

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6736467号
(P6736467)

(45) 発行日 令和2年8月5日 (2020. 8. 5)

(24) 登録日 令和2年7月17日 (2020. 7. 17)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/12 (2006. 01)	C 1 2 N 15/12 Z N A
C O 7 K 14/47 (2006. 01)	C O 7 K 14/47
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 35 (全 160 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-549788 (P2016-549788)	(73) 特許権者	509012625
(86) (22) 出願日	平成27年2月4日 (2015. 2. 4)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2017-506072 (P2017-506072A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
(43) 公表日	平成29年3月2日 (2017. 3. 2)		ス サンフランシスコ ディーエヌエー
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/014496		ウェイ 1
(87) 国際公開番号	W02015/120075	(73) 特許権者	501188889
(87) 国際公開日	平成27年8月13日 (2015. 8. 13)		キュリス, インコーポレイテッド
審査請求日	平成29年12月18日 (2017. 12. 18)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(31) 優先権主張番号	61/935, 775		4 2 1 レキシントン, マグアイア ロー
(32) 優先日	平成26年2月4日 (2014. 2. 4)		ド 4
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	110000523
			アクシス国際特許業務法人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 平滑化変異体及びその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 に対して少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む変異型 SMO タンパク質をコードする単離核酸分子であって、該アミノ酸配列がアミノ酸 281 にシステイン (C) を含む単離核酸分子。

【請求項 2】

前記変異型 SMO タンパク質が配列番号 2 のアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列がアミノ酸 281 にシステイン (C) を含む、請求項 1 に記載の単離核酸分子。

【請求項 3】

配列番号 5 の親核酸配列を含み、該配列が該アミノ酸 281 コード配列をシステイン (C) をコードするように変化させる変異を有する、請求項 1 に記載の単離核酸分子。

【請求項 4】

配列番号 2 に対して少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む単離変異型 SMO タンパク質であって、該アミノ酸配列がアミノ酸 281 にシステイン (C) を含む単離変異型 SMO タンパク質。

【請求項 5】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列がアミノ酸 281 にシステイン (C) を含む、請求項 4 に記載の変異型 SMO タンパク質。

【請求項 6】

請求項 4 又は 5 に記載の変異型 SMO タンパク質に特異的に結合する単離抗体であって

10

20

、該抗体がアミノ酸 281 にトリプトファンを有する野生型 SMO には結合しない単離抗体。

【請求項 7】

前記抗体がモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体又はその抗原結合フラグメントである、請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 8】

前記抗体が細胞毒性剤に結合されている、請求項 6 又は 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

前記抗体が検出可能な標識に結合されている、請求項 6 又は 7 に記載の抗体。

【請求項 10】

前記抗体が SMO 活性を阻害する、請求項 6～9 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 11】

サンプルにおける少なくとも 1 つの SMO 変異を同定する方法であって、該サンプルからの核酸と、アミノ酸 281 コード配列をシステインに変化させる変異を組み込む変異型 SMO タンパク質又はそのフラグメントをコードする核酸に特異的にハイブリダイズすることのできる核酸プローブとを接触させ、及び該ハイブリダイゼーションを検出することを含む方法。

【請求項 12】

前記プローブが検出可能に標識されている、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記プローブがアンチセンスオリゴマーである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記核酸サンプル中における SMO 遺伝子又はそのフラグメントを増幅させ、そして該プローブと接触させる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

GDC-0449 による治療に耐性である又は耐性になるヒト被験体において腫瘍を同定するための方法であって、該腫瘍のサンプルにおいて変異 SMO 遺伝子又は変異 SMO タンパク質の存在を決定し、該変異 SMO 遺伝子がアミノ酸 281 に変異を含む SMO タンパク質をコードし、該 SMO タンパク質がアミノ酸 281 にシステインを含み、それによって、該変異 SMO 遺伝子又は変異 SMO タンパク質の存在は、該腫瘍が GDC-0449 による治療に耐性であることを示すことを含む方法。

【請求項 16】

前記変異の存在又は非存在を、核酸サンプルを検査することによって決定する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記変異の存在又は非存在を、タンパク質サンプルを検査することによって決定する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

アミノ酸 281 にシステインを組み込む変異型 SMO タンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、該変異型 SMO と試験化合物とを接触させ、及び該化合物の該変異型 SMO への結合を検出し、それによって、該変異型 SMO への該試験化合物の結合は、該試験化合物が変異型 SMO の阻害剤であることを示すことを含む方法。

【請求項 19】

アミノ酸 281 にシステインを組み込む変異型 SMO タンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、該変異型 SMO を発現する細胞と試験化合物とを接触させ、及び該細胞における Gli の活性を検出し、それによって、該 Gli 活性の存在は、該試験化合物が変異型 SMO の阻害剤ではないことを示すことを含む方法。

【請求項 20】

ヘッジホッグ経路阻害剤を同定する方法であって、該方法は、細胞と試験薬剤の所定量

10

20

30

40

50

とを接触させ、ここで、該細胞はヘッジホッグタンパク質に応答し又はヘッジホッグシグナル伝達経路の増大したヘッジホッグシグナル伝達及び／又は活性を有し、該細胞は請求項4又は5に記載の変異型SMOタンパク質を発現し；及び対照と比較して、該試験薬剤が該細胞内においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害するかどうかを決定し、該試験薬剤が該対照に対して該細胞内におけるヘッジホッグシグナル伝達を阻害する場合には、該試験薬剤をヘッジホッグ経路阻害剤として同定することを含む方法。

【請求項21】

前記試験薬剤が前記細胞内においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害する能力を、G1i1発現アッセイを使用して決定する、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

ヘッジホッグ経路阻害剤を同定する方法であって、該方法は、細胞と試験薬剤の所定量とを接触させ、ここで、該細胞はヘッジホッグタンパク質に応答し又はヘッジホッグシグナル伝達経路の増大したヘッジホッグシグナル伝達及び／又は活性を有し、該細胞は請求項4又は5に記載の変異型SMOタンパク質を発現し；及び対照と比較して、該試験薬剤が該細胞の成長及び／又は増殖を阻害するかどうかを決定し、該試験薬剤が該対照に対して該細胞の成長及び／又は増殖を阻害する場合には、該試験薬剤をヘッジホッグ経路阻害剤として同定することを含む方法。

【請求項23】

対照が野生型SMOタンパク質を発現する細胞である、請求項20～22のいずれかに記載の方法。

【請求項24】

前記対照が前記試験薬剤と接触させた細胞と同じ変異型SMOタンパク質を発現する細胞であり、該対照を該変異型SMOタンパク質が部分的又は完全に耐性である対照薬剤で処理する、請求項20～22のいずれかに記載の方法。

【請求項25】

対照薬剤がビスモデギブ、LY2940680、LDE225及び／又は化合物5である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記試験薬剤が変異型SMOタンパク質に結合するが、野生型SMOタンパク質には結合しない、請求項20～25のいずれかに記載の方法。

【請求項27】

前記試験薬剤が変異体SMOタンパク質と野生型SMOタンパク質の両方に結合する、請求項20～25のいずれかに記載の方法。

【請求項28】

前記試験薬剤が野生型SMOタンパク質を発現する細胞よりも変異型SMOタンパク質を発現する細胞においてヘッジホッグシグナル伝達経路を阻害するのに有効である、請求項20又は21に記載の方法。

【請求項29】

前記試験薬剤が野生型SMOタンパク質を発現する細胞よりも変異型SMOタンパク質を発現する細胞の成長及び／又は増殖を阻害するのに有効である、請求項22に記載の方法。

【請求項30】

請求項1～3のいずれかに記載の核酸を含むベクター。

【請求項31】

請求項30に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項32】

請求項30に記載のベクターを含む宿主細胞であって、該ベクターを発現することができる宿主細胞。

【請求項33】

ヘッジホッグ経路阻害剤を同定する方法であって、該方法は、細胞と試験薬剤の所定量

10

20

30

40

50

とを接触させ、ここで、該細胞はヘッジホッグタンパク質に応答し又はヘッジホッグシグナル伝達経路の増大したヘッジホッグシグナル伝達及び／又は活性を有し、該細胞は請求項 30 に記載のベクターを発現し；及び対照と比較して、該試験薬剤が該細胞内においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害するかどうかを決定し、該試験薬剤が該対照に対して該細胞内におけるヘッジホッグシグナル伝達を阻害する場合には、該試験薬剤をヘッジホッグ経路阻害剤として同定することを含む方法。

【請求項 34】

前記試験薬剤が前記細胞内においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害する能力を、Gli1 発現アッセイを使用して決定する、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

ヘッジホッグ経路阻害剤を同定する方法であって、該方法は、細胞と試験薬剤の所定量とを接触させ、ここで、該細胞はヘッジホッグタンパク質に応答し又はヘッジホッグシグナル伝達経路の増大したヘッジホッグシグナル伝達及び／又は活性を有し、該細胞は請求項 30 に記載のベクターを発現し；及び対照と比較して、該試験薬剤が該細胞の成長及び／増殖を阻害するかどうかを決定し、該試験薬剤が該対照に対して該細胞の成長及び／増殖を阻害する場合には、該試験薬剤をヘッジホッグ経路阻害剤として同定する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2014年2月4日に出願された米国仮出願第61/935775号の優先権の利益を主張する。本明細書においてその全体が参照により本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

分子標的癌治療薬が臨床において印象的な活性を示している。最も注目された例のいくつかとしては、フィラデルフィア染色体陽性慢性骨髄性白血病（CML）又はKIT/PDGFRA変異消化管間質腫瘍（GIST）におけるチロシナーゼ阻害剤のイマチニブ及びEGFR変異非小細胞肺癌（NSCLC）におけるエルロチニブが挙げられる（Krause, D. S. 及び R. A. Van Etten (2005) N. Engl. J. Med. 353 (2) : 172-187）。これらの薬剤を用いた治療は、これらの分子異常を有する患者集団における劇的な抗腫瘍応答をもたらした。しかし、この印象的な初期臨床応答にもかかわらず、ほとんどの患者が薬剤耐性の獲得のため最終的に進行する（Engelman, J. A. 及び J. Settleman (2008) Curr. Opin. Genet. Dev. 18 (1) : 73-79）。耐性のメカニズムの同定は、結果として、より合理的な薬物の組み合わせ及び耐性の出現を潜在的に克服する又は避けることができる「第二世代」阻害剤の開発の扉を開いた。

【0003】

髄芽腫は、小児における最も一般的な脳の悪性腫瘍を示す小脳の原始神経外胚葉腫瘍である（Polkinghorn, W. R. 及び N. J. Tarbell (2007) Nat. Clin. Pract. Oncol. 4 (5) : 295-304）。髄芽腫の治療の一形態は、アジュバント放射線療法である。生存率の改善にもかかわらず、アジュバント放射線は衰弱性副作用に関連するため、新たな分子標的療法の必要性が支持される。

【0004】

ヘッジホッグ（Hh）シグナル伝達経路は、髄芽腫の病因に直接関与する。抑制性受容体PTCH1における機能変異の根本的な欠失による場合が最も多い構成的Hhシグナルが孤発例の約30%で実証されている（Zurawel, R. H. 外, (2000) Genes Chromosomes Cancer 27 (1) : 44-51; Kool, M. 外, (2008) PLoS ONE 3 (8) : e3088; Dellovade, T. 外 (2006) Annu. Rev. Neurosci. 29 : 539; Rubin,

10

20

30

40

50

L. L. 及び F. J. de Sauvage (2006) Nat. Rev. Drug Discov. 5:1026)。PTCH1 に対するヘテロ接合マウス (PTCH1+/-) は髄芽腫を自発的に発症する場合があります、Hh 経路阻害剤による治療により、腫瘍の除去及び生存期間の延長が生じた (Goodrich, L. V. 外 (1997) Science 277 (5329):1109-1113; Romer, J. T. 外 (2004) Cancer Cell 6 (3):229-240)。しかし、近年、新規 Hh 経路阻害剤 GDC-0449 により治療された患者は、最初に、治療に対して劇的な応答を示した (Charles M. Rudin 外 (2009) N. Engl. J. Med. (前出)) が、治療に対する永久的な応答を獲得するのにはやはり失敗し、腫瘍の再発を示したことが観察されている。

10

【0005】

BCC は、最も一般的なヒトの癌であり、主に Hh 経路の過剰活性化によって活動化する (Oro 外, 1997; Xie 外, 1998)。Hh シグナル伝達と癌との関連は、最初に、髄芽腫 (MB) 及び BCC に影響を非常に受けやすいゴーリン又は基底細胞母斑症候群 (BCNS) の患者で発見された。これらの患者は、一般に、Hh リガンドに対する受容体をコードする Patched1 (PTCH1) 内にヘテロ生殖細胞変異を有する (Hahn 外, 1996; Johnson 外, 1996)。Hh リガンド結合は、蛇行膜貫通 (TM) シグナル伝達物質平滑化 (SMO) の PTCH1 抑制を緩和する。散発性 BCC の大半は、PTCH1 の変異及びヘテロ接合性の消失 (LOH) を不活性化させることにより活動化し、残りの大部分は、SMO の変異の活性化を維持する (Reifenberger 外, 2005)。SMO は、融合サプレッサー (SUFU) 及びプロテインキナーゼ A (PKA) の阻害により GLI 転写因子の活性化及び核局在化を促進する。SUFU は、細胞質において GLI 転写因子を結合させ隔離することによって Hh 経路を負に調節する (Stone 外, 1999)。また、SUFU の機能喪失変異はゴーリン症候群とも関連する (Pastorino 外, 2009; Smith 外, 2014; Taylor 外, 2002)。また、散発性 BCC の約 50% は TP53 変異も有する (Jayaraman 外, 2014)。

