分子またはオリゴヌクレオチドを前記多薬物耐性細胞に導入することにより、前記タンパク質の発現を阻害する、請求の範囲第45項記載の方法。
【請求項４９】
前記遺伝子配列がRNAである、請求の範囲第48項記載の方法。
【請求項５０】
前記単離された核酸分子が、前記タンパク質をコードする遺伝子配列のセンス鎖に相補的であるオリゴヌクレオチド又は核酸分子としてさらに定義される、請求の範囲第48項又は第49項記載の方法。
【請求項５１】
前記核酸又はオリゴヌクレオチド分子が、前記タンパク質をコードする遺伝子の制御領域の配列に対して相補的である、請求の範囲第48項～第50項のいずれか１項記載の方法。
【請求項５２】
前記核酸又はオリゴヌクレオチド分子が、前記タンパク質をコードする遺伝子の転写開始領域の配列に対して相補的である、請求の範囲第48項～第50項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５３】
前記核酸又はオリゴヌクレオチド分子が、前記タンパク質をコードするmRNAの５′－又は３′－非翻訳領域の配列に対して相補的である、請求の範囲第48項～第50項のいずれか１項記載の方法。
【請求項５４】
前記核酸又はオリゴヌクレオチド分子が翻訳開始コドンを含む領域に相補的である、請求の範囲第48項～第50項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５５】
前記核酸又はオリゴヌクレオチド分子が、細胞中で該核酸又はオリゴヌクレオチドの発現を許容する組換え発現ベクター中に導入される、請求の範囲第48項～第54項のいずれか１項記載の方法。
【請求項５６】
前記核酸又はオリゴヌクレオチド分子が、少なくとも１つの供給ビヒクル（derivery vehicle）、又はウィルスベクター、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、共沈澱、リポゾーム、エアロゾル供給及び洗浄（lavage）から選択された技法を用いて細胞に導入される、請求の範囲第48項～第55項のいずれか１項記載の方法。
【請求項５７】
前記多薬物耐性細胞が腫瘍細胞である、請求の範囲第45項～第56項のいずれか１項記載の方法。
【請求項５８】
前記細胞を、阻害剤の非存在下では該細胞が耐性を示す療法剤に暴露することをさらに含

んで成る、請求の範囲第45項～第57項のいずれか１項記載の方法。
【請求項５９】
療法剤に前記細胞を暴露することにより前記細胞を殺す、請求の範囲第58項に記載の方法。
【請求項６０】
請求の範囲第20項または21項記載のタンパク質を発現する多薬物耐性細胞を、前記発現されたタンパク質に特異的に結合することができ、毒性または療法活性を有する物質で標識化された抗体と接触させることを含んでなる、インビトロにおいて、前記多薬物耐性細胞を殺す方法。
【請求項６１】
前記抗体がモノクローナル抗体である、請求の範囲第60項記載の方法。
【請求項６２】
前記抗体が、前記タンパク質を発現する細胞に及び毒性又は療法活性を有する物質に結合することができる二重特異性抗体である、請求の範囲第60項記載の方法。
【請求項６３】
前記抗体が、前記タンパク質を発現する細胞に結合することができる第一モノクローナル抗体及び毒性又は療法活性を有する物質に結合することができる第二モノクローナル抗体を含んで成る４量体抗体であり、前記第一及び第二モノクローナル抗体が、第一の動物種からのものであり、該第一の動物種の前記第一及び第二モノクローナル抗体のFc断片に対して向けられた第二動物種の２つのモノクローナル抗体と接合して環状４量体を形成している、請求の範囲第60項記載の方法。
【請求項６４】
前記多薬物耐性細胞が腫瘍細胞である、請求の範囲第60項～第63項のいずれか１項記載の方法。
【請求項６５】
請求の範囲第20項または21項記載のタンパク質をコードする核酸分子によりトランスフェクションして前記細胞に薬物耐性を付与することを含んでなる、インビトロにおいて、薬物への暴露による細胞障害性から前記細胞を保護する方法。
【請求項６６】
前記核酸分子が、高いストリンジエンシー条件下で配列番号：１又は相補的ヌクレオチド配列とハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列又はその相補的配列を含んで成る、請求の範囲第65項記載の方法。
【請求項６７】
前記核酸分子が組換え発現ベクターである請求の範囲第65項または第66項記載の方法。
【請求項６８】
前記細胞が造血幹細胞または心筋細胞である請求の範囲第65項～第67項のいずれか１項記載の方法。
【請求項６９】
ａ）請求の範囲第20項または21項記載のタンパク質をコードする核酸によりトランスフェクトされた細胞と共に療法剤を試験されるべき物質の存在下及びその非存在下でインキュベートし、ここで前記タンパク質は細胞に該療法剤に対する耐性を付与し；
ｂ）試験すべき物質の存在または不存在下にインキュベートした場合、療法剤に対する細胞の耐性を決定し；そして
ｃ）前記物質の不存在下にインキュベートしたときの療法剤に対する細胞の耐性に比較して、前記物質の存在下にインキュベートしたときの療法剤に対する細胞の耐性を減少する前記物質の能力により療法剤の化学的感作物質である物質を同定する、
療法剤の化学的感作物質である物質を同定する方法。
【請求項７０】
前記細胞を核酸でトランスフェクトする前に細胞が療法剤に対して感受性である請求の範囲第69項記載の方法。

【請求項７１】
前記核酸が配列番号：１に示すヌクレオチド配列からなる組換え発現ベクターを含んでなる請求の範囲第69項または第70項記載の方法。
【請求項７２】
前記療法剤がアントラサイクリン、エピポドフィロトキシンおよびニチニチソウ（Vinca）アルカロイドから成る群より選択される請求の範囲第69項、第70項又は第71項記載の方法。
【請求項７３】
前記細胞が非ヒトトランスジェニック動物であり、そして療法剤および試験すべき物質を非ヒトトランスジェニック動物に投与することによって、療法剤および試験すべき物質を細胞とインキュベートする請求の範囲第69項記載の方法。
【請求項７４】
請求の範囲第20項または21項記載のタンパク質をコードする核酸によりトランスフェクトされた細胞と試験されるべき物質とをインキュベートし、ここで前記タンパク質は細胞に対して多薬物耐性を付与し、そして前記多薬物耐性細胞に対する前記物質の細胞毒性を決定することを含んで成る、多薬物耐性細胞に対して細胞毒性である物質を同定するための方法。
【請求項７５】
前記多薬物耐性細胞を核酸でトランスフェクトする前に前記細胞が多薬物感受性である請求の範囲第74項記載の方法。
【請求項７６】
前記核酸が配列番号：１に示すヌクレオチド配列を含んでなる組換え発現ベクターを含んでなる請求の範囲第74項記載の方法。
【請求項７７】
前記細胞が非ヒトトランスジェニック動物であり、そして試験すべき物質を非ヒトトランスジェニック動物に投与することによって試験すべき物質を細胞とインキュベートする請求の範囲第74項記載の方法。
【請求項７８】
腫瘍細胞の試料とインキュベートするための配列番号：２に示すアミノ酸配列を有するタンパク質に結合する抗体；タンパク質に結合した抗体、未反応のタンパク質又は未結合の抗体を検出する手段；前記試料中のタンパク質の量を決定する手段；および前記試料中のタンパク質の量を標準と比較する手段；を含んでなる多薬物耐性腫瘍細胞を同定とする診断キット。
【請求項７９】
前記抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第78項記載の診断キット。
【請求項８０】
腫瘍細胞の試料からのmRNAとハイブリダイゼーションするための配列番号：１に示す配列に対して相補性のヌクレオチドのプローブ；mRNAに結合したヌクレオチドのプローブを検出する手段；前記試料中のmRNAの量を決定する手段；および前記試料中のmRNAの量を標準と比較する手段；を含んでなる多薬物耐性腫瘍細胞を同定する診断キット。
【請求項８１】
請求の範囲第20項または21項記載のタンパク質の発現又は活性を阻害することにより、多薬物耐性細胞の薬物耐性を阻害するための医薬組成物であって、請求の範囲第７項に記載の単離された核酸分子もしくはオリゴヌクレオチド又は請求の範囲第24項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片を含む、組成物。
【請求項８２】
前記タンパク質の活性が該タンパク質に結合する抗体により阻害される請求の範囲第81項記載の医薬組成物。
【請求項８３】
前記タンパク質に結合する抗体がモノクローナル抗体又はその抗原結合断片である請求の

範囲第82項記載の医薬組成物。
【請求項８４】
モノクローナル抗体又はその抗原結合断片が毒性または療法活性を有する物質に結合している、請求の範囲第83項記載の医薬組成物。
【請求項８５】
前記タンパク質をコードする遺伝子配列にハイブリダイズすることができる単離された核酸分子またはオリゴヌクレオチドを含む、請求の範囲第81項記載の医薬組成物。
【請求項８６】
前記遺伝子配列がRNAである、請求の範囲第85項記載の医薬組成物。
【請求項８７】
前記単離された核酸分子が、前記タンパク質をコードする遺伝子配列のセンス鎖に相補的であるオリゴヌクレオチド又は核酸分子としてさらに定義される、請求の範囲第85項又は第86項記載の医薬組成物。
【請求項８８】
前記核酸又はオリゴヌクレオチド分子が、前記タンパク質をコードする遺伝子の制御領域の配列に対して相補的である、請求の範囲第85項～第87項のいずれか１項記載の医薬組成物。
【請求項８９】
前記核酸又はオリゴヌクレオチド分子が、前記タンパク質をコードする遺伝子の転写開始領域の配列に対して相補的である、請求の範囲第85項～第87項のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項９０】
前記核酸又はオリゴヌクレオチド分子が、前記タンパク質をコードするmRNAの５′－又は３′－非翻訳領域の配列に対して相補的である、請求の範囲第85項～第87項のいずれか１項記載の医薬組成物。
【請求項９１】
前記核酸又はオリゴヌクレオチド分子が翻訳開始コドンを含む領域に相補的である、請求の範囲第85項～第87項のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項９２】
前記核酸又はオリゴヌクレオチド分子が、細胞中で該核酸又はオリゴヌクレオチドの発現を許容する組換え発現ベクター中に導入される、請求の範囲第85項～第91項のいずれか１項記載の医薬組成物。
【請求項９３】
前記核酸又はオリゴヌクレオチド分子が、少なくとも１つの供給ビヒクル（derivery vehicle）、又はウィルスベクター、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、共沈澱、リポゾーム、エアロゾル供給及び洗浄（lavage）から選択された技法を用いて細胞に導入される、請求の範囲第85項～第92項のいずれか１項記載の医薬組成物。
【請求項９４】
前記多薬物耐性細胞が腫瘍細胞である、請求の範囲第81項～第93項のいずれか１項記載の医薬組成物。
【請求項９５】
請求の範囲第１項～第６項のいずれかに記載の核酸を含み、該核酸のトランスフェクションにより薬物感受性細胞に薬物耐性を付与し、薬物への暴露による細胞障害性から前記薬物感受性細胞を保護するための薬物組成物。
【請求項９６】
核酸を組換え発現ベクターとして含む、請求の範囲第95項記載の医薬組成物。
【請求項９７】
細胞が造血幹細胞または心筋細胞である請求の範囲第95項又は第96項記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
発明の背景

多数の種類の癌は現在入手可能な薬物に初期に応答して退行することはよく知られている。しかしながら、この疾患が回帰する場合、それは変動する頻度で起こるので、処置に本来使用した薬あるいは患者に対して前に暴露しなかった薬でそれ以上の処置に対してしばしば治療しにくい。現在、この形態の多薬物耐性を表示する腫瘍をもつ患者のためになすことができることはほとんど存在しない。

多数の構造的に多様な薬物に対する耐性を癌細胞が同時に発生することができる１つのメカニズムは、Ｐ－糖タンパク質の特性決定で過去15年間にわたって明らかにされてきている。

Ｐ－糖タンパク質は、細胞膜を横切って、イオンからタンパク質までの範囲の種々の分子を輸送する働きをする膜タンパク質のスーパーファミリーの１構成員である。このスーパーファミリーは膜輸送タンパク質のATP結合性カセット（ABC）のスーパーファミリーとして知られている。概観については、C. F. Higgins, Ann. Rev. Cell Biol. 8, 67（1992）を参照のこと。例えば、化学療法薬物を輸送するＰ－糖タンパク質に加えて、この科は塩素イオンのフラックスをコントロールする膵嚢胞性線維症のトランスメンブレンコンダクタンスレギュレーター、ならびに抗マラリア薬物に対する耐性を仲介する昆虫タンパク質を包含する。Ｐ－糖タンパク質は、広い範囲の細胞障害物質および他の生体異物の細胞内蓄積を制限するエネルギー依存性外向きフラックスポンプとして作用することによって、多数の抗癌薬物に対する耐性を付与すると信じられる。Ｐ－糖タンパク質により哺乳動物細胞から排除される化合物はしばしば天然生産物型薬物であるが、他の大きい複素環式分子がまたこのポンプのための「基質」である。

種々の腫瘍型におけるＰ－糖タンパク質およびその存在の発見は、その機能をブロックしそして結局、耐性を逆転することができる化合物についての探索を刺激した。これらの発見は多数のいわゆる化学的感作物質または逆転物質の同定を生み出した。これらの化合物のいくつかはＰ－糖タンパク質のポンピング作用を阻害することによって作用するが、他の作用のメカニズムはまだ決定されていない。これらの物質の選択したグループは現在集中的に臨床研究されており、そして普通の化学療法に対する付加物としてかなりの有望性を示す。Ｐ－糖タンパク質仲介多薬物耐性を逆転することができる化学的感作物質はバラパミルおよびサイクロスポリンＡを包含する。

不都合なことには、Ｐ－糖タンパク質の過度の発現は癌の罹患率の高い形態のあるもの、例えば、肺癌における多薬物耐性の高い頻度を説明しない。西洋において、肺癌は合計の癌の死亡のほぼ30％を占める。肺の腫瘍の次の４つの組織学的カテゴリーが存在する：エピデルモイドまたは偏平上皮細胞腺癌、大細胞癌、腺癌および小細胞癌。最初の３つのカテゴリーは、集合的に非小細胞肺癌として知られており、化学療法および放射線療法に対するそれらの初期の応答において最後のものと異なる。非小細胞肺癌は開始から処置の２つの形態に対して比較的耐性である。対照的に、小細胞肺癌は、すべての肺癌の20％を占め、化学療法に対して高い初期の応答割合（制限された疾患において80～90％）を示す。しかしながら、ほとんどすべての患者はその疾患の多薬物耐性の形態をもって回帰し、そして２年の生存率は10％より低い。回帰した小細胞肺癌の患者において表示される薬物耐性のプロフィルはＰ－糖タンパク質により付与されるものに類似するが、Ｐ－糖タンパク質は関係しないように思われる。さらに、細胞培養および患者における制限された研究は、小細胞肺癌における多薬物耐性が薬物耐性腫瘍の他の種類で有望性を示す化学的感作物質、例えば、ベラパミルおよびサイクロスポリンＡに対して応答しないことを示す。

肺癌における生存率は40年間有意に改良されてきていずそして、その共通の発生のために、この疾患のための改良された治療が非常に要求されていることは明らかである。

発明の要約

本発明は、少なくとも一部分、細胞の中で発現されるとき薬物感受性哺乳動物細胞に多薬物耐性を付与しかつある種の多薬物耐性癌細胞系の中で過度に発現されるタンパク質をコードする核酸の発見に基づく。本発明の核酸は、Ｐ－糖タンパク質を過度に発現せずかつその耐性がＰ－糖タンパク質を阻害する化学的感作物質により実質的に逆転されない、多薬物耐性癌細胞系から単離された。本発明の核酸およびコードされたタンパク質は、その

核酸およびタンパク質を発現する多薬物耐性腫瘍において治療的にターゲッティングすることができる分子を表す。
本発明は、Ｐ－糖タンパク質の過度の発現に対して独立に、多薬物耐性細胞の中で過度に発現される多薬物耐性に関連するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸を提供する。このタンパク質は多薬物耐性関連タンパク質（MRPと呼ぶ）と命名された。本発明のタンパク質はアミノ酸配列がＰ－糖タンパク質と異なる。単離された核酸は、多薬物耐性でない細胞の中で発現されるとき、細胞に多薬物耐性を付与することができる。
好ましい態様において、配列番号：２に示すアミノ酸配列と実質的な配列の相同性を有するアミノ酸配列を有する。多薬物耐性に関連するタンパク質をコードする配列を有する単離された核酸が提供される。最も好ましくは、単離された核酸は配列番号：１に示すヌクレオチド配列と実質的な配列の相同性を有する配列を有する。本発明は、さらに、配列番号：１に示すヌクレオチド配列と実質的な配列の相同性を有する核酸に対してアンチセンスである単離された核酸を提供する。
本発明は、さらに、調節配列に操作的に連鎖する本発明の核酸からなる宿主細胞の形質転換のために適合する組換え発現ベクターを提供する。本発明は、また、配列番号：１に示すヌクレオチド配列に対してアンチセンスであるRNA分子の発現を可能とする調節配列に操作的に連鎖するDNA分子からなる宿主細胞の形質転換のために適合する組換え発現ベクターを提供する。
本発明は、また、本発明の核酸を利用して多薬物耐性を付与することができるタンパク質を製造する方法を提供する。この方法は、本発明の核酸および核酸に操作的に連鎖する調節配列からなる組換え発現ベクターを含む形質転換体宿主細胞を適当な培地の中で多薬物耐性タンパク質が形成するまで培養し、その後タンパク質を単離することからなる。
本発明は、さらに、タンパク質が細胞の中で発現されるとき薬物感受性細胞に多薬物耐性を付与することができ、前記耐性がＰ－糖タンパク質の化学的感作物質により逆転されない、MRPの生物学的活性を有する単離されたタンパク質を提供する。本発明の単離されたタンパク質は腫瘍細胞における多薬物耐性に関連し、そしてＰ－糖タンパク質を過度に発現することができるか、あるいはすることができない多薬物耐性細胞の中で過度に発現される。好ましい態様において、タンパク質は配列番号：２に示すアミノ酸配列と実質的な配列の相同性を有するアミノ酸配列を有する。
本発明は、さらに、本発明のタンパク質のエピトープに対して特異性の抗体を提供する。この抗体は検出可能な物質あるいは毒性または治療活性を有する物質に連結することができる。
本発明は、また、本発明のタンパク質を発現する腫瘍に、および検出可能な物質あるいは毒性または治療活性を有する物質に結合することができる二重特異性抗体を提供する。好ましくは、毒性物質は細胞障害細胞であり、そして二重特異性抗体は腫瘍細胞および細胞障害細胞を架橋し、これにより腫瘍細胞の溶解を促進することができる。本発明は、さらに、本発明のタンパク質を発現する腫瘍細胞に結合することができる第１モノクローナル抗体および検出可能な物質あるいは毒性または治療活性を有する物質に結合することができる第２モノクローナル抗体の４量体の抗体の複合体を提供し、ここで第１および第２のモノクローナル抗体は第１動物種からのものであり、前記第１動物種の抗体のFc断片に対して向けられた第２動物種の２つのモノクローナル抗体と接合して環状４量体を形成している。
抗体、二重特異性抗体または４量体の抗体の複合体は、製剤学的に許容されうる担体中の投与に適当な組成物の中に混入することができる。
本発明の抗体、二重特異性抗体および４量体の抗体の複合体を包含する、本発明のタンパク質に結合する分子は、多薬物耐性腫瘍細胞を同定する方法において、分子を検出可能な物質で標識化し、分子を腫瘍細胞と接触させ、そして腫瘍細胞に結合した検出可能な物質を検出することによって使用することができる。本発明のタンパク質に結合する分子は、さらに、MRPタンパク質の活性をブロックすることによって、細胞の多薬物耐性を阻害す

る方法において使用することができる。本発明のタンパク質に結合する分子は、さらに、毒性または治療物質に連結された分子を多薬物耐性細胞と接触させることによって、タンパク質を発現する多薬物耐性細胞を殺すために使用することができる。本発明の核酸は、細胞中の核酸によりコードされるタンパク質の発現に適当な形態の核酸で細胞をトランスフェクションし、これにより細胞に薬物耐性を付与することによって、薬物への暴露のための細胞障害性から薬物感受性細胞を保護する方法において使用することができる。

本発明の組換え分子は、本発明のタンパク質を発現する形質転換体宿主細胞を生産するために使用することができる。本発明の組換え分子は、また、トランスジェニック非ヒト動物および非ヒトノックアウト動物を生産するために使用することができる。トランスフェクションされた細胞、トランスジェニック動物およびノックアウト動物は多薬物耐性への作用について物質を試験するために使用することができる。本発明の形質転換体宿主細胞または動物を使用して、治療剤の化学的感作物質である物質を同定する方法および多薬物耐性細胞について細胞障害物質を同定する方法を提供する。

本発明は、また、多薬物耐性であり、Ｐ－糖タンパク質を過度に発現せず、そして疎水性薬物に対して実質的に耐性である細胞系に関する。この細胞系は小細胞肺癌細胞、好ましくは細胞系はNCI-H69から誘導することができる。最も好ましくは、多薬物耐性細胞系はH69AR（ATCC CRL 11351）である。復帰突然変異体の薬物感受性細胞系は、多薬物耐性細胞系から、多薬物耐性細胞系を薬物の不存在下に復帰突然変異体の薬物感受性細胞系を生産するために十分な時間の間培養することによって得ることができる。好ましくは、復帰突然変異体の薬物感受性細胞系はH69PR（ATCC CRL 11350）である。

【図面の簡単な説明】

第1A図は、本発明の多薬物耐性タンパク質の1.8kbのEcoR1 cDNA断片とハイブリダイゼーションしたH69，H69ARおよびH69PRからのポリ（A^+）RNAのノザンブロットである。

第1B図は、本発明の多薬物耐性タンパク質の1.8kbのEcoR1 cDNA断片とハイブリダイゼーションしたH69，H69ARおよびH69PRからのEcoRI消化ゲノムDNAのサザンブロット分析である。

第1C図は、本発明の多薬物耐性タンパク質の1.8kbのEcoR1 cDNA断片とハイブリダイゼーションした感受性および耐性のHeLa細胞のポリ（A^+）RNAのノザンブロットである。

第２図は、疎水性トランスメンブレン領域および引き続くヌクレオチド結合性折りたたみを含有するATP結合性カッセトのトランスポーター上科の選択した構成員に対する、本発明の多薬物耐性タンパク質の相対的類似性のクラスター分析である。

第3A図および第3B図は、ItPgpA（Lei/PgpA）の完全なアミノ酸配列と整列した本発明の多薬物耐性タンパク質の完全なアミノ酸配列である。

第3C図は、本発明の多薬物耐性タンパク質、ヒトCFTRおよびリーシュマニアItPgpAおよびヒトＰ－糖タンパク質（Hum/Mdr1）の延長されたヌクレオチド結合性領域の整列を示すダイヤグラムである。

第４図は、本発明の多薬物耐性タンパク質の0.9kbのEcoRI cDNA断片とハイブリダイゼーションした正常組織からの全体のRNAのノザンブロットである。

第５図は、中期染色体への本発明の多薬物耐性タンパク質の1.8kbのEcoRI cDNA断片の現場ハイブリダイゼーションに従う銀粒子分布を示すヒト核形のISCN誘導イディオグラムである。

第６図は、MRPトランスフェクションしたHeLa細胞の集団（T2，T5）、T5集団のクローン（T5－５）、トランスフェクションしないHeLa細胞および親発現ベース（C1）でトランスフェクションしたHeLa細胞へのドキソルビシンの相対的細胞障害性を描写するグラフである。

第7A図は、内因性MRP mRNA（ｅ）および発現ベクター誘導MRP mRNA（ｖ）とハイブリダイゼーションする４kbのMRP cDNA断片とハイブリダイゼーションしたトランスフェクションしたおよび対照のHeLa細胞からのポリ（Ａ）＋RNAのノザンブロットである。GAPDHcDNAとのハイブリダイゼーションは各レーンにおいてポリ（Ａ）＋RNAの相対量を示す。

第7B図は、発現ベクター誘導MRP mRNA（ｖ）のみに対してハイブリダイゼーションするpR

c/CMVベクターからのDNA断片とハイブリダイゼーションしたトランスフェクションしたHeLa細胞および対照細胞からのポリ（Ａ）＋RNAのノザンブロットである。GAPDHcDNAとのハイブリダイゼーションは各レーンにおいてポリ（Ａ）＋RNAの相対量を示す。
第7C図は、発現ベクター誘導体MRP mRNAおよびトランスフェクションしたHeLa細胞および内因性MRP mRNA中のタンパク質およびH69AR細胞系中のタンパク質の相対的レベルを描写するノザンブロット（MRP mRNA）およびイムノブロット（MRPタンパク質）である。
第8A図は、トポイソメラーゼII（Topo　II）アルファおよびベータmRNAについてのcDNAプローブとハイブリダイゼーションしたトランスフェクションしたHeLaおよび対照細胞からのポリ（Ａ）＋RNAのノザンブロットである。GAPDHcDNAとのハイブリダイゼーションは各レーンにおいてポリ（Ａ）＋RNAの相対量を示す。
第8B図は、アンネキシンII　cDNAについてのcDNAプローブとハイブリダイゼーションしたトランスフェクションしたHeLa細胞および対照細胞からのポリ（Ａ）＋RNAのノザンブロットである。GAPDHcDNAとのハイブリダイゼーションは各レーンにおいてポリ（Ａ）＋RNAの相対量を示す。
第９図は、MRPトランスフェクションしたHeLa細胞の集団（T2，T5）、T5集団のクローン（T5－５）、トランスフェクションしないHeLa細胞および親発現ベクター（C1）でトランスフェクションしたHeLa細胞へのVP－16、ビンクリスチンおよびシスプラチンの相対的細胞障害性を描写するグラフである。
好ましい態様の詳細な説明
多薬物耐性哺乳動物細胞系はある数の腫瘍の型から誘導され、そして獲得した耐性の研究のための生体外モデルを提供きている。これらの細胞系は、単一の天然生産物型薬物により選択されるが、細胞レベル以下の標的をもつ広い範囲の化学的に無関係の生体異物に対して交差耐性である。典型的には、これらの細胞はアントラサイクリン〔例えば、ドキソルビシン（DOX）、エピポドフィロトキシン（例えば、VP－16）およびニチニチソウ（Vinca）のアルカロイド（例えば、ビンブラスチン）〕に対して耐性であるが、代謝拮抗物質、例えば、５－フルオロウラシル、または白金含有薬物に対して耐性ではない。多薬物耐性細胞は、また、局所的麻酔物質およびステロイドホルモンを包含するある種の疎水性薬物に対して付随する感受性をしばしば示す。
多薬物耐性腫瘍細胞系における最も共通の報告された変更は、MDR1遺伝子によりエンコードされる、170kDaの原形質膜糖タンパク質、Ｐ－糖タンパク質（Ｐ－gp）の発現の増加であった。多数の腫瘍の型を表す臨床試料および細胞系を使用していくつかの実験室において実施された研究において、Ｐ－gpは、いくつかの悪性疾患において臨床的に関係するが、他のものにおいて重要であると思われないという結論が導かれた。Ｐ－gpの過度の発現は小細胞肺癌（SCLC）および非小細胞肺癌（NSCLC）の両方において頻繁には起こらない。
SCLCの実験的研究において最も広く使用される細胞系の１つは、NCI-H69（H69）である（Gazdarら、Cancer Res. 40，3502-3507（1980）（ATCC HTB 119）。この細胞系はアントラサイクリン、例えば、ダウノルビシンまたはエピルビシンおよび好ましくはDOXを使用して反復して処理され、そしてH69ARと表示する多薬物耐性細胞系を生産するために0.8μMの最終濃度に対して段階的に選択された。多薬物耐性細胞系、例えば、H69ARを生産するために使用できる方法の説明は、Cole，Cancer Chemother. Pharmacol. 17，259-263（1986）およびMirskiら、Cancer Research 47，2594-2598（1987）の中に見出される。
H69AR細胞系（ATCC CRL 11351）は、H69細胞系に比較してDOXに対して50倍耐性である。H69ARは、また、広範な種類の天然生産物型薬物に対して交差耐性である。他方において、薬物、例えば、カルボプラチン、５－フルオロウラシルおよびブレオマイシンは感受性H69および耐性H69ARの両方の細胞に対して等しく毒性である。H69AR細胞の交差耐性のパターンはＰ－gpのレベルの増加に関連する耐性に典型的であるが、それらの細胞は疎水性薬物、例えば、ステロイドまたは局所的麻酔物質に対して付随する感受性をほとんどあるいはまったく表示しないことにおいて異なる。Ｐ－gpを過度に発現する細胞系とH69ARを区別する潜在的な臨床的関連性のH69ARの他の区別する特徴は、Ｐ－gpと相互作用するベラ

パミル、サイクロスポリンＡおよび他の化学的感作物質のこれらの細胞系におけるDOX耐性を逆転する制限された能力である。Ｐ－gpの過度の発現の不存在は、H69ARが肺癌における薬物耐性の臨床的に関係するモデルを提供することを示唆する。

関係する薬物耐性細胞系H69PR（Coleら、Br J. Cancer 65, 498-502, 1992）（ATCC CRL 11350）は、H69AR細胞系を薬物、例えば、DOXの不存在下に関係する細胞系を生産するために十分な時間の間培養することによって単離された。好ましくは細胞系H69PRを薬物の不存在下に少なくとも３カ月かつ約48カ月までの間、好ましくは42カ月間培養する。

本発明の細胞系は多薬物耐性腫瘍細胞に影響を与える物質についてアッセイするために使用することができる。本発明の細胞系からの細胞を、多薬物耐性に影響を与えると疑われる被験物質とインキュベーションすることができる。細胞の薬物耐性のパターンを分析し、そして結果を対照と比較することによって、物質の作用を決定することができる。前述したように、本発明の多薬物耐性細胞系はアントラサイクリン、エピポドフィロトキシン、ニチニチソウのアルカロイドおよび他の天然生産物型薬物に対して耐性である。こうして、多薬物耐性のアゴニストまたはアンタゴニストあるいはアゴニストの作用を阻害するアンタゴニストについてスクリーニングすることができる。

本発明の態様において、多薬物耐性腫瘍細胞に対して細胞障害性が疑われる物質を同定することができる。したがって、前述の方法を使用して、多薬物耐性腫瘍の処置において有用であることができる物質を同定することができる。

実施例に記載するように、H69AR細胞系を使用してMRPと表示する多薬物耐性に関連する新規なタンパク質をコードするcDNAが同定された。DNA配列およびMRPの推定されたアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号：１および配列番号：２に示す。MRP mRNAはH69ARを包含するある種の多薬物耐性腫瘍細胞系において過度に発現される。さらに、薬物感受性哺乳動物細胞系におけるMRPタンパク質の発現はその細胞系に多薬物耐性を付与する。「MRPの生物学的活性を有する」とここにおいて記載するタンパク質は、タンパク質が哺乳動物細胞の中で発現される場合、アントラサイクリン、エピポドフィロトキシンおよびニチニチソウのアルカロイドに対する多薬物耐性を哺乳動物細胞に付与することができ、そしてこの耐性はＰ－糖タンパク質仲介多薬物耐性を逆転する化学的感作物質、例えば、ベラパミルまたはサイクロスポリンＡにより実質的に逆転されない。

細胞の性質を記載するためにここにおいて使用するとき用語「薬物耐性の」または「薬物耐性」は、適当な対照細胞に比較して増加した濃度に細胞障害性なしに耐える細胞の能力を呼ぶ。薬物への連続した暴露により薬物耐性とされた細胞のために適当な対照細胞は、薬物耐性細胞を誘導した親細胞である。細胞に薬物耐性を付与するタンパク質の細胞の中の発現により薬物耐性とされた細胞のために適当な対照細胞は、発現されたタンパク質を含まない同一細胞である。薬物への連続した暴露により薬物耐性とされた天然に見出される腫瘍細胞のために適当な対照細胞は、薬物への初期の暴露のときと同一の腫瘍細胞である。

本発明は、MRPの生物学的活性を有するタンパク質をコードする単離された核酸を提供する。好ましい態様において、核酸は配列番号：１に示すヌクレオチド配列からなるcDNAである。本発明は、さらに、MRPの生物学的活性を有するタンパク質をコードする核酸のアンチセンス核酸を提供する。本発明は、さらに、本発明の核酸およびアンチセンス核酸および本発明の組換え核酸を含有する形質転換体宿主細胞からなる組換え発現ベクターを提供する。

本発明は、MRPの生物学的活性を有する単離されたタンパク質およびこのようなタンパク質を製造する方法を提供する。好ましい態様において、MRPの生物学的活性を有する単離されたタンパク質は配列番号：２に示すアミノ酸配列からなる。配列番号：２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質は、膜輸送タンパク質のABC上科の構成員である。本発明は、さらに、本発明の単離されたタンパク質に対して特異性の抗体およびこのような抗体からなる投与に適当な組成物を提供する。本発明は、さらに、本発明の核酸を使用して生産されたトランスジェニックおよびノックアウトの非ヒト動物を提供する。

本発明は、本発明の核酸および抗体を使用して多薬物耐性を同定する方法を提供する。本

発明は、さらに、多薬物耐性細胞の多薬物耐性を阻害する方法および本発明の核酸および抗体を使用して多薬物耐性細胞を殺す方法を提供する。本発明は、さらに、本発明の組み換え宿主細胞および動物を使用して治療剤の化学的感作物質または薬物耐性細胞に対して細胞障害性である物質を同定する方法を提供する。さらに、本発明は薬物耐性腫瘍細胞を同定するための診断キットを提供する。

本発明のそれらおよび他の面を次の小区において詳細に説明する。

Ｉ．単離された核酸

本発明は、MRPの生物学的活性を有するタンパク質をコードする単離された核酸を提供する。用語「単離された」は、組み換えDNA技術により生産するとき細胞の材料または培地、あるいは化学的に合成するとき化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含有しない核酸を呼ぶ。「単離された」核酸は、また、核酸を誘導する生物中の核酸を自然にフランキングする配列（すなわち、核酸の５’および３’末端に位置する配列）を含まない。用語「核酸」はDNAおよびRNAを包含することを意図し、そして二本鎖または一本鎖のいずれであることもできる。好ましい態様において、核酸は配列番号：１に示すヌクレオチド配列からなるcDNAである。他の態様において、核酸は配列番号：１に示すヌクレオチド配列のコーディング領域からなるcDNAである。他の態様において、核酸は配列番号：２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする。

理解されるように、本発明は配列番号：１に示すヌクレオチド配列と実質的な相同性を有する核酸、あるいは配列番号：２に示すアミノ酸配列と実質的な相同性を有するコーディングタンパク質を包含する。相同性は配列の間の類似性を呼び、そして比較の目的で整列することができる各配列中の位置を比較することによって決定することができる。配列の間の類似性の程度は、配列がを共有する合致または相同位置の数の関数である。

用語「実質的な配列の相同性を有する」は、配列番号：１および配列番号：２に開示されている配列からのわずかまたは重要でない配列の変化を有するヌクレオチドおよびアミノ酸配列を意味する、すなわち、相同核酸配列を実質的に同一の方法で実際の配列と実質的に同一のポリペプチドを生産するように機能する。変化は局所的突然変異または構造的変更とみなすすることができる。タンパク質の機能に影響を与えないで、とくに置換または変更が機能的意味をもつと予測される組換え遺伝子の外側に存在する場合、それらはヌクレオチドまたはアミノ酸配列の種々の領域においてなすことができることが期待される。

配列番号：１によりコードされ、配列番号：２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質の分析は、膜スパニング領域でありかつ機能的重要性をもつと予測される12の疎水性ストレッチを明らかにする。これらのアミノ酸残基は、配列番号：２の位置99-115，137-153，175-191，365-381，444-460，466-482，555-571，591-607，969-985，1028-1044，1102-1118および1205-1221に相当する。これらの領域内にアミノ酸配列の変化を生ずるヌクレオチドの置換、ことにこれらの領域の疎水性の性質を減少するものは機能的タンパク質に翻訳されると思われない。

配列番号：１によりコードされ、配列番号：２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質の分析は、ATP結合性カッセトのドメイン（ABCドメイン）に典型的なヌクレオチド結合性折りたたみ（NBF）の特徴を示す構造の特性を有する２つの領域を明らかにする。参照、Hyde，S．C．ら、Nature 346，362-365（1990）。これらのNBFの構造の一部分からなる要素は膜輸送タンパク質のABC上科の他の構成員において保存され、そしてドメインはヌクレオチドに結合しかつ機能的に重要であることが示された。例えば、、Higgins，C．F.，Ann．Rev．Cell Bion．８，67-113（1992）を参照のこと。配列番号：２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質において、２つのNBFは配列識別番号：２のアミノ酸残基661-810および1310-1469の間に位置する。膜輸送タンパク質のABC上科の他の構成員と比較して、これらの領域の相同性の程度を減少するヌクレオチドおよび対応するアミノ酸の置換は機能的タンパク質において耐えられると思われない。あるいは、NBFの構造を維持するヌクレオチドおよび対応するアミノ酸の置換は耐えられるように思われる。例えば、膜輸送タンパク質のABCスーパーファミリーの１つの構成員のNBFをコードするヌクレオチドは、他の構成員の相同ドメインと置換すると同時にタンパク質の機能を維持することができること

が証明された。参照、Buschmann, FおよびGros, P. Mol. Cell. Biol. 11, 595-603（1991）。したがって、本発明は、式
Ｖ－Ｗ－Ｘ－Ｙ－Ｚ
式中Ｖは配列番号：２の約１～660のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基であり、Ｗは配列識別番号：２の約661～810のアミノ酸残基と実質的に相同性のNBFのアミノ酸残基であり、Ｘは配列番号：２の約811～1309のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基であり、Ｙは配列番号：２の約1310～1469のアミノ酸残基と実質的に相同性のNBFのアミノ酸残基であり、そしてＺは配列番号：２の約1470～1531のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基でである、
により表されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするヌクレオチド配列からなる核酸を提供する。用語「約」は、タンパク質の２つの領域（例えば、ＶおよびＷの間）の間の接合を特定的に示されたものから数アミノ酸だけ変化することができることを意味することを意図する。
予測されるように、上に特定した領域の外側において、配列番号：２に示すアミノ酸配列に約50％類似するアミノ酸配列からなるタンパク質をエンコードする核酸は機能的タンパク質を提供するであろう。あるいは、配列番号：２に示すアミノ酸配列と60％，70％，80％または90％相同性であるアミノ酸配列からなるタンパク質はMRP活性を有するタンパク質を提供することができる。本発明は、配列番号：２に示すアミノ酸配列と少なくとも50％相同性であるMRPの生物学的活性を有するタンパク質をコードする核酸を包含する。
さらに理解されるように、本発明のcDNAに相当するmRNAの代わりのスプライシングにより生ずる本発明の核酸の変異型は本発明に包含される。配列識別番号：１のすべてまたは一部分を含有する本発明のcDNAの細胞のRNAへのハイブリダイゼーションは、1531アミノ酸の伸長したオープンリーディングフレームをもつほぼ6.5kbのmRNAを同定する。もとのリーディングフレームを維持する内部の欠失を含有するいくつかのcDNAクローンが単離され、それらを代わりのスプライシングにより生産できることを示唆する。これらの欠失を含有するmRNA種の存在は、多薬物耐性および感受性の両方の細胞からのRNAの逆PCRにより確証された。ほとんどの場合において、変異型mRNAは10％以下の少量の成分を表す。しかしながら、いくつかは合計のMRP mRNAの20％より多い比率を構成する。配列識別番号：１のヌクレオチド657～783（配列番号：２のアミノ酸155～196）、1845～1992（アミノ酸551～599）、2287～2463（アミノ酸698～756）、2287～2628（アミノ酸698～811）および4230～約4818（アミノ酸1346～1531）を除去する代わりのスプライスの形態が同定された。
より普通の変異型の２つはNBFに近位のNH2のセグメントを欠如する。両方は同一部位（アミノ酸698）において開始し、そしてそれらは非常に近いカッセトの領域および膵嚢胞性線維症のトランスメンブレンコンダクタンスレギュレーター（CFTR）mRNAの普通のエクソン９スプライシング変異型に対して近位のCOOHに影響を与える。参照、Chu, C-S. ら、EMBO Journal 10, 1355-1363（1991）。２つのうちの短い方のもの（アミノ酸698-756）は、CFTRのF508に相当する位置におけるフェニルアラニンを排除する。より長いもの（アミノ酸698-811）は、保存されたLSGGQ配列およびウォーカー（Walker）Ｂモチーフを含む活性な輸送族の特徴を除去する。より普通の変異型の他のもの（アミノ酸1346-1531）は、CFTR mRNAのエクソン23の代わりのスプライシングにより影響を受ける位置に類似する、COOH末端に近いタンパク質のセグメントを特定する領域を欠如する。参照、Yoshimura. K. ら、J. Biol. Chem. 268, 686-690（1993）。さらに、２つの他の欠失は同定され、それらの一方は分子のNH2近位の半分の中のトランスメンブレンドメインの２つを排除し（アミノ酸551-599）、そして他のものはアミノ酸189/190の間に位置する潜在的分泌シグナル切断部位を除去する（アミノ酸155-196）。
本発明の他の面は、配列番号：２に示すアミノ酸配列のすべてまたは一部分をコードする核酸に高いまたは低いストリンジェンシーの条件下にハイブリダイゼーションする核酸を提供する。DNAのハイブリダイゼーションを促進する適当なストリンジェンシーの条件、例えば、約45℃において6.0×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）、次いで50℃において2.0×SSCの洗浄は当業者に知られているか、あるいはCurrent Protocols in Mol

ecular Biology, John Wiely & Sons、ニューヨーク（1989）、6.3.1-6.3.6の中に見出すことができる。例えば、洗浄工程における塩濃度は50℃における約2.0×SSCの低いストリンジェンシー～50℃における約0.2×SSCの高いストリンジェンシーから選択することができる。さらに、洗浄工程における温度は室温、約22℃における低いストリンジェンシーの条件から約65℃における高いストリンジェンシーの条件に増加することができる。

ここに記載するように、MRPの生物学的活性を有する、および遺伝暗号中の縮重のために配列番号：１に示すヌクレオチド配列と異なる配列を有するタンパク質をコードする単離された核酸は、また、本発明の範囲内である。このような核酸は機能的に同等のタンパク質（例えば、MRP活性を有するタンパク質）をコードするが、遺伝暗号中の縮重のために配列番号：１の配列からの配列が異なる。例えば、ある数のアミノ酸は２以上のトリプレットにより表示される。同一アミノ酸を特定するコドン、または異名（例えば、CAUおよびCACはヒスチジンについての異名である）は遺伝暗号における縮重のために起こることがある。１つの例として、MRPタンパク質のヌクレオチド配列内のDNA配列の多形性（ことにコドンの第３塩基内のもの）は、エンコードされるアミノ酸に影響を与えないDNA中の「サイレント」突然変異を生ずることがある。しかしながら、MRPタンパク質のアミノ酸配列中の変化に事実導くDNA配列の多形性は集団の中に存在するであろうことが期待される。当業者は理解するように、MRPの生物学的活性を有するタンパク質をエンコードする核酸の１または２以上のヌクレオチド中のこれらの変動（ヌクレオチドの約３～４％まで）は、天然アレレの変動のために集団内の個体の間に存在することがある。任意のかつすべてのこのようなヌクレオチドの変動および生ずるアミノ酸の多形性は本発明の範囲内である。さらに、ここに記載するMRPの１または２以上のイソ型または関係する交差反応性の族の構成員が存在することができる。このようなイソ型または族の構成員は、生物学的活性およびアミノ酸配列においてMRPに関係するが、異なる位置における遺伝子によりコードされるタンパク質として定義される。

MRPの生物学的活性を有するタンパク質をコードする本発明の単離された核酸は、Ｐ－糖タンパク質仲介多薬物耐性を逆転する化学的感作物質、例えば、ベラパミルまたはサイクロスポリンＡにより実質的に逆転されないアントラサイクリン、エピポドフィロトキシンおよびニチニチソウのアルカロイドのような薬物に対する耐性を表示する多薬物耐性細胞系から単離することができる。このような細胞系の１つはH69ARである。他の適当な細胞系は、耐性を数カ月～数年の期間にわたって獲得すべき薬物の増加する濃度の存在下に非耐性細胞系の段階的選択により生産することができる。例えば、細胞系をアントラサイクリン、好ましくはドキソルビシンの存在下に約14カ月間培養する。次いで、選択した細胞系を他の薬物、例えば、エピポドフィロトキシン、例えば、VP－16およびニチニチソウのアルカロイド、例えば、ビンクリスチンに暴露し、そして細胞系への薬物の細胞障害性を決定することによって、多薬物耐性を評価する。次いでＰ－糖タンパク質仲介多薬物耐性、例えば、ベラパミルおよびサイクロスポリンＡを逆転する化学的感作物質が多薬物耐性を逆転する能力を、選択した細胞系をこれらの物質に耐性薬物の存在下に暴露することによって評価する。適当な多薬物耐性細胞系、例えば、H69ARを生産するために使用できる方法の詳細な説明は、Cole, Cancer Chemother, Pharmacol. 17, 259-263（1986）およびMirskiら、Cancer Research 47, 2594-2598（1987）の中に見出される。

適当な多薬物耐性細胞系（例えば、ベラパミルまたはサイクロスポリンＡにより実質的に逆転されないアントラサイクリン、エピポドフィロトキシンおよびニチニチソウのアルカロイドに対する耐性を表示する多薬物耐性細胞系）を使用して、cDNAライブラリーをこの細胞系から標準の技術により調製し、そしてこのライブラリーを多薬物耐性細胞系およびその薬物感受性親細胞系から単離された全体のmRNAから生産されたcDNAでスクリーニングすることによって、本発明の核酸を単離する。例えば、H69AR細胞からの全体のmRNAから構成されたcDNAライブラリーを調製する。このライブラリーをプレートし、そして２組のレプリカフィルターを標準の技術により調製する。次いでフィルターの一方をH69AR mRNAから調製したcDNAでスクリーニングし、そしてフィルターの他方をH69 mRNAから調製したcDNAの匹敵する量でスクリーニングする。ライブラリーのスクリーニングに使用したcDNA

を、典型的には放射性標識で、標識化する。標準の方法によりハイブリダイゼーション耐性の可視化後、H69 cDNAと比較したときH60AR cRNAとのハイブリダイゼーションの増加を表示するcDNAクローンをライブラリーから選択することができる。H69細胞と比較したときH69AR細胞の中で過度に発現されたmRNAから、これらのcDNAを誘導する。示差的cDNAライブラリーのスクリーニングの説明については、King, C. R. ら、J. Biol. Chem. 254, 6781（1979）；Van der Bliek, A. M. ら、Mol. Cell. Biol. 6, 1671（1986）を参照のこと。

そのように単離されたcDNAがMRPの生物学的活性を有するかどうかの決定は、cDNAを非耐性哺乳動物細胞を標準の技術により発現させ、そしてcDNAによりコードされるタンパク質の細胞中の発現がベラパミルまたはサイクロスポリンＡにより実質的に逆転されないアントラサイクリン、エピポドフィロトキシンおよびニチニチソウのアルカロイドに対する多薬物耐性を細胞に付与するかどうかを評価することによって達成される。そのように単離されたMRPの生物学的活性を有するcDNAを、標準の技術、例えば、ジデオキシ連鎖停止法またはマキサム－ギルバート（Maxam-Gilbert）化学的配列決定により配列決定して、エンコードされたタンパク質の核酸配列および予測されたアミノ酸配列を決定することができる。

DNAである本発明の単離された核酸は、また、配列番号：１に示すヌクレオチド配列のすべてまたは一部分を包含する標識化核酸プローブを調製し、そしてこの標識化核酸プローブを使用して適当なDNAライブラリー（例えば、cDNAまたはゲノムDNAライブラリー）をスクリーニングすることによって単離することができる。例えば、前述したように多薬物耐性細胞系から作られたcDNAライブラリーを使用して、このライブラリーを標識化プローブで標準の技術によりスクリーニングすることによって、MRP活性を有するタンパク質をエンコードするcDNAを単離することができる。好ましくは、H69AR cDNAライブラリーを使用する。あるいは、ゲノムDNAライブラリーを同様にスクリーニングして、MRP活性を有するタンパク質をエンコードする遺伝子を包含するゲノムのクローンを単離することができる。実施例４において証明するように、ヒトMRP遺伝子は染色体16にマッピングされた。したがって、全体のゲノムDNAライブラリーよりむしろ染色体16ライブラリーをまた使用してヒトMRP遺伝子を単離することができる。cDNAまたはゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることによって単離された核酸は、標準の技術により配列決定することができる。

DNAである本発明の単離された核酸は、また、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法およびゲノムDNAまたはmRNAを使用して、MRP活性を有するタンパク質をコードする核酸を選択的に増幅することによって単離することができる。mRNAからcDNAを調製するために、全体の細胞のmRNAは、例えば、多薬物耐性細胞系から、Chirgwinら、Biochemistry, 18, 5294-5299（1979）をグアニジン－チオシアネート抽出法を使用することによって単離することができる。次いで、逆転写酵素を使用してmRNAからcDNAを合成する。ギブコ（Gibco）/BRL、マリイランド州ベセスダから入手可能なモロニーMLV逆転写酵素、あるいはセイカガク・アメリカ・インコーポレーテッド（Ｓｅｉｋａｇａｋｕ America, Inc.）フロリダ州セントペタースバーグから入手可能なAMV逆転写酵素は好ましくは使用される。PCRにおいて使用するために配列番号：１に示すヌクレオチド配列から合成オリゴヌクレオチドのプライマーをデザインすることができる。これらのオリゴヌクレオチドのプライマーおよび標準のPCR増幅技術により、核酸をcDNAまたはゲノムDNAから増幅することができる。そのように増幅された核酸を適当なベクターの中にクローニングし、そしてDNA配列分析により特性決定することができる。

cDNAの転写を可能とする適当なベクターの中に本発明のcDNAをクローニングして、MRP活性を有するタンパク質をエンコードするRNA分子を生産することによって、RNAである本発明の単離された核酸を単離することができる。例えば、cDNAをベクター中のバクテリオファージのプロモーター、例えば、T7プロモーターの下流にクローニングしそしてcDNAをT7ポリメラーゼで生体外で転写することができる。生ずるRNAを標準の技術により単離することができる。

本発明の核酸、例えば、オリゴヌクレオチドをまた標準の技術により化学的に合成することができる。ペプチド合成のように、商業的に入手可能なDNA合成装置において完全に自動化された固相合成を包含する、ポリデオキシヌクレオチドを化学的に合成する種々の方法が知られている（参照、例えば、Itakuraら、米国特許第4,598,049号；Caruthersら、米国特許第4,458,066号；およびItakura,米国特許第4,401,796号および米国特許第4,373,071号）。

配列番号：１に示すヌクレオチド配列の分析は、この目的のためにデザインされた現在入手可能なコンピューターのソフトウェア、例えば、PC／Gene－インテリジェネティクス・インコーポレーテッド（IntelliGenetics Inc.）カリフォルニア州を使用して、MRPの開始コドンおよび非翻訳配列の同定を可能とする。配列番号：１と表示するcDNAコーディング鎖は、1531アミノ酸をエンコードする4593ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム、ならびに195 ５’非翻訳ヌクレオチドおよび223 ３’非翻訳ヌクレオチドを含有する。MRP cDNAをエンコードする遺伝子のイントロン－エクソン構造および転写調節配列は、本発明の核酸を使用してゲノムDNAクローンライブラリーをプロービングすることによって同定することができる。種々の組織の中のMRPをエンコードする遺伝子の発現に必要な調節要素、例えば、プロモーターおよびエンハンサーを普通の技術により同定することができる。エンハンサーの機能は、断片に操作的に連鎖するリポーター遺伝子、例えば、細菌の遺伝子lacZを発現するために要素を使用するすることによって確証することができる。このような構成体は培養細胞の中に標準の方法により導入するか、あるいは非ヒトトランスジェニック動物のモデルの中に導入することができる。DNA中の調節要素を同定することに加えて、この分野において知られている技術により、このような構成体をまた使用して前記要素と相互作用する核タンパク質を同定することができる。

制限酵素のためのある数の独特制限部位は、配列番号：１に示すヌクレオチド配列からなる核酸の中に存在する。それらの制限部位は配列識別番号：１によりコードされるタンパク質（すなわち、本発明のタンパク質）に対して独特のポリペプチドをコードするヌクレオチド断片へのアクセスを提供する。

本発明の単離された核酸または単離された核酸のオリゴヌクレオチドの断片により、生物学的物質、例えば、腫瘍細胞の試料中のヌクレオチド配列の検出において使用するためのヌクレオチドのプローブを当業者は構成することができる。検出の手段として適切なシグナルを提供しそして検出に作用であるために十分な半減期を有する放射性元素、例えば、^{32}P, ^{3}H, ^{14}Cなどでヌクレオチドのプローブを標識化することができる。プローブを標識化するために使用できる他の物質は、特定の標識化抗体により認識される抗原、蛍光性化合物、酵素、標識化抗原に対して特異性の抗体、および化学発光性化合物を包含する。ハイブリダイゼーション速度および検出すべきヌクレオチドへのプローブの結合性およびハイブリダイゼーションのために有効な量に関して、適当な標識を選択することができる。

II．アンチセンス核酸

本発明は、また、本発明の核酸のアンチセンス核酸、またはそのオリゴヌクレオチドの断片に関する。アンチセンス核酸は、ワトソン（Watson）およびクリック（Crick）塩基対合則に従い構成された核酸のコーディング鎖に対して相補的、例えば、mRNA配列に対して相補的であるヌクレオチド配列からなることができ、そして核酸のコーディング鎖に水素結合することができる。mRNAの配列に対して相補的なアンチセンス配列はmRNAのコーディング領域の中に見出される配列に対して相補的であることができるか、あるいはmRNAの５’または３’非翻訳領域に対して相補的であることができる。さらに、アンチセンス核酸はmRNAをコードする遺伝子の調節領域、例えば、翻訳開始配列または調節要素に対して配列が相補的であることができる。好ましくは、mRNAの開始コドンに先行するまたはそれをスパニングする領域、あるいは３’非翻訳領域の中の領域に対して相補的なアンチセンス核酸を使用する。アンチセンス核酸は配列番号：１に示すヌクレオチド配列に基づいてアンチセンス核酸をデザインすることができる。示した核酸のコーディング領域または非翻訳領域の配列に対して相補的な配列を有する核酸をデザインすることができる。あるいは

、アンチセンス核酸をMRP遺伝子の配列に基づいてデザインし、前述したようにゲノムのライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。例えば、重要な調節要素を前述したように決定しそして調節要素に対してアンチセンスである配列をデザインすることができる。