20

【0006】

数種の Hh 経路阻害剤 (HPI) が近年 BCC 及び MB の両方について臨床試験中である (Amakye 外, 2013)。以前から GDC-0449 として知られているビスモデギブは、転移性で局所的に進行した BCC の治療について承認を受けた SMO 阻害剤である (Sekulic 外, 2012)。ビスモデギブによる治療を受けた BCC 患者の大半は、完全応答及び部分応答の両方を含めて臨床的利益を経験する (Sekulic 外, 2012)。

30

【0007】

しかし、予備的な推定から、進行 BCC 患者の 20% までが治療の 1 年以内にビスモデギブに対する耐性を生じることが示唆される (Chang 及び Oro, 2012)。これまで、臨床でのビスモデギブに対する耐性獲得の唯一の機能的に特徴づけられた機構は、転移性 MB 患者からのものである。SMO-D473H 変異が再発転移性腫瘍からの生検で検出され、試験管内で薬物結合を阻害することが示された (Yauch 外, 009)。近年、他の 4 つの臨床 SMO 変異がビスモデギブ耐性 BCC で報告されたが、機能的には検討されなかった (Brinkhuizen 外, 2014; Prichard 外, 2014)。SMO 阻害剤に対するいくつかの耐性機構が、追加の SMO 変異、GLI2 などの下流 Hh 経路成分の増幅及びホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) キナーゼ及び非定型プロテインキナーゼ C ι / λ (aPKC- ι / λ) などのバイパスシグナル伝達経路の活性化を含めた前臨床モデルから示されている (Atwood 外, 2013; Buonamici 外, 2010; Dijkgraaf 外, 2011)。しかし、どの機構が患者において耐性にするのか不明なままである。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0008】

追加のGDC-0449耐性変異型SMOタンパク質を同定し、そしてこのような変異型SMOタンパク質においてSMO活性を調節してGDC-0449による治療時における薬剤耐性を克服する化合物を見出すことが当該技術分野において急務となっている。さらに、そのSMO遺伝子型の自然変異による又は獲得した変異及び耐性による治療に対して耐性の場合がある患者を診断する方法に対する要望がさらに存在する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

開示の概要

本発明は、特定の実施形態では、単離された変異型SMO核酸及びタンパク質、例えば腫瘍の化学療法耐性に関連するものに関し、また、SMO変異に結合し又はSMO活性を調節する化合物についての及びスクリーニング方法、並びに癌診断及び治療、特に薬剤耐性腫瘍の診断及び／又は予後及び治療である変異の検出に関するものでもある。

【0010】

いくつかの実施形態では、本発明は、変異型SMOタンパク質をコードする単離核酸分子であって、該アミノ酸配列が野生型SMOアミノ酸配列の281位に対応するアミノ酸位置にトリプトファン以外のアミノ酸を含むものを提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号1に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む変異型SMOタンパク質をコードする単離核酸分子であって、該アミノ酸配列がアミノ酸281にトリプトファン以外のアミノ酸を含むものを提供する。いくつかの実施形態では、変異型SMOタンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列は、アミノ酸281にシステイン(C)を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の親核酸配列を含み、該配列は、異なるアミノ酸をコードするように、アミノ酸281をコードする配列を変化させる変異を含有する。いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸281をコードする配列に変異を組み込む変異型SMOタンパク質又はそのフラグメントをコードする核酸にハイブリダイズ可能な核酸プローブも提供する。いくつかの実施形態では、プローブは、変異型SMO又はそのフラグメントをコードする該核酸に相補的である。いくつかの実施形態では、プローブは、約10～約50ヌクレオチド長を有する。いくつかの実施形態では、プローブは検出可能な標識をさらに含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、本発明は、変異型SMOタンパク質をコードする単離核酸分子を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の459位に対応するアミノ酸位置にアラニン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号1に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む変異型SMOタンパク質をコードする単離核酸分子を提供し、該アミノ酸配列は、アミノ酸459におけるアラニン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、変異型SMOタンパク質は、配列番号3のアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列はアミノ酸459にバリン(V)を含む。いくつかの実施形態では、核酸分子は、配列番号5の親核酸配列を含み、該配列は、異なるアミノ酸をコードするようにアミノ酸459コード配列を変化させる変異を有する。いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸459コード配列に突然変異を組み込む変異型SMOタンパク質又はそのフラグメントをコードする核酸に特異的にハイブリダイズ可能な核酸プローブを提供する。いくつかの実施形態では、プローブは、変異型SMO又はそのフラグメントをコードする核酸に相補的である。いくつかの実施形態では、プローブは、約10～50ヌクレオチド長を有する。いくつかの実施形態では、プローブは検出可能な標識をさらに含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、本発明は、変異型SMOタンパク質をコードする単離核酸分子を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の535位に対応するアミノ酸位置にトリプトファン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号1に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む変異型SMOタンパク

質をコードする単離核酸分子を提供し、該アミノ酸配列は、アミノ酸 535 にトリプトファン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、変異型 SMO タンパク質は、配列番号 4 のアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列はアミノ酸 535 にロイシン (L) を含む。いくつかの実施形態では、核酸分子は、配列番号 5 の親核酸配列を含み、該配列は、異なるアミノ酸をコードするようにアミノ酸 535 コード配列を変化させる変異を有する。いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸 535 コード配列に突然変異を組み込む変異型 SMO タンパク質又はそのフラグメントをコードする核酸に特異的にハイブリダイズ可能な核酸プローブを提供する。いくつかの実施形態では、プローブは、変異型 SMO 又はそのフラグメントをコードする核酸に相補的である。いくつかの実施形態では、プローブは、約 10 ～ 50 ヌクレオチド長を有する。いくつかの実施形態では、プローブは検出可能な標識をさらに含む。

10

【0013】

いくつかの実施形態では、本発明は、変異型 SMO タンパク質をコードする単離核酸分子を提供し、該アミノ酸配列は、野生型 SMO アミノ酸配列の 408 位に対応するアミノ酸位置にイソロイシン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号 1 に対して少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を含む変異型 SMO タンパク質をコードする単離核酸分子を提供し、該アミノ酸配列は、アミノ酸 408 にイソロイシン (I) 以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、変異型 SMO タンパク質は、配列番号 7 のアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列はアミノ酸 408 にバリン (V) を含む。いくつかの実施形態では、核酸分子は、配列番号 5 の親核酸配列を含み、該配列は、異なるアミノ酸をコードするようにアミノ酸 408 コード配列を変化させる変異を有する。いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸 408 コード配列に突然変異を組み込む変異型 SMO タンパク質又はそのフラグメントをコードする核酸に特異的にハイブリダイズ可能な核酸プローブを提供する。いくつかの実施形態では、プローブは、変異型 SMO 又はそのフラグメントをコードする核酸に相補的である。いくつかの実施形態では、プローブは、約 10 ～ 50 ヌクレオチド長を有する。いくつかの実施形態では、プローブは検出可能な標識をさらに含む。

20

【0014】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸配列を含む単離変異型 SMO タンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型 SMO アミノ酸配列の 281 位に対応するアミノ酸位置にトリプトファン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号 2 に対して少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を含む単離変異型 SMO タンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、アミノ酸 281 にトリプトファン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、該アミノ酸配列はアミノ酸 281 にシステイン (C) を含む。

30

【0015】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸配列を含む変異型 SMO タンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型 SMO アミノ酸配列の 459 位に対応するアミノ酸位置にアラニン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号 3 に対して少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を含む単離変異型 SMO タンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、アミノ酸 459 にアラニン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、該アミノ酸配列はアミノ酸 459 にバリン (V) を含む。

40

【0016】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸配列を含む変異型 SMO タンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型 SMO アミノ酸配列の 535 位に対応するアミノ酸位置にトリプトファン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号 4 に対して少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を含む単離変異型 SMO タンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、アミノ酸 535 にトリプトファン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、該アミノ酸配列はアミノ酸 535 にロイシン (L) を含む。

【0017】

50

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸配列を含む変異型 SMO タンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型 SMO アミノ酸配列の 408 位に対応するアミノ酸位置にイソロイシン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号 7 に対して少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を含む単離変異型 SMO タンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、アミノ酸 408 にイソロイシン (I) 以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、該アミノ酸配列は、アミノ酸 408 にイソロイシン (I) 以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、該アミノ酸配列はアミノ酸 408 にバリン (V) を含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、本発明は、ここに開示された変異型 SMO タンパク質のいずれかに特異的に結合する単離抗体を提供し、該抗体は、野生型 SMO タンパク質には結合しない。

【0019】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸 281 にトリプトファン以外のアミノ酸を含む変異型 SMO タンパク質に特異的に結合する単離抗体を提供し、該抗体は、アミノ酸 281 にトリプトファンを有する野生型 SMO には結合しない。いくつかの実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体又はそれらの抗原結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体は、細胞傷害剤に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、検出可能な標識に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、SMO 活性を阻害する。

【0020】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸 459 にアラニン以外のアミノ酸を含む変異型 SMO タンパク質に特異的に結合する単離抗体を提供し、該抗体は、アミノ酸 459 にトリプトファンを有する野生型 SMO には結合しない。いくつかの実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体又はそれらの抗原結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体は細胞傷害剤に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は検出可能な標識に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は SMO 活性を阻害する。

【0021】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸 535 にトリプトファン以外のアミノ酸を含む変異型 SMO タンパク質に特異的に結合する単離抗体を提供し、該抗体は、アミノ酸 535 にトリプトファンを有する野生型 SMO には結合しない。いくつかの実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体又はそれらの抗原結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体は細胞傷害剤に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は検出可能な標識に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は SMO 活性を阻害する。

【0022】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸 408 にイソロイシン以外のアミノ酸を含む変異型 SMO タンパク質に特異的に結合する単離抗体を提供し、該抗体は、アミノ酸 408 にイソロイシンを有する野生型 SMO には結合しない。いくつかの実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体又はそれらの抗原結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体は細胞傷害剤に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は検出可能な標識に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は SMO 活性を阻害する。

【0023】

いくつかの実施形態では、本発明は、サンプル中の変異型 SMO 遺伝子を検出する方法であって、変異を含む疑いのある SMO 又はそのフラグメントの第 1 細胞外ループのカルボキシ末端に相当するサンプル核酸を増幅し、そして該増幅核酸の電気泳動移動度と対応する野生型 SMO 遺伝子又はそのフラグメントの電気泳動移動度とを比較することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、電気泳動移動度をポリアクリルアミドゲル上

10

20

30

40

50

で決定する。

【0024】

いくつかの実施形態では、本発明は、サンプル中の変異型 SMO 遺伝子を検出する方法であって、変異を含む疑いのある SMO 又はそのフラグメントの第 1 膜貫通ドメインのアミノ末端に相当する該サンプル核酸を増幅し、そして該増幅核酸の電気泳動移動度と対応する野生型 SMO 遺伝子又はそのフラグメントの電気泳動移動度とを比較することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、電気泳動移動度をポリアクリルアミドゲル上で決定する。

【0025】

いくつかの実施形態では、本発明は、サンプル中の変異型 SMO 遺伝子を検出する方法であって、変異を含む疑いのある SMO 又はそのフラグメントの第 2 膜貫通ドメインのカルボキシ末端に相当する該サンプル核酸を増幅し、そして該増幅核酸の電気泳動移動度と対応する野生型 SMO 遺伝子又はそのフラグメントの電気泳動移動度とを比較することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、電気泳動移動度をポリアクリルアミドゲル上で決定する。

【0026】

いくつかの実施形態では、本発明は、サンプル中の変異型 SMO 遺伝子を検出する方法であって、変異を含む疑いのある SMO 又はそのフラグメントの第 5 細胞外ループのアミノ末端に相当する該サンプル核酸を増幅し、そして該増幅核酸の電気泳動移動度と対応する野生型 SMO 遺伝子又はそのフラグメントの電気泳動移動度とを比較することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、電気泳動移動度をポリアクリルアミドゲル上で決定する。

【0027】

いくつかの実施形態では、本発明は、サンプル中の変異型 SMO 遺伝子を検出する方法であって、変異を含む疑いのある SMO 又はそのフラグメントの膜貫通ドメイン 6 のカルボキシ末端に相当する該サンプル核酸を増幅し、そして該増幅核酸の電気泳動移動度と対応する野生型 SMO 遺伝子又はそのフラグメントの電気泳動移動度とを比較することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、電気泳動移動度をポリアクリルアミドゲル上で決定する。