本発明のアンチセンス核酸およびオリゴヌクレオチドは、この分野において知られている方法により、化学的合成および酵素結合反応を使用して構成することができる。アンチセンス核酸またはオリゴヌクレオチドは天然に見出されるヌクレオチドまたは種々に修飾されたヌクレオチドを使用して化学的に合成することができ、前記修飾されたヌクレオチドは分子の生物学的安定性を増加するように、あるいはアンチセンスおよびセンス核酸の間で形成された二本鎖の物理的安定性を増加するようにデザインされ、例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドを使用することができる。あるいは、アンチセンス核酸およびオリゴヌクレオチドは、核酸がアンチセンスの向きサブクローニングされている発現ベクター（すなわち、挿入された核酸から転写された核酸は問題の標的核酸に対してアンチセンスの向きをもつであろう）を使用して生物学的に生産することができる。アンチセンス発現ベクターは組換えプラスミド、ファージミドまたは弱毒化ウイルスの形態で細胞の中に導入され、ここでアンチセンス核酸は高い効率の調節領域のコントロール下に生産され、それらの活性はベクターを導入した細胞型により決定することができる。アンチセンス遺伝子を使用する調節の論考は、Weintraub, H. ら、Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews-Trend in Genetics, Vol. 1（1）1986を参照のこと。

III. 組換え発現ベクター

MRP活性を有するタンパク質をコードする本発明の核酸は、コードされたタンパク質またはその一部分のすぐれた発現を保証する組換え発現ベクターの中に既知の方法で導入することができる。組換え発現ベクターは「宿主細胞の形質転換に適当」であり、これは本発明の核酸またはそのオリゴヌクレオチドの断片および調節配列（発現のために使用すべき宿主細胞に基づいて選択され、核酸またはオリゴヌクレオチドの断片に操作的に連鎖されている）を含有する組換え発現ベクターを意味する。操作的に連鎖されているは、核酸が調節配列に核酸の発現を可能とする方法で連鎖されていることを意味することを意図する。調節配列はこの分野において認識されており、そして適当な宿主細胞の中の所望のタンパク質の発現を指令するように選択される。したがって、用語調節配列はプロモーター、エンハンサーおよび他の発現コントロール要素を包含する。このような調節配列は当業者に知られているか、あるいはGoeddel, Gene Expression Technology：Methods in Enzymology 185, Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ（1990）に記載されているものを使用することができる。発現ベクターのデザインはトランスフェクションすべき宿主細胞の選択および／または発現しようとするタンパク質の種類のような因子に依存することがあることを理解すべきである。このような発現ベクターは、ここに記載するように、細胞をトランスフェクションし、これにより核酸によりエンコードされるタンパク質またはペプチドを生産するために使用することができる。

本発明の組換え発現ベクターはコードされたタンパク質を原核細胞または真核細胞の中で発現するようにデザインすることができる。例えば、タンパク質は細菌細胞、例えば、大腸菌（E. coli）、昆虫細胞（バキュロウイルスを使用する）、酵母細胞または哺乳動物細胞の中で発現することができる。他の適当な宿主細胞は、Goeddel, Gene Expression Technology：Methods in Enzymology 185, Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ（1990）の中に見出すことができる。

原核細胞の中の発現は、融合タンパク質または非融合タンパク質の発現を指令する構成的または誘発可能なプロモーターを含有するベクターを使用して、大腸菌（E. coli）の中で最もしばしば実施される。融合ベクターは発現された標的遺伝子のアミノ末端に通常ある数のアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは典型的には３つの目的をはたす：１）組換えタンパク質の発現を増加する：２）標的組換えタンパク質の溶解度を増加する：および３）アフィニティー精製におけるリガンドとして作用することによって標的組換

えタンパク質の精製を促進する。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解の切断部位を融合部分と標的組換えタンパク質の接合部に導入して、融合タンパク質の精製に引き続いて融合部分からの標的組換えタンパク質の分離を可能とする。このような酵素、およびそれらの同種の認識配列は、因子Xa、トロンビンおよびエンテロキナーゼを包含する。典型的な融合発現ベクターは、pGEX（Amrad Corp.、オーストラリア国メルボルン）、pMAL, New England Biolabs、マサチュセッツ州ベベリイ）およびpRIT5（Pharmacia、ニュージャージイ州ピスカタェイ）を包含し、これらは、融合グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ、マルトースＥ結合性タンパク質、またはプロテインＡを標的組換えタンパク質を融合する。

誘発可能な非融合発現ベクターは、pTrc（Amannら、（1988）, Gene 69：301-315）およびpET 11d（Studerら、Gene Expression Technology：Methods in Enzymology 185, Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ（1990）60-89）を包含する。標的遺伝子の発現はpTrcにおけるハイブリッドtrp-lac融合プロモーターからの宿主RNAポリメラーゼ転写に頼るが、pET 11dの中に挿入された標的遺伝子の発現は非発現されたウイルスのRNAポリメラーゼ（T7gn1）により仲介されたT7gn10-lac0融合プロモーターからの転写に頼る。このウイルスのポリメラーゼは、lacUV5プロモーターの転写コントロール下にT7gn1を収容するレジデントλファージからの宿主株BL21（DE3）またはHMS174（DE3）により供給される。

大腸菌（E. coli）中の組換えタンパク質の暴露を最大にする１つの方法は、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する障害された能力をもつ宿主細菌の中でタンパク質を発現することである（Gottesman, S., Genc Expression Technology：Methods in Enzymology 185, Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ（1990）119-128）。他の方法は、各アミノ酸のための個々のコドンが高度に発現された大腸菌（E. coli）タンパク質において優先的に利用されるものであるように、発現ベクターの中に挿入すべき核酸（例えば、MRPタンパク質をコードする核酸）の核酸配列を変更することである（Wadaら、（1992）Nucl. Acids Res. 20-2111-2118）。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準のDNA合成技術により実施することができるであろう。

酵母サッカロミセス・セレビシアエ（S. cerevisiae）中の発現のためにベクターの例は、pYepSecl（Baldariら、（1987）Embo J. ６：229-234）、pMFa（KurjanおよびHerskowitz, （1982）Cell 30：933-943）、pJRY88（Shultzら、（1987）Gene 54：113-123）、およびpYES2（Invitrogen Corporation、カリフォルニア州サンディエゴ）を包含する。

培養した昆虫細胞（SF9細胞）中のタンパク質の発現について利用可能なバキュロウイルスのベクターは、pAc系列（Smithら、（1983）Mol. Cell Biol. ３：2156-2165）およびpVL系列（Lucklow, V. A. およびSummers, M. D., （1989）Virology 170：31-39）を包含する。

哺乳動物細胞中のMRPタンパク質の発現は哺乳動物の発現ベクターを使用して達成される。哺乳動物の発現ベクターの例は、pCDM8（Seed, B., （1987）Nature 329：840）およびpMT2PC（Kaufmanら（1987）, EMBOJ. ６：187-195）を包含する。哺乳動物細胞の中で使用するとき、発現ベクターの制御機能はウイルスの物質によりしばしば提供される。例えば、普通に使用されるプロモーターはポリオーマ、アデノウイルス２、サイトメガロウイルスおよび最も頻繁には、シミアンウイルス40から誘導される。好ましくは、pRc/CMV発現ベクター（Invitrogen）を使用する。pRc/CMVベクターにおいて、発現すべきベクターの中に導入される核酸はヒトサイトメガロウイルスの直ちの初期遺伝子からのエンハンサー／プロモーター配列のコントロール下にある。さらに、ネオマイシン耐性を付与する遺伝子はこのベクターのコントロール下にある。１つの態様において、組換え発現ベクターは特定の細胞の型において優先的に核酸の発現を指令することができる。これが意味するように、発現ベクターの制御機能は調節配列により提供され、これらの調節配列は特定の細胞の型の中に含有される核酸の優先的発現を可能とし、これによりコードされたタンパク質の組織または細胞の型に特異的発現を可能とする。例えば、MRP活性をもつタンパク質をコードする核酸は、心筋細胞の中で優先的に発現遺伝子、例えば、心臓のミオシン遺

伝子または心臓のアクチン遺伝子からのプロモーターまたはエンハンサーの配列を使用して、心筋細胞の中で優先的に発現させることができる。
本発明の組換え発現ベクターはプラスミドであることができる。本発明の組換え発現ベクターは、ウイルスの核酸の中に導入された核酸の発現を可能とする、ウイルス、またはその一部分であることができる。例えば、レプリコン欠如レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスを使用することができる。
本発明は、さらに、発現ベクターの中にアンチセンスの向きにクローニングされた本発明のDNA分子からなる組換え発現ベクターを提供する。すなわち、配列番号：１に示すヌクレオチド配列に対してアンチセンスであるRNA分子の発現を、DNA分子の転写により、可能とする方法で、DNA分子は調節配列に操作的に連鎖される。種々の細胞の型中のアンチセンスRNA分子の連続的発現を指令するアンチセンス核酸に操作的に連鎖された調節配列、例えば、ウイルスのプロモーターおよび／またはエンハンサーを選択することができるか、あるいは、前述したように、アンチセンスRNAの組織または細胞の型に特異的の発現を指令する調節配列を選択することができる。
IV. 形質転換体宿主細胞
本発明の組換え発現ベクターを使用して、組換え発現ベクターを含む形質転換体宿主細胞を作ることができる。用語「形質転換体宿主細胞」は、本発明の組換え発現ベクターで形質転換またはトランスフェクションされた原核細胞および真核細胞を包含することを意図する。用語「で形質転換された」、「でトランスフェクションされた」、「形質転換体」および「トランスフェクション」は、多数の可能なこの分野において知られている技術の１つにより細胞の中への核酸（例えば、ベクター）の導入を包含することを意図する。原核細胞は、例えば、エレクトロポレイションまたは塩化カルシウム仲介形質転換により核酸で形質転換することができる。核酸は哺乳動物細胞の中に普通の技術、例えば、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈、DEAE－デキストラン仲介トランスフェクション、リポフェクチン、エレクトロポレイションまたはマイクロインジェクションを介して導入することができる。宿主細胞を形質転換およびトランスフェクションするために適当な方法は、Sambrookら（Molecular Cloning：A Laboratory Manual、第２版、Cold Spring Harbor Laboratory Press（1989））、および他の実験室のテキストブックの中に見出すことができる。
技術、例えば、前述の技術により本発明の組換え発現ベクターで形質転換される宿主細胞の数は、使用する組換え発現ベクターの型および使用する形質転換技術に依存するであろう。哺乳動物細胞の中に導入されるプラスミドベクターは宿主細胞のDNAの中に低い頻度でのみ組込まれる。これらの組込み体を同定するために、選択可能なマーカー（例えば、抗生物質に対する耐性）を含有する遺伝子は一般に問題の遺伝子と一緒に宿主細胞の中に導入される。好ましいマーカーはある種の薬物に対する耐性を付与するもの、例えば、G418およびヒグロマイシンを包含する。適当なマーカーは問題の核酸からの別のプラスミド上に導入することができるか、あるいは、好ましくは、同一プラスミド上に導入される。本発明の核酸および選択可能なマーカーのための遺伝子を含有する１または２以上の組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞は、選択可能なマーカーを使用して細胞について選択することによって同定することができる。例えば、選択可能なマーカーがネオマイシン耐性を付与する遺伝子（例えば、pRc/CMV）をコードした場合、形質転換体細胞をG418で選択することができる。選択可能なマーカー遺伝子とり込んだ細胞は生き残るが、他の細胞は死亡する。
実施例５および６において証明するように、本発明の核酸は、細胞の中にトランスフェクションされたとき、アントラサイクリン、エピポドフィロトキシンおよびニチニチソウのアルカロイドを包含する薬物に対する多薬物耐性を薬物感受性細胞に付与することができる。こうして、これらの薬物は、独立の選択可能なマーカー（例えば、ネオマイシン耐性）を使用するよりむしろ形質転換体宿主細胞を調製するとき、選択因子として使用することができる。したがって、本発明の核酸は多薬物耐性を細胞に付与するためにばかりでなく、かつまた核酸が導入された細胞のための選択可能なマーカーとして有用である。参照

、例えば、Pastanら、米国特許第5,166,059号；Croopら、米国特許第5,198,344号。細胞は核酸が耐性を付与する１種または２種以上の薬物への暴露により選択される。組換え発現ベクターにおけるMRPをコードする核酸は、同一ベクターまたは別のベクター中の、問題の遺伝子からなる第２核酸と一緒に細胞の中に挿入することができ、そして形質転換体細胞をそれらの獲得した薬物耐性に基づいて選択することができる。選択される薬物耐性細胞は、しばしば問題の遺伝子と共組込むされたMRPをコードする核酸を含有するであろう。さらに、細胞の選択に使用される薬物の濃度を増加することによって、MRPをコードする核酸および問題の遺伝子の両方を包含する、導入された核酸のより高い数のコピーをもつ形質転換体細胞を得ることができる。したがって、本発明の核酸はまた増幅可能なマーカーとして有用である。

本発明の核酸は「MRPの生物学的活性を有する」タンパク質をコードする。MRPの生物学的活性は、薬物感受性哺乳動物細胞の中で発現されるとき、Ｐ－糖タンパク質仲介多薬物耐性を逆転する化学的感作物質、例えば、ベラパミルまたはサイクロスポリンＡにより実質的に逆転されないアントラサイクリン、エピポドフィロトキシンおよびニチニチソウのアルカロイドのような薬物に対する多薬物耐性を細胞に付与するタンパク質の能力として定義される。本発明の単離された核酸は、それを本発明の組換え発現ベクターの中に組込み、前述したように薬物感受性哺乳動物細胞を組換え発現ベクターで形質転換して形質転換体宿主細胞を作り、そして形質転換体宿主細胞の多薬物耐性を試験することによって、MRP活性について試験され得る。形質転換体宿主細胞の多薬物耐性は、非形質転換細胞に比較して形質転換細胞に対する試験すべき薬物（すなわち、アントラサイクリン、エピポドフィロトキシンおよびニチニチソウのアルカロイド）の細胞障害性、および多薬物耐性を逆転する他の薬物（すなわち、ベラパミルまたはサイクロスポリンＡ）の能力を決定することによって試験される。例えば、好ましい態様において、形質転換体宿主細胞はHeLa細胞であり、そしてトランスフェクションされたHeLa細胞の多薬物耐性を非トランスフェクションHeLa細胞と比較するか、あるいは好ましくはMRP活性を有するタンパク質をエンコードする核酸を欠如する親発現ベクターでトランスフェクションされたHeLa細胞と比較する。

Ｖ．単離されたタンパク質

本発明はMRPの生物学的活性を有するタンパク質を提供する。用語「単離された」は、組み換えDNA技術により生産するとき、細胞物質または培地を実質的に含まないか、あるいは、化学的に合成するとき、化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まないタンパク質を呼ぶ。好ましい態様において、MRPの生物学的活性を有するタンパク質は配列番号：２に示すアミノ酸配列を有する。あるいは、タンパク質は配列番号：１に示すヌクレオチド配列からなる核酸によりエンコードされることができる。配列番号：２に示すアミノ酸配列と実質的な配列の相同性を有するMRPの生物学的活性を有するタンパク質は、上に定義したように、また、本発明に包含される。さらに、高いまたは低いストリンジェンシーの条件下に、上に定義したように、配列番号：１に示すヌクレオチド配列からなる核酸に対してハイブリダイゼーションする核酸によりコードされるMRPの生物学的活性を有するタンパク質は本発明に包含される。さらに、MRPタンパク質の免疫性部分は本発明の範囲内である。実施例７において証明されるように、配列番号：２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質の２つの免疫原性部分は、配列番号：２に示すアミノ酸残基932～943（残基AELQKAEAKKEE）およびアミノ酸残基1427～1441（残基GENLSVGQRQLVCLA）に相当する。好ましい免疫原性部分は他のABC上科の構成員の中に保存されない、すなわち、２つのNBFドメイン（アミノ酸残基661～810および1310～1469）の外側のタンパク質の領域に相当し、そして12の膜スパニング領域の間の領域を含む。免疫原性部分は少なくとも約８アミノ酸の長さであろう。

本発明のMRPタンパク質、またはイソ型またはその一部分は、この分野において知られている技術を使用して適当な宿主細胞の中で発現させることによって単離することができる。適当な宿主細胞は、原核または真核の生物または細胞、例えば、酵母、大腸菌（E. coli）および昆虫の細胞を包含する。本発明の前述の組換え発現ベクターは、タンパク質を

単離するために宿主細胞中のMRP活性を有するタンパク質を発現させるために使用することができる。本発明は、タンパク質をコードする組換え核酸を宿主細胞の中に導入し、宿主細胞の中でタンパク質を発現させ、そしてタンパク質を単離することからなる本発明の単離されたタンパク質を製造する方法を提供する。好ましくは、組換え核酸は組換え発現ベクターである。タンパク質はタンパク質を発現する宿主細胞からこの分野の標準の方法に従い単離することができ、ここで標準の方法は硫酸アンモニウム沈澱、分別カラムクロマトグラフィー（例えば、イオン交換、ゲル濾過、電気泳動、アフィニティクロマトグラフィーなど）および究極的に結晶化を包含する（参照、一般に、「Enzyme Purification and Related Techniques」、Methods in Enzymology, 22, 233-577（1971））。

あるいは、タンパク質またはその一部分は、タンパク質の化学においてよく知られている技術、例えば、固相合成を使用する化学的合成（Merrifield, 1964, J. Am. Chem. Assoc. 85：214-2154）または均質溶液中の合成（Houbenweyl, 1987, Methods of Organic Chemistry, E. Wansch編、Vol. 15　IおよびII, Theime, Stuttgart）により製造することができる。

VI. 抗体

本発明のタンパク質、またはその一部分を使用して、タンパク質に対して特異性の抗体を調製することができる。タンパク質の非保存領域における明確なエピトープに結合する抗体を調製することができる。タンパク質の非保存領域は、他のタンパク質、例えば、膜輸送タンパク質のABC上科の他の構成員に対する実質的な配列の相同性をもたないものである。例えば、NBFドメインを排除する。12の膜のスパニング領域の間に配列を包含する非保存領域を使用することができる。あるいは、２つのNBFドメインの一方からの領域を使用して、MRPタンパク質の保存された領域に対する抗体を調製することができる。保存された領域に対する抗体は、膜輸送タンパク質のABC族の他の構成員と反応することができる。普通の方法を使用して抗体を調製することができる。例えば、MRPタンパク質のペプチドを使用することによって、ポリクローナル抗血清またはモノクローナル抗体を標準の方法を使用して作ることができる。実施例７において証明されるように、、哺乳動物（例えば、マウス、ハムスター、またはウサギ）を哺乳動物の中で抗体の応答を誘発する形態のペプチドで免疫化することができる。ペプチドに免疫原性に付与する技術は、キャリヤーへの接合またはこの分野においてよく知られている他の技術を包含する。例えば、ペプチドはアジュバントの存在下に投与することができる。免疫化の進行は血漿または血清中の抗体の力価の検出によりモニターすることができる。標準のELISAまたは他のイムノアッセイを抗原として免疫原とともに使用して、抗体レベルを評価することができる。免疫化後、抗血清を獲得しそして、必要に応じて、ポリクローナル抗体を血清から単離することができる。

モノクローナル抗体を生産するために、抗体生産性細胞（リンパ球）を免疫化動物から収穫し、そして標準体細胞融合方法により骨髄腫細胞と融合し、こうしてこれらの細胞を永久分裂能化しそしてハイブリドーマ細胞を生じさせる。このような技術はこの分野においてよく知られている。例えば、KohlerおよびMilsteinにより本来開発されたハイブリドーマ技術（Nature 256, 495-497（1975））ならびに他の技術、例えば、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Kozborら、Immunol. Today 4, 72（1983））、ヒトモノクローナル抗体を生産するためのEBV-ハイブリドーマ技術（Coleら、Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy（1985）Allen. Bliss, Ine., pp. 77-96）、およびコンビネイショナル抗体ライブラリーのスクリーニング（Huseら、Science 246, 1275（1989））。ハイブリドーマ細胞は、単離されたペプチドおよびモノクローナル抗体と特異的に反応性の抗体の生産について免疫化学的にスクリーニングすることができる。

ここにおいて使用する用語抗体は、MRPの生物学的活性を有するタンパク質、またはそのペプチドとまた特異的に反応性であるその断片を包含することを意図する。抗体を普通の技術により断片化し、そして断片を全抗体について前述したのと同一の方法で利用するためにスクリーニングすることができる。例えば、抗体をペプシンで処理することによってＦ（ab’）２断片を発生させることができる。生ずるＦ（ab’）２断片を処理してジスル

フィド架橋を減少させてFab'断片を生成することができる。
非ヒト被検体において生産された抗体をヒトにおいて治療的に使用するとき、それらは外来因子として変化する程度に認識されそして免疫応答を患者において発生させることができる。この問題を最小とするか、あるいは排除する１つのアプローチは、一般的免疫抑制に対して好ましく、キメラ抗体誘導、すなわち、非ヒト動物の可変領域およびヒト一定量域を結合抗体分子を生産することである。キメラ抗体分子は、例えば、ヒト一定領域をもつ、マウス、ラット、または他の種からの抗体結合性ドメインを含むことができる。キメラ抗体を作る種々のアプローチは記載されてきており、そして本発明の新規なＢリンパ球抗原の遺伝子生産物を認識する免疫グロブリンの可変領域を含有するキメラ抗体を作るために使用することができる。参照、例えば、Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81, 6851（1985）；Takedaら、Nature 314, 452（1985）；Cabillyら、米国特許第4,816,567号；Bossら、米国特許第4,816,397号；Tanaguchiら、欧州特許公開EP第171496号；欧州特許公開第0173494号、英国特許GB第2177096B号。このようなキメラ抗体は対応する非ヒト化学抗体よりヒト被検体において免疫原性がより低いであろうことが期待される。
ヒトの治療の目的で、ここに記載するようにMRPの生産学的活性を有するタンパク質、またはそのペプチドと特異的に反応性のモノクローナル抗体またはキメラ抗体は、抗原結合性ドメインの可変領域、ことに保存されたフレームワーク領域の一部分がヒト由来でありかつ超可変性領域が非ヒト由来である、ヒト一定領域のキメラを生成することによって、さらにヒト化することができる。このような変更された免疫グロブリン分子はこの分野において知られているいくつかの技術により作るすることができ（例えば、Tengら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80, 7308-7312（1983）；Kozborら、Immunol. Today, 4, 7279（1986）；Olssonら、Meth. Enzymol. 92, 3-16（1982））、そして好ましくはPCT公開WO92/06193号または欧州特許（EP）第0239400号の教示に従い作られる。ヒト化抗体は、例えば、スコットゲン・リミテッド（Scotgen Limited）、英国ミドレセックス、ツウィッケンハム、ホリイロード２、により商業的に生産されることができる。免疫原性が減少されたヒト化抗体はヒト被検体における免疫治療のために好ましい。ヒト化抗体を使用する免疫治療は付随する免疫抑制の必要性を減少させるように思われ、そして慢性疾患の場合または反復した抗体処置を必要とする場合の処置のための長期間の有効性を増加させることができる。
MRPの生物学的活性を有するタンパク質、またはそのペプチドに対して反応性である特定の抗体、または抗体断片を発生させる方法は、本発明の核酸分子から生産されたペプチドで細菌中で発現された、免疫グロブリン遺伝子、またはその一部分をコードするライブラリーをスクリーニングすることである。例えば、完全なFab断片、VH領域およびFV領域をファージ発現ライブラリーを使用して発現させることができる。参照、例えば、Wardら、Nature 341, 544-546；（1989）；Huseら、Science 246, 1275-1281（1989）；およびMcCaffertyら、Nature 348, 552-554（1990）。このようなライブラリーを、例えば、B7－２でスクリーニングして、B7－２と反応性の免疫グロブリン断片を同定することができる。あるいは、ゲンファーム（Genpharm）により発育されたSCID-huマウスを使用して、抗体、またはその断片を生成することができる。
ポリクローナル、モノクローナルまたはキメラモノクローナル抗体を使用して、種々の生物学的物質の中の本発明のタンパク質、その一部分または密接に関係するイソ型を検出することができ、例えば、それらはELISA、ラジオイムノアッセイまたは組織化学的試験において使用することができる。こうして、抗体を使用して試料中の本発明のMRPタンパク質、その一部分または密接に関係するイソ型の量を定量して、多薬物耐性を診断し、そして特定の細胞の事象または病理学的状態、とくに多薬物耐性におけるその役割を決定することができる。前に記載された方法を使用して、モノクローナル抗体、またはキメラモノクローナル抗体をMRPの非保存領域に対して発生させ、そして密接に関係するイソ型および共通の保存されたエピトープを共有する他のタンパク質からMRPを区別するために使用することができる。

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を検出可能な物質に連結することができる。用語「連結」は検出可能な物質を抗体に物理的に連鎖することを意味する。適当な検出可能な物質は、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質および放射性物質を包含する。適当な酵素の例は、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを包含する；適当な補欠分子族複合体の例は、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンを包含する；適当な蛍光物質の例は、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンを包含する；発光物質の例はルミノールを包含する；そして適当な放射性物質の例は^{125}Ｉ，^{131}Ｉ，^{35}Ｓまたは^{3}Ｈを包含する。

本発明によれば、当業者は二重特異性抗体および４量体の抗体の複合体を調製することができる。ハイブリッドハイブリドーマをこの分野において知られている方法、例えば、StaerzおよびBevan（PNAS（USA）83：1453，1986およびImmunology Today，７：241，1986）に開示されている方法により調製することができる。一般に、本発明のタンパク質を発現する腫瘍細胞に結合することができる第１モノクローナル抗体を生産する第１細胞系および検出可能な物質あるいは毒性または治療活性を有する物質に結合することができる第２モノクローナル抗体を生産する第２細胞系を融合することによって、ハイブリッドハイブリドーマは形成される。二重特異性抗体は、また、方法、例えば、Staezら（Nature，314：628，1985）およびPerezら（Nature 316：354，1985）により記載されている方法を使用して化学的手段により構成することができる。

本発明のMRPタンパク質、またはその一部分に対して特異性の抗体、好ましいヒト抗体の可変領域、検出可能な物質あるいは毒性または治療活性を有する物質に結合することができる抗体の可変領域およびヒト免疫グロブリン、例えば、ヒトIgG1，IgG2，IgG3およびIgG4の一定量域を、また、前述したように構成することができる。二重特異性キメラモノクローナル抗体を、また、前述したように構成することができる。

４量体の抗体の複合体は、本発明のタンパク質を発現する腫瘍細胞に結合することができる第１モノクローナル抗体および検出可能な物質あるいは毒性または治療活性を有する物質に結合することができる第２モノクローナル抗体を調製することによって調製することができる。第１および第２の抗体は第１動物種からのものである。第１および第２の抗体を、第１および第２のモノクローナル抗体の抗体のFc断片に対して向けられた第２動物種の抗体またはそのFab断片のほぼ等しい量と反応させる。次いで、形成された４量体の複合体を単離する（４量体の抗体の複合体を調製する方法の説明についてはLansdorpへの米国特許第4,868,109号を参照のこと）。

検出可能な物質の例は、酵素、例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼおよびガラクトシダーゼである。毒性活性を有する物質の例は、細胞障害性細胞、例えば、マクロファージ、好中球、好酸球、NK細胞、LAK細胞、および大きい顆粒のリンパ球または腫瘍細胞に対して毒性の物質、例えば、放射性核種、およびジフテリア毒性およびシリンまたはそれらの弱毒化誘導体である。理解されるように、抗体を細胞障害性細胞上のFcレセプターに対して向けることができる。治療的活性を有する物質の例は化学療法剤、例えば、カルボプラチンおよびメトトレキセートである。好ましくは、化学療法剤はMRP活性を有するタンパク質が耐性を付与する薬物ではない。