【0028】

いくつかの実施形態では、本発明は、サンプル中の変異型 SMO 遺伝子を検出する方法であって、変異を含む疑いのある SMO 又はそのフラグメントの膜貫通ドメイン 7 のカルボキシ末端に相当する該サンプル核酸を増幅し、そして該増幅核酸の電気泳動移動度と対応する野生型 SMO 遺伝子又はそのフラグメントの電気泳動移動度とを比較することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、電気泳動移動度をポリアクリルアミドゲル上で決定する。

【0029】

いくつかの実施形態では、本発明は、サンプル中における少なくとも 1 つの SMO 変異を同定する方法であって、該サンプルからの核酸と、アミノ酸 281 をコードする配列をトリプトファン以外のアミノ酸に変化させる変異を組み込む変異型 SMO タンパク質をコードする核酸又はそのフラグメントに特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブとを接触させ、そして該ハイブリダイゼーションを検出することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、該プローブは検出可能に標識されている。いくつかの実施形態では、該プローブはアンチセンスオリゴマーである。いくつかの実施形態では、該核酸サンプル中における該 SMO 遺伝子又はそのフラグメントを増幅させ、そしてプローブと接触させる。

【0030】

いくつかの実施形態では、本発明は、サンプル中における少なくとも 1 つの SMO 変異を同定する方法であって、該サンプルからの核酸と、アミノ酸 459 をコードする配列をアラニン以外のアミノ酸に変化させる変異を組み込む変異型 SMO タンパク質をコードす

10

20

30

40

50

る核酸又はそのフラグメントに特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブとを接触させ、そして該ハイブリダイゼーションを検出することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、該プローブは検出可能に標識されている。いくつかの実施形態では、該プローブはアンチセンスオリゴマーである。いくつかの実施形態では、該核酸サンプル中における該SMO遺伝子又はそのフラグメントを増幅させ、そしてプローブと接触させる。

【0031】

いくつかの実施形態では、本発明は、サンプル中における少なくとも1つのSMO変異を同定する方法であって、該サンプルからの核酸と、アミノ酸535をコードする配列をトリプトファン以外のアミノ酸に変化させる変異を組み込む変異型SMOタンパク質をコードする核酸又はそのフラグメントに特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブとを接触させ、そして該ハイブリダイゼーションを検出することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、該プローブは検出可能に標識されている。いくつかの実施形態では、該プローブはアンチセンスオリゴマーである。いくつかの実施形態では、該核酸サンプル中における該SMO遺伝子又はそのフラグメントを増幅させ、そしてプローブと接触させる。

10

【0032】

いくつかの実施形態では、本発明は、サンプル中における少なくとも1つのSMO変異を同定する方法であって、該サンプルからの核酸と、アミノ酸408をコードする配列をイソロイシン以外のアミノ酸に変化させる変異を組み込む変異型SMOタンパク質をコードする核酸又はそのフラグメントに特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブとを接触させ、そして該ハイブリダイゼーションを検出することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、該プローブは検出可能に標識されている。いくつかの実施形態では、該プローブはアンチセンスオリゴマーである。いくつかの実施形態では、該核酸サンプル中における該SMO遺伝子又はそのフラグメントを増幅させ、そしてプローブと接触させる。

20

【0033】

いくつかの実施形態では、本発明は、GDC-0449による治療に耐性である又は耐性になるヒト被験体において腫瘍を同定するための方法であって、該腫瘍のサンプル中における変異型SMO遺伝子又は変異型SMOタンパク質の存在を決定し、ここで、該変異型SMO遺伝子は、アミノ酸281に突然変異を含むSMOタンパク質をコードし、該SMOタンパク質はアミノ酸281に突然変異を含み、それによって、該変異型SMO遺伝子又は変異型SMOタンパク質の存在は、該腫瘍がGDC-0449による治療に耐性であることを示すことを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、この方法は、GDC-0449による治療に影響を受けない又はもはや影響を受けやすすくない腫瘍を有する被験体を該変異型SMOに結合する化合物で治療することを含む。いくつかの実施形態では、変異の有無を、核酸サンプルを調査することによって決定する。いくつかの実施形態では、該変異の有無を、タンパク質サンプルを検査することによって決定する。

30

【0034】

いくつかの実施形態では、本発明は、GDC-0449による治療に耐性である又は耐性になるヒト被験体において腫瘍を同定するための方法であって、該腫瘍のサンプル中における変異型SMO遺伝子又は変異型SMOタンパク質の存在を決定し、ここで、該変異型SMO遺伝子は、アミノ酸459に突然変異を含むSMOタンパク質をコードし、該SMOタンパク質はアミノ酸459に突然変異を含み、それによって、該変異型SMO遺伝子又は変異型SMOタンパク質の存在は、該腫瘍がGDC-0449による治療に耐性であることを示すことを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、この方法は、GDC-0449による治療に影響を受けない又はもはや影響を受けやすすくない腫瘍を有する被験体を該変異型SMOに結合する化合物で治療することを含む。いくつかの実施形態では、変異の有無を、核酸サンプルを調査することによって決定する。いくつかの実施形態では、該変異の有無を、タンパク質サンプルを検査することによって決定する。

40

50

【0035】

いくつかの実施形態では、本発明は、GDC-0449による治療に耐性である又は耐性になるヒト被験体において腫瘍を同定するための方法であって、該腫瘍のサンプル中における変異型SMO遺伝子又は変異型SMOタンパク質の存在を決定し、ここで、該変異型SMO遺伝子は、アミノ酸535に突然変異を含むSMOタンパク質をコードし、該SMOタンパク質はアミノ酸535に突然変異を含み、それによって、該変異型SMO遺伝子又は変異型SMOタンパク質の存在は、該腫瘍がGDC-0449による治療に耐性であることを示すことを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、この方法は、該変異型SMOを結合する化合物によるGDC-0449を用いた治療に感受性でない又はもはや感受性ではない腫瘍を有する対象を治療することを含む。いくつかの実施形態では、変異の有無を、核酸サンプルを調査することによって決定する。いくつかの実施形態では、該変異の有無を、タンパク質サンプルを検査することによって決定する。

10

【0036】

いくつかの実施形態では、本発明は、GDC-0449による治療に耐性である又は耐性になるヒト被験体において腫瘍を同定するための方法であって、該腫瘍のサンプル中における変異型SMO遺伝子又は変異型SMOタンパク質の存在を決定し、ここで、該変異型SMO遺伝子は、アミノ酸408に突然変異を含むSMOタンパク質をコードし、該SMOタンパク質はアミノ酸408に突然変異を含み、それによって、該変異型SMO遺伝子又は変異型SMOタンパク質の存在は、該腫瘍がGDC-0449による治療に耐性であることを示すことを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、この方法は、GDC-0449による治療に影響を受けない又はもはや影響を受けやすすくない腫瘍を有する被験体を該変異型SMOに結合する化合物で治療することを含む。いくつかの実施形態では、変異の有無を、核酸サンプルを調査することによって決定する。いくつかの実施形態では、該変異の有無を、タンパク質サンプルを検査することによって決定する。

20

【0037】

いくつかの実施形態では、本発明は、GDC-0449による治療に耐性である又は耐性になるヒト被験体において腫瘍を同定するための方法であって、該腫瘍のサンプル中における変異型SMO遺伝子又は変異型SMOタンパク質の存在を決定し、ここで、該変異型SMO遺伝子は、アミノ酸533に突然変異を含むSMOタンパク質をコードし、該SMOタンパク質はアミノ酸533に突然変異を含み、それによって、該変異型SMO遺伝子又は変異型SMOタンパク質の存在は、該腫瘍がGDC-0449による治療に耐性であることを示すことを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、この方法は、GDC-0449による治療に影響を受けない又はもはや影響を受けやすすくない腫瘍を有する被験体を該変異型SMOに結合する化合物で治療することを含む。いくつかの実施形態では、変異の有無を、核酸サンプルを調査することによって決定する。いくつかの実施形態では、該変異の有無を、タンパク質サンプルを検査することによって決定する。

30

【0038】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸281に変異を組み込む変異体SMOタンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、該変異体SMOと試験化合物とを接触させ、そして該化合物の該変異体SMOへの結合を検出し、それによって、該試験化合物の該変異型SMOへの結合は、該試験化合物が変異体SMOの阻害剤であることを示すことを含む方法を提供する。

40

【0039】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸281に変異を組み込む変異体SMOタンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、該変異体SMOを発現する細胞と試験化合物とを接触させ、そして該細胞におけるGliの活性を検出し、それによって、Gli活性の存在は、該試験化合物が変異体SMOの阻害剤であることを示すことを含む方法を提供する。

【0040】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸459に変異を組み込む変異体SMOタ

50

ンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、該変異体 SMO と試験化合物とを接触させ、そして該化合物の該変異体 SMO への結合を検出し、それによって、該試験化合物の該変異型 SMO への結合は、該試験化合物が変異体 SMO の阻害剤であることを示すことを含む方法を提供する。

【0041】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸 459 に変異を組み込む変異体 SMO タンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、該変異体 SMO を発現する細胞と試験化合物とを接触させ、そして該細胞における Gli の活性を検出し、それによって、Gli 活性の存在は、該試験化合物が変異体 SMO の阻害剤であることを示すことを含む方法を提供する。

10

【0042】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸 535 に変異を組み込む変異体 SMO タンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、該変異体 SMO と試験化合物とを接触させ、そして該化合物の該変異体 SMO への結合を検出し、それによって、該試験化合物の該変異型 SMO への結合は、該試験化合物が変異体 SMO の阻害剤であることを示すことを含む方法を提供する。

【0043】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸 535 に変異を組み込む変異体 SMO タンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、該変異体 SMO を発現する細胞と試験化合物とを接触させ、そして該細胞における Gli の活性を検出し、それによって、Gli 活性の存在は、該試験化合物が変異体 SMO の阻害剤であることを示すことを含む方法を提供する。

20

【0044】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸 408 に変異を組み込む変異体 SMO タンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、該変異体 SMO と試験化合物とを接触させ、そして該化合物の該変異体 SMO への結合を検出し、それによって、該試験化合物の該変異型 SMO への結合は、該試験化合物が変異体 SMO の阻害剤であることを示すことを含む方法を提供する。

【0045】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸 408 に変異を組み込む変異体 SMO タンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、該変異体 SMO を発現する細胞と試験化合物とを接触させ、そして該細胞における Gli の活性を検出し、それによって、Gli 活性の存在は、該試験化合物が変異体 SMO の阻害剤であることを示すことを含む方法を提供する。

30

【0046】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸 533 に変異を組み込む変異体 SMO タンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、該変異体 SMO と試験化合物とを接触させ、そして該化合物の該変異体 SMO への結合を検出し、それによって、該試験化合物の該変異型 SMO への結合は、該試験化合物が変異体 SMO の阻害剤であることを示すことを含む方法を提供する。

40

【0047】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸 533 に変異を組み込む変異体 SMO タンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、該変異体 SMO を発現する細胞と試験化合物とを接触させ、そして該細胞における Gli の活性を検出し、それによって、Gli 活性の存在は、該試験化合物が変異体 SMO の阻害剤であることを示すことを含む方法を提供する。

【0048】

本発明は、変異型 SMO タンパク質をコードする単離核酸分子を提供する。一態様では、該核酸分子は、配列番号 2 に対して少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列をコードし、該アミノ酸配列は、配列番号 2 の位置 281 に、トリプトファン (W) 以外の任意の

50

アミノ酸であるアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、配列番号2の位置281のアミノ酸はシステイン（C）である。本発明の一態様では、単離核酸配列は、配列番号5（野生型SMO）の親核酸配列を含むが、ただし、位置841、842及び／又は843に、コードアミノ酸をトリプトファン（W）から異なるアミノ酸に変化させる1以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、変異は、トリプトファン（W）からシステイン（C）に変化させる。

【0049】

いくつかの実施形態では、該核酸分子は、配列番号3に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をコードし、該アミノ酸配列は、配列番号3の位置459に、アラニン（A）以外の任意のアミノ酸であるアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、配列番号3の位置459のアミノ酸はバリン（V）である。本発明の一態様では、単離核酸配列は、配列番号5（野生型SMO）の親核酸配列を含むが、ただし、位置1375、1376及び／又は1377に、コードアミノ酸をアラニン（A）から異なるアミノ酸に変化させる1以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、変異は、アラニン（A）からバリン（V）に変化させる。

【0050】

いくつかの実施形態では、該核酸分子は、配列番号4に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列をコードし、該アミノ酸配列は、配列番号4の位置535に、トリプトファン（W）以外の任意のアミノ酸であるアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、配列番号4の位置535のアミノ酸はロイシン（L）である。本発明の一態様では、単離核酸配列は、配列番号5（野生型SMO）の親核酸配列を含むが、ただし、位置1603、1604及び／又は1605に、コードアミノ酸をトリプトファン（W）から異なるアミノ酸に変化させる1以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、変異は、トリプトファン（W）からロイシン（L）に変化させる。

【0051】

別の態様では、本発明は、SMOのアミノ酸281に変異を組み込む変異型SMOタンパク質又はそのフラグメントをコードする核酸に特異的にハイブリダイズすることのできる核酸プローブを提供する。一実施形態では、該プローブは、変異型SMO又はそのフラグメントをコードする核酸に相補的である。該プローブは約10～約50ヌクレオチド長を有することができる。いくつかの実施形態では、該プローブは検出可能に標識できる。該プローブは、変異型Sm oを野生型Sm o（281位にトリプトファンを有する）に対して差次的に結合させる。

【0052】

別の態様では、本発明は、SMOのアミノ酸459に変異を組み込む変異型SMOタンパク質又はそのフラグメントをコードする核酸に特異的にハイブリダイズすることのできる核酸プローブを提供する。一実施形態では、該プローブは、変異型SMO又はそのフラグメントをコードする核酸に相補的である。該プローブは約10～約50ヌクレオチド長を有することができる。いくつかの実施形態では、該プローブは検出可能に標識できる。該プローブは、変異型Sm oを野生型Sm o（459位にトリプトファンを有する）に対して差次的に結合させる。

【0053】

別の態様では、本発明は、SMOのアミノ酸535に変異を組み込む変異型SMOタンパク質又はそのフラグメントをコードする核酸に特異的にハイブリダイズすることのできる核酸プローブを提供する。一実施形態では、該プローブは、変異型SMO又はそのフラグメントをコードする核酸に相補的である。該プローブは約10～約50ヌクレオチド長を有することができる。いくつかの実施形態では、該プローブは検出可能に標識できる。該プローブは、変異型Sm oを野生型Sm o（535位にトリプトファンを有する）に対して差次的に結合させる。

【0054】

いくつかの実施形態では、本発明は、変異型SMO核酸又はそのフラグメントを提供す

10

20

30

40

50

る。本発明の核酸は、単離変異型 SMOコード配列を含む。いくつかの実施形態では、該核酸は、配列番号 5 の核酸配列に対して少なくとも 80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % 同一である配列を含み、かつ、該核酸が配列番号 1 のヌクレオチド位置 281 に相当するヌクレオチド位置にトリプトファン (W) 以外のアミノ酸を含む SMOポリペプチドをコードするように少なくとも 1 つの変異を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 1 の 281 位に相当するアミノ酸位置にシステイン (C) をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 5 の位置 841、842 及び／又は 843 に相当するヌクレオチド位置に親野生型 SMOからの少なくとも 1 個の変異を有する。いくつかの実施形態では、パーセント同一性は、配列番号と 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % であるが、ただし、配列番号 5 の 841、842 及び／又は 843 位に相当するヌクレオチド位置には少なくとも 1 個の変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 5 の核酸配列に対して少なくとも 80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % 同一の配列を含み、かつ、核酸が配列番号 1 の 408 位に相当するアミノ酸位置にイソロイシン (I) 以外のアミノ酸を含む SMOポリペプチドをコードするように少なくとも 1 個の突然変異を含有する配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 1 の 408 位に相当するアミノ酸位置にバリン (V) をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 5 の位置 1222、1223 及び／又は 1224 に相当するヌクレオチド位置に親野生型 SMOからの少なくとも 1 個の変異を有する。いくつかの実施形態では、パーセント同一性は、配列番号 5 と 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % であるが、ただし、配列番号 5 の 1222、1223 及び／又は 1224 位に相当するヌクレオチド位置には少なくとも 1 個の変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 5 の核酸配列に対して少なくとも 80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % 同一の配列を含み、かつ、核酸が配列番号 1 の 459 位に相当するアミノ酸位置にアラニン (A) 以外のアミノ酸を含む SMOポリペプチドをコードするように少なくとも 1 個の突然変異を含有する配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 1 の 459 位に相当するアミノ酸位置にバリン (V) をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 5 の位置 1375、1376 及び／又は 1377 に相当するヌクレオチド位置に親野生型 SMOからの少なくとも 1 個の変異を有する。いくつかの実施形態では、パーセント同一性は、配列番号 5 と 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % であるが、ただし、配列番号 5 の 1375、1376 及び／又は 1377 位に相当するヌクレオチド位置には少なくとも 1 個の変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 5 の核酸配列に対して少なくとも 80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % 同一の配列を含み、かつ、核酸が配列番号 1 の 533 位に相当するアミノ酸位置にセリン (S) 以外のアミノ酸を含む SMOポリペプチドをコードするように少なくとも 1 個の突然変異を含有する配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 1 の 533 位に相当するアミノ酸位置にアスパラギン (N) をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 5 の位置 1597、1598 及び／又は 1599 に相当するヌクレオチド位置に親野生型 SMOからの少なくとも 1 個の変異を有する。いくつかの実施形態では、パーセント同一性は、配列番号 5 と 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % であるが、ただし、配列番号 5 の 1597、1598 及び／又は 1599 位に相当するヌクレオチド位置には少なくとも 1 個の変異が存

10

20

30

40

50

在するものとする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の核酸配列に対して少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一の配列を含み、かつ、核酸が配列番号1の535位に相当するアミノ酸位置にトリプトファン(W)以外のアミノ酸を含むSMOポリペプチドをコードするように少なくとも1個の突然変異を含有する配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号1の535位に相当するヌクレオチド位置にロイシン(L)をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の位置1603、1604及び／又は1605に相当するヌクレオチド位置に親野生型SMOからの少なくとも1個の変異を有する。いくつかの実施形態では、パーセント同一性は、配列番号5と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%であるが、ただし、配列番号5の1603、1604及び／又は1605ヌクレオチド位に相当するヌクレオチド位置には少なくとも1個の変異が存在するものとする。

10

【0055】

また、本発明は、少なくとも20ヌクレオチド長であるフラグメントに上記変異の領域に及ぶような核酸のフラグメントを包含する。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドフラグメントは、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95又は100ヌクレオチド長である。これらのフラグメントは、全長変異型SMOコード核酸分子にまで上記変異の領域に及ぶ任意の長さとすることができる。

20

【0056】

いくつかの実施形態では、本発明は、変異型SMOタンパク質又はそれらのフラグメントを提供する。

【0057】

いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、アミノ酸位置281に置換が存在するものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該アミノ酸配列は、配列番号1の281位に相当するアミノ酸位置にトリプトファン(W)以外のアミノ酸を含むものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該SMOタンパク質は、配列番号1の281位に相当するアミノ酸位置にシステイン(C)を含むものとする。

30

【0058】

いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、アミノ酸位置408に変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該アミノ酸配列は、配列番号1の408位に相当するアミノ酸位置にイソロイシン(I)以外のアミノ酸を含むものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該SMOタンパク質は、配列番号1の408位に相当するアミノ酸位置にバリン(V)を含むものとする。

40

50

る。

【0059】

いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、アミノ酸位置459に変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該アミノ酸配列は、配列番号1の459位に相当するアミノ酸位置にアラニン（A）以外のアミノ酸を含むものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該SMOタンパク質は、配列番号1の459位に相当するアミノ酸位置にバリン（V）を含むものとする。

10

【0060】

いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、アミノ酸位置533に変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該アミノ酸配列は、配列番号1の533位に相当するアミノ酸位置にセリン（S）以外のアミノ酸を含むものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該SMOタンパク質は、配列番号1の533位に相当するアミノ酸位置にアスパラギン（N）を含むものとする。

20

【0061】

いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、アミノ酸位置535に変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該アミノ酸配列は、配列番号1の535位に相当するアミノ酸位置にトリプトファン（W）以外のアミノ酸を含むものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該SMOタンパク質は、配列番号1の535位に相当するアミノ酸位置にロイシン（L）を含むものとする。

30

40

【0062】

いくつかの実施形態では、変異型ヒトSMOは、アミノ酸281が「Xaa」（本願に関して、トリプトファン（W）以外の任意のアミノ酸を表す）として示される配列番号2に示される。いくつかの実施形態では、Xaaはシステイン（C）である。

【0063】

いくつかの実施形態では、変異型ヒトSMOは、アミノ酸408が「Xaa」（本願に関して、イソロイシン（I）以外の任意のアミノ酸を表す）として示される配列番号6に示される。いくつかの実施形態では、Xaaはバリン（V）である。

50

【0064】

いくつかの実施形態では、変異型ヒトSMOは、アミノ酸459が「Xaa」（本願に関して、アラニン（A）以外の任意のアミノ酸を表す）として示される配列番号3に示される。いくつかの実施形態では、Xaaはバリン（V）である。

【0065】

いくつかの実施形態では、変異型ヒトSMOは、アミノ酸533が「Xaa」（本願に関して、セリン（S）以外の任意のアミノ酸を表す）として示される配列番号7に示される。いくつかの実施形態では、Xaaはアスパラギン（N）である。

【0066】

いくつかの実施形態では、Xaaはバリン（V）である。いくつかの実施形態では、変異型ヒトSMOは、アミノ酸535が「Xaa」（本願に関して、トリプトファン（W）以外の任意のアミノ酸を表す）として示される配列番号4に示される。いくつかの実施形態では、Xaaはロイシン（L）である。

10

【0067】

また、本発明は、配列番号2に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む単離変異型SMOタンパク質であって、該アミノ酸配列が位置281にトリプトファン（W）以外のアミノ酸を含むものも提供する。いくつかの実施形態では、位置281でのアミノ酸はシステイン（C）である。

【0068】

また、本発明は、配列番号3に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む単離変異型SMOタンパク質であって、該アミノ酸配列が位置459にアラニン（A）以外のアミノ酸を含むものも提供する。いくつかの実施形態では、位置459でのアミノ酸はバリン（V）である。

20

【0069】

また、本発明は、配列番号4に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む単離変異型SMOタンパク質であって、該アミノ酸配列が位置535にトリプトファン（W）以外のアミノ酸を含むものも提供する。いくつかの実施形態では、位置535でのアミノ酸はロイシン（L）である。

【0070】

本発明は、本発明の変異型SMOタンパク質に特異的に結合する抗体であって、該抗体のエピトープが281位にトリプトファン以外のアミノ酸を有する変異型SMO上に存在するが、野生型SMOには結合しないものをさらに提供する。いくつかの態様では、該抗体は、変異型SMOに対して高い親和性で結合するが、野生型SMOには高い親和性では結合しない。いくつかの態様では、該抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂又はFvフラグメント）である。いくつかの実施形態では、抗体は、検出可能な標識に結合されている。他の実施形態では、抗体は細胞障害剤、例えば限定されないが、化学療法剤、毒素又は放射性同位体に結合している。いくつかの態様では、抗体はSMO活性を阻害する。他の実施形態では、抗体は変異型SMO活性のみを阻害する。

30

【0071】

本発明は、本発明の変異型SMOタンパク質に特異的に結合する抗体であって、該抗体のエピトープが408位にトリプトファン以外のアミノ酸を有する変異型SMO上に存在するが、野生型SMOには結合しないものをさらに提供する。いくつかの態様では、該抗体は、変異型SMOに対して高い親和性で結合するが、野生型SMOには高い親和性では結合しない。いくつかの態様では、該抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂又はFvフラグメント）である。いくつかの実施形態では、抗体は、検出可能な標識に結合されている。他の実施形態では、抗体は細胞障害剤、例えば限定されないが、化学療法剤、毒素又は放射性同位体に結合している。いくつかの態様では、抗体はSMO活性を阻害する。他の実施形態では、抗体は変異型SMO活性のみを阻害する。

40

50

【0072】

本発明は、本発明の変異型SMOタンパク質に特異的に結合する抗体であって、該抗体のエピトープが459位にアラニン以外のアミノ酸を有する変異型SMO上に存在するが、野生型SMOには結合しないものをさらに提供する。いくつかの態様では、該抗体は、変異型SMOに対して高い親和性で結合するが、野生型SMOには高い親和性では結合しない。いくつかの態様では、該抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂又はFvフラグメント）である。いくつかの実施形態では、抗体は、検出可能な標識に結合されている。他の実施形態では、抗体は細胞障害剤、例えば限定されないが、化学療法剤、毒素又は放射性同位体に結合している。いくつかの態様では、抗体はSMO活性を阻害する。他の実施形態では、抗体は変異型SMO活性のみを阻害する。

10

【0073】

本発明は、本発明の変異型SMOタンパク質に特異的に結合する抗体であって、該抗体のエピトープが533位にトリプトファン以外のアミノ酸を有する変異型SMO上に存在するが、野生型SMOには結合しないものをさらに提供する。いくつかの態様では、該抗体は、変異型SMOに対して高い親和性で結合するが、野生型SMOには高い親和性では結合しない。いくつかの態様では、該抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂又はFvフラグメント）である。いくつかの実施形態では、抗体は、検出可能な標識に結合されている。他の実施形態では、抗体は細胞障害剤、例えば限定されないが、化学療法剤、毒素又は放射性同位体に結合している。いくつかの態様では、抗体はSMO活性を阻害する。他の実施形態では、抗体は変異型SMO活性のみを阻害する。