毒性または治療活性を有する物質と連結された毒性または治療活性を有する物質に対して向けられた抗体、二重特異性抗体および４量体の抗体の複合体を使用して多薬物耐性腫瘍細胞を処置することができる。したがって、、本発明は製剤学的に許容されうる担体中の抗体、二重特異性抗体および４量体の抗体の複合体からなる組成物を提供する。好ましくは、抗体、二重特異性抗体および４量体の抗体の複合体を、毒性または治療活性を有する物質に、および本発明のタンパク質を発現する腫瘍細胞に連結するか、あるいは結合させることができる。

本発明の組成物は、生体内の製剤学的投与に適当な生物学的に適合性の形態で被検体に投

与される。「生体内の製剤学的投与に適当な生物学的に適合性の形態」は、抗体の治療効果が毒性効果にまさる投与すべき抗体の形態を意味する。用語被検体は、免疫応答を誘発することができる生きている生物、例えば、哺乳動物を包含することを意図する。被検体の例は、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそれらのトランスジェニック種を包含する。治療的に活性量の本発明の治療組成物の投与は、所望の結果を達成するために必要な投与量における時間の間の、有効な量として定義される。例えば、本発明のMRPタンパク質と反応性の抗体の治療的に活性量は、因子、例えば、個体の疾患の状態、年齢、性別、および重量、および個体において所望の応答を誘発する抗体の能力に従い変化するであろう。投与量の養生法を調節して最適な治療的応答を提供するすることができる。例えば、いくつかの分割投与量を毎日投与することができるか、あるいは投与量は治療の場合の事情により示されるように比例的に減少することができる。

活性化合物（例えば、抗体）を便利な方法で、例えば、注射（皮下、静脈内など）、経口的投与、吸入、経皮的適用、または経直腸的投与により投与することができる。投与のルートに依存して、活性化合物は酵素、酸類および化合物を不活性化する他の自然の条件の作用から化合物を保護するための物質で被覆することができる。

抗体組成物は被検体に適当な担体または希釈剤とともに投与し、酵素インヒビターとともに同時に投与するか、あるいは適当な担体、例えば、リポソームとともに投与することができる。ここにおいて使用するとき用語「製剤学的に許容されうる担体」は、希釈剤、例えば、生理食塩水および水性緩衝液を包含することを意図する。MRPタンパク質と反応性の抗体を非経口的投与以外の投与により投与するために、抗体をその不活性化を防止するための物質で被覆するか、あるいは前記物質とともに抗体を同時に投与することが必要である。酵素インヒビターは、膵臓トリプシンインヒビター、ジイソプロピルフルオロホスフェート（DEP）およびトラシロールを包含する。リポソームは油中水滴形乳濁液ならびに普通のリポソームを包含する（Strejanら、（1984）J. Neuroimmunol 7：27）。活性化合物は、また、非経口的または腹腔内に投与することができる。分散液をグリセロール、液状ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物および油中で調製することができる。貯蔵および使用の通常の条件下に、これらの調製物は微生物の成長を防止するために防腐剤を含有することができる。

注射可能な用途に適当な製剤学的組成物は、無菌の水溶液（水溶性である場合）または分散液および無菌の溶液または分散液の即時調製のための無菌の粉末を包含する。すべての場合において、組成物は無菌でなくてはならずかつ容易な注射可能性が存在する程度に流動性でなくてはならない。それは製造および貯蔵の条件下に安定でなくてはならず、そして微生物、例えば、細菌および真菌の汚染に対して保存しなくてはならない。製剤学的に許容されうる担体は、溶媒または、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液状ポリエチレングリコールなど）を含有する分散液、およびそれらの適当な混合物であることができる。適切な流動性は、例えば、被膜、例えば、レクチンの使用により、分散液の場合において要求される粒子サイズの維持によりおよび界面活性剤の使用により維持することができる。微生物の作用の防止は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどにより達成することができる。多くの場合において、組成物の中に等張化剤、例えば、糖類、ポリアルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射可能な組成物の延長した吸収は、組成物の中に吸収を遅延させる物質、例えば、アルミニウムモノステアレートおよびゼラチンを含めることによって発生させることができる。

無菌の注射可能な溶液は、活性化合物（例えば、MRPタンパク質に対して反応性の抗体）を要求される量で適当な溶媒の中に、必要に応じて、前述の成分の１つまたは組み合わせとともに混入し、次いで濾過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散液は基本的分散媒質および要求される前述の他の成分を含有する無菌の賦形剤の中に、活性化合物を混入することによって調製される。無菌の注射可能な多少の調製のための無菌の粉末の場合において、好ましい調製方法は、前もって濾過滅菌したその溶液から活性成

分（例えば、抗体）＋任意の追加の所望の成分の粉末を生ずる真空乾燥および凍結乾燥である。

活性化合物を適当に保護したとき、前述したように、組成物は、例えば、不活性希釈剤または同化可能な食用担体とともに、経口的に投与することができる。ここにおいて使用するとき「製剤学的に許容されうる担体」は、任意のおよびすべての溶媒、分散媒質、被膜、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などを包含する。製剤学的に活性な物質のためのこのような媒質および物質の使用は、この分野においてよく知られている。普通の媒質および物質が活性化合物と不適合性である場合を除外して、治療組成物中のそれらの使用は考えられる。補助的活性化合物を、また、組成物の中に混入することができる。

非経口的組成物は投与の容易さおよび投与の均一性のために投与単位形態で配合することは、ことに有利である。ここにおいて使用するとき投与単位形態は、処置すべき哺乳動物の被検体のために単一の投与として適合した物理的に離散した単位を意味する；各単位は要求される製剤学的に許容されうる担体に関連して所望の治療効果を生成するように計算された前もって決定した量の活性化合物を含有する。本発明の投与単位形態のための規格は、（ａ）活性化合物の独特の特性および達成すべき特定の治療効果、および（ｂ）個体の治療的処置のためにこのような活性化合物活性化合物を配合する技術において固有の制限により支配されたかつそれらに直接に依存する。

VII. トランスジェニック動物およびノックアウト動物

MRPの生物学的活性を有するタンパク質をエンコードする核酸はトランスジェニック動物または「ノックアウト（knock out）」動物を発生させるために使用することができ、これらの動物は引き続いて治療的に有用な試薬の開発およびスクリーニングにおいて有用である。トランスジェニック動物（例えば、マウス）はトランスジーンを含有する細胞を有する動物であり、前記トランスジーンは出生前、例えば、胚形成期における動物または動物の祖先の中に導入された。トランスジーンはトランスジェニック動物を発生させる細胞のゲノムの中に組込まれるDNAである。１つの態様において、配列番号：１に示すヌクレオチド配列、またはその適当な配列からなるヒトMRP cDNAを確立された技術に従いネズミMRP遺伝子をクローニングするために使用することができ、そしてゲノム核酸を使用してMRPタンパク質を発現する細胞を含有するトランスジェニック動物を発生させることができる。トランスジェニック動物、とくに動物、例えば、マウスを発生するための方法はこの分野において普通となりそして、例えば、米国特許第4,736,866号および米国特許第4,870,009号に記載されている。好ましい態様において、本発明の組換え分子を含有するプラスミドをマウスの胚の中にマイクロインジェクションする。とくに、プラスミドを受精した１細胞の卵の雄の前核の中にマイクロインジェクションする；注入された卵を偽妊娠の養い親の雌に移す；そして、養い親の雌の中の卵を妊娠期間の終結まで発育させる。〔Hogan, B. ら、（1986）A Laboratory、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、Cold Spring Harbor Laboratory〕。あるいは、胚の幹細胞系をMRP活性を有するタンパク質をコードする核酸を含有する発現ベクターでトランスフェクションすることができ、そして核酸を含有する細胞を使用して適当な受容体のマウス系統からの胚との凝集キメラを形成することができる。次いで、キメラの胚を適当な系統の適当な偽妊娠の雌マウスの中に移入し、そして胚を妊娠期間の終結まで維持することができる。トランスフェクションされたDNAをそれらの胚芽細胞の中に収容する子孫を使用して、トランスジェニックのマウスを均一に飼育することができる。

典型的には、MRPをコードする遺伝子に操作的に連鎖された組織特異性エンハンサーの使用により、特定の細胞はMRPトランスジーンのとり込みについてターゲッティングされるであろう。例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサーが優先的に心筋細胞の中で操作的に連鎖されている遺伝子の遺伝子を指令するプロモーターおよび／またはエンハンサーを使用して、MRPタンパク質を優先的に心筋組織の中で発現するトランスジェニック動物をつくることができる。適当なプロモーターおよびエンハンサーの例は、心臓のミオシンおよびアクチンのための遺伝子の発現を調節するものを包含する。胚形成期における

動物の胚芽系統の中に導入されたMRPトランスジーンのコピーを含むトランスジェニック動物は、また、種々の組織の中のMRPの発現の増加の効果を検査するために使用することができる。

トランスジェニックマウスにおける本発明の組換え分子の発現のパターンおよび程度は、両方の遺伝子が共転写されて多シストロン性mRNAを形成するように、リポーター遺伝子を組換え分子に融合することによって促進される。リポーター遺伝子は組換え分子の中に普通の方法、例えば、Sambrookら、1989, Molecular Cloning：A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press、に記載されている方法により導入することができる。本発明のタンパク質をコードする多シストロン性mRNAおよびリポータータンパク質の両方のシストロンの効率より発現は、既知の内部の翻訳開始配列、例えば、ポリオウイルスの中に存在するものを含めることによって達成することができる。リポーター遺伝子は本発明の組換え分子の調節配列の制御下にあるべきであり、したがって、本発明のタンパク質をエンコードする遺伝子の発現のパターンおよび程度はリポーター遺伝子の表現型についてアッセイすることによって決定できる。好ましくは、リポーター遺伝子は宿主細胞により表示されない表現型をコードし、そして表現型は定量的にアッセイすることができる。適当なリポーター遺伝子の例は、lacZ（β－ガラクトシダーゼ）、neo（ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ）、CAT（クロランフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）、dhfr（ジヒドロ葉酸リダクターゼ）、aphIV（ヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ）、lux（ルシフェラーゼ）、uidA（β－グルクロニダーゼ）を包含する。好ましくは、リポーター遺伝子はβ－ガラクトシダーゼをコードするlacZである。β－ガラクトシダーゼは、β－ガラクトシダーゼにより青色の生成物に分解されるラクトース類似体Ｘ－gal（５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－ｂ－Ｄ－ガラクトピラノシド）を使用してアッセイすることができる。（参照、例えば、Old R. W. およびPrimrose S. B., Principles of Gene Manipulation。An Introduction to Genetic Engineering、第４版、Oxford University Press, pp. 63-66、組換え体のスクリーニング方法の論考について）。

開示された好ましい態様において使用する実験動物はマウスであるが、本発明はそれに限定されるべきではない。他の種、例えば、ラット、ハムスターおよびウサギを使用することが望ましいことがある。

本発明のトランスジェニック動物を使用して、多薬物耐性の分子的基礎を研究することができる。本発明のトランスジェニック動物は、また、多薬物耐性の発生を防止し、遅くするか、あるいは逆転する能力について物質を試験するために使用できる。トランスジェニック動物を未処理対照のトランスジェニック動物と平行して物質で処理することができる。

本発明のトランスジェニック動物からの細胞を標準の組織培養技術により培養することができる。とくに、本発明の組換え分子を有する細胞を培養し、そして多薬物耐性の発生を防止し、遅くするか、あるいは逆転する能力について物質を試験するために使用できる。さらに、MRP活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の非ヒト相同体を使用して、欠陥のあるか、あるいは変更されたMRP遺伝子を有するMRP「ノックアウト」動物を構成することができる。例えば、配列番号：１に示すヌクレオチド配列、またはその適当な配列からなる、ヒトMRP cDNAを、確立された技術に従い、ネズミMRP遺伝子をクローニングするために使用できる。ゲノムMRP DNAの一部分（例えば、エクソン）を欠失させるか、あるいは他の遺伝子、例えば、組込みをモニターするために使用できる選択可能なマーカーをコードする遺伝子と置換することができる。変更されたMRP DNAはある種の細胞の中で内因性MRP遺伝子と均質に組換えられ、そして変更された遺伝子を含有するクローンを選択することができる。変更された遺伝子を含有する細胞の動物、例えば、芽細胞の中に注入して、トランスジェニック動物について記載したように凝集キメラを形成する。キメラ胚を前述したように移植する。生ずるアミンの生殖細胞系の中への変更された遺伝子の転移は標準の技術により確証することができ、そして動物はすべての細胞における変更されたMRP遺伝子を有する動物を飼育するために使用できる。したがって、機能的MRPタンパク質

を発現することができないノックアウト動物を作ることができる。このようなノックアウト動物は、例えば、MRP多薬物耐性タンパク質の不存在下に化学療法剤の有効性を試験するために使用できる。

VIII. 本発明の使用

本発明の単離された核酸は、腫瘍の多薬物耐性を決定するために診断的に使用する分子プローブとして有用である。実施例１において証明されるように、ある種の腫瘍細胞系の多薬物耐性は配列番号：１のヌクレオチド配列に相当する細胞のmRNAの発現の増加に関連する。したがって、本発明の核酸は検出可能なマーカー、例えば、放射性、蛍光性またはビオチニル化マーカーで標識化し、そして普通のドットブロット、ノザンハイブリダイゼーションまたはインサイチュ・ハイブリダイゼーションにおいて使用して、生物学的試料、例えば、腫瘍バイオプシーの細胞から全体の細胞のmRNAまたはポリ（Ａ）＋RNAをプロービングすることができる。

核酸プローブは、本発明のMRPに関係するか、あるいはそれに類似するタンパク質をコードする遺伝子、好ましくはヒト細胞中の遺伝子を検出するために使用できる。好ましくは、本発明のヌクレオチド配列、またはそのセグメントからなる核酸をプローブとして使用して、本発明の遺伝子で共増幅されかつ同一の増幅ユニット、またはアンプリコン内に染色体位置16p13.1に存在する遺伝子または遺伝子の一部分に相当するDNA断片を同定することができる。さらに詳しくは、本発明の核酸はコスミドまたは酵母の人工的染色体ベクターの中で構成されたヒトゲノムDNAライブラリーを、この分野において標準の方法により、プローブとして使用して、多薬物耐性細胞系、例えば、H69ARにおいて検出された増幅ユニットからなるDNAの隣接するセグメントを定めることができる。この方法において、H69ARおよびなお検査すべきであるが、HeLa細胞系J2cおよびHT1080DR4細胞系を包含することが知られている他のヒト細胞系の多薬物耐性表現型に付与するか、あるいはそれに寄与する追加の遺伝子を同定することができる。

本発明のアンチセンス核酸は、MRP活性を有するタンパク質をエンコードする核酸（例えば、mRNA）の発現を阻害し、これによりMRP活性を有するタンパク質の発現を減少するために有用である。MRP活性を有するタンパク質の発現の増加は多薬物耐性に関連しかつ細胞に多薬物耐性を付与することができるので、このようなタンパク質の発現の減少はアンチセンス核酸が導入された細胞の多薬物耐性を阻害または逆転することができる。アンチセンス核酸を培養において多薬物耐性細胞の中に導入して、MRPの発現を阻害することができる。１または２以上のアンチセンス核酸、例えば、オリゴヌクレオチドを培地中の細胞に、典型的には200μｇ／mlで、添加することができる。MRPの発現が阻害された培養多薬物耐性細胞は、潜在的治療剤の効能を試験するために有用である。例えば、MRPおよびＰ－糖タンパク質の両方を発現する腫瘍細胞系においてMRPの発現を阻害して、特定の治療剤に対して観察された耐性または感受性へのMRPの寄与を決定することができる。

本発明のアンチセンス核酸、またはそのオリゴヌクレオチドは、また、被検体における多薬物耐性を補正または防止するために使用できる。例えば、アンチセンス配列を使用して多薬物耐性哺乳動物細胞を化学療法剤に対して感受性することができる。被検体へのアンチセンス核酸の投与は、アンチセンスRNAの連続的生産を可能とする組換え発現ベクターの中にアンチセンス核酸が含有されているとき、最も有効であることがある。アンチセンス核酸またはそのオリゴヌクレオチドからなる組換え分子は、生体内の肺組織を包含する組織の中に、送り出しベヒクル、例えば、リポソーム、ライノウイルスのベクター、アデノウイルスのベクターおよびDNAウイルスのベクターを使用して導入することができる。被検体における問題の細胞（例えば、多薬物耐性腫瘍細胞）にターゲッティングすることができる送り出しベヒクルを選択することができる。アンチセンス核酸は、また、単離された細胞、例えば、造血系のそれらの中に、半ビボでウイルスのベクターまたは物理的技術、例えば、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレイションおよび化学的方法、例えば、共沈およびリポソームの中へのDNAのとり込みを使用して導入し、そしてこのような細胞をドナーに戻すことができる。組換え分子は、また、エアゾールの形態でまたは洗浄により送り出すことができる。肺の悪性疾患の処置において、アンチセンス配列を

肺組織にエアゾールまたは洗浄により直接送り出すことができる。
したがって、本発明は、配列番号：２に示すタンパク質をコードする核酸に対してアンチセンスである核酸を多薬物耐性細胞の中に導入することによって、多薬物耐性細胞の多薬物耐性を阻害する方法を提供する。
本発明の単離された核酸およびアンチセンス核酸は、前述したように、組換え発現ベクターを構成するために使用することができる。次いで、組換え発現ベクターは、組換え発現ベクターを含有する形質転換体宿主細胞を作るために、本発明の核酸によりコードされるタンパク質を発現するために、そして前述したように本発明のタンパク質を単離するために有用である。本発明の単離された核酸およびアンチセンス核酸は、また、前述したようにトランスジェニック動物およびノックアウト動物を構成するために使用できる。
実施例５および６において証明されるように、本発明の核酸を含有する組換え発現ベクターを使用して、トランスフェクションされた細胞系に多薬物耐性を付与するタンパク質を細胞の中で生産する薬物感受性細胞系をトランスフェクションすることができる。こうして、本発明の組換え発現ベクターは、薬物感受性細胞に多薬物耐性を付与するために有用である。したがって、本発明は、配列番号：１に示すヌクレオチド配列からなる核酸で細胞をトランスフェクションして細胞に薬物耐性を付与することによって、薬物への暴露のための細胞障害性から薬物感受性細胞を保護する方法を提供する。好ましい態様において、薬物感受性細胞は心筋細胞または造血幹細胞である。細胞に薬物耐性を付与する能力は重要な臨床的用途を有する。化学療法剤についての主要な投与制限因子は、患者における正常細胞ならびに腫瘍細胞系へのそれらの細胞障害性である。多薬物耐性腫瘍をもつ患者において、化学療法剤の投与量の増加は正常細胞へのこれらの化学療法剤の毒性により禁止される。アントラサイクリンの場合において、この薬物の心臓毒性は主要な臨床的制限であることがある。分割している細胞を急速にターゲッティングする化学療法薬物について、造血細胞は主要な臨床的制限であることがある。さらに、神経毒性が起こることがある。こうして、細胞に多薬物耐性を付与することによって、化学療法剤の作用から非耐性正常細胞を保護することは主要な臨床的重要性を有する。
本発明の形質転換体宿主細胞、およびそれらを作るために使用する組換え発現ベクターは、多薬物耐性細胞に対するそれらの有効性について潜在的治療剤を試験するために有用である。これらの治療剤は、多薬物耐性細胞に対してそれら自体細胞障害性であるか、あるいは他の治療剤の化学的感作物質である物質を包含する。ここにおいて使用するとき、用語「化学的感作物質」は、多薬物耐性細胞に対する治療剤の効能を増加するおよび／または治療剤に対する多薬物耐性細胞の耐性を減少することができる物質を意味する。
治療剤の化学的感作物質を同定する方法が提供される。この方法は、試験すべき物質の存在または不存在下に、治療剤に対する耐性を細胞に付与する核酸でトランスフェクションされた細胞と治療剤をインキュベーションし、試験すべき物質の存在または不存在下にインキュベーションしたとき、治療剤に対する細胞の耐性を決定し、そして前記物質の不存在下にインキュベーションしたときの治療剤に対する細胞の耐性に比較して、前記物質の存在下にインキュベーションしたときの治療剤に付与する細胞の耐性を減少する前記物質の能力により治療剤の化学的感作物質である物質を同定することを包含する。好ましい態様において、核酸は配列番号：１に示すヌクレオチド配列からなる核酸を含有する組換え発現ベクターである。好ましくは、核酸をその中にトランスフェクションする細胞はトランスフェクションの前に薬物感受性であり、こうして潜在的化学的感作物質の作用を単一の、単離された多薬物耐性付与性タンパク質の存在下に評価する。潜在的化学的感作物質を試験するために使用する細胞は培養細胞、例えば、本発明の形質転換体宿主細胞であり、そして治療剤および試験すべき物質を培養において細胞とインキュベーションする。細胞は本発明の核酸についてトランスジェニックの、トランスジェニック動物における多薬物耐性細胞であることができ、そして治療剤および試験すべき物質をトランスジェニック動物に投与する。さらに、細胞は本発明の多薬物耐性トランスジェニック動物から単離された培養細胞であることができる。試験すべき物質の存在およびの不存在下に細胞に対して細胞障害性である治療剤の濃度を決定することによって、潜在的治療剤の存在およびの

不存在下の治療剤に対する細胞の耐性を評価する。
本発明は、試験すべき物質を多薬物耐性を細胞に付与する核酸でトランスフェクションされた細胞とインキュベーションし、そして細胞に対する物質の細胞障害性を決定することを包含する。多薬物耐性細胞に対して直接に細胞障害性である物質を同定する方法を提供する。好ましい態様において、核酸は配列番号：１に示すヌクレオチド配列からなる組換え発現ベクターである。好ましくは、核酸をその中にトランスフェクションする細胞はトランスフェクションの前に薬物感受性であり、こうして潜在的化学的感作物質の作用を単一の、単離された多薬物耐性付与性タンパク質の存在下に評価する。潜在的細胞障害性物質を試験するために使用する細胞は培養細胞、例えば、本発明の形質転換体宿主細胞であり、そして試験すべき物質を培養において細胞とインキュベーションする。あるいは、細胞は本発明の核酸についてトランスジェニックの、トランスジェニック動物における多薬物耐性細胞であることができ、そして試験すべき物質をトランスジェニック動物に投与する。さらに、細胞は本発明の多薬物耐性トランスジェニック動物から単離された培養細胞であることができる。
さらに、多薬物耐性細胞系、例えば、H69AR、または同等の細胞系を、治療剤の化学的感作物質を同定するか、あるいは多薬物耐性細胞に対して直接に細胞障害性である物質を同定する方法において使用することができる。
本発明の単離されたタンパク質は、前述したように、MRP活性を有するタンパク質に対して反応性の抗体を作るために有用である。あるいは、本発明の抗体は標準のイムノアフィニティー技術により本発明のタンパク質を単離するために使用できる。さらに、二重特異性抗体および４量体の抗体の複合体を包含する、本発明の抗体は診断の目的および治療の目的に有用である。
本発明の１つの態様において、検出可能な物質、例えば、蛍光性マーカー、酵素または放射性マーカーで標識化された抗体を使用して、腫瘍試料または生体内の多薬物耐性腫瘍細胞を同定することができる。腫瘍試料の分解を防止するために、試料を－20℃以下の温度において貯蔵することができる。患者から取り出した腫瘍組織の組織の切片、例えば、凍結乾燥または新鮮な凍結した切片を、また、腫瘍試料として使用することができる。試料を同定し、そして抗体のために使用する標識化の種類に依存して適当な固定法を選択する。あるいは、細胞膜の画分を患者から取り出した腫瘍組織から分離し、そして腫瘍組織として使用することができる。普通の方法、例えば、分画遠心分離または密度勾配遠心を使用して膜の画分を分離することができる。
多薬物耐性腫瘍細胞は、本発明の抗体、例えば、モノクロナール抗体を多薬物耐性について試験すべき物質とインキュベーションすることによって同定される。腫瘍細胞への抗体の結合は、MRP活性を有するタンパク質が腫瘍細胞上に存在することを示す。腫瘍細胞に結合する抗体のレベルを正常の対照細胞へ結合する抗体のレベルと比較することができ、そして正常細胞と比較して腫瘍細胞への抗体の結合の増加は多薬物耐性のインジケーターとして使用することができる。細胞（試験すべき腫瘍細胞または正常の対照細胞）に対する抗体の結合は、抗体の標識化に使用した検出可能な物質を検出することによって決定することができる。検出可能な物質は抗体に直接結合することができるか、あるいは他の分子に連結することができる。例えば、ウサギFc領域（例えば、ウサギの免疫化により調製された）を有する本発明の抗体はウサギFc領域に対する第２抗体を使用して検出することができ、ここで第２抗体は検出可能な物質に連結されている。
多薬物耐性腫瘍細胞は、前述したように調製した腫瘍の試料において、前述したように生体内で検出することができる。例えば、検微鏡のスライド上の腫瘍切片を標準の免疫化学的技術を使用して抗体と反応させることができる。さらに、腫瘍細胞の単細胞の懸濁液を形成できる場合、腫瘍細胞を抗体と反応させそしてフローサイトメトリーにより分析することができる。あるいは、多薬物耐性腫瘍細胞は腫瘍を有する患者において生体内で検出することができる。標識化抗体を被検体の中に導入し、そして腫瘍に結合した抗体を検出することができる。さらに、被検体におけるその存在および位置が標準の画像技術により検出できる放射性マーカーで、抗体を標識化することができる。

また、本発明の抗体、およびそれらの組成物を使用して多薬物耐性細胞の多薬物耐性を阻害することができる。本発明は、多薬物耐性細胞により発現された配列番号：２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質の活性を阻害することからなる多薬物耐性細胞の多薬物耐性を阻害する方法を提供する。好ましくは、多薬物耐性細胞は腫瘍細胞である。好ましい態様において、配列番号：２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質に結合する分子は、本発明のモノクロナール抗体、二重特異性抗体または４量体の免疫学的複合体である。多薬物耐性はこの分子が結合するタンパク質のMRP活性を妨害することによって阻害することができる。例えば、薬物を輸送するMRPタンパク質の能力を障害することができる。したがって、MRP活性を有するタンパク質に結合しかつその結合がタンパク質のMRP活性を阻害する分子は本発明の範囲内に入る。配列番号：２に示すアミノ酸配列からなる本発明の単離されたタンパク質を使用して、標準の結合アッセイにおいてMRP活性を有するタンパク質に結合する、本発明の抗体を包含するしかつそれらに加えた分子を同定することができる。MRPタンパク質の活性を阻害することによって、多薬物耐性が阻害される多薬物耐性細胞は、さらに、MRP活性の阻害のために細胞がもはや耐性ではないまたは耐性がより低い治療剤で処理して、細胞を殺すことができる。