20

【0074】

本発明は、本発明の変異型SMOタンパク質に特異的に結合する抗体であって、該抗体のエピトープが535位にトリプトファン以外のアミノ酸を有する変異型SMO上に存在するが、野生型SMOには結合しないものをさらに提供する。いくつかの態様では、該抗体は、変異型SMOに対して高い親和性で結合するが、野生型SMOには高い親和性では結合しない。いくつかの態様では、該抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂又はFvフラグメント）である。いくつかの実施形態では、抗体は、検出可能な標識に結合されている。他の実施形態では、抗体は細胞障害剤、例えば限定されないが、化学療法剤、毒素又は放射性同位体に結合している。いくつかの態様では、抗体はSMO活性を阻害する。他の実施形態では、抗体は変異型SMO活性のみを阻害する。

30

【0075】

また、本発明は、サンプル中における変異型SMO遺伝子を検出する方法であって、サンプルから変異を含む疑いのあるSMOの第1、第2、第5、第6又は第7膜貫通ドメイン、SMOのカルボキシ末端膜貫通ドメイン6、SMOのカルボキシ末端膜貫通ドメイン7又はそれらのフラグメントをコードする核酸を増幅し、及び該増幅核酸の電気泳動移動度と対応する野生型SMO遺伝子又はそのフラグメントの電気泳動移動度とを比較することを含む方法も提供する。いくつかの実施形態では、該電気泳動移動度は、ポリアクリルアミドゲル上で決定される。このような実施形態では、変異型SMOの電気泳動移動度は、野生型Sm oと区別できる。

40

【0076】

さらに、本発明は、サンプル中における少なくとも1つのSMO変異を同定する方法であって、該サンプルからの核酸と、変異を取り入れる変異型SMOタンパク質又はそのフラグメントをコードする核酸に特異的にハイブリダイズできる核酸プローブとを接触させ、及び該ハイブリダイゼーションを検出することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、この方法は、SMOの第1、第2、第5、第6又は第7膜貫通ドメインにおいて変異を検出する。いくつかの実施形態では、SMO変異は、Sm oにおいて841、842及び／又は843位で生じ（281位にアミノ酸をコードする）、ここで、該変異は

50

、トリプトファン以外のアミノ酸をコードするコドンをもたらし。いくつかの実施形態では、該方法は、SMOの膜貫通ドメイン6のカルボキシ末端部分における変異を検出する。いくつかの実施形態では、SMO変異は、Smoにおいて1375、1376及び／又は1377位（459位にアミノ酸をコードする）に生じ、ここで、該変異は、アラニン以外のアミノ酸をコードするコドンをもたらし。いくつかの実施形態では、該方法は、SMOの膜貫通ドメイン7のカルボキシ末端部分における変異を検出する。いくつかの実施形態では、SMO変異は、Smoにおいて1603、1604及び／又は1605位（535位にアミノ酸をコードする）に生じ、ここで、該変異はトリプトファン以外のアミノ酸をコードするコドンをもたらし。いくつかの実施形態では、プローブは検出可能に標識される。いくつかの実施形態では、プローブはアンチセンスオリゴマーである。いくつかの実施形態では、サンプル中におけるSMO遺伝子又はそのフラグメントの核酸を増幅させ、そしてプローブと接触させる。

10

【0077】

また、本発明は、GDC-0449などの化学療法剤による治療に耐性であるヒト被験体において腫瘍を同定するための方法であって、腫瘍サンプル中における変異型SMO遺伝子又は変異型SMOタンパク質の存在を決定することを含み、ここで、該変異は、膜表面でSMOの一部をコードするSMO遺伝子内に位置し（例えば、SMOの膜貫通ドメイン6のカルボキシ末端部分又はSMOの膜貫通ドメイン7のカルボキシ末端部分）、それによって、該変異型SMO遺伝子又は変異型SMOタンパク質の存在は、腫瘍が化学療法剤（例えばGDC-0449、これに限定されない）での治療に耐性であることを示す方法も提供する。いくつかの実施形態では、化学療法剤はGDC-0449である。他の実施形態では、化学療法剤はシクロパミンである。いくつかの実施形態では、変異はSMOのアミノ酸281をコードするSMO遺伝子の部分にある。いくつかの実施形態では、変異はトリプトファンから別のアミノ酸にSMOのアミノ酸281に変化を引き起こす。いくつかの実施形態では、他のアミノ酸はシステイン（C）である。いくつかの実施形態では、変異はSMOのアミノ酸459をコードするSMO遺伝子の部分にある。いくつかの実施形態では、変異は、アラニンから別のアミノ酸にSMOのアミノ酸459に変化を引き起こす。いくつかの実施形態では、他のアミノ酸はバリン（V）である。いくつかの実施形態では、変異は、SMOのアミノ酸535をコードするSMO遺伝子の部分にある。いくつかの実施形態では、変異は、トリプトファンから別のアミノ酸にSMOのアミノ酸535に変化を引き起こす。いくつかの実施形態では、他のアミノ酸はロイシン（L）である。

20

30

【0078】

また、本発明は、SMO阻害剤による治療に感受性であるヒト被験体において腫瘍を同定するための方法であって、（i）腫瘍サンプル中における野生型SMOタンパク質又は遺伝子の存在を決定し、それによって、野生型SMOタンパク質又は遺伝子の存在は、腫瘍がSMO阻害剤による治療に感受性であることを示し、又は（ii）腫瘍の試料で変異型SMOタンパク質又は遺伝子の存在を決定することを含み、ここで、該変異はSMOの281位でアミノ酸の変化をもたらし、それによって変異型SMOタンパク質又は遺伝子の存在は、腫瘍がGDC-0449などのSMO阻害剤による治療に感受性ではないことを示す方法も提供する。いくつかの実施形態では、SMO変異は、トリプトファン（W）281から他のアミノ酸への変化である。いくつかの実施形態では、アミノ酸はシステイン（C）である。

40

【0079】

また、本発明は、SMO阻害剤による治療に感受性であるヒト被験体において腫瘍を同定するための方法であって、（i）腫瘍サンプル中における野生型SMOタンパク質又は遺伝子の存在を決定し、それによって、野生型SMOタンパク質又は遺伝子の存在は、腫瘍がSMO阻害剤による治療に感受性であることを示し、又は（ii）腫瘍の試料で変異型SMOタンパク質又は遺伝子の存在を決定することを含み、ここで、該変異はSMOの459位でアミノ酸の変化をもたらし、それによって変異型SMOタンパク質又は遺伝子

50

の存在は、腫瘍がGDC-0449などのSMO阻害剤による治療に感受性ではないことを示す方法も提供する。いくつかの実施形態では、SMO変異は、アラニン（A）459から他のアミノ酸への変化である。いくつかの実施形態では、アミノ酸はバリン（V）である。

【0080】

また、本発明は、SMO阻害剤による治療に感受性であるヒト被験体において腫瘍を同定するための方法であって、（i）腫瘍サンプル中における野生型SMOタンパク質又は遺伝子の存在を決定し、それによって、野生型SMOタンパク質又は遺伝子の存在は、腫瘍がSMO阻害剤による治療に感受性であることを示し、又は（ii）腫瘍の試料で変異型SMOタンパク質又は遺伝子の存在を決定することを含み、ここで、該変異はSMOの535位でアミノ酸の変化をもたらし、それによって変異型SMOタンパク質又は遺伝子の存在は、腫瘍がGDC-0449などのSMO阻害剤による治療に感受性ではないことを示す方法も提供する。いくつかの実施形態では、SMO変異は、トリプトファン（W）535から他のアミノ酸への変化である。いくつかの実施形態では、アミノ酸はロイシン（L）である。

10

【0081】

また、本発明は、ヘッジホッグ依存性腫瘍の治療を受けている患者の予後を決定する方法であって、腫瘍のサンプル中において、アミノ酸281、アミノ酸459又はアミノ酸535での変異の有無を決定し、それによって、該変異の存在は、所定のSm o阻害剤を使用して該変異が存在しない場合と比較して予後不良を示す方法も提供する。

20

【0082】

さらに、本発明は、アミノ酸281、アミノ酸459又はアミノ酸535に変異を組み込む変異型SMOタンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、該変異型とSMO試験化合物とを接触させ、そして該化合物の該変異型SMOへの結合を検出することを含み、それによって、該試験化合物の該変異型SMOへの結合は、該試験化合物が該変異型SMOの阻害剤であることを示す方法を提供する。

【0083】

また、本発明は、アミノ酸459、アミノ酸281又はアミノ酸535に変異を組み込む変異型SMOタンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、変異型SMOを発現する細胞と試験化合物とを接触させ、そして該細胞内でのG1iの活性を検出することを含み、それによって、該G1i活性の存在は、該試験化合物が該変異型SMOの阻害剤ではないことを示す方法も提供する。いくつかの実施形態では、G1i活性は、検出可能な標識に結合されたGLIタンパク質を使用して測定される。いくつかの実施形態では、検出可能な標識は蛍光標識（例えば、ルシフェラーゼ）である。

30

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1A】図1A～1Gは、野生型ヒトSMO（1A）及びいくつかのヒト変異型SMO（1B～1I）についてのアミノ酸配列を示す。図1Aは、配列番号1を示す。

【図1B】図1A～1Gは、野生型ヒトSMO（1A）及びいくつかのヒト変異型SMO（1B～1I）についてのアミノ酸配列を示す。図1Bは、配列番号2を示す。

40

【図1C】図1A～1Gは、野生型ヒトSMO（1A）及びいくつかのヒト変異型SMO（1B～1I）についてのアミノ酸配列を示す。図1Cは、配列番号3を示す。

【図1D】図1A～1Gは、野生型ヒトSMO（1A）及びいくつかのヒト変異型SMO（1B～1I）についてのアミノ酸配列を示す。図1Dは、配列番号4を示す。

【図1E】図1A～1Gは、野生型ヒトSMO（1A）及びいくつかのヒト変異型SMO（1B～1I）についてのアミノ酸配列を示す。図1Eは、配列番号5を示す。

【図1F】図1A～1Gは、野生型ヒトSMO（1A）及びいくつかのヒト変異型SMO（1B～1I）についてのアミノ酸配列を示す。図1Fは、配列番号6を示す。

【図1G】図1A～1Gは、野生型ヒトSMO（1A）及びいくつかのヒト変異型SMO

50

(1 B-1 I) についてのアミノ酸配列を示す。図 1 G は、配列番号 7 を示す。

【図 2】図 2 は、ビスモデギブ耐性 B C C におけるヘッジホッグ経路のシグナル伝達のレベルを決定するために実施した実験の結果を示す。

【図 3】図 3 は、処置前及び処置後生検における S M O-A 4 5 9 V 変異の頻度を決定するために実施した実験の結果を示す。

【図 4】図 4 は、W 2 8 1 変異を有する S M O 変異体のビスモデギブ結合ポケットを示す。

【図 5 A】図 5 A は、S M O-A 4 5 9 V 変異体が P T C H に感受性かどうかを決定するために実施した実験の結果を示す。

【図 5 B】図 5 B は、S M O-A 4 5 9 V 変異体がビスモデギブに対して感受性であるかどうかを決定するために実施した実験の結果を示す。

【図 5 C】図 5 C は、S M O-A 4 5 9 V、S M O-W 2 8 1 C、及び S M O-W 5 3 5 L 変異体の変異を活性化しているかどうかを決定するために実施した実験の結果を示す。

【図 5 D】図 5 D は、S M O-W 2 8 1 C 変異体が P T C H 感受性であるかどうかを決定するために実施した実験の結果を示す。

【図 5 E】図 5 E は、S M O-W 2 8 1 C 変異体がビスモデギブに対して感受性であるかどうかを決定するために実施した実験の結果を示す。

【図 5 F】図 5 F は、S M O-A 4 5 9 V 及び S M O-W 2 8 1 C がビスモデギブへの結合を損なったかどうかを決定するために実施した実験の結果を示す。

【図 6 A-C】図 6 A は H h 経路の概略図を示す。図 6 B は、肺に転移した患者 1 2 (P T 1 2) からの散発性 B C C の初期応答及び疾患の進行を示すスキャン写真を示す。赤の矢印は、治療前 (P r e R x) 並びにビスモデギブ治療の 4 ヶ月後 (病変サイズの減少を示す) 及び 3 7 ヶ月後 (病気の進行を示す) における胸のコンピュータ断層撮影 (C T スキャン) における標的病変を示す。図 6 C は、最初にビスモデギブに応答したが、その後再発した (黒矢印)、治療の指示期間後におけるゴーリン症候群の患者 (P T 1 0) からの 2 つの局所的に進行した B C C の写真を示す。

【図 6 D-F】図 6 D は、ビスモデギブ治療の前及び 1 1 ヶ月後における患者 9 . 1 (P T 0 9 . 1) からの局所的に進行した散発性 B C C のヘマトキシリン及びエオシン (H & E) 染色切片を示す。再発病変は、未治療の腫瘍の組織学的性質を維持していることに注意されたい。スケールバーは 5 0 μ m を表す。図 6 E は、ビスモデギブ耐性及び正常皮膚生検における G L I 1 及び M K I 6 7 発現レベルを示すグラフである。ピアソンの相関係数 (R) = 0 . 9 6 。正規化された読取り回数が示されている。図 6 F は、1 2 名の再発 B C C 患者で同定された H h 経路遺伝子及び T P 5 3 における遺伝的変化の表形式の概要である。生殖細胞系列 P T C H 1 変異体がゴーリン B C C について報告されている一方で、体細胞変異が散発性 B C C について示されている。2 つの領域的に異なる生検を P T 0 6、P T 0 8 及び P T 0 9 について同じ初期腫瘍の再増殖時に得た。2 つの別々の B C C は患者 P T 1 0 において耐性を生じた。L O H を、S N P アレイからのマイナー対立遺伝子頻度によって決定した。緑のボックスは、L O H 事象、その後の変異対立遺伝子のコピー数増加を強調するものである。対立遺伝子特異的発現を R N A s e q により決定した。