配列番号：２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質に結合する分子は、また、そのタンパク質を発現する多薬物耐性細胞を殺す方法において使用することができる。好ましくは、多薬物耐性細胞は腫瘍細胞である。多薬物耐性細胞の破壊は分子を毒性または治療活性を有する物質で標識化することによって達成することができる。用語「毒性または治療活性を有する物質」は、ここにおいて使用するとき、その作用が細胞を破壊することができる分子、例えば、放射性同位元素、毒素（例えば、ジフテリア毒素またはシリン）、または化学療法薬物、ならびにその作用が細胞を破壊することができる細胞、例えば、細胞障害性細胞を包含することを意図する。多薬物耐性細胞に結合する分子は、毒性または治療活性を有する物質に直接連結することができる（例えば、リシン連鎖モノクロナール抗体）か、あるいは物質に間接的に連鎖させることができる。例えば、腫瘍細胞および細胞障害細胞を架橋することができる二重特異性抗体を使用し、これにより腫瘍細胞の溶解を促進することができる。二重特異性抗体は、細胞障害細胞のＴ細胞の応答への結合により、腫瘍細胞および細胞障害細胞を架橋することができる。

本発明の組成物および方法は、多薬物耐性を表示する腫瘍、とくにアントラサイクリン、エピポドフィロトキシン、ニチニチソウのアルカロイド、および疎水性薬物に対して耐性を表示する腫瘍をもつ患者を処置するために使用できる。腫瘍細胞の多薬物耐性を阻害するおよび多薬物耐性腫瘍細胞を殺す本発明の方法は、多薬物耐性腫瘍を有する患者に適用することができる。組成物および方法は、乳癌、白血病、線維肉腫、子宮頸癌、および肺癌、とくに小細胞肺癌および非小細胞肺癌の処置においてとくに有用であることができる。

本発明は、また、配列番号：２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質に結合する分子；タンパク質に結合した分子、未反応のタンパク質または未結合の分子を検出する手段；試料中のタンパク質の量を決定する手段；および試料中のタンパク質の量を標準と比較する手段；からなる多薬物耐性腫瘍細胞を同定するための診断キットを提供する。好ましくは、分子はモノクロナール抗体である。本発明の二重特異性抗体および４量体の抗体の複合体を包含する。MRP活性を有するタンパク質に結合することができる他の分子を使用することができる。診断キットは、また、そのキットの使用のための取り扱い説明書を含有することができる。

本発明は、さらに、腫瘍細胞の試料からのmRNAとハイブリダイゼーションするための、配列番号：１に示配列、またはそのオリゴヌクレオチド断片に対して相補性のヌクレオチドのプローブ；mRNAに結合したヌクレオチドのプローブを検出する手段；試料中のmRNAの量を決定する手段；および試料中のmRNAの量を標準と比較する手段；からなる多薬物耐性腫瘍細胞を同定する診断キットを提供する。診断キットは、また、そのキットの使用のための取り扱い説明書を含有することができる。

本発明を以下の実施例によりさらに例示する。しかしながら、実施例は本発明の態様を例

示することを意図しそして本発明の領域を限定すると解釈すべきではない。この出願を通じて引用されたすべての参考文献および発行された特許および特許出願を引用によって加える。

実施例１：H69AR細胞の中で過度に発現されたmRNAから誘導されたcDNA配列の単離

H69AR細胞により表示される多薬物耐性の原因となる調製の探索の一部分として、H69AR mRNAから構成されたランダムに活性化されたcDNAライブラリーを、H69およびH69AR mRNAから調製された全体のcDNAとの異なるハイブリダイゼーションを使用してスクリーニングした。単離されたクローンの１つは2.8kbのcDNAインサートを含有し、そしてノザンブロットで分析したとき、とくに強い示差的シグナルを与えた（第1A図）。各細胞系からの１μｇのポリ（Ａ$^+$）RNAの分析は標準の方法を使用して実施した。ポリ（Ａ$^+$）RNAはファスト・トラック（Fast Track^R）単離キット（Invitrogen）を使用して獲得し、そして１μｇを変性ホルムアルデヒドのアガロースゲル上で電気泳動させた。RNAをニトロセルロース膜に移し、そして50％ホルムアルデヒド、５×SSPE（１×＝150mMのNaCl，10mMのNaH_2PO_4，１mMのEDTA，pH7.4）、2.5×デンハルト溶液（50×＝１％ウシ血清アルブミン、１％ポリビニルピロリドン、１％フィコール）の中でプレハイブリダイゼーションし、そして42℃において４～16時間の間剪断、変性ヘリング試験DNA（100μｇ／ml）にかけた。ブロットをMRPの1.8kbのEcoRI断片でプロービングし、ランダムプライミング方法によりα－〔32Ｐ〕－cCTP（3000Ci／mmol；Dupont／NEN）で＞５×10^8cmp／μｇDNAの比活性に標識化した〔A. P. Fciberg, B. Vogelstein, Analyt. Biochem. 132, 6（1983）〕。ハイブリダイゼーションを42℃において16～20時間の間実施した。ブロットを0.1％SDSおよび0.1×SSC（pH7.0）中で各30分間52℃において３回洗浄し、次いでフィルムに露出した。ゲルのRNA負荷の変動を推定するために、ブロットを^{32}Ｐ標識化β－アクチンcDNA（201pBv2.2）で再プロービングした〔H. Ueyama, H. Hamada, N. Battula, T. Kakunaga, Mol. Cell. Biol. ４, 1073（1984）〕。第1A図に示すオートラジオグラフを増強スクリーンを使用して－70°において５時間の間露出した。H69AR細胞の中で過度に発現されたmRNAの大きさはほぼ７kbであると推定された。フィルムの延長した露出はH69およびH69AR細胞におけるこのmRNAの低いレベルを明らかにした。このmRNAの濃度はH69細胞に関してH69AR細胞において100倍増加した。H69PR中のこのmRNA、すなわち、H69ARの薬物感受性復帰突然変異体、のレベルはH69ARの中に見出されるレベルに関してほぼ20倍減少し、さらにこの特定のmRNAの過度の発現と多薬物耐性表現型との相関関係を実証する。

H69，H69ARおよびH69PR DNAのサザンブロット分析は、過度の発現の基礎となる主要なメカニズムが遺伝子の増幅であることを示した。10μｇの各DNAをEcoRIで消化し、0.7％アガロースゲルを通して電気泳動させ、そしてニトロセルロース膜上にブロットした。DNAをMRPの1.8kbのEcoRI cDNA断片とハイブリダイゼーションさせ、α－〔32Ｐ〕－cCTPでランダムプライミングすることによって標識化した。第1B図に示すオートラジオグラフは－70℃における６時間露出である。いくつかの制限消化物の検査および負荷されたDNAの量の正規化に基づいて、MRP遺伝子は耐性H69AR細胞の中で40～50倍増幅され、そしてH69およびH69AR細胞における遺伝子のコピー数の差を検出されなかった。

mRNAは、また、Ｐ－糖タンパク質を過度に発現しないドキソルビシン選択多薬物耐性HeLa細胞の中で10～15倍過度に発現された（第1C図）。S3およびJ2はR. M. ベイカー（Baker）博士（Roswell Park Memorial Institute）の実験室から入手した薬物感受性および耐性HeLa細胞系である。第1A図について説明したように、各細胞系からの２μｇのポリ（Ａ$^+$）RNAを電気泳動させ、ブロットし、そしてMRP cDNAでプロービングした。第1C図に示すMRPおよびβ－アクチンのオートラジオグラフは、－70℃における、それぞれ、18時間および１時間の露出である。S3およびJ2細胞からのDNAのサザンブロッティングは、MRP遺伝子が耐性細胞系において10～15倍増幅されることを示した。これらの発見は、多薬物耐性をもつこのmRNAの増加したレベルの関連のそれ以上の証拠を提供する。

初期の2.8kbのcDNAクローンを配列決定し、H69AR cDNAライブラリーを合成オリゴヌクレオチドで再スクリーニングすることによってオーバーラップするクローンの単離を可能とした。多薬物耐性関連タンパク質（MRP）と表示するタンパク質をエンコードする、単一

の、延長した1531アミノ酸のオープンリーディングフレームが定められた。翻訳されたゲンバンク（GenBank）およびスイスプロット（SeissProt）のデータバンクを、FASTAプログラムを使用してMRPに対する類似性についてサーチした。このサーチにより、MRPは輸送系のATP結合性カッセト（ABC）上科の新規な構成員であることが明らかにされた。このスーパーファミリーの構成員は、真核生物および原核生物の両者における細胞膜を横切る広範な種類の分子のエネルギー依存性輸送に関係する。ヒト多薬物トランスポーターのＰ－糖タンパク質（MDR1）および膵嚢胞性線維症のトランスメンブレンコンダクターレギュレーター（CFTR）は、このスーパーファミリーに包含される。

実施例２：ABCトランスポータースーパーファミリーの他の構成員に対するMRPの関係

ジェネティック・コンピューター・グループ（Genetics Computer Group）パッケージ（バージョン７）からのPILEUPプログラムを使用して、フェング（Feng）およびドーリトル（Doolttle）〔J. Mol. Evol. 25, 351（1987）〕の進行的整列法（progressive aligment method）の変更したバージョンにより、ABCトランスポータースーパーファミリーの種々の構成員に対するMRPの関係を検査した。疎水性トランスメンブレン領域および引き続くヌクレオチド結合性領域から構成され、そしてその配列をゲンバンクおよびスイスプロットのデータバンクから検索することができた、ABCタンパク質の系統発生的に広い範囲の代表的選択をこの分析に含めた。この分析はタンパク質のこの族を２つの主要な下位群に分割する（第２図）。主要な下位群の一方はMRP（Hum/MRP）、リーシュマニアＰ－糖タンパク質関係分子（Lei/PgpA）およびCFTR（Hum/CFTR, Bov/CFTR, Mus/CFTRおよびSqu/CFTR）を含有するクラスターから成る。他方の下位群は、Ｐ－糖タンパク質、MHCクラスII連鎖ペプチドトランスポーター（Hum/Tap2, Mus/Tap1）、細菌エキスポーター（Eco/HlyB, Pas/LktB）、ヘテロシスト分化タンパク質（Ana/HetA）、マラリア寄生体トランスポーター（Pfa/mdr1）および酵母交配因子エキスポーター（Ysc/Ste6）から成る。

第２図におけるデンドログラムが示すように、MRPはABCトランスポーター上科の前に同定された構成員に遠く関係するのみである。分析はそれがLei/PgpAに最も密接に関係することを示唆するが、MRPとLei/PgpAとの間の類似性は主として２つの領域の中に存在し、両方の領域はヌクレオチド結合性折りたたみ（NBF）の特徴を含有する（第3A図）。第２図に記載するようにPILEUPを使用して整列を発生させた。示されるMRP配列は４つのオーバーラップするラムダgt11cDNAクローンからコンパイルした。Lei/PgpAのイニシエイターのメチオニンと整列するMRPにおけるメチオニン残基において整列は開始する。MRPそれ自体の予測されたイニシエイターのメチオニンは上流の66アミノ酸に位置する。同一のアミノ酸および保存されたアミノ酸は、それぞれ、二重および単一の点により第3A図において識別されている。ABCトランスポーターのヌクレオチド結合性折りたたみ（NBF）の特徴を示すウォーカー（Walker）ＡおよびＢのモチーフおよび「活性のトランスポーター」族の特徴は単一の線により示されかつ、それぞれ、Ａ，ＢおよびＣと表示されている。各タンパク質の予測されたトランスメンブレン領域は二重線により示されている。破線により示されているLei/PgpAにおける領域は、トランスメンブレン領域のそれに近づく平均の疎水性値を有する。

Ｐ－糖タンパク質の二連構造は動物および植物の進化の分離の前に起こった祖先の遺伝子の重複を反映することが提案された。しかしながら、MRPおよびLei/PgpAのNH2末端およびCOOH末端の比較は、Ｐ－糖タンパク質の２つの対応する領域の間において典型的に見出されたものよりより低い類似性を明らかにした。これがMRP, Lei/PgpAおよびHum/CFTRの共通の構造的特徴であるかどうかを決定するために、それらのNH2末端およびCOOH末端のNBFを互いにかついくつかのＰ－糖タンパク質のそれらと整列させた。試料としてヒトＰ－糖タンパク質（Hum/Mdr1）を使用する１つのこのような比較を第3B図に示す。ltpgpA（Lei/PgpA）（アミノ酸650-799および1303-1463）、ヒトCFTR（Hum/CFTR）（アミノ酸441-590および1227-1385）、およびMDR1（Hum/Mdr1）（アミノ酸410-573および1053-1215）に相当するMRPの推定されたアミノ酸配列のNH_2末端（Ｎ）およびCOOH末端（Ｃ）の半分が第3B図に示されている。配列はPILEUPにより整列されているとして表されている。逆のタイプはその位置における４アミノ酸のうちの３つが同一であるか、あるいは保存されているこ

とを示す。第3A図に記載する保存されたモチーフＡ，Ｂ、およびＣは単一の線によりアンダーラインが引かれている。MRP，Hum/CFTRおよびLei/PgpAのNH_2末端は、とくに保存されたモチーフの間隔において、Hum/Mdr1のNH_2末端のNBFからそれらを明瞭に区別する構造的特徴を共有する。間隔のこの差は、また、３つのタンパク質の各々におけるNH_2末端およびCOOH末端のNBFの間の比較的低い類似性に寄与する。さらに、MRP，Hum/CFTRおよびLei/PgpAのCOOH末端は、Hum/Mdr1のCOOHまたはNH末端のNBFに対してより互いに対していっそう類似する。MRPに関するNH末端のNBFについての類似性の評点は次の通りである：Lei/PgpA（0.93），Hum/CFTR（0.85）およびHum/Mdr1（0.60）。匹敵するCOOH末端のスコアは、Lei/PgpA（0.87），Hum/CFTR（0.84）およびHum/Mdr1（0.73）である。同一タンパク質内のNH末端およびCOOH末端の類似性の評点は次の通りである：MRP（0.61），Lei/PgpA（0.60），Hum/CFTR（0.62）およびHum/Mdr1（1.10）。これらの観測を第２図に示す全体の分析と組み合わせると、示唆されるように、MRP，Lei/PgpAおよびCFTRはNH_2末端およびCOOH末端の両方を含有する共通の祖先から進化し、この祖先は動物／植物の分離前にＰ－糖タンパク質の祖先の遺伝子と区別されるか、あるいはそれから分岐された。

実施例３：正常組織の発現

Ｐ－糖タンパク質の構造および薬物の外向きフラックスのポンプとして作用する能力の知識にかかわらず、Ｐ－糖タンパク質の１または２以上の生理学的役割は明らかにされてきていない。その機能の手がかりをあたえるいくつかの可能性は正常組織におけるその分布により提供された。Ｐ－糖タンパク質は分泌器官および組織、例えば、副腎、腎臓、結腸の内腔上皮およびネズミの妊娠中の子宮の中で高度に発現される。また、それは肺において検出されたが、この発見は変動する。それが発現される細胞の型に基づいて、Ｐ－糖タンパク質はステロイドの輸送および／または生体異物に対する保護に関係することが仮定された。ある範囲のヒト組織からの全体のRNA調製物のノザンブロット分析により、MRPは肺、精巣および末梢血液単核細胞（PBMC）の中で比較的高いレベルで発現されることが示された（第４図）。肺および精巣のRNAはクロンテク・ラボラトリーズ（Clontech Laboratories）（カリフォルニア州パロアルト）から入手した。健康なボランティアからの末梢血液のフィコール－アイソパーク（Ficoll-Isopaque）（比重1.078ｇ／ml；Pharmacia）上の遠心により単離された細胞から、PBMC RNAを調製した。肺、精巣およびPBMCからの全体のRNA（30μｇ）およびH69AR細胞（10μｇ）を第1A図についてのように分析した。第４図に示すオートラジオグラフは、MRPの0.9kbのEcoRI cDNA断片でプロービングしそして正常組織のRNAについて38時間およびH69AR RNAについて24時間露出したブロットからのものである。ブロットをストリッビングし、そして^{32}Ｐ標識化β－アクチンcDNAで再プロービングした。アクチンのオートラジオグラフは24時間の露出である。MRPの転写体は胎盤、脳、腎臓、唾液腺、子宮、肝臓および脾臓における検出レベル以下であった。

実施例４：ヒトMRP遺伝子のマッピング

ヒトCFTRおよびMDR1遺伝子は、それぞれ、染色体７にバンドq31およびq21においてマッピングされた。これらのタンパク質に対するMRPの可能な進化の関係は、MRP遺伝子がこれらの前に同定された位置の１つに連鎖させることができる可能性の検査を促進した。MRP cDNAの1.8kbのEcoRI断片のインサイチュ・ハイブリダイゼーションを、ハーパー（Harper）およびサウンダース（Saunders）〔Chromosoma ８，431（1981）〕の方法により実施した。スライド上の中期染色体を70℃において70％脱イオン化ホルムアミド、２×SSC中で２分間変性し、次いでエタノールで脱水した。ハイブリダイゼーション混合物は50％脱イオン化ホルムアミド、10％硫酸デキストラン、２×SSC（pH６）、20μｇ／ml超音波処理サケ精子DNAおよび0.2μｇ／ml ^{3}Ｈ標識化MRP cDNAから成っていた。cDNAプローブをマルチプライム（Multiprimc）DNA標識化系（Amersham）を使用して〔^{3}Ｈ〕－dTTPおよび〔^{3}Ｈ〕－dATP（New England Nuclear）で8.5×10^{8}cpm/μｇ DNAの比活性に標識化し、そしてハイブリダイゼーション溶液中で70℃において５分間変性した。50μｌのプローブ溶液を各スライド上に配置し、そして37℃において一夜インキュベーションした。ハイブリダイゼーション後、スライドを50％脱イオン化ホルムアミド、２×SSC中で、次いで２×SSC（pH７）中で洗浄し、次いでエタノール中で順次に脱水した。スライドをコダック（Kodak

）NTB／２乳剤で被覆し、そして４℃において５週間露出後に現像した。染色体を変更蛍光、0.25%ライト（Wright）染色法で染色した〔C. C. Lin, P. N, Daper, M. Braekeleer, Cytogener. Cell Genet. 39, 269（1985）〕。よくバンド化した中期染色体の直ぐ上またはそれに接触する200銀粒子の位置を、ヒト核形のISCN誘導イディオグラム上に記録した。粒子の有意なクラスター化（40）が16p領域において観察され（ｐ＜0.0001）そして分布のピークは16p13.1であり、MRPがCFTRまたはMDR子遺伝子のいずれにも連鎖しないことが確証された。ほぼ160中期を検査した。これらの結果を第５図に要約する。

実施例５：薬物感受性細胞中のMRPの発現はその細胞にドキソルビシン耐性を付与する

MRPおよびmRNAの濃度の増加は種々の組織から誘導された多薬物耐性細胞系において検出され、そしてこれらの細胞系のいくつかは、また、バンドp13.1におけるMRPをスパニングする染色体16の領域の増幅および翻訳の結果として、MRP遺伝子の多数のコピーを含有することが示されたが、細胞系を誘導するために使用した多段選択法にかんがみて、MRP遺伝子の過度の発現は多薬物耐性を付与するために要求される１組の変更のただ１つの成分である可能性がある。MRP発現ベクターを構成し、この発現ベクターを薬物感受性細胞の中にトランスフェクションし、そしてトランスフェクションされた細胞集団の相対的薬物耐性を評価することによって、MRP単独が薬物耐性を薬物感受性細胞系に付与する能力を決定した。

MRP mRNAの完全なコーディング領域＋５’非翻訳配列の86ヌクレオチドおよび３’非翻訳配列の32ヌクレオチドをアセンブリングし、そしてヒトサイトメガロウイルスのプロモーターの制御下に発現ベクターpRc/CMVの中に移した。ベクター、pBluescript II KS^+（Stratagene）の中で、オーバーラップするcDNAクローンまたはこれらのクローンから発生したPCR生成物を使用して、MRP mRNAの完全なコーディング領域を含有するDNA断片をアセンブリングした。無傷のMRP断片が真核生物の発現ベクター、pRc/CMV（Invitrogen）に動く前に、DNA配列の分析によりMRP配列の信頼性を確証した。発現ベクター中のMRP断片の完全性を詳細な制限マッピングおよびクローニング部位のDNA配列分析により評価した。pRc/CMVベクターにおいて、MRPの発現はヒトサイトメガロウイルスの真ぐ初期の遺伝子からのエンハンサー／プロモーター配列の制御下にある。MRP転写体は、また、３’非翻訳配列およびベクターにより提供されるウシ成長ホルモンのmRNAからのポリアデニル化シグナルを含有する。こうして、pRc/CMV-MRP構造体は、全体のコーディング配列（そのうちの86ヌクレオチドはMRP mRNA配列から誘導される）、および３’非翻訳配列のほぼ250ヌクレオチド（そのうちの32ヌクレオチドはMRP mRNA配列から誘導される）を含む5.2～5.3kbの転写体を発生する。このベクターは、また、ゲネチシン（G418）に対する耐性を付与する細菌のアミノグリコシド３’ホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含有する。

スーパーコイルDNAおよび標準のリン酸カルシウムトランスフェクション法を使用して、親のベクター、またはMRPコーディング領域を含有するベクターでHeLa細胞をトランスフェクションした。標準のリン酸カルシウムトランスフェクション法を使用して、pRc/CMVベクターまたはMRPコーディング領域を含有するベクターでHeLa細胞をトランスフェクションした〔J. Sambrook, E. F. Firtsch, T. Maniatis, Molecular Cloning：A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Prcss、コールド・スプリング・ハーバー・ニューヨーク（1989）〕。６ウェルの組織培養プレートの各ウェル中のほぼ50,000細胞を、リン酸カルシウム沈澱法において10μｇのスーパーコイルDNAに対して16時間暴露した。48時間後、成長培地を交換してG418を200μｇ／mlで含め、これをpRc/CMVベクターによりエンコードされるネオマイシン耐性遺伝子を発現する細胞について選択した。３週後、細胞の６つの独立したトランスフェクションされた集団をテトラゾリウム塩マイクロタイタープレートのアッセイを使用してドキソルビシンに対する耐性について試験した（S. P. C. Cole, Cencer Chemother. Pharmacol. 26, 250（1990））。薬物に対する相対的耐性の増加を証明する集団を、他の細胞障害性薬物に対する交差耐性の試験、およびMRP mRNAおよびタンパク質のレベルの分析のために拡張した。

マイクロ－ファスト・トラック（Micro-Fast Track）RNA単離キット（Invitrogen）を使用して、ポリ（Ａ）$^+$RNAを単離した。このRNAをホルムアルデヒドアガロースゲルの電気

泳動にかけ、そしてゼータプローブ膜（Bio-Rad）に移した。ブロットをMRP, MDR1〔A. M. Van der Bliek, F. Baas, T. Ten Houte de Lange, P. M. Kooiman, T. Van der Velde Koerts, P. Borst, EMBO J. 6, 3325（1987）〕、トポイソメラーゼIIα〔T. D. Y. Chung, F. H. Drake, K. B. Tan, S. R. Per, S. T. Crooke, C. K. Mirabelli,, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 9431（1989）〕、トポイソメラーゼIIβ〔前掲〕、アンネキシンII（S. P. C. Cole, M. J. Pinkoski, G. Bhardwaj, T. G. Deeley, Br. J. Cancer 65, 498（1992））、および３’非翻訳配列の一部分をエンコードするpRc/CMVベクターおよびウシ成長ホルモン遺伝子からのポリアデニル化シグナルの領域のためのmRNasに対して相補性の^{32}Ｐ標識化cDNA断片のプローブとハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションプローブを、モレキュラー・ダイナミックス・コンピューティング・デンシトメーター（Molecular Dynamics Computing Densitomter）でオートラジオグラソのデンシトメトリーにより定量した。フィルムの線状範囲内にあるオートラジオグラフの露出を比較するために注意を払った。さらに、^{32}Ｐ標識化グリセルアルデヒド－３－ホスヘートデヒドロゲナーゼ（GAPDH）cDNA断片（ATCC/NIH#57090）を使用するブロットのプロービングにより、およびRNAゲルの写真ネガ上の臭化エチジウム染色リボソームRNAバンドのデンシトメトリーの走査により、ゲル上のRNAの負荷の変動を推定した。

全体の細胞抽出物および膜濃縮画分のイムノブロット分析により、MRPタンパク質の相対量を評価した。細胞ペレットを10mMのTris-HCl, pH7.4, 10mMのKCl, 1.5mMの$MgCl_2$、およびプロテアーゼインヒビター（２mMのフェニルメチルスルホニルフルオライド、50μｇ／mlのアンチペイン、２μｇ／mlのアプロチニン、200μｇ／mlのEDTA, 200μｇ／mlのベンズアミジン、１μｇ／mlのペプスタチン）を含有する緩衝液の中に５×10^7で再懸濁させた。氷上で10分後、細胞をテンボレク（Tenbroeck）ホモジナイザーのほぼ80ストロークで均質化した。ホモジネートをスクロース中で250mMに調節した後、残留する無傷の細胞および核を４℃において800×ｇで20分間遠心することによって除去した。膜に富んだ画分を調製するために、上澄み液を４℃において100,000×ｇで20分間ベックマン（Beckman）TL-100超遠心機で遠心し、そしてペレットを10mMのTris-HCl, pH7.4, 125mMのスクロース、および上に列挙したプロテアーゼインヒビターの中に再懸濁させた。ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲルの電気泳動およびイムノブロッティングのために、適当量のタンパク質を１：１で可溶化緩衝液（最終濃度４Ｍの尿素、05%のSDS, 50mMのジチオスレイトール）と混合した。試料を加熱しないで７％の分割ゲルおよび４％のスタッキングゲル上に負荷した。50mMの３－（シクロヘキシルアミノ）－１－プロパンスルホネート、pH11.0を使用して、インモビロン－PPVDF膜（Millipore）にタンパク質を移した。MRPの検出のために、ブロットを合成ペプチドに対してレイズしたアフィニティー精製ウサギポリクローナル抗体とインキュベーションし、この合成ペプチドの配列はクローニングしたMRP cDNAのそれから予測しそして他の既知のタンパク質の中に見出されない。抗体の結合をヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ接合ヤギ抗ウサギIgGおよび増強化学発光性検出（Amersham）で可視化した。アフィニティー精製した抗MRP抗体は、190キロダルトンの見掛けの分子量をもつグリコシル化された、無傷の膜タンパク質を認識する。その脱グリコシル化された形態において、タンパク質のマルチ－ウェルの165～170キロダルトンに減少し、これはMRPの主要なアミノ酸配列から予測される170キロダルトンと一致する。

この時点において、成長培地中のG418のレベルは400～800μｇ／mlに増加し、親ベクターまたはMRPコーディング配列を含有するベクターでトランスフェクションされた細胞の成長速度に感知し得る作用は存在しなかった。トランスフェクションされた集団は、ドキソルビシンに対する耐性レベルを変化させないで、G418を含有する培地中で４カ月までの間連続的に成長させた。これらのベクターのゲノムDNAの中への組込みは、薬物耐性を外因的に増加することができる内因性遺伝子の発現を変更する可能性を有する。結局、化学療法薬物は選択物質として使用しなかった。トランスフェクションされた細胞の集団は、G418の存在下に成長するそれらの能力によってのみ選択した。MRPを過度に発現する細胞はこの抗生物質に対する耐性の増加を表示しないので、MRPの発現の変動するレベルはトラ

ンスフェクションされた細胞の集団において期待すべきである。
デキストロースに対する相対的耐性は、MRP発現ベクター（T2およびT5）でトランスフェクションされたG418耐性細胞集団ならびに非トランスフェクションHeLa細胞および親ベクター（C1）でトランスフェクションされた集団の２つの試料について示された（第６図）。凡例；HeLa細胞（○）；発現ベクターpRc/CMVでトランスフェクションされたHeLa細胞（C1，○）；MRPコーディング配列を含有するベクターでトランスフェクションされたHeLa細胞（T2，□；T5，▲）；および示したドキソルビシン耐性トランスフェクションT5細胞から単離されたクローン（△T5－５）。各点は単一の実験において三重反復決定の平均を表し、そして標準偏差は＜５％であった。３回の追加の実験において同様な結果が得られた。IC_{50}は図面上に示されており、そして未処理細胞を使用して得られた値を50%だけ減少するために要求されるドキソルビシンの濃度として定義される。示した実施例において、MRP発現ベクター（T2）でトランスフェクションされた集団の１つはドキソルビシン耐性のわずかの変化を表示したが、他方（T5）の耐性は15倍増加した。さらに、耐性集団からのいくつかのクローンをG418の存在下に成長させ、そしてドキソルビシン耐性のそれらの程度を決定した。次いで、トランスフェクション体の２つ（T2，T5）およびクローンの１つ（T5－５）についての投与量応答曲線を比較して、ドキソルビシンに対するそれらの耐性がMRP mRNAの濃度と相関関係を有するかどうかを決定した。
発現ベクターから生産されたMRP mRNAはポリ（Ａ）テイルを含めて5.2～5.3kbの予測される長さを有し、こうしてそれはより長い、内因性MRP mRNAとノザン分析により区別することができる。MRPコーディング配列の一部分に相当するクローニングされたcDNAプローブとハイブリダイゼーションした第６図に示す細胞集団からのポリ（Ａ）$^{+}$RNAのブロットは、耐性トランスフェクション体においてほぼ5.3kbの比較的豊富なmRNAおよび内因性MRP mRNAの低いレベルを明らかにした（第7A図）。5.3kbのmRNAの相対濃度は、対照集団（C1）の中に存在する内因性MRP mRNAのそれより、耐性集団（T5）およびクローン（T5－５）において、それぞれ、70～80倍および20～30倍より高い。mRNAの相対的レベルはデンシトメトリーおよびGAPDH mRNAに対する正規化により決定した。耐性のわずかの変化を示したトランスフェクションされた細胞集団（T2）における5.3kbのMRP mRNAの発現は、内因性MRP mRNAのそれのわずかにほぼ半分であった。同様なRNAブロットを、また、ベクターエンコーデッドMRP mRNAの３’非翻訳配列の一部分を形成するpRc/CMVプラスミドからのDNA断片でプロービングした。このプローブは5.3kbのMRP mRNAのみとハイブリダイゼーションし、それはベクターから転写されそして内因性MRP関係遺伝子の発現の増加から生じないことが確証された（第7B図）。こうして、MRP発現ベクターでトランスフェクションされた細胞において、薬物耐性の相対的レベルはMRP mRNAの濃度とともに増加する。
多薬物耐性H69AR細胞（図面においてARと表示する）における内因性MRP mRNAの濃度は、H69親細胞（図面においてH69と表示する）におけるよりほぼ100倍高く、そしてドキソルビシンに対する２つの細胞系の相対的耐性は、また、50～100倍だけ異なる。T5 HeLa細胞集団におけるベクターエコーデッドMRP mRNAのレベルは、親細胞における内因性MRP mRNAより70～80倍高い。しかしながら、薬物耐性はわずかに15倍増加する。薬物耐性の相対的増加がH69AR細胞におけるよりトランスフェクション体においてより低い理由を研究するために、われわれは２つの異なる細胞の型においてMRP mRNAおよびタンパク質のレベルを比較した。ノザン分析において、pRc/CMV親ベクターでトランスフェクションされたH69細胞およびHeLa細胞における内因性MRP mRNAは類似することが明らかにされた。薬物耐性トランスフェクション体細胞集団（T5）におけるベクターエコーデッドMRP mRNAの相対的発生量を、また、H69AR細胞における内因性MRP mRNAのそれに匹敵した（第7C図）。しかしながら、アフィニティー精製抗MRP抗体を使用するタンパク質ブロットは、T5 HeLa細胞トランスフェクション体においてタンパク質のレベルがH69細胞におけるより５～８倍低いことを示した（第7C図）。これらの発見は、H69AR細胞における50～100倍の増加に比較して、トランスフェクションされたT5細胞において観測された耐性の15倍の増加と一致する。トランスフェクションされた細胞におけるタンパク質のより低いレベルは、ベクターをコードしたMRP mRNAと内因性MRP mRNAとの間の翻訳効率の差に帰属される可能性が最も強い

が、２つの細胞の型の間のタンパク質の分解速度の差を排除することはできない。
H69AR細胞は多段選択により得られたので、独立にあるいはMRPとともに、ある薬物に対するそれらの耐性の程度に影響を及ぼすことがある追加の変更が起こった可能性がある。H69AR細胞は、アントラサイクリンおよびエピポドフィロトキシンに対するそれらの耐性を増強することができるトポイソメラーゼIIαおよびβmRNAおよびタンパク質のレベルを減少したことを示した。それらは、また、膜タンパク質のトラフィッキング（trafficking）に影響を与えることがあるアンネキシンIIを過度に発現することが示された。C. d. Evans, S. E. L. Mirski, M. K. Danks, W. T. Beck, S. P. C. Cole, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 33, 2694（1992）。アンネキシンIIはフソゲニック・ヴェシクル（fusogenic vesiclcs）およびエキソサイトーシスに関係することが示された。S. P. C. Cole, M. J. Pinkoski, G. Bhardwaj. R. G. Deeley, Br. J. Cancer 65, 498（1992）。これらの追加の変化がH69AR細胞の耐性度にどの程度に影響を及ぼすか、あるいはそれらがMRPの過度の発現にどのような方法でかかわるかはまだ知られていない。しかしながら、トランスフェクションされた細胞におけるMRPの過度の発現は、トポイソメラーゼIIイソ型（第8A図）またはアンネキシンII（第8B図）を特定するmRNAのレベルを変更せず、またトランスフェクションされたHeLa細胞はMDR1 mRNAのレベルの変更を表示しない。トランスフェクションされた細胞におけるドキソルビシンに対する耐性の増加はMRPの過度の発現に直接帰属されるという結論を、これらの観察は強く支持する。

実施例６：薬物感受性細胞中のMRPの発現はその細胞の多薬物耐性を付与する

トランスフェクションされた細胞のドキソルビシン耐性の増加が化学療法薬物の他のクラスに対する耐性の増加を伴うかどうかを決定するために、細胞をビンクリスチン（ニチニチソウのアルカロイド）、VP－16（エピポドフィロトキシン）およびシスプラチンに対する交差反応性について試験した（第９図）。細胞障害性のアッセイ非トランスフェクションHeLa細胞（●）、発現ベクターpRc/CMVでトランスフェクションされたHeLa細胞（C1, ○）、発現ベクターpRc/CMV-MRPでトランスフェクションしそして400μｇ／mlのG418中で４カ月間維持したHeLa細胞（T5, ▲）、および800μｇ／mlのG418中で１カ月間（T5-800／１, △）および３カ月間（T5-800／３, □）維持したT5細胞について実施した。各点は単一の実施例における三重反復決定の平均を表し、そして標準偏差は＜５％であった。ビンクリスチンおよびVP－16を使用して同様な結果が２～３つの追加の実験において得られた。種々の細胞系のIC_{50}は図面に示されている。MRPトランスフェクション体のいくつかの独立に増殖した培養物についての投与応答曲線は、非トランスフェクションHeLa細胞または発現ベクター（C1）でトランスフェクションされた細胞に関して、それらがビンクリスチンおよびVP－16に対して、それぞれ、ほぼ25倍および５～10倍耐性であることを示す。トランスフェクション体はシスプラチン耐性の増加を示さず、これはH69AR細胞の薬理学的表現型と一致しそして、また、Ｐ－糖タンパク質を過度に発現する細胞の特徴を示す。これらの結果は、Ｐ－糖タンパク質と構造的に非常に異なるトランスポーターのABCスーパーファミリーの構成員がこの表現型を付与することができることを初めて証明する。

実施例７：抗MRP抗体の調製および免疫沈澱およびイムノブロッティング実験におけるそれらの使用

MRPは1531アミノ酸の延長された読み取り枠をもつほぼ6.5kbのmRNAによりコードされる。このタンパク質は、それぞれ、NH2およびCOOH末端の半分の間で８および４分割された、２つのヌクレオチド結合性折りたたみ（NBF）を含有すると予測された。予測された大きさおよび配列のタンパク質が耐性H69AR細胞の中で過度に発現されることを確証するために、MRPの推定されたアミノ酸配列に基づく合成ペプチドに対するポリクローナル抗体を調製しそして免疫分析において使用した。

配列AELQKAEAKKEEの１つのペプチドをMRPの高度にダイバージェントの細胞質リンカードメイン領域（MRP-Ｌ、位置932-943）から選択したが、第２ペプチド（GENLSVGQRQLVCLA）をMRPの第２ヌクレオチド結合性ドメイン（MRP-２、位置1427-1441）から選択した。両方のエピトープは、ウルトラシン（Ultrasyn）Ｄ樹脂上で病気の子供のための病院（Hospital for Sick Chilodren）（オンタリオ州トロント）におけるバイオテクノロジー・サー

ビス・センター（Biotechnology Service Center）により直接免疫化のために合成された。ほぼ400μｇの結合したペプチドを蒸留水の中に再懸濁させ、そして超音波処理した。生ずる懸濁液を等しい体積の完全フロインドアジュバント（Difco）の中で乳化させ、そして３月齢の雌のニュージーランド白ウサギにおいて４部位に皮下注射した。２～３週の間隔で、不完全フロインドアジュバント中の同一量の免疫原を皮下注射した。ウサギを第３免疫化後２週に動脈穿刺により採血し、そしてウサギの血清を酵素結合イムノアッセイ（ELISA）およびイムノブロッティングにより抗体の存在について試験した。

ELISAおよびウェスタンブロッティングにより陽性であったペプチドMRP-Ｌで免疫化した後得られたウサギの抗血清を、硫酸アンモニウム沈澱により濃縮しそしてアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。供給会社（Pharmacia LKB Biotechnology Inc.）に指示に従いCNBr活性化セファローズ（Sepharose）にMRP-Ｌペプチドを連結し（５μmolペプチド／mlゲル）次いで10mMのTris, pH7.5でよく洗浄することによって、アフィニティーカラムを構成した。硫酸アンモニウム沈澱をリン酸塩緩衝液中に溶解し、同一緩衝液に対して広範に透析し、次いで前もって洗浄したアフィニティーカラムに適用した。負荷されたカラムをまず10mMのTris, pH7.5で洗浄し、次いで10mMのTris, pH7.5, 0.5MのNaClで洗浄した後、0.1Mのグリシン、pH2.5で抗体を溶離した。１MのTris, pH8.0を含有する収集管の中で画分を中和した。所望の画分をプールし、リン酸塩緩衝液に対して広範に透析し、そしてアミコン（Amicon）濃縮器／濾過により濃縮した。精製された抗体の最終タンパク質濃度を0.7～1.5mg／mlに調節した。ペプチドMRP-２で免疫化後に得られたウサギ抗血清をそれ以上精製しないで使用した。

これらのウサギからのELISA陽性抗血清をイムノブロット分析において使用した。ポリアクリルアミドゲルの電気泳動をレムリ（Laemmli）の方法により５％または７％分離ゲルおよび４％スタッキングゲルを使用して実施した。試料を可溶化緩衝液中で１：１で４Mの尿素、0.5%SDS, 50mMのDTTの最終濃度に希釈し、そして加熱せずにゲル上に負荷した。イムノブロッティングのために、タンパク質を電気泳動後にイムビロン－PPBDF膜（Millipore、オンタリオ州ミッシサウガ）に50mMのCAPS, pH11.0を使用して移した。ブロットをTBS-Ｔ（10mMのTris, pH7.5, 0.05%ツイーン20, 150mMのNaCl）中のブロッキング溶液（５％正常ヤギ血清／５％ハイクローン（HyClone）血清／１％BSA）中で１時間インキュベーションした。抗MRP抗体をブロッキング溶液に直接添加し、そして２時間インキュベーションした。ブロットを３×５分間TBS-Ｔ中で洗浄し、そしてブロッキング緩衝液中で希釈したヤギ抗ウサギIgGヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ接合体〔アフィニティー精製したＦ（ab’）２断片（Jackson ImmunoResearch）または全分子（ICN Biomedicals）〕を添加した。１時間インキュベーションした後、ブロットを５×５分間TBS-Ｔ中で洗浄し、そしてECL（Amersham、英国）およびコダック（Kodak）XOMATフィルム上への露出により抗体の結合を検出した。抗血清は、感受性G69および復帰突然変異体H69AR細胞において検出不可能であった耐性H69AR細胞中の190kDのタンパク質を検出した。

^{35}Ｓ－メチオニンで代謝的に標識化した細胞膜調製物を使用する免疫沈澱実験において、また、抗血清を使用した。細胞をメチオニン欠如RPMI1640培地（Sigma）中の50μCi／mlの^{35}Ｓメチオニン（Tran^{35}Ｓ標識：細胞標識化ゲル；比活性、710Ci／mmol）中で一夜、あるいはリン酸塩欠如RPMI1640培地（ICN）中の500μCi／mlの^{32}Ｐ－オルトリン酸（担体不含、500mCi/ml）（Dupont NEN）とともに４時間培養した。次のようにして、粗製の放射性標識化100,000×ｇ膜濃縮画分を調製しそして免疫沈澱させた。凍結細胞または新鮮な細胞（50×10^6/ml）を10mMのKCl, 1.5mMのMRP-２およびプロテアーゼインヒビター（２mMのフェニルメチルスルホニルフルオライド、50μｇ／mlのアンチペイン、２μｇ／mlのアプロチニン、200μｇ／mlのEDTA、200μｇ／mlベンズアミジン、0.5μｇ／mlのロイペプチン、１μｇ／mlのペプスタチン）および0.025mg／mlのRNアーゼＡおよび0.05mg／mlのDNアーゼ１を含有する10mMのTris－HCl, pH7.4の中に懸濁させた。10分後、この懸濁液を冷却したテンブレック（Tenbroeck）ホモジナイザー中で80ストロークの乳棒で均質化した。次いでホモジネートを800×ｇで４℃において15分間遠心して、核および残留する無傷の細胞を除去した。100,000×ｇで４℃において20分間遠心することによって、膜濃

縮画分を調製した。ペレットを10mMのTris HCl，pH7.6中で125mMのスクロースおよび前述のプロテアーゼインヒビターとともに再懸濁させた。タンパク質の濃度をロウリイ（Lowry）アッセイのペターソン（Peterson）変法により決定し、そしてアリコートを－80℃において貯蔵した。

タンパク質を１％CHAPS，10mMのKCl，50mMのTris－HCl，pH7.5中で20：１の洗浄剤／タンパク質で４℃において頻繁に撹拌しながら可溶化し、次いでベックマン・ウルトラセントリフージ（Beckmann Ultracentrifuge）中でT1003ローターを使用して100,000×ｇで20分間遠心した。上澄み液（タンパク質の百分率が最初の40μｇの膜タンパク質から可溶化するかどうかにかかわらず）アフィニティー精製MRP-Ｌ抗血清（１％CHAPS，100mMのKCl，50mMのTris－HCl，pH7.5中で可溶化した25mg）と４℃において一夜インキュベーションした。試料を１％CHAPS緩衝液で700μｌにし、次いで、50μｌ（10％ｗ／ｖ）のプロテインＡセファローズCl－4B（Pharmacia）と４℃においておだやかに揺動しながら３時間インキュベーションした。試料を14,000×ｇで10秒間遠心し、そして順次に５分間各１mlの緩衝液１（10mMのTris－HCl，pH8.0，0.5mMのNaCl，0.5％Nonidet P-40，0.05％SDS）、緩衝液２（10mMのTris－HCl，pH8.0，0.15mMのNaCl，0.5％Nonidet P-40，0.05％デオキシコレート）および緩衝液３（10mMのTris－HCl，pH8.0，0.05％SDS）で洗浄した。洗浄したビーズを100μｌの４Ｍの尿素、0.5％SDS，50mMのDTTと室温において頻繁に撹拌しながら１時間インキュベーションした。試料を遠心し、そして上澄み液を７％ポリアクリルアミドゲル上で分析した。ゲルをイソプロパノール：水：酢酸（25：65：10）中で30分間固定し、次いでフルオログラフの試薬アンプリファイ（Amplify）（Amersham）を添加した。ゲルを乾燥し、次いで－80℃において一夜フィルムに露出した。190kDのタンパク質は^{35}SOメチオニン標識化H69AR細胞からの膜関連タンパク質の免疫沈澱により免疫反応性抗血清で検出可能であった。

H69AR細胞膜中の免疫検出可能な190kDのタンパク質の見掛けの分子量は、推定された主要なアミノ酸配列に基づくMRPの予測された17kDの分子量よりほぼ20kD大きい。しかしながら、MRP配列の分析は、膜の２層付近に対称的に分布していることが予測される領域における３つの潜在的Ｎ－グリコシル化部位の存在を示す。190kDのタンパク質がＮ－グリコシル化されているか否かを決定するために、２組の実験を実施した。第１に、耐性H69AR細胞をＮ－連鎖グリコシル化のタンパク質インヒビターであるツニカマイシンの存在下に成長させた。15μｇ／mlのツニカマイシン（Sigma）中で24時間の間培養することによって、Ｎ－連鎖グリコシル化はH69AR細胞中で阻害された。処理した細胞をリン酸塩緩衝液で洗浄し、次いで前述したように溶解緩衝液（20mMのTris HCl，pH7.5，20mMのKCl，３mMのMgCl２，0.5mg／mlのDNアーゼ１，0.25mg／mlのRNアーゼＡ）中でプロテアーゼインヒビターとともに均質化することによって全細胞のリゼイトを調製した。全細胞のリゼイトのポリアクリルアミドゲルの電気泳動およびイムノブロッティングを前述したように実験した。第２のアプローチにおいて、H69ARの100,000×ｇの膜をデグリコシラーゼPNGアーゼＦとインキュベーションした。25,000NEB単位のPNGアーゼＦ（New England Biolabs）を含有する50mMのリン酸ナトリウム緩衝液中で、膜に富んだ画分（200μｇのタンパク質）を１μｇ／mlの最終濃度に希釈した。37℃において８時間後、追加の25,000NEB単位のPNGアーゼＦを添加し、次いで37℃において一夜インキュベーションした。試料の緩衝液を直接添加し、そしてSDS-PAGEおよびイムノブロッティングを前述したように実施した。両方の場合において、170kDのタンパク質がイムノブロット分析により検出され、これはMRPの予測された分子量170kDとよく相関関係する。

MRPがATP結合性タンパク質であることを確証するために、ATP結合性特徴のモチーフの存在により示唆されるように、耐性H69ARおよび感受性H69細胞からの膜を^{32}Ｐ－８－アジドATPで光標識化した。粗製の膜に富んだ画分を10mMのTris－HCl，pH7.6、前述したように１mMの$MgCl_2$およびプロテアーゼインヒビターを含有する緩衝液中で１μｇ／mlのタンパク質に再懸濁させた。３～４μCiの32Ｐ－８－アジド－ATP（比活性２～10Ci／mmol：ICN Biomedical、オンタリオ州ミッシサウガ）の添加後、氷上のインキュベーションを１～５分間続けた。1100μＷにセットしたストラタリンカー（Stratalinker）を使用して光源

から約10cmで366nmにおいて８分間照射することによって、氷上のタンパク質にアジド－ATPは交差連鎖した。ポリアクリルアミドゲルの電気泳動または免疫沈澱を実施するまで、標識化タンパク質を－80℃において貯蔵した。^{32}Ｐ－８－アジド－ATPの添加の前に、膜調製物に添加した冷い過剰のATP（Boehringer Mannheim、クエベック州ラバル）との競合により、標識化の特異性を確証した。これらの研究は、薬物感受性H69細胞において検出されなかったH69AR細胞からの膜において、190kDの強い、特異的標識化を明らかにした。われわれの結果が示すように、H69AR細胞において、MRP遺伝子は190kDのＮ－グリコシル化ATP結合性タンパク質をエンコードする。

本発明の多薬物耐性耐性タンパク質についての添付した配列のリストは本発明の開示の一部分を形成する。

同等の態様

当業者は、日常的実験を使用して、ここに記載する本発明の特定の態様の多数の同等の態様を確認するか、あるいは認識することができるであろう。このような同等の態様は次の請求の範囲に包含されることを意図する。

配列の列挙

（１）一般情報：

（ｉ）出願者：Cole, Susan P. C.
Deeley, Roger G.