【図 7】図 7 は、治療未経験散発性 B C C で特定され S M O 変異体を示す表である。S M O-A 2 3 9 V は、以前には報告されていない (C O S M I C / d b S N P) のに対し、他の全てのものは、以前に発癌性変異について報告されている。注：標的バリエーションは S M O-A 2 3 9 V を同定したが、異なる読取カットオフ及び感度の低下のため、体細胞バリエーションコール V a r i a n t T o o l s は同定しなかった。

【図 8 A】図 8 A は、この研究で同定された S M O 突然変異の表形式の概要を示す。全ての変異は本質的に体細胞であった。これらは、同じ患者からの血液又は他の組織のいずれかで検出されなかったからである。

【図 8 B】図 8 B は、S M O T M 領域 (灰色のヘリックス; W a n g 外, 2 0 1 3) の結晶構造にドッキングされたビスモデギブ (黄色) の計算モデルを示す。これまでに特徴づけられていない変異体残留物を緑色で強調している。

【図8C-D】図8Cは、治療前及び治療後の生検におけるSMO変異の有病率を示す棒グラフである。棒グラフは、ピロシーケンスによって決定される、PT03、PT04及びPT12（8C）についてのSMO-A459Vに相当する位置での野生型（青）又は変異型（赤）ヌクレオチドの取り込み頻度を示す。SMO変異はヘテロ接合性であることが予期され、SMOのコピー数は、最大Y軸値を決めることに留意されたい。このコピー数は、PT03、PT04、PT12、PT10及びPT11については50%であり（SMOコピー数は2である）、PT09については25%である（SMOコピー数は4である）。変異型ヌクレオチドの取り込みは、全ての治療前サンプルにおけるピロシーケンスアッセイのバックグラウンドレベル（<5%）の範囲内にあるとみなされた。四重アッセイからのデータを血液コントロールに対してプロットする。エラーバーは、データの範囲を表す。図8Dは、治療前及び治療後の生検におけるSMO変異の有病率を示す棒グラフである。棒グラフは、ピロシーケンスによって決定される、PT09（8D）についてのSMO-V321Mに相当する位置での野生型（青）又は変異型（赤）ヌクレオチドの取り込み頻度を示す。SMO変異はヘテロ接合性であることが予期され、SMOのコピー数は、最大Y軸値を決めることに留意されたい。このコピー数は、PT03、PT04、PT12、PT10及びPT11のために50%であり（SMOコピー数は2である）、PT09については25%である（SMOコピー数は4である）。変異型ヌクレオチドの取り込みは、全ての治療前サンプルにおけるピロシーケンスアッセイのバックグラウンドレベル（<5%）の範囲内にあるとみなされた。四重アッセイからのデータを血液コントロールに対してプロットする。エラーバーは、データの範囲を表す。

【図8E-F】図8Eは、治療前及び治療後の生検におけるSMO変異の有病率を示す棒グラフである。棒グラフは、ピロシーケンスによって決定される、PT11（8E）についてのSMO-L412Fに相当する位置での野生型（青）又は変異型（赤）ヌクレオチドの取り込み頻度を示す。SMO変異はヘテロ接合性であることが予期され、SMOのコピー数は、最大Y軸値を決めることに留意されたい。このコピー数は、PT03、PT04、PT12、PT10及びPT11のために50%であり（SMOコピー数は2である）、PT09については25%である（SMOコピー数は4である）。変異型ヌクレオチドの取り込みは、全ての治療前サンプルにおけるピロシーケンスアッセイのバックグラウンドレベル（<5%）の範囲内にあるとみなされた。四重アッセイからのデータを血液コントロールに対してプロットする。エラーバーは、データの範囲を表す。図8Fは、初期にビスモデギブに対して応答したが、その後示された期間後に再発したPT11からの局所的に進行したBCC（白矢印）の写真を示す。

【図9】図9は、SMOのタンパク質ドメイン内における治療未経験BCC（薄い灰色-S278I）、耐性BCC（黒）又は両方（薄い灰色-L412F、W535L）で同定された変異の位置を示す概略図である。アスタリスクは、以前に報告された発癌性変異を強調するものである。TMヘリックスは、円筒によって表される。

【図10A-C】図10Aは、SMO（灰色）に結合する結合ビスモデギブ（黄色）のトップダウン図を示し、かつ、薬剤結合ポケットにW281、V321及びI408（全て緑色）が近いこと明らかにする計算ドッキングモデルを示す。図10Bの左は、ビスモデギブ（黄色）を基準にしたV321及びW281（両方とも緑色）の位置を示す。図10Bの中央は、PT02からのC281変異体がおそらくビスモデギブとの相互作用を破壊することを示す。図10Bの右は、PT09からのM321変異体がW281の立体構造に影響を与えることが予期されることを示す。図10Cは、I408（左）からバリン（右）への変異がH470及びV404（これらは両方はビスモデギブと相互作用する）のパッキングに影響を与えることが予測されることを示す。この変異は、全体のタンパク質骨格構造のさらに大きな変化を引き起こし、ひいては第2シェル効果により薬剤結合中に影響を及ぼす場合がある。全てのパネルにおいて、変異残留物を赤字で強調している。

【図11A-B】図11Aは、示されたSMO構築物をトランスフェクトしたC3H10T1/2細胞におけるG1iルシフェラーゼレポーター活性を示すグラフである。値はSMO-WTの活性に対して正規化されたものであり、プロットしたデータは、3回の平均

値±SDである。図11Bは、示されたPTCH1対SMO発現構築物比でトランスフェクトされたC3H10T1/2細胞におけるGliルシフェラーゼレポーター活性を示すグラフである。値はPTCH1共トランスフェクションなしの活性に対して正規化されたものであり、プロットしたデータは、3回の平均値±SDである。

【図11C-D】図11Cは、HEK-293細胞内におけるSMO薬剤結合ポケット変異体の細胞表面発現を示す表である。示された値は、10000個の細胞の事象について及び空ベクタートランスフェクト細胞及びヨウ化プロピジウム（PI）でゲートしてFACSによって決定されるときにSMOの細胞表面発現を有する生存細胞のパーセンテージである。図11Dは、SHHと共に又はSHHなしで培養された非形質導入（ウイルスなし）、コントロールウイルス（tRFPのみ）又はCreウイルス（tRFP-IRES-eGFPcre）感染患者の小脳顆粒ニューロン前駆細胞のメチルー[3H]-チミジン取り込みからの結果を示すグラフである。メチルー[3H]-チミジン取り込みを、1分当たりのカウントで表し（CPM）、そしてプロットされたデータは3回の平均値±SDである。

【図11E-F】図11Eは、10000万個の細胞事象について及び非形質細胞でゲートしてFACSにより決定される、示されたウイルス構築物による感染後にtdTomatoの発現について陽性であるPtch1loxP/loxP Tp53loxP/loxP Rosa26LSL-tdTomato（PPT）小脳顆粒ニューロン前駆細胞（CGNP）のパーセンテージを示す棒グラフである。図11Fは、定量的RT-PCRによってパネルEからのPPT CGNPにおけるヒトSMO mRNAレベルの定量化を示す棒グラフである。データは、マウスハウスキーピング遺伝子RPL19に対する ΔC_t 値であり、3回の平均±SDとしてプロットされる。

【図12A-B】図12Aは、ビスモデギブによる用量応答後における、SMO構築物がトランスフェクトされたC3H10T1/2細胞における正規化Gliルシフェラーゼレポーター活性を示すグラフである。値は、未処理の活性に対して正規化され、プロットしたデータは、3回の平均値±標準偏差（SD）である。IC50値は、非線形回帰フィッティング後に算出された。図12Bは、示されたMO構築物がトランスフェクトされたHEK-293細胞へのビスモデギブ- $[^3H]$ の結合を示す棒グラフである。EVは、空のベクターを意味し、薬剤結合を1分当たりカウント測定した（cpm）。特異的結合を、全結合から非特異的結合を減算することにより、過剰量での非標識ビスモデギブとの拮抗後に算出した。示したデータは、平均値±SDである。

【図12C】図12Cは、一次CGNPのウイルス形質導入スキームを示す図である。SHHの不在下では形質導入CGNPのみが増殖し、これにより、SMO変異体がビスモデギブの存在下での増殖を促進する能力を具体的に試験することが可能となる。

【図12D】図12Dは、SHHリガンド除去後のビスモデギブによる用量応答の後における、示されたウイルスがトランスフェクトされたPPT CGNPの正規化メチルー[3H]-チミジンの取り込みを示す一連のグラフである。各グラフは、同じコントロールデータを示す。プロットされたデータは、3回の平均値±SDである。

【図13A-C】図13Aは、21残基（濃い灰色の球形）の合計がSMO TM構造（灰色ヘリックス）に結合したビスモデギブ（薄い灰色の球形）の4.5 Å内に原子を有することが予測されることを示すモデルである。図13Bは、N219、D384及びS387が水素結合ネットワーク（破線）を形成することを示すモデルである。これらの残基のいずれかの変異は、ビスモデギブ結合ポケットの形状を変化させる可能性がある。図13Cは、示されたSMO構築物がトランスフェクトされかつ1 μMのビスモデギブで処理されたC3H10T1/2細胞におけるGliルシフェラーゼレポーター活性を示す。値は、各構築物について未処理の活動レベルに正規化されたものであり、プロットされたデータは3回の平均±SDである。

【図14A-B】図14Aは、SMO TM領域（灰色のらせん、Wang外、2013）の結晶構造にドッキングされたビスモデギブ（薄い灰色の球形）の計算モデルを示す。薬剤結合ポケットに対して遠位の変異体残基は濃い灰色で強調されている。図14Bは、

10

20

30

40

50

示されたSMO構築物がトランスフェクトされたC3H10T1/2細胞におけるG1iルシフェラーゼレポーター活性の結果を示す棒グラフである。値はSMO-WTの活性レベルに対して正規化されたものであり、プロットされたデータは3回の平均値±SDである。

【図15A-B】図15Aは、ビスモデギブによる用量応答後における、示されたSMO構築物をトランスフェクトしたC3H10T1/2細胞における正規化G1iルシフェラーゼレポーター活性を示すグラフである。プロットされたデータは、3回の平均値±SDである。図15Bは、示されたSMO構築物をトランスフェクトしたHEK-293細胞への³H-ビスモデギブの結合を示す棒グラフである。非トランスフェクト細胞（UN）及び空ベクター（EV）がトランスフェクトされた細胞をコントロールとして含めた。薬剤結合を1分当たりのカウント（cpm）で測定し、そして特異的結合を、総結合から非特異的結合を引くことにより、過剰の非標識ビスモデギブの競合後に算出した。

10

【図15C】図15Cは、HEK-293細胞における活性化SMO変異体の細胞表面発現を示す表である。示される値は、10000個の細胞事象についてのFACS及び空ベクタートランスフェクト細胞及びPIでのゲート化によって決定されるときにSMOの細胞表面発現を有する生存細胞のパーセンテージである。

【図15D】図15Dは、SHHリガンドを除去した後のビスモデギブによる用量応答後における、示されたウイルスがトランスフェクトされたPPT CGNPの正規化メチルー³H-チミジン取り込みを示すグラフである。プロットされたデータは、3回の平均値±SDである。2回の独立した実験を示す。

20

【図16A】図16Aは、様々なSMO変異体がトランスフェクトされかつ示された化合物500nMで処理されたPPT CGNPの正規化メチルー³H-チミジン取り込みを示す。評価した各野生型（WT）又はSMO変異体のデータのセットについて、次の処理条件のそれぞれのデータを左から右に次の順序でバーとして示す：ビスモデギブ、LY2940680、LDE225及び化合物5。値を、薬剤なしの増殖レベルに正規化し、プロットされたデータは、3回の平均値±SDである。薬剤の存在下でのSMO-WTの残留増殖は、これらの一次CGNP培養の線維芽細胞及びグリア汚染によるものであることに留意されたい。

【図16B】図16Bは、図16Aと同じデータを示すが、ただし、導入CGNPをビスモデギブ又はJQ1のいずれかの1μMで処理した。JQ1を有するSMO-WTでは、残留増殖が少ないが、これは、この化合物もHh非依存性細胞増殖を阻害することを示唆することに留意されたい。

30

【発明を実施するための形態】

【0085】

詳細な説明

ヘッジホッグ依存性腫瘍のための化学療法に対する耐性に関連する変異事象が、シクロパミン及びGDC-0449などのヘッジホッグシグナル伝達を阻害する化合物による治療に対する腫瘍の耐性を与える平滑化（SMO）で生じることが本発明の発見である。本発明は、ヘッジホッグシグナル伝達に依存する癌についての予後、診断及び治療薬として有用な組成物及び方法を提供する。

40

【0086】

ここで説明する又は参照する技術及び手順は、一般的によく理解されており、かつ、当業者により従来の方法、例えば次に記載された広く利用されている方法を用いて一般的に使用される：Sambrook外、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版（2001）Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. ; Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, 外著, (2003)) ; the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.) : PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson

50

, B. D. Hames 及び G. R. Taylor 著 (1995)), Harlow 及び Lane 著, (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture* (R. I. Freshney 著, (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait 著, 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis 著, 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney) 著, 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather 及び P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths 及び D. G. Newell 著, 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir 及び C. C. Blackwell 著.) ; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller 及び M. P. Calos 著, 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis 外著, 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan 外著, 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway 及び P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty. 著, IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd 及び C. Dean 著, Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow 及び D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra 著, Harwood Academic Publishers, 1995); 並びに *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V. T. DeVita 外著, J. B. Lippincott Company, 1993)。引用した参考文献は、その全体が参考として援用される。

【0087】

本明細書を解釈する目的のために、次の定義が適用され、適宜、単数形で使用される用語は複数形を含み、その逆も同様である。以下に示す任意の定義が参照により援用される任意の刊行物と矛盾する場合には、以下に示す定義が優先するものとする。

【0088】

本発明をさらに詳細な説明を継続する前に、本発明は、特定の組成物又はプロセス工程に限定されず、それ自体変更可能であると解すべきである。本明細書及び特許請求の範囲で使用するとき、単数形の「a」、「an」及び「the」は、文脈が明確に指示しない限り、複数の対象を含むことに留意しなければならない。

【0089】

特に定義しない限り、ここで使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が関連する技術分野の当業が一般的に理解するのと同じ意味を有する。例えば、the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 第3版, 1999, Academic Press; and the Oxford Dictionary Of Biochemistry

And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Pressは本発明で使用される用語の多くの一般的な辞書となる。

【0090】

アミノ酸は、ここでは、それらの一般に知られている3文字記号によって又はIUPAC-IUB生化学命名法委員会によって推奨される1文字記号によって言及する場合がある。同様に、ヌクレオチドは、一般的に受け入れられている1文字コードにより言及する場合がある。

【0091】

ここで、ここで使用されるときに、「及び／又は」は、他のものと共に又は他のものなしに2つの特定の特性又は成分のそれぞれの特定の開示として解釈すべきことを指摘することが好都合である。「A及び／又はB」は、例えば、それぞれが個別に本明細書に記載されているかのように、(i) A、(ii) B並びに(iii) A及びBのそれぞれの特定の開示であると解釈すべきである。

10

【0092】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、アミノ酸残基の重合体を用いるために本明細書において区別なく使用される。これらの用語は、1種以上のアミノ酸残基が対応する天然型アミノ酸の人工化学的模倣体並びに天然アミノ酸重合体及び非天然アミノ酸重合体であるアミノ酸重合体に適用される。本明細書で使用するときに、用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」には、少なくとも、ここに記載される変異型SMOタンパク質、その変異体又はそのフラグメントのいずれかが包含される。

20

【0093】

ここで、用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、かつ、具体的には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2種のインタクトな抗体から形成される多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）及び抗体フラグメントをカバーするが、ただし、これらのものが所望の生物学的活性を示す場合に限る。

【0094】

「単離」抗体とは、その自然環境の成分から同定されかつ分離され及び／又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分は、抗体についての研究、診断又は治療用途を妨害するであろう物質であり、酵素、ホルモン及び他のタンパク質様又は非タンパク質様物質を挙げることができる。いくつかの態様では、抗体は、例えば、ローリー法で決定されるときに、(1) 抗体の95重量%超まで、いくつかの実施形態では、99重量%超まで精製され；(2) 例えば、スピニングカップシークエネーターの使用によってN末端又は内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度にまで精製され、或いは(3) 例えば、クマシーブルー又は銀染色を使用して還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEにより均一になるまで精製される。単離抗体は、組換え細胞内における*in situ*抗体を含む。というのは、抗体の自然環境の少なくとも1種成分は存在しないからである。しかしながら、通常は、単離抗体は少なくとも1回の精製工程により調製される。

30

【0095】

「天然抗体」は、通常、2個の同一の軽(L)鎖及び2個の同一の重(H)鎖から構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。それぞれの軽鎖は、1個の共有ジスルフィド結合によって重鎖に結合しているが、ジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。また、各重鎖及び軽鎖は、規則的に間隔の開いた鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、一方の末端に可変ドメイン(V_H)を有し、それに多数の定常ドメインが続く。各軽鎖は、一方の末端に可変ドメイン(V_L)及び他方の末端に定常ドメインを有する；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列する。特定のアミノ酸残基が、軽鎖と重鎖可変ドメインと間の境界を形成すると考えられている。

40

【0096】

抗体の「可変領域」又は「可変ドメイン」とは、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端ドメ

50

インをいう。重鎖の可変ドメインを「VH」ということができる。軽鎖の可変ドメインを「VL」ということができる。これらのドメインは、一般に抗体の最も可変的な部分であり、かつ、抗原結合部位を含む。

【0097】

用語「可変」とは、可変ドメインの所定の部分が抗体間において配列の点で広範囲に異なり、かつ、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合及び特異性の点で使用されることを意味する。しかし、可変性は抗体の可変ドメイン全体にわたって均一に分布しているわけではない。このものは、軽鎖及び重鎖可変ドメインの両方において高頻度可変領域（HVR）と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのさらに高度に保存された部分はフレームワーク領域（FR）と呼ばれる。天然重鎖及び軽鎖可変ドメインは、それぞれ、βシート構造の一部を連結する、場合によってはループを形成する3つのHVRにより結合した、大きくβシート構造を採用する4つのFR領域を含む。各鎖内におけるHVRは、FR領域によって近接して共に保持され、かつ、他の鎖からのHVRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabat外, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD（1991））。定常ドメインは、抗体の抗原への結合には直接関与しないが、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与といった様々なエフェクター機能を発揮する。

10

【0098】

任意の脊椎動物種からの抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる2つの明確に異なるタイプの一方に分類できる。

20

【0099】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体（免疫グロブリン）は異なるクラスに分類できる。免疫グロブリンの5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMが存在し、これらのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及びIgA₂に分割できる。免疫グロブリンの異なるクラスに相当する重鎖定常ドメインは、それぞれ、α、δ、ε、γ及びμと呼ばれる。免疫グロブリンのサブユニット構造及び異なるクラスの三次元構造は周知であり、一般に、例えば、Abbas外, Cellular and Mol. Immunology, 第4版.（W. B. Saunders, Co., 2000）に記載されている。抗体は、抗体と1種以上の他のタンパク質又はペプチドとの共有結合又は非共有結合によって形成される大きな融合分子の一部であることができる。

30

【0100】

ここでは、用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「全抗体」は、その実質的に無傷の形態の抗体をいうために区別なく使用され、以下に定義される抗体フラグメントをいうものではない。これらの用語は、特にFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

【0101】

本明細書の目的上、「裸の抗体」とは、細胞傷害性部分又は放射性標識には結合していない抗体のことである。

40

【0102】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の一部を含み、いくつかの実施形態では、その抗原結合領域を含む。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFvフラグメント；ダイアボディ；直鎖状抗体；単鎖抗体分子；及び抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体が挙げられる。

【0103】

抗体のパパイン消化により、2つの同一の抗原結合フラグメントを、それぞれ単一の抗原結合部位を有する「Fab」フラグメント及び残りの「Fc」フラグメントが生じ、それらの名称は、容易に結晶化するその能力を反映している。ペプシン処理により、2つの

50

抗原結合部位を有し、かつ、依然として抗原を架橋することが可能な $F(ab')_2$ フラグメントが生じる。

【0104】

「 F_v 」は、完全な抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。一実施形態では、二本鎖 F_v 種は、堅固な非共有結合での1個の重鎖と1個の軽鎖可変ドメインとの二量体からなる。単鎖 F_v (scF_v) 種では、1本の重鎖及び1本の軽鎖可変ドメインは、柔軟なペプチドリンカーによって共有結合でき、それによって軽鎖及び重鎖は、2本鎖 F_v 種と類似の「二量体」構造に会合できる。それは、この配置では、各可変ドメインの3つのHVRは、 $VH-VL$ 二量体の表面に抗原結合部位を決定するように相互作用する。集合的に、6個のHVRが抗体に対する抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は抗原に特異的な3個のみのHVRを含む F_v の半分）であっても、抗原を認識しかつ結合させる能力を有するが、ただし結合部位全体よりも低い親和性である。

10

【0105】

Fab フラグメントは、重鎖及び軽鎖可変ドメインを含み、また軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第一定常ドメイン (CH1) を含む。 Fab' フラグメントは、抗体ヒンジ領域からの1個以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端での数個の残基の付加により Fab フラグメントとは相違する。ここで、 $Fab'-SH$ は、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を有する Fab' に対する命名である。 $F(ab')_2$ 抗体フラグメントは、元々、間にヒンジシステインを有する Fab' フラグメントの対として生成された。抗体フラグメントの他の化学結合も知られている。

20

【0106】

「単鎖 F_v 」又は「 scF_v 」抗体フラグメントは、抗体の VH 及び VL ドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。一般に、 scF_v ポリペプチドは、 VH ドメインと VL ドメインと間に、 scF_v が抗原結合のための所望の構造を形成するのを可能にするポリペプチドリンカーを含む。 scF_v の概説については、例えば、Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315 を参照されたい。

30

【0107】

用語「ダイアボディ」は、2個の抗原結合部位を有する抗体フラグメントであって、そのフラグメントが同じポリペプチド鎖 ($VH-VL$) 内における軽鎖可変ドメイン (VL) に結合した重鎖可変ドメイン (VH) を含むものをいう。同じ鎖上にある2つのドメイン間での対形成を可能にする非常に短いリンカーを使用することにより、これらのドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対形成し、かつ、2つの抗原結合部位を創り出す。ダイアボディは、二価又は二重特異性であることができる。ダイアボディは、より完全には、例えば、EP404097; WO1993/01161; Hudson 外, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); 及び Hollinger 外, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)。また、トリアボディ及びテトラボディも、Hudson 外, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003) に記載されている。

40

【0108】

本明細書で使用するときに、用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体をいう、すなわち、集団を構成する個々の抗体が可能な変異、例えば少量で存在する場合のある天然型変異を除いて同一である。したがって、修飾語「モノクローナル」は、抗体の特徴を別個の抗体の混合物ではないものと示す。所定の実施形態では、このようなモノクローナル抗体は、典型的には、標的を結合させるポリペプチド配列を含む抗体を含み、その際、該標的に結合するポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列からの単一の標的結合の選択を含む方法によって得られた。例えば、選択プロセス

50

は、ハイブリドーマクローン、ファージクローン又は組換えDNAクローンのプールといった、複数のクローンからの独特のクローンの選択であることができる。選択された標的結合配列をさらに変更して、例えば、標的に対する親和性を改善させ、標的結合配列をヒト化し、細胞培養におけるその産生を改善し、生体内でのその免疫原性を低減させ、多重特異性抗体を生成すること、そして改変された標的結合配列を含む抗体もこの開示のモノクローナル抗体であることを理解すべきである。典型的には異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、それらのものが典型的には他の免疫グロブリンによって汚染されないという点で有利である。

10

【0109】

修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるべきモノクローナル抗体は、例えばハイブリドーマ法（例えばKohler及びMilstein, Nature, 256:495-97 (1975); Hongo外, Hybridoma, 14(3):253-260 (1995), Harlow外, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling外, : Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)), recombinant DNA methods (例えば米国特許第4,816,567号), phage-display technologies (例えばClackson外, Nature, 352:624-628 (1991); Marks外, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992); Sidhu外, J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee外, J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); 及びLee外, J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)並びにヒト免疫グロブリン遺伝子座又はヒト免疫グロブリン配列をコード遺伝子の一部又は全てを有する動物においてヒト又はヒト様抗体を産生するための技術を含めた様々な技術（例えばWO1998/24893; WO1996/34096; WO1996/33735; WO1991/10741; Jakobovits外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits外, Nature 362:255-258 (1993); Bruggemann外, Year in Immunol. 7:33 (1993); U. S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; and 5,661,016; Marks外, Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg外, Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-813 (1994); Fishwild外, Nature Biotechnol. 14:845-851 (1996); Neuberg, Nature Biotechnol. 14:826 (1996); 及びLonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)によって作製できる。

20

30

40

【0110】

ここで、モノクローナル抗体には、特に「キメラ」抗体が含まれる。重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の種に由来する又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一又は相同である一方で、鎖の残りは別の種に由来する又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応配列並びにこのような抗体のフラグメントと同一又は相同であるが、ただし、それらのものが所望の生物活性を示す場合に限る（例えば、

50

米国特許第4, 816, 567号; 及びMorrison外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984))。キメラ抗体としては、PRIMATIZED (登録商標) 抗体が挙げられる。抗体の抗原結合領域が、例えば目的の抗原でマカクザルを免疫化することによって産生される抗体に由来する。