（ii）発明の名称：多薬物耐性遺伝子

（iii）配列の数：２

（iv）通信住所：

（Ａ）住所：LAHIVE & COCKFIELD

（Ｂ）通り：60 STATE STREET, SUITE 510

（Ｃ）市：BOSTON

（Ｄ）州：MASSACHUSETTS

（Ｅ）国：USA

（Ｆ）郵便番号：02109

（ｖ）コンピューター読取りフォーム：

（Ａ）媒体型：フロッピーディスク

（Ｂ）コンピューター：IBM PC compatible

（Ｃ）操作システム：PC-DOS/MS-DOS

（Ｄ）ソフトウェア：PatentIn Release #1.0,
Version #1.25

（vi）出願データ：

（Ａ）出願番号：US 000000

（Ｂ）出願日：-OCT-1993

（Ｃ）分類：

（vii）アトニー／エージェント情報：

（Ａ）名称：

（Ｂ）登録番号：000000

（Ｃ）参照／ドケット番号：PQI-002

（ix）電信情報：

（Ａ）電話：（617）227-7400

（Ｂ）テレファックス：（617）227-5149

（２）配列番号１についての情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：5011個の塩基対

（Ｂ）型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA
(ix) 特徴：
(A) 名称／キー：CDS
(B) 位置：196..4788
(xi) 配列：配列番号１：

```
CAGGCGGCGT TGCGGCCCCG GCCCCGGCTC CCTGCGCCGC CGCCGCCGCC     50

GCCGCCGCCG CCGCCGCCGC CGCCGCCAGC GCTAGCGCCA GCAGCCGGGC    100

CCGATCACCC GCCGCCCGGT GCCCGCCGCC GCCCGCGCCA GCAACCGGGC    150

CCGATCACCC GCCGCCCGGT GCCCGCCGCC GCCCGCGCCA CCGGC ATG     198
                                                 Met
                                                  1

GCG CTC CGG GGC TTC TGC AGC GCC GAT GGC TCC GAC CCG CTC   240
Ala Leu Arg Gly Phe Cys Ser Ala Asp Gly Ser Asp Pro Leu
              5                  10                  15

TGG GAC TGG AAT GTC ACG TGG AAT ACC AGC AAC CCC GAC TTC   282
Trp Asp Trp Asn Val Thr Trp Asn Thr Ser Asn Pro Asp Phe
             20                  25

ACC AAG TGC TTT CAG AAC ACG GTC CTC GTG TGG GTG CCT TGT   324
Thr Lys Cys Phe Gln Asn Thr Val Leu Val Trp Val Pro Cys
 30                  35                  40

TTT TAC CTC TGG GCC TGT TTC CCC TTC TAC TTC CTC TAT CTC   366
Phe Tyr Leu Trp Ala Cys Phe Pro Phe Tyr Phe Leu Tyr Leu
     45                  50                  55
```

```
TCC CGA CAT GAC CGA GGC TAC ATT CAG ATG ACA CCT CTC AAC  408
Ser Arg His Asp Arg Gly Tyr Ile Gln Met Thr Pro Leu Asn
        60                  65                  70

AAA ACC AAA ACT GCC TTG GGA TTT TTG CTG TGG ATC GTC TGC  450
Lys Thr Lys Thr Ala Leu Gly Phe Leu Leu Trp Ile Val Cys
            75                  80                  85

TGG GCA GAC CTC TTC TAC TCT TTC TGG GAA AGA AGT CGG GGC  492
Trp Ala Asp Leu Phe Tyr Ser Phe Trp Glu Arg Ser Arg Gly
        90                  95

ATA TTC CTG GCC CCA GTG TTT CTG GTC AGC CCA ACT CTC TTG  534
Ile Phe Leu Ala Pro Val Phe Leu Val Ser Pro Thr Leu Leu
100                 105                 110

GGC ATC ACC ACG CTG CTT GCT ACC TTT TTA ATT CAG CTG GAG  576
Gly Ile Thr Thr Leu Leu Ala Thr Phe Leu Ile Gln Leu Glu
    115                 120                 125

AGG AGG AAG GGA GTT CAG TCT TCA GGG ATC ATG CTC ACT TTC  618
Arg Arg Lys Gly Val Gln Ser Ser Gly Ile Met Leu Thr Phe
        130                 135                 140

TGG CTG GTA GCC CTA GTG TGT GCC CTA GCC ATC CTG AGA TCC  660
Trp Leu Val Ala Leu Val Cys Ala Leu Ala Ile Leu Arg Ser
            145                 150                 155

AAA ATT ATG ACA GCC TTA AAA GAG GAT GCC CAG GTG GAC CTG  702
Lys Ile Met Thr Ala Leu Lys Glu Asp Ala Gln Val Asp Leu
        160                 165

TTT CGT GAC ATC ACT TTC TAC GTC TAC TTT TCC CTC TTA CTC  744
Phe Arg Asp Ile Thr Phe Tyr Val Tyr Phe Ser Leu Leu Leu
170                 175                 180

ATT CAG CTC GTC TTG TCC TGT TTC TCA GAT CGC TCA CCC CTG  786
Ile Gln Leu Val Leu Ser Cys Phe Ser Asp Arg Ser Pro Leu
    185                 190                 195

TTC TCG GAA ACC ATC CAC GAC CCT AAT CCC TGC CCA GAG TCC  828
Phe Ser Glu Thr Ile His Asp Pro Asn Pro Cys Pro Glu Ser
        200                 205                 210

AGC GCT TCC TTC CTG TCG AGG ATC ACC TTC TGG TGG ATC ACA  870
Ser Ala Ser Phe Leu Ser Arg Ile Thr Phe Trp Trp Ile Thr
            215                 220                 225

GGG TTG ATT GTC CGG GGC TAC CGC CAG CCC CTG GAG GGC AGT  912
Gly Leu Ile Val Arg Gly Tyr Arg Gln Pro Leu Glu Gly Ser
        230                 235
```

```
GAC CTC TGG TCC TTA AAC AAG GAG GAC ACG TCG GAA CAA GTC  954
Asp Leu Trp Ser Leu Asn Lys Glu Asp Thr Ser Glu Gln Val
240                 245                 250

GTG CCT GTT TTG GTA AAG AAC TGG AAG AAG GAA TGC GCC AAG  996
Val Pro Val Leu Val Lys Asn Trp Lys Lys Glu Cys Ala Lys
    255                 260                 265

ACT AGG AAG CAG CCG GTG AAG GTT GTG TAC TCC TCC AAG GAT 1038
Thr Arg Lys Gln Pro Val Lys Val Val Tyr Ser Ser Lys Asp
        270                 275                 280

CCT GCC CAG CCG AAA GAG AGT TCC AAG GTG GAT GCG AAT GAG 1080
Pro Ala Gln Pro Lys Glu Ser Ser Lys Val Asp Ala Asn Glu
            285                 290                 295

GAG GTG GAG GCT TTG ATC GTC AAG TCC CCA CAG AAG GAG TGG 1122
Glu Val Glu Ala Leu Ile Val Lys Ser Pro Gln Lys Glu Trp
            300                 305

AAC CCC TCT CTG TTT AAG GTG TTA TAC AAG ACC TTT GGG CCC 1164
Asn Pro Ser Leu Phe Lys Val Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Pro
310                 315                 320

TAC TTC CTC ATG AGC TTC TTC TTC AAG GCC ATC CAC GAC CTG 1206
Tyr Phe Leu Met Ser Phe Phe Phe Lys Ala Ile His Asp Leu
    325                 330                 335

ATG ATG TTT TCC GGG CCG CAG ATC TTA AAG TTG CTC ATC AAG 1248
Met Met Phe Ser Gly Pro Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ile Lys
        340                 345                 350

TTC GTG AAT GAC ACG AAG GCC CCA GAC TGG CAG GGC TAC TTC 1290
Phe Val Asn Asp Thr Lys Ala Pro Asp Trp Gln Gly Tyr Phe
            355                 360                 365

TAC ACC GTG CTG CTG TTT GTC ACT GCC TGC CTG CAG ACC CTC 1332
Tyr Thr Val Leu Leu Phe Val Thr Ala Cys Leu Gln Thr Leu
            370                 375

GTG CTG CAC CAG TAC TTC CAC ATC TGC TTC GTC AGT GGC ATG 1374
Val Leu His Gln Tyr Phe His Ile Cys Phe Val Ser Gly Met
380                 385                 390

AGG ATC AAG ACC GCT GTC ATT GGG GCT GTC TAT CGG AAG GCC 1416
Arg Ile Lys Thr Ala Val Ile Gly Ala Val Tyr Arg Lys Ala
    395                 400                 405

CTG GTG ATC ACC AAT TCA GCC AGA AAA TCC TCC ACG GTC GGG 1458
Leu Val Ile Thr Asn Ser Ala Arg Lys Ser Ser Thr Val Gly
        410                 415                 420
```

```
GAG ATT GTC AAC CTC ATG TCT GTG GAC GCT CAG AGG TTC ATG 1500
Glu Ile Val Asn Leu Met Ser Val Asp Ala Gln Arg Phe Met
                425                 430                 435

GAC TTG GCC ACG TAC ATT AAC ATG ATC TGG TCA GCC CCC CTG 1542
Asp Leu Ala Thr Tyr Ile Asn Met Ile Trp Ser Ala Pro Leu
            440                 445

CAA GTC ATC CTT GCT CTC TAC CTC CTG TGG CTG AAT CTG GGC 1584
Gln Val Ile Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Trp Leu Asn Leu Gly
450                 455                 460

CCT TCC GTC CTG GCT GGA GTG GCG GTG ATG GTC CTC ATG GTG 1626
Pro Ser Val Leu Ala Gly Val Ala Val Met Val Leu Met Val
    465                 470                 475

CCC GTC AAT GCT GTG ATG GCG ATG AAG ACC AAG ACG TAT CAG 1668
Pro Val Asn Ala Val Met Ala Met Lys Thr Lys Thr Tyr Gln
        480                 485                 490

GTG GCC CAC ATG AAG AGC AAA GAC AAT CGG ATC AAG CTG ATG 1710
Val Ala His Met Lys Ser Lys Asp Asn Arg Ile Lys Leu Met
                495                 500                 505

AAC GAA ATT CTC AAT GGG ATC AAA GTG CTA AAG CTT TAT GCC 1752
Asn Glu Ile Leu Asn Gly Ile Lys Val Leu Lys Leu Tyr Ala
            510                 515

TGG GAG CTG GCA TTC AAG GAC AAG GTG CTG GCC ATC AGG CAG 1794
Trp Glu Leu Ala Phe Lys Asp Lys Val Leu Ala Ile Arg Gln
520                 525                 530

GAG GAG CTG AAG GTG CTG AAG AAG TCT GCC TAC CTG TCA GCC 1836
Glu Leu Lys Val Leu Lys Lys Ser Ala Tyr Leu Ser Ala Val
    535                 540                 545

GTG GGC ACC TTC ACC TGG GTC TGC ACG CCC TTT CTG GTG GCC 1878
Gly Thr Phe Thr Trp Val Cys Thr Pro Phe Leu Val Ala Leu
        550                 555                 560

TTG TGC ACA TTT GCC GTC TAC GTG ACC ATT GAC GAG AAC AAC 1920
Leu Cys Thr Phe Ala Val Tyr Val Thr Ile Asp Glu Asn Asn
                565                 570                 575

ATC CTG GAT GCC CAG ACA GCC TTC GTG TCT TTG GCC TTG TTC 1962
Ile Leu Asp Ala Gln Thr Ala Phe Val Ser Leu Ala Leu Phe
            580                 585

AAC ATC CTC CGG TTT CCC CTG AAC ATT CTC CCC ATG GTC ATC 2004
Asn Ile Leu Arg Phe Pro Leu Asn Ile Leu Pro Met Val Ile
590                 595                 600
```

```
AGC AGC ATC GTG CAG GCG AGT GTC TCC CTC AAA CGC CTG AGG 2046
Ser Ser Ile Val Gln Ala Ser Val Ser Leu Lys Arg Leu Arg
    605                 610                 615

ATC TTT CTC TCC CAT GAG GAG CTG GAA CCT GAC AGC ATC GAG 2088
Ile Phe Leu Ser His Glu Glu Leu Glu Pro Asp Ser Ile Glu
        620                 625                 630

CGA CGG CCT GTC AAA GAC GGC GGG GGC ACG AAC AGC ATC ACC 2130
Arg Arg Pro Val Lys Asp Gly Gly Gly Thr Asn Ser Ile Thr
            635                 640                 645

GTG AGG AAT GCC ACA TTC ACC TGG GCC AGG AGC GAC CCT CCC 2172
Val Arg Asn Ala Thr Phe Thr Trp Ala Arg Ser Asp Pro Pro
                650                 655

ACA CTG AAT GGC ATC ACC TTC TCC ATC CCC GAA GGT GCT TTG 2214
Thr Leu Asn Gly Ile Thr Phe Ser Ile Pro Glu Gly Ala Leu
660                 665                 670

GTG GCC GTG GTG GGC CAG GTG GGC TGC GGA AAG TTG TCC CTG 2256
Val Ala Val Val Gly Gln Val Gly Cys Gly Lys Leu Ser Leu
    675                 680                 685

CTC TCA GCC CTC TTG GCT GAG ATG GAC AAA GTG GAG GGG CAC 2298
Leu Ser Ala Leu Leu Ala Glu Met Asp Lys Val Glu Gly His
        690                 695                 700

GTG GCT ATC AAG GGC TCC GTG GCC TAT GTG CCA CAG CAG GCC 2340
Val Ala Ile Lys Gly Ser Val Ala Tyr Val Pro Gln Gln Ala
            705                 710                 715

TGG ATT CAG AAT GAT TCT CTC CGA GAA AAC ATC CTT TTT GGA 2382
Trp Ile Gln Asn Asp Ser Leu Arg Glu Asn Ile Leu Phe Gly
                720                 725

TGT CAG CTG GAG GAA CCA TAT TAC AGG TCC GTG ATA CAG GCC 2424
Cys Gln Leu Glu Glu Pro Tyr Tyr Arg Ser Val Ile Gln Ala
730                 735                 740

TGT GCC CTC CTC CCA GAC CTG GAA ATC CTG CCC AGT GGG GAT 2466
Cys Ala Leu Leu Pro Asp Leu Glu Ile Leu Pro Ser Gly Asp
    745                 750                 755

CGG ACA GAG ATT GGC GAG AAG GGC GTG AAC CTG TCT GGG GGA 2508
Arg Thr Glu Ile Gly Glu Lys Gly Val Asn Leu Ser Gly Gly
        760                 765                 770

CAG AAG CAG CGC GTG AGC CTG GCC CGG GCC GTG TAC TCC AAC 2550
Gln Lys Gln Arg Val Ser Leu Ala Arg Ala Val Tyr Ser Asn
            775                 780                 785
```

```
GCT GAC ATT TAC CTC TTC GAT GAT CCC CTC TCA GCA GTG GAT 2592
Ala Asp Ile Tyr Leu Phe Asp Asp Pro Leu Ser Ala Val Asp
                790                 795

GCC CAT GTG GGA AAA CAC ATC TTT GAA AAT GTG ATT GGC CCC 2634
Ala His Val Gly Lys His Ile Phe Glu Asn Val Ile Gly Pro
800                 805                 810

AAG GGG ATG CTG AAG AAC AAG ACG CGG ATC TTG GTC ACG CAC 2676
Lys Gly Met Leu Lys Asn Lys Thr Arg Ile Leu Val Thr His
    815                 820                 825

AGC ATG AGC TAC TTG CCG CAG GTG GAC GTC ATC ATC GTC ATG 2718
Ser Met Ser Tyr Leu Pro Gln Val Asp Val Ile Ile Val Met
        830                 835                 840

AGT GGC GGC AAG ATC TCT GAG ATG GGC TCC TAC CAG GAG CTG 2760
Ser Gly Gly Lys Ile Ser Glu Met Gly Set Tyr Gln Glu Leu
            845                 850                 855

CTG GCT CGA GAC GGC GCC TTC GCT GAG TTC CTG CGT ACC TAT 2802
Leu Ala Arg Asp Gly Ala Phe Ala Glu Phe Leu Arg Thr Tyr
                860                 865

GCC AGC ACA GCG CAG GAG CAG GAT GCA GAG GAG AAC GGG GTC 2844
Ala Ser Thr Glu Gln Glu Gln Asp Ala Glu Glu Asn Gly Val
870                 875                 880

ACG GGC GTC AGC GGT CCA GGG AAG GAA GCA AAG CAA ATG GAG 2886
Thr Gly Val Ser Gly Pro Gly Lys Glu Ala Lys Gln Met Glu
    885                 890                 895

AAT GGC ATG CTG GTG ACG GAC AGT GCA GGG AAG CAA CTG CAG 2928
Asn Gly Met Leu Val Thr Asp Ser Ala Gly Lys Gln Leu Gln
        900                 905                 910

AGA CAG CTC AGC AGC TCC TCC TCC TAT AGT GGG GAC ATC AGC 2970
Arg Gln Leu Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ser Gly Asp Ile Ser
            915                 920                 925

AGG CAC CAC AAC AGC ACC GCA GAA CTG CAG AAA GCT GAG GCC 3012
Arg His His Asn Ser Thr Ala Glu Leu Gln Lys Ala Glu Ala
                930                 935

AAG AAG GAG GAG ACC TGG AAG CTG ATG GAG GCT GAC AAG GCG 3054
Lys Lys Glu Glu Thr Trp Lys Leu Met Glu Ala Asp Lys Ala
940                 945                 950

CAG ACA GGG CAG GTC AAG CTT TCC GTG TAC TGG GAC TAC ATG 3096
Gln Thr Gly Gln Val Lys Leu Ser Val Tyr Trp Asp Tyr Met
    955                 960                 965
```

```
AAG GCC ATC GGA CTC TTC ATC TCC TTC CTC AGC ATC TTC CTT 3138
Lys Ala Ile Gly Leu Phe Ile Ser Phe Leu Ser Ile Phe Leu
        970                 975                 980

TTC ATG TGT AAC CAT GTG TCC GCG CTG GCT TCC AAC TAT TGG 3180
Phe Met Cys Asn His Val Ser Ala Leu Ala Ser Asn Tyr Trp
            985                 990                 995

CTC AGC CTC TGG ACT GAT GAC CCC ATC GTC AAC GGG ACT CAG 3222
Leu Ser Leu Trp Thr Asp Asp Pro Ile Val Asn Gly Thr Gln
                1000                1005

GAG CAC ACG AAA GTC CGG CTG AGC GTC TAT GGA GCC CTG GGC 3264
Glu His Thr Lys Val Arg Leu Ser Val Tyr Gly Ala Leu Gly
1010                1015                1020

ATT TCA CAA GGG ATC GCC GTG TTT GGC TAC TCC ATG GCC GTG 3306
Ile Ser Gln Gly Ile Ala Val Phe Gly Tyr Ser Met Ala Val
    1025                1030                1035

TCC ATC GGG GGG ATC TTG GCT TCC CGC TGT CTG CAC GTG GAC 3348
Ser Ile Gly Gly Ile Leu Ala Ser Arg Cys Leu His Val Asp
        1040                1045                1050

CTG CTG CAC AGC ATC CTG CGG TCA CCC ATG AGC TTC TTT GAG 3390
Leu Leu His Ser Ile Leu Arg Ser Pro Met Ser Phe Phe Glu
            1055                1060                1065

CGG ACC CCC AGT GGG AAC CTG GTG AAC CGC TTC TCC AAG GAG 3432
Arg Thr Pro Ser Gly Asn Leu Val Asn Arg Phe Ser Lys Glu
                1070                1075

CTG GAC ACA GTG GAC TCC ATG ATC CCG GAG GTC ATC AAG ATG 3474
Leu Asp Thr Val Asp Ser Met Ile Pro Glu Val Ile Lys Met
1080                1085                1090

TTC ATG GGC TCC CTG TTC AAC GTC ATT GGT GCC TGC ATC GTT 3516
Phe Met Gly Ser Leu Phe Asn Val Ile Gly Ala Cys Ile Val
    1095                1100                1105

ATC CTG CTG GCC ACG CCC ATC GCC GCC ATC ATC ATC CCG CCC 3558
Ile Leu Leu Ala Thr Pro Ile Ala Ala Ile Ile Ile Pro Pro
        1110                1115                1120

CTT GGC CTC ATC TAC TTC TTC GTC CAG AGG TTC TAC GTG GCT 3600
Leu Gly Leu Ile Tyr Phe Phe Val Gln Arg Phe Tyr Val Ala
            1125                1130                1135

TCC TCC CGG CAG CTG AAG CGC CTC GAG TCG GTC AGC CGC TCC 3642
Ser Ser Arg Gln Leu Lys Arg Leu Glu Ser Val Ser Arg Ser
                1140                1145
```

```
CCG GTC TAT TCC CAT TTC AAC GAG ACC TTG CTG GGG GTC AGC 3684
Pro Val Tyr Ser His Phe Asn Glu Thr Leu Leu Gly Val Ser
1150                1155                1160

GTC ATT CGA GCC TTC GAG GAG CAG GAG CGC TTC ATC CAC CAG 3726
Val Ile Arg Ala Phe Glu Glu Gln Glu Arg Phe Ile His Gln
    1165                1170                1175

AGT GAC CTG AAG GTG GAC GAG AAC CAG AAG GCC TAT TAC CCC 3768
Ser Asp Leu Lys Val Asp Glu Asn Gln Lys Ala Tyr Tyr Pro
        1180                1185                1190

AGC ATC GTG GCC AAC AGG TGG CTG GCC GTG CGG CTG GAG TGT 3810
Ser Ile Val Ala Asn Arg Trp Leu Ala Val Arg Leu Glu Cys
            1195                1200                1205

GTG GGC AAC TGC ATC GTT CTG TTT GCT GCC CTG TTT GCG GTG 3852
Val Gly Asn Cys Ile Val Leu Phe Ala Ala Leu Phe Ala Val
                1210                1215

ATC TCC AGG CAC AGC CTC AGT GCT GGC TTG GTG GGC CTC TCA 3894
Ile Ser Arg His Ser Leu Ser Ala Gly Leu Val Gly Leu Ser
1220                1225                1230

GTG TCT TAC TCA TTG CAG GTC ACC ACG TAC TTG AAC TGG CTG 3936
Val Ser Tyr Ser Leu Gln Val Thr Thr Tyr Leu Asn Trp Leu
    1235                1240                1245

GTT CGG ATG TCA TCT GAA ATG GAA ACC AAC ATC GTG GCC GTG 3978
Val Arg Met Ser Ser Glu Met Glu Thr Asn Ile Val Ala Val
        1250                1255                1260

GAG AGG CTC AAG GAG TAT TCA GAG ACT GAG AAG GAG GCG CCC 4020
Glu Arg Leu Lys Glu Tyr Ser Glu Thr Glu Lys Glu Ala Pro
            1265                1270                1275

TGG CAA ATC CAG GAG ACA CGT CCG CCC AGC AGC TGG CCC CAG 4062
Trp Gln Ile Gln Glu Thr Arg Pro Pro Ser Ser Trp Pro Gln
                1280                1285

GTG GGC CGA GTG GAA TTC CGG AAC TAC TGC CTG CGC TAC CGA 4104
Val Gly Arg Val Glu Phe Arg Asn Tyr Cys Leu Arg Tyr Arg
1290                1295                1300

GAG GAC CTG GAC TTC GTT CTC AGG CAC ATC AAT GTC ACG ATC 4146
Glu Asp Leu Asp Phe Val Leu Arg His Ile Asn Val Thr Ile
    1305                1310                1315

AAT GGG GGA GAA AAG GTC GGC ATC GTG GGG CGG ACG GGA GCT 4188
Asn Gly Gly Glu Lys Val Gly Ile Val Gly Arg Thr Gly Ala
        1320                1325                1330
```

```
GGG AAG TCG TCC CTG ACC CTG GGC TTA TTT CGG ATC AAC GAG 4230
Gly Lys Ser Ser Leu Thr Leu Gly Leu Phe Arg Ile Asn Glu
          1335                1340                1345

TCT GCC GAA GGA GAG ATC ATC ATC GAT GGC ATC AAC ATC GCC 4272
Ser Ala Glu Gly Glu Ile Ile Ile Asp Gly Ile Asn Ile Ala
               1350                1355

AAG ATC GGC CTG CAC GAC CTC CGC TTC AAG ATC ACC ATC ATC 4314
Lys Ile Gly Leu His Asp Leu Arg Phe Lys Ile Thr Ile Ile
1360                1365                1370

CCC CAG GAC CCT GTT TTG TTT TCG GGT TCC CTC CGA ATG AAC 4356
Pro Gln Asp Pro Val Leu Phe Ser Gly Ser Leu Arg Met Asn
     1375                1380                1385

CTG GAC CCA TTC AGC CAG TAC TCG GAT GAA GAA GTC TGG ACG 4398
Leu Asp Pro Phe Ser Gln Tyr Ser Asp Glu Glu Val Trp Thr
          1390                1395                1400

TCC CTG GAG CTG GCC CAC CTG AAG GAC TTC GTG TCA GCC CTT 4440
Ser Leu Glu Leu Ala His Leu Lys Asp Phe Val Ser Ala Leu
               1405                1410                1415

CCT GAC AAG CTA GAC CAT GAA TGT GCA GAA GGC GGG GAG AAC 4482
Pro Asp Lys Leu Asp His Glu Cys Ala Glu Gly Gly Glu Asn
               1420                1425

CTC AGT GTC GGG CAG CGC CAG CTT GTG TGC CTA GCC CGG GCC 4524
Leu Ser Val Gly Gln Arg Gln Leu Val Cys Leu Ala Arg Ala
1430                1435                1440

CTG CTG AGG AAG ACG AAG ATC CTT GTG TTG GAT GAG GCC ACG 4566
Leu Leu Arg Lys Thr Lys Ile Leu Val Leu Asp Glu Ala Thr
     1445                1450                1455

GCA GCC GTG GAC CTG GAA ACG GAC GAC CTC ATC CAG TCC ACC 4608
Ala Ala Val Asp Leu Glu Thr Asp Asp Leu Ile Gln Ser Thr
          1460                1465                1470

ATC CGG ACA CAG TTC GAG GAC TGC ACC GTC CTC ACC ATC GCC 4650
Ile Arg Thr Gln Phe Glu Asp Cys Thr Val Leu Thr Ile Ala
               1475                1480                1485

CAC CGG CTC AAC ACC ATC ATG GAC TAC ACA AGG GTG ATC GTC 4692
His Arg Leu Asn Thr Ile Met Asp Tyr Thr Arg Val Ile Val
               1490                1495

TTG GAC AAA GGA GAA ATC CAG GAG TAC GGC GCC CCA TCG GAC 4734
Leu Asp Lys Gly Glu Ile Gln Glu Tyr Gly Ala Pro Ser Asp
1500                1505                1510
```

```
CTC CTG CAG CAG AGA GGT CTT TTC TAC AGC ATG GCC AAA GAC 4776
Leu Leu Gln Gln Arg Gly Leu Phe Tyr Ser Met Ala Lys Asp
    1515                1520                1525

GCC GGC TTG GTG TGAGCCCCAG AGCTGGCATA TCTGGTCAGA       4818
Ala Gly Leu Val
        1530

ACTGCAGGGC CTATATGCCA GCGCCCCAGG GAGGAGTCAG TACCCCTGGT  4868

AAACCAAGCC TCCCACACTG AAACCAAAAC ATAAAAACCA AACCCAGACA  4918

ACCAAAAACAT ATTCAAAGCA GCAGCCACCG CCATCCGGTC CCCTGCCTGG  4968

AACTGGCTGT GAAGACCCAG GAGAGACAGA GATGCGAACC ACC         5011
```

（２）配列番号２についての情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：1531個のアミノ酸

（Ｂ）型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）配列の種類：タンパク質

（xi）配列：配列番号２

```
Met Ala Leu Arg Gly Phe Cys Ser Ala Asp Gly Ser Asp Pro
 1               5                  10

Leu Trp Asp Trp Asn Val Thr Trp Asn Thr Ser Asn Pro Asp
15                  20                  25

Phe Thr Lys Cys Phe Gln Asn Thr Val Leu Val Trp Val Pro
     30                  35                  40

Cys Phe Tyr Leu Trp Ala Cys Phe Pro Phe Tyr Phe Leu Tyr
         45                  50                  55

Leu Ser Arg His Asp Arg Gly Tyr Ile Gln Met Thr Pro Leu
             60                  65                  70

Asn Lys Thr Lys Thr Ala Leu Gly Phe Leu Leu Trp Ile Val
                 75                  80

Cys Trp Ala Asp Leu Phe Tyr Ser Phe Trp Glu Arg Ser Arg
85                  90                  95

Gly Ile Phe Leu Ala Pro Val Phe Leu Val Ser Pro Thr Leu
    100                 105                 110
```

Leu Gly Ile Thr Thr Leu Leu Ala Thr Phe Leu Ile Gln Leu
115 120 125

Glu Arg Arg Lys Gly Val Gln Ser Ser Gly Ile Met Leu Thr
130 135 140

Phe Trp Leu Val Ala Leu Val Cys Ala Leu Ala Ile Leu Arg
145 150

Ser Lys Ile Met Thr Ala Leu Lys Glu Asp Ala Gln Val Asp
155 160 165

Leu Phe Arg Asp Ile Thr Phe Tyr Val Tyr Phe Ser Leu Leu
170 175 180

Leu Ile Gln Leu Val Leu Ser Cys Phe Ser Asp Arg Ser Pro
185 190 195

Leu Phe Ser Glu Thr Ile His Asp Pro Asn Pro Cys Pro Glu
200 205 210

Ser Ser Ala Ser Phe Leu Ser Arg Ile Thr Phe Trp Trp Ile
215 220

Thr Gly Leu Ile Val Arg Gly Tyr Arg Gln Pro Leu Glu Gly
225 230 235

Ser Asp Leu Trp Ser Leu Asn Lys Glu Asp Thr Ser Glu Gln
240 245 250

Val Val Pro Val Leu Val Lys Asn Trp Lys Lys Glu Cys Ala
255 260 265

Lys Thr Arg Lys Gln Pro Val Lys Val Val Tyr Ser Ser Lys
270 275 280

Asp Pro Ala Gln Pro Lys Glu Ser Ser Lys Val Asp Ala Asn
285 290

Glu Glu Val Glu Ala Leu Ile Val Lys Ser Pro Gln Lys Glu
295 300 305

Trp Asn Pro Ser Leu Phe Lys Val Leu Tyr Lys Thr Phe Gly
310 315 320

Pro Tyr Phe Leu Met Ser Phe Phe Phe Lys Ala Ile His Asp
325 330 335

Leu Met Met Phe Ser Gly Pro Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ile
340 345 350

Lys Phe Val Asn Asp Thr Lys Ala Pro Asp Trp Gln Gly Tyr
355 360

Phe Tyr Thr Val Leu Leu Phe Val Thr Ala Cys Leu Gln Thr
365 370 375

Leu Val Leu His Gln Tyr Phe His Ile Cys Phe Val Ser Gly
380 385 390

Met Arg Ile Lys Thr Ala Val Ile Gly Ala Val Tyr Arg Lys
395 400 405

Ala Leu Val Ile Thr Asn Ser Ala Arg Lys Ser Ser Thr Val
410 415 420

Gly Glu Ile Val Asn Leu Met Ser Val Asp Ala Gln Arg Phe
425 430

Met Asp Leu Ala Thr Tyr Ile Asn Met Ile Trp Ser Ala Pro
435 440 445

Leu Gln Val Ile Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Trp Leu Asn Leu
450 455 460

Gly Pro Ser Val Leu Ala Gly Val Ala Val Met Val Leu Met
465 470 475

Val Pro Val Asn Ala Val Met Ala Met Lys Thr Lys Thr Tyr
480 485 490

Gln Val Ala His Met Lys Ser Lys Asp Asn Arg Ile Lys Leu
495 500

Met Asn Glu Ile Leu Asn Gly Ile Lys Val Leu Lys Leu Tyr
505 510 515

Ala Trp Glu Leu Ala Phe Lys Asp Lys Val Leu Ala Ile Arg
520 525 530

Gln Glu Glu Leu Lys Val Leu Lys Lys Ser Ala Tyr Leu Ser
535 540 545

Ala Val Gly Thr Phe Thr Trp Val Cys Thr Pro Phe Leu Val
550 555 560

Ala Leu Cys Thr Phe Ala Val Tyr Val Thr Ile Asp Glu Asn
565 570

Asn Ile Leu Asp Ala Gln Thr Ala Phe Val Ser Leu Ala Leu
575 580 585

Phe Asn Ile Leu Arg Phe Pro Leu Asn Ile Leu Pro Met Val
590 595 600

Ile Ser Ser Ile Val Gln Ala Ser Val Ser Leu Lys Arg Leu
605 610 615

Arg Ile Phe Leu Ser His Glu Glu Leu Glu Pro Asp Ser Ile
620 625 630

Glu Arg Arg Pro Val Lys Asp Gly Gly Gly Thr Asn Ser Ile
635 640

Thr Val Arg Asn Ala Thr Phe Thr Trp Ala Arg Ser Asp Pro
645 650 655

Pro Thr Leu Asn Gly Ile Thr Phe Ser Ile Pro Glu Gly Ala
660 665 670

Leu Val Ala Val Val Gly Gln Val Gly Cys Gly Lys Leu Ser
675 680 685

Leu Leu Ser Ala Leu Leu Ala Glu Met Asp Lys Val Glu Gly
690 695 700

His Val Ala Ile Lys Gly Ser Val Ala Tyr Val Pro Gln Gln
705 710

Ala Trp Ile Gln Asn Asp Ser Leu Arg Glu Asn Ile Leu Phe
715 720 725

Gly Cys Gln Leu Glu Glu Pro Tyr Tyr Arg Ser Val Ile Gln
730 735 740

Ala Cys Ala Leu Leu Pro Asp Leu Glu Ile Leu Pro Ser Gly
745 750 755

Asp Arg Thr Glu Ile Gly Glu Lys Gly Val Asn Leu Ser Gly
760 765 770

Gly Gln Lys Gln Arg Val Ser Leu Ala Arg Ala Val Tyr Ser
775 780

Asn Ala Asp Ile Tyr Leu Phe Asp Asp Pro Leu Ser Ala Val
785 790 795

Asp Ala His Val Gly Lys His Ile Phe Glu Asn Val Ile Gly
800 805 810

Pro Lys Gly Met Leu Lys Asn Lys Thr Arg Ile Leu Val Thr
815 820 825

His Ser Met Ser Tyr Leu Pro Gln Val Asp Val Ile Ile Val
830 835 840

Met Ser Gly Gly Lys Ile Ser Glu Met Gly Set Tyr Gln Glu
845 850

Leu Leu Ala Arg Asp Gly Ala Phe Ala Glu Phe Leu Arg Thr
855 860 865

Tyr Ala Ser Thr Glu Gln Glu Gln Asp Ala Glu Glu Asn Gly
870 875 880

Val Thr Gly Val Ser Gly Pro Gly Lys Glu Ala Lys Gln Met
885 890 895

Glu Asn Gly Met Leu Val Thr Asp Ser Ala Gly Lys Gln Leu
900 905 910

Gln Arg Gln Leu Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ser Gly Asp Ile
915 920