【0111】

非ヒト (例えば、マウス) 抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。一実施形態では、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン (レシピエント抗体) であり、ここで、該レシピエントのHVR由来の残基は、マウス、ラット、ウサギ又は所望の特異性、親和性及び／又は能力を有する非ヒト霊長類などの非ヒト種 (ドナー抗体) のHVR由来の残基によって置換されている。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのFR残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含むことができる。これらの修飾は、抗体性能をさらにさらに改良するために行うことができる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、その際、超可変ループの全て又は実質的に全ては、非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、そしてFRの全て又は実質的に全てはヒト免疫グロブリン配列のものである。また、ヒト化抗体は、任意に、免疫グロブリン定常領域 (Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンのそのの少なくとも一部も含む。詳細については、Jones外, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann外, Nature 332: 323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992) 参照。また、例えばVaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428-433 (1994); 並びに米国特許第6, 982, 321号及び同7, 087, 409号参照。

【0112】

「ヒト抗体」は、ヒトによって産生される抗体のアミノ酸配列に相当する及び／又はここに開示されるヒト抗体を作製するための技術のいずれかを使用して作製されたアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、特に非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーを含めた当該技術分野において公知の様々な技術を使用して生成できる。Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks外, J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)。また、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用できるのは、Cole外, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner外, J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991) に記載された方法である。また、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001) も参照されたい。ヒト抗体は、抗原チャレンジに応答してこのような抗体を産生するように改変されているが、ただしその内因性遺伝子座が無効になっているトランスジェニック動物、例えば免疫ゼノマウスに抗原を投与することにより調製できる (例えば、XENOMOUSE (商標) 技術に関しては米国特許第6075181号及び同6150584号を参照)。例えば、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術により生成されたヒト抗体についてはLi外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557-3562 (2006) も参照されたい。

【0113】

本明細書で使用されるときに、用語「超可変領域」、「HVR」又は「HV」は、配列において高頻度可変であり及び／又は構造的に定まったループを形成する抗体可変ドメインの領域をいう。一般に、抗体は、6個のHVRを含み; VHにおいて3つ (H1、H2

10

20

30

40

50

、H3)及びVL(L1、L2、L3)において3つ。ネイティブ抗体では、H3及びL3は、6つのHVRの最多様性を示し、特にH3は、抗体に良好な特異性を与える際に独自の役割を果たしていると考えられる。例えば、Xu外, *Immunity* 13:37-45(2000); Johnson and Wu, *Methods in Molecular Biology* 248:1-25(Lo著, Human Press, Totowa, NJ, 2003)参照。実際、重鎖からなる天然型ラクダ抗体のみが軽鎖の非存在下で機能的かつ安定である。例えば、Hamers-Casterman外, *Nature* 363:446-448(1993); Sherif外, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736(1996)参照。多数のHVRの描写の数が使用されており、かつ、ここに含まれる。カバット相補性決定領域(CDR)は配列可変性に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabat外, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。コチアは構造的ループの場所に代わりに言及している(Chothia及びLesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917(1987))。AbmのHVRは、KabatのHVRとChothiaの構造的ループとの間の妥協を表し、かつ、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアにより使用されている。「接触」HVRは、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく。これらのHVRのそれぞれからの残基を以下に示す。

【0114】

ループ	C	接触	
-----	-----	-----	
L1	LLL	L30-L36	
L2	LLL	L46-L55	
L3	LLL	L89-L96	
H1	H31-H35B	H26-H35B	H H30 (Kabat 番号付け)
H1	HHH	H30 (Chothia 番号付け)	
H2	HHH	H47-H58	
H3	H95-H102	H95-H102	H9 H93-H101

【0115】

HVRは、次のように「拡張HVR」を含むことができる。VLにおける24-36又は24-34(L1)、46-56又は50-56(L2)及び89-97又は89-96(L3)及びVHにおける26-35(H1)、50-65又は49-65(H2)及び93-102、94-102又は95-102(H3)。可変ドメイン残基は、これらの定義のそれぞれについてKabat外(前出)に従って番号が付けられている。

【0116】

「フレームワーク」又は「FR」残基とは、ここに定義されるようなHVR残基以外の可変ドメイン残基である。

【0117】

用語「Kabatにおける可変ドメイン残基番号付け」又は「Kabatのようなアミノ酸位置番号付け」及びそれらの変形は、Kabat外(前出)における抗体の編集の重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインのために使用される番号付けシステムをいう。この番号付けシステムを使用して、実際の直鎖アミノ酸配列は、可変ドメインのFR若しくはHVRの短縮又はそれへの挿入に相当する、より少ない又は追加のアミノ酸を含有することができる。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後に単一のアミノ酸挿入(Kabatに従って残基52a)及び重鎖FR残基82の後に挿入残基(例えばKabatに従って残基82a、82b及び82cなど)を含むことができる。残基のKabat番号付けは、配列の相同領域で、抗体と「基準」カバット番号付け配列とをアライメント

することによって所定の抗体について決定できる。Kabat 番号付けシステムは、可変ドメイン内の残基に言及するときに一般に使用される（およそ軽鎖の残基 1-107 及び重鎖の残基 1-113）（例えば、Kabat 外, Sequences of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。「EU 番号付けシステム」又は「EU インデックス」は、免疫グロブリン重鎖定常領域内の残基に言及するときに一般に使用される（例えば、Kabat 外前出で報告された EU インデックス）。

【0118】

「親和性成熟」抗体とは、その 1 個以上の HVR に 1 以上の変化を有するものであり、これは、該変化を有しない親抗体と比較して抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす。一実施形態では、親和性成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル又はさらにはピコモルの親和性を有する。親和性成熟抗体は、当該技術分野で知られている所定の手順を使用して生成できる。例えば、Marks 外, Bio/Technology 10:779-783 (1992) には、VH 及び VL ドメインシャッフリングによる親和性成熟が記載されている。HVR 及び／又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘発は、例えば、に記載されている。Barbas 外, Proc Natl Acad Sci USA 91:3809-3813 (1994); Schier 外, Gene 169:147-155 (1995); Yelton 外, J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson 外, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); 及び Hawkins 外, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992) に記載されている。

【0119】

「ブロッキング」抗体又は「アンタゴニスト」抗体とは、それが結合する抗原の生物学的活性を阻害又は減少させるものである。所定のブロッキング抗体又はアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を実質的に又は完全に阻害する。

【0120】

本明細書で使用するときに、「アゴニスト抗体」は、目的のポリペプチドの機能的活性の少なくとも 1 つを部分的に又は完全に模倣する抗体である。

【0121】

「成長阻害」抗体とは、抗体が結合する抗原を発現する細胞の増殖を阻害又は減少させるものである。例えば、抗体は、Sm o 又は変異体を試験管内又は生体内で発現させる癌細胞の増殖を阻害又は減少させることができる。

【0122】

「アポトーシスを誘導する」抗体とは、アネキシン V の結合、DNA のフラグメント化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞フラグメント化及び／又は膜小胞（アポトーシス小体と呼ばれる）の形成といった標準的なアポトーシスアッセイにより決定されるようなプログラム細胞死を誘導するものである。

【0123】

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体の Fc 領域（天然配列の Fc 領域又はアミノ酸配列変異 Fc 領域）に起因する生物学的活性をいい、抗体アイソタイプにより変わる。抗体エフェクター機能の例としては、C1q 結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）；Fc 受容体結合；抗体依存性細胞伸介細胞傷害（ADCC）；食作用；細胞表面受容体（例えば、B 細胞受容体）の下方調節；及び B 細胞の活性化が挙げられる。

【0124】

本明細書において、用語「Fc 領域」は、天然配列 Fc 領域及び変異体 Fc 領域を含めて、免疫グロブリン重鎖の C 末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖の Fc 領域の境界は異なる場合があるが、ヒト IgG 重鎖 Fc 領域は、通常、Cys 226 位のアミノ酸残基から又は Pro 230 からカルボキシル末端にまで伸長するように定義される。Fc 領域の C 末端リジン（EU 番号付けシステムに係る残基 447）は、例え

ば、抗体の産生又は精製中に又は組換え抗体の重鎖をコードする核酸を操作することによって除去できる。したがって、インタクトな抗体の組成物は、全てのK 4 4 7 残基が除去された抗体集団、K 4 4 7 残基が除去されていない抗体集団及びK 4 4 7 残基を有する抗体と該残基を有しない抗体との混合物を有する抗体集団を含むことができる。

【0125】

「機能的Fc領域」は、天然配列Fc領域の「エフェクター機能」を有する。代表的な「エフェクター機能」としては、C1q結合；CDC；Fc受容体結合；ADCC；食作用；細胞表面受容体（例えばB細胞受容体；BCR）のダウンレギュレーションなどが挙げられる。このようなエフェクター機能は、一般に、結合ドメイン（例えば、抗体可変ドメイン）と結合するFc領域を必要とし、例えば本明細書における定義で開示されているような様々なアッセイを使用して評価できる。

10

【0126】

「天然配列Fc領域」は、天然に見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。天然配列ヒトFc領域としては、天然配列ヒトIgG1のFc領域（非A及びAアロタイプ）；天然配列ヒトIgG2のFc領域；天然配列ヒトIgG3のFc領域；及び天然配列のヒトIgG4のFc領域並びにそれらの天然型変異体が挙げられる。

【0127】

「変異型Fc領域」とは、少なくとも1つのアミノ酸修飾、いくつかの実施形態では1つ以上のアミノ酸置換によって天然配列Fc領域とは相違するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変異型Fc領域は、天然配列Fc領域又は親ポリペプチドのFc領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば天然配列Fc領域又は親ポリペプチドのFc領域において約1～約10のアミノ酸置換、いくつかの実施形態では約1～約5のアミノ酸置換を有する。変異型Fc領域は、本明細書のいくつかの実施形態では、天然配列Fc領域及び／又は親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%の同一性、いくつかの実施形態ではそれと少なくとも約90%の同一性、いくつかの実施形態ではそれと少なくとも約95%の同一性を有する。

20

【0128】

「Fc受容体」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を説明する。いくつかの実施形態では、FcRは天然ヒトFcRである。いくつかの実施形態では、FcRは、IgG抗体（ガンマ受容体）と結合し、かつ、FcγRI、FcγRII及びFcγRIIIサブクラスの受容体を含むものであり、対立遺伝子変異体及びそれらの受容体の選択的スプライシング型が含まれる。FcγRII受容体としては、主として細胞質ドメインの点で異なる類似のアミノ酸配列を有するFcγRIIA（「活性化受容体」）及びFcγRIIB（「阻害重合体」）が挙げられる。活性化受容体FcγRIIAは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）を含有する。阻害受容体FcγRIIBは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ（ITIM）を含有する（例えば、Daeron、Annu. Rev. Immunol. 15:203-234（1997））。FcRは、例えばRavetch及びKinet、Annu. Rev. Immunol. 9:457-92（1991）；Capel外、Immunomethods 4:25-34（1994）；及びde Haas外、J. Lab. Clin. Med. 126:330-41（1995）で検討されている。将来的に同定されるべきものを含めて、他のFcRは、本明細書にける用語「FcR」に包含される。

30

40

【0129】

また、用語「Fc受容体」又は「FcR」は、新生児受容体FcRnを含み、これは、母性IgGから胎児への移行（Guyer外、J. Immunol. 117:587（1976））及びKim外、J. Immunol. 24:249（1994））及び免疫グロブリンの恒常性の調節を担当する。FcRnへの結合を測定する方法が知られている（例えば、Ghetie and Ward., Immunol. Today 18（12）:592-598（1997）；Ghetie外、Nature Biotechnol

50

ogy, 15 (7) : 637-640 (1997); Hinton 外, J. Biol. Chem. 279 (8) : 6213-6216 (2004); WO2004/92219 (Hinton 外参照)。

【0130】

生体内でのヒトFcRnへの結合及びヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えば、ヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウス若しくはトランスフェクトヒト細胞株又は変異型Fc領域を有するポリペプチドが投与された霊長類においてアッセイできる。WO2000/42072 (Presta) には、FcRへの結合が改善又は減少した抗体変異体が記載されている。例えば、Shields 外, J. Biol. Chem. 9 (2) : 6591-6604 (2001) も参照。

10

【0131】

「ヒトエフェクター細胞」とは、1種以上のFcRを発現し、かつ、エフェクター機能を実行する白血球のことである。所定の実施形態では、細胞は、少なくともFcγRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実行する。ADCCを仲介するヒト白血球の例としては、末梢血単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞傷害性T細胞及び好中球が挙げられる。エフェクター細胞は、天然源、例えば血液から単離できる。

【0132】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」又は「ADCC」とは、細胞毒性の形態をいう。所定の細胞傷害性細胞(例えば、NK細胞、好中球、及びマクロファージ)上に存在するFc受容体(のFcR)上に結合した分泌Igがこれらの細胞傷害性エフェクター細胞を抗原保持標的細胞に特異的に結合させ、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させるのを可能にする。ADCC、NK細胞を仲介する主要な細胞はFcγRIIIのみを発現するのに対し