Ser Arg His His Asn Ser Thr Ala Glu Leu Gln Lys Ala Glu
925 930 935

Ala Lys Lys Glu Glu Thr Trp Lys Leu Met Glu Ala Asp Lys
940 945 950

Ala Gln Thr Gly Gln Val Lys Leu Ser Val Tyr Trp Asp Tyr
955 960 965

Met Lys Ala Ile Gly Leu Phe Ile Ser Phe Leu Ser Ile Phe
970 975 980

Leu Phe Met Cys Asn His Val Ser Ala Leu Ala Ser Asn Tyr
985 990

Trp Leu Ser Leu Trp Thr Asp Asp Pro Ile Val Asn Gly Thr
995 1000 1005

Glu Glu His Thr Lys Val Arg Leu Ser Val Tyr Gly Ala Leu
1010 1015 1020

Gly Ile Ser Gln Gly Ile Ala Val Phe Gly Tyr Ser Met Ala
1025 1030 1035

Val Ser Ile Gly Gly Ile Leu Ala Ser Arg Cys Leu His Val
1040 1045 1050

Asp Leu Leu His Ser Ile Leu Arg Ser Pro Met Ser Phe Phe
1055 1060

Glu Arg Thr Pro Ser Gly Asn Leu Val Asn Arg Phe Ser Lys
1065 1070 1075

Glu Leu Asp Thr Val Asp Ser Met Ile Pro Glu Val Ile Lys
1080 1085 1090

Met Phe Met Gly Ser Leu Phe Asn Val Ile Gly Ala Cys Ile
1095 1100 1105

Val Ile Leu Leu Ala Thr Pro Ile Ala Ala Ile Ile Ile Pro
1110 1115 1120

Pro Leu Gly Leu Ile Tyr Phe Phe Val Gln Arg Phe Tyr Val
1125 1130

Ala Ser Ser Arg Gln Leu Lys Arg Leu Glu Ser Val Ser Arg
1135 1140 1145

Ser Pro Val Tyr Ser His Phe Asn Glu Thr Leu Leu Gly Val
1150 1155 1160

Ser Val Ile Arg Ala Phe Glu Glu Gln Glu Arg Phe Ile His
1165 1170 1175

Gln Ser Asp Leu Lys Val Asp Glu Asn Gln Lys Ala Tyr Tyr
1180 1185 1190

Pro Ser Ile Val Ala Asn Arg Trp Leu Ala Val Arg Leu Glu
1195 1200

Cys Val Gly Asn Cys Ile Val Leu Phe Ala Ala Leu Phe Ala
1205 1210 1215

Val Ile Ser Arg His Ser Leu Ser Ala Gly Leu Val Gly Leu
1220 1225 1230

Ser Val Ser Tyr Ser Leu Gln Val Thr Thr Tyr Leu Asn Trp
1235 1240 1245

Leu Val Arg Met Ser Ser Glu Met Glu Thr Asn Ile Val Ala
1250 1255 1260

Val Glu Arg Leu Lys Glu Tyr Ser Glu Thr Glu Lys Glu Ala
1265 1270

Pro Trp Gln Ile Gln Glu Thr Arg Pro Pro Ser Ser Trp Pro
1275 1280 1285

Gln Val Gly Arg Val Glu Phe Arg Asn Tyr Cys Leu Arg Tyr
1290 1295 1300

Arg Glu Asp Leu Asp Phe Val Leu Arg His Ile Asn Val Thr
1305 1310 1315

Ile Asn Gly Gly Glu Lys Val Gly Ile Val Gly Arg Thr Gly
1320 1325 1330

Ala Gly Lys Ser Ser Leu Thr Leu Gly Leu Phe Arg Ile Asn
1335 1340

Glu Ser Ala Glu Gly Glu Ile Ile Ile Asp Gly Ile Asn Ile
1345 1350 1355

Ala Lys Ile Gly Leu His Asp Leu Arg Phe Lys Ile Thr Ile
1360 1365 1370

Ile Pro Gln Asp Pro Val Leu Phe Ser Gly Ser Leu Arg Met
1375 1380 1385

Asn Leu Asp Pro Phe Ser Gln Tyr Ser Asp Glu Glu Val Trp
1390 1395 1400

Thr Ser Leu Glu Leu Ala His Leu Lys Asp Phe Val Ser Ala
1405 1410

Leu Pro Asp Lys Leu Asp His Glu Cys Ala Glu Gly Gly Glu
1415 1420 1425

Asn Leu Ser Val Gly Gln Arg Gln Leu Val Cys Leu Ala Arg
1430 1435 1440

Ala Leu Leu Arg Lys Thr Lys Ile Leu Val Leu Asp Glu Ala
1445 1450 1455

Thr Ala Ala Val Asp Leu Glu Thr Asp Asp Leu Ile Gln Ser
1460 1465 1470

Thr Ile Arg Thr Gln Phe Glu Asp Cys Thr Val Leu Thr Ile
1475 1480

Ala His Arg Leu Asn Thr Ile Met Asp Tyr Thr Arg Val Ile
1485 1490 1495

Val Leu Asp Lys Gly Glu Ile Gln Glu Tyr Gly Ala Pro Ser
1500 1505 1510

Asp Leu Leu Gln Gln Arg Gly Leu Phe Tyr Ser Met Ala Lys
1515 1520 1525

Asp Ala Gly Leu Val
1530

【図１Ａ】

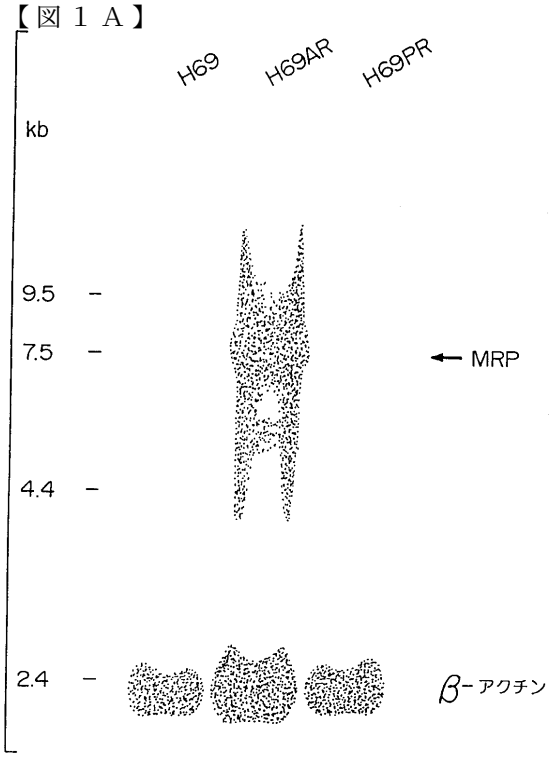


FIG. IA

【図１Ｂ】

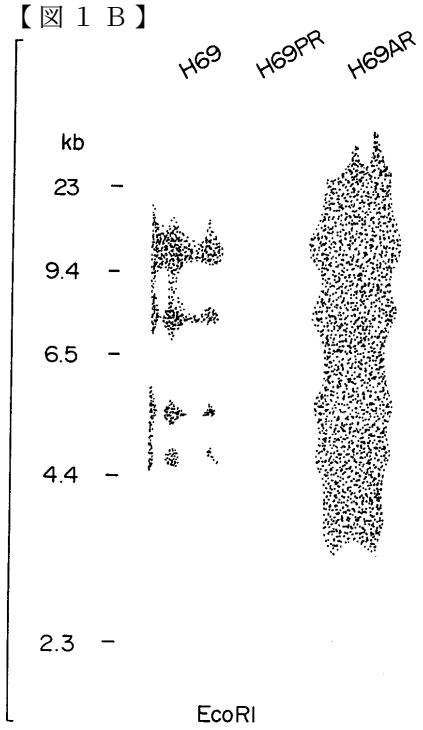


FIG. IB

【図１Ｃ】

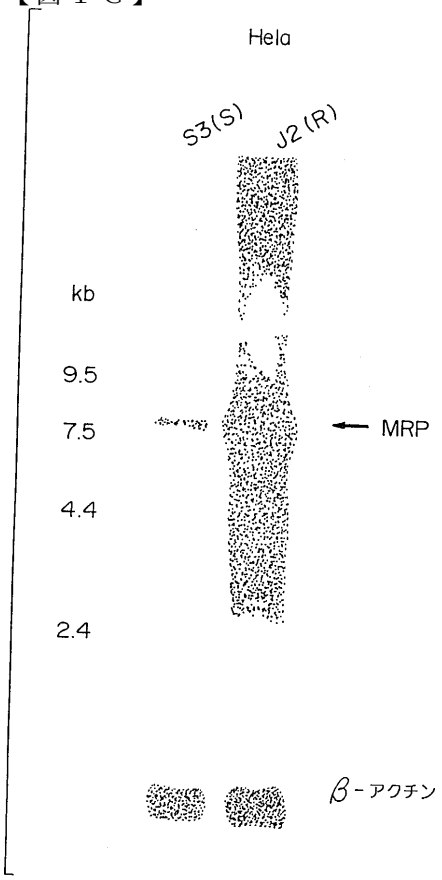


FIG. IC

【図２】

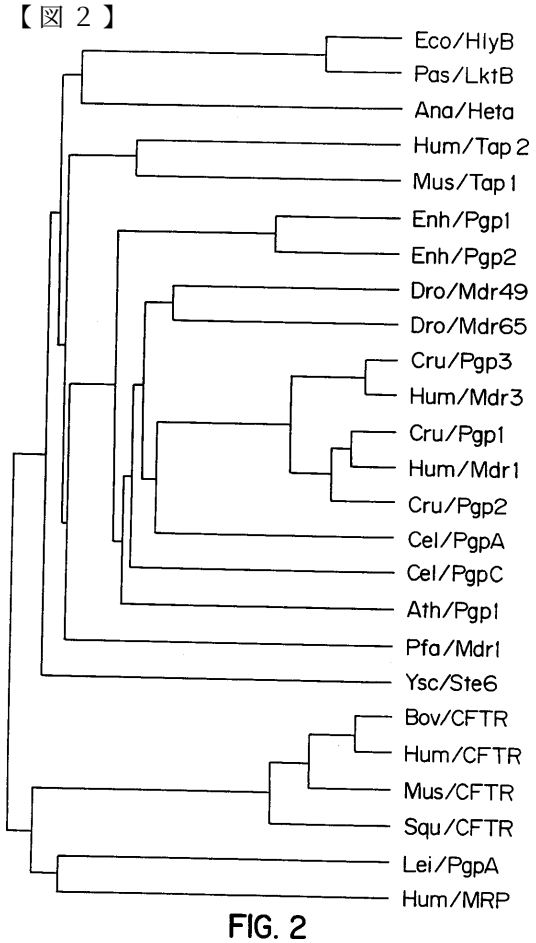


FIG. 2

【図３Ａ】

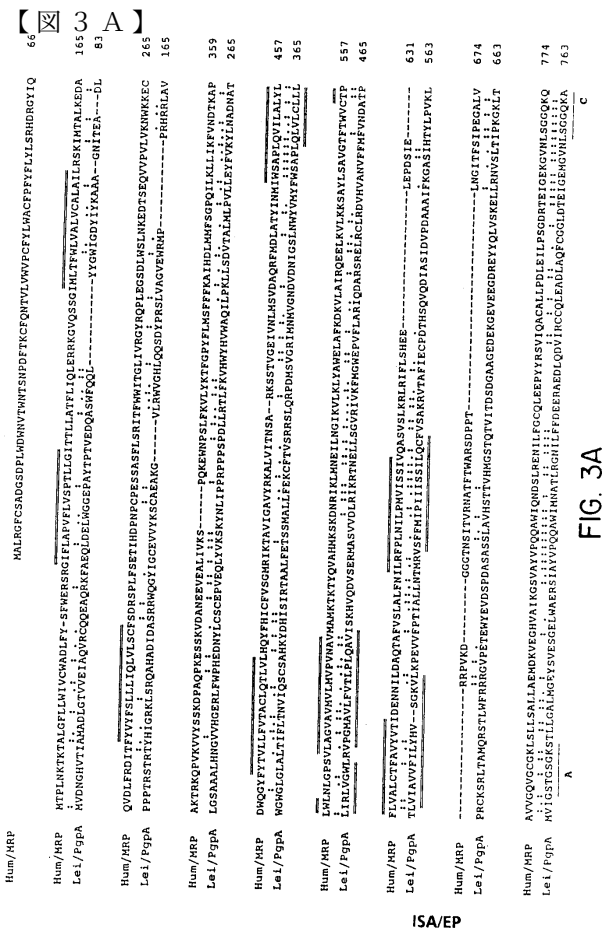


FIG. 3A

【図３Ｂ】

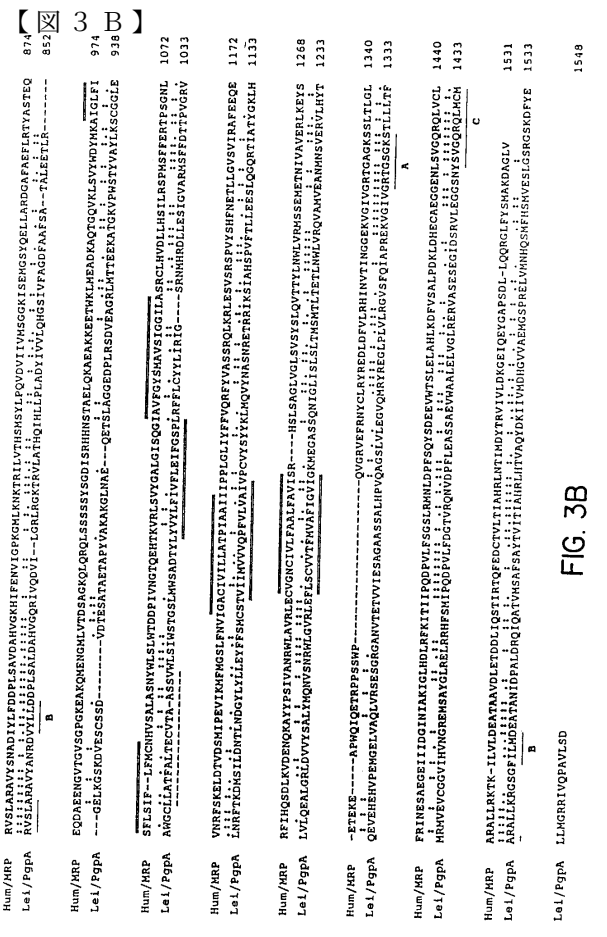


FIG. 3B

【図３Ｃ】

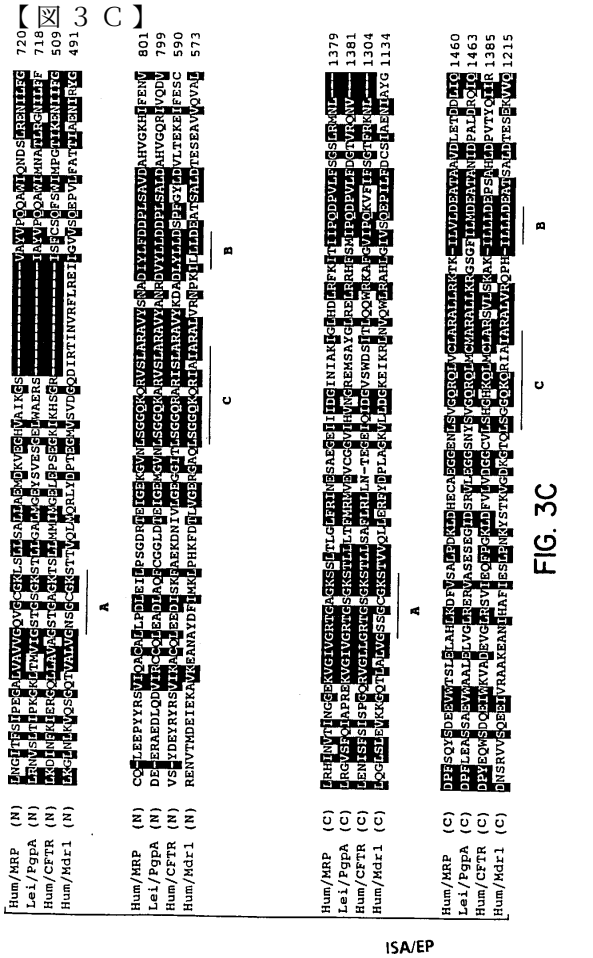


FIG. 3C

【図４】

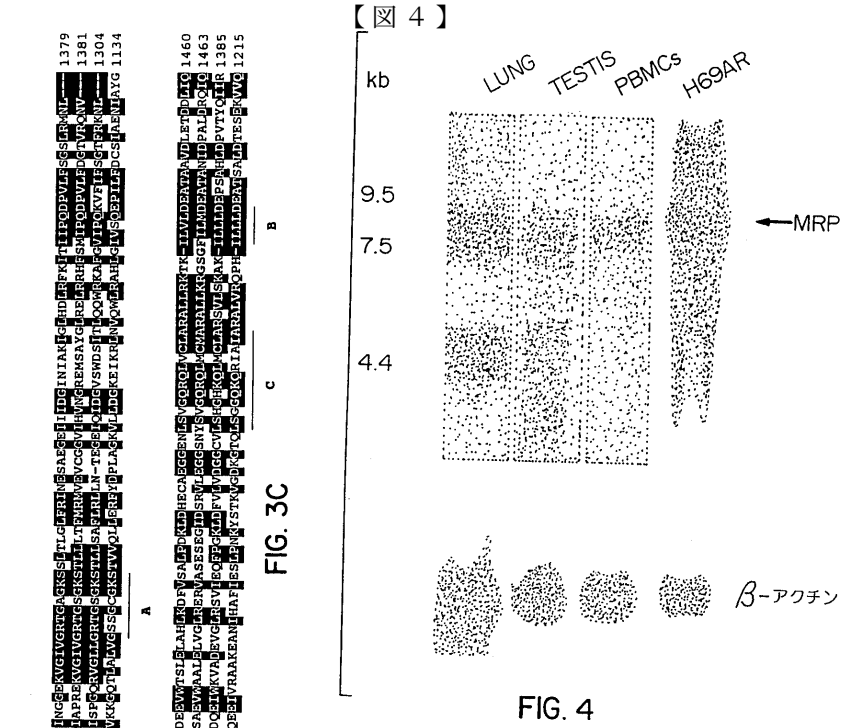


FIG. 4

【図５】

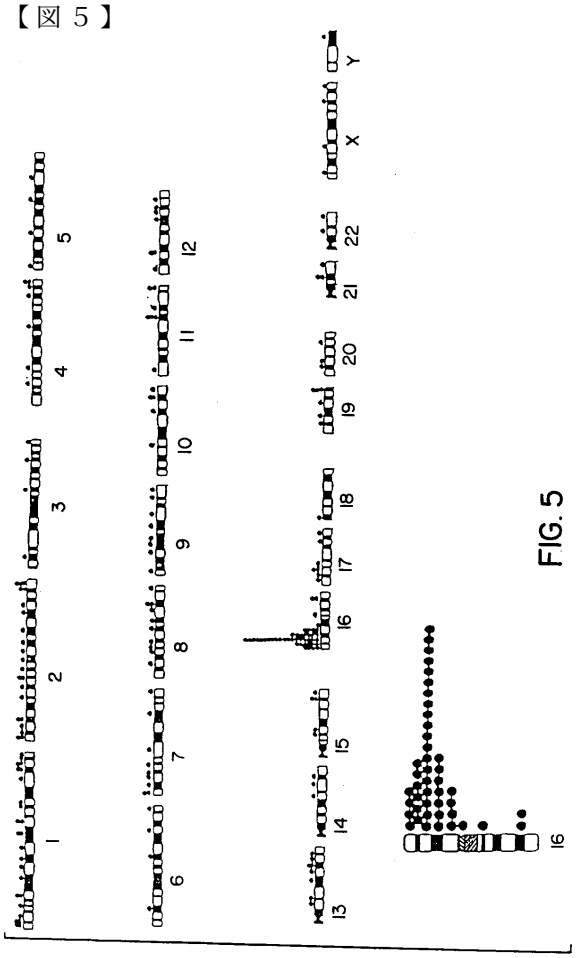


FIG. 5

【図６】

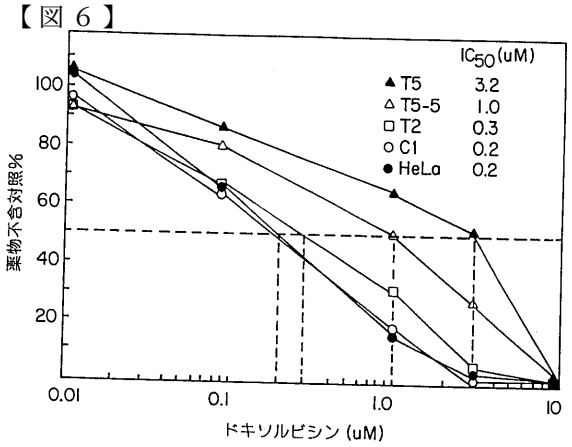


FIG. 6

【図７】

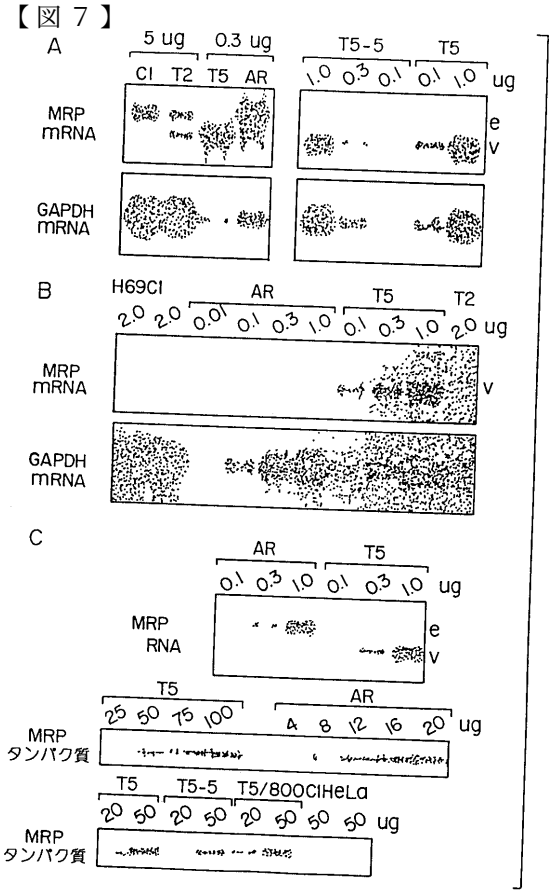


FIG. 7

【図８】

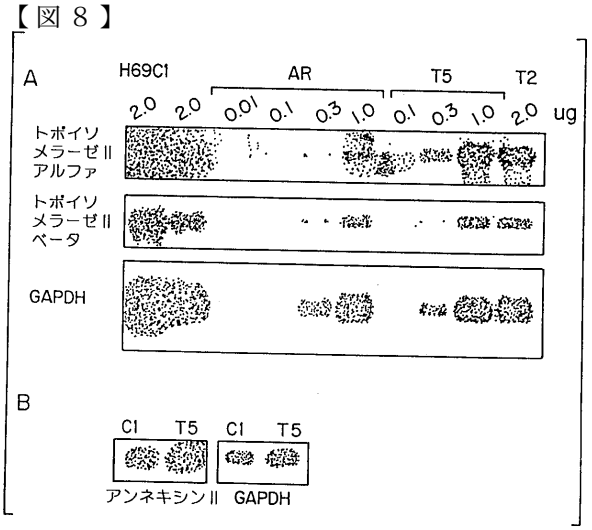


FIG. 8

【図９】

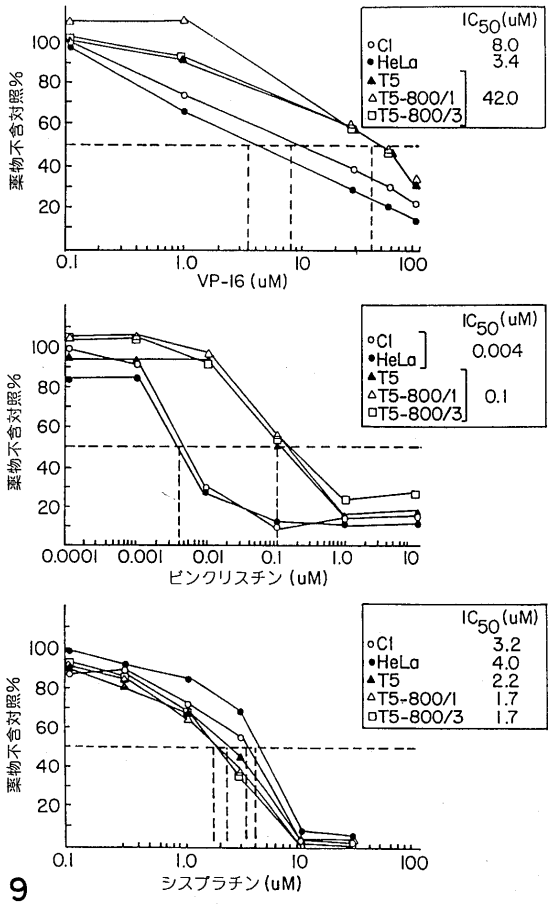

IC50(uM)
○CI 8.0
●HeLa 3.4
▲T5
△T5-800/1 42.0
□T5-800/3
薬物不含対照%
VP-16 (uM)
IC50(uM)
○CI
●HeLa 0.004
▲T5
△T5-800/1 0.1
□T5-800/3
ビンクリスチン (uM)
IC50(uM)
○CI 3.2
●HeLa 4.0
▲T5 2.2
△T5-800/1 1.7
□T5-800/3 1.7
シスプラチン (uM)

FIG. 9

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]		FI		
	C07K 16/18		C07K 16/18	
	C12N 5/10		C12P 21/02	C
	C12P 21/02		C12P 21/08	
	C12P 21/08		G01N 33/53	D
	G01N 33/53		G01N 33/574	A
	G01N 33/574		C12N 5/00	B
//(C12N	5/10		C12N 5/00	B
C12R	1:91)		C12R 1:91	
(C12P	21/02		C12P 21/02	C
C12R	1:91)		C12R 1:91	
(C12P	21/08		C12P 21/08	
C12R	1:91)		C12R 1:91	

(72)発明者 コール, スーザン ピー. シー.
カナダ国, オンタリオ ケー7エム 2ビー4, キングストン, フェアウェイ ヒルズ クレセント 206

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 Br.J.Cancer,Vol.64,No.1(1991)p.15-22

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], DB名)
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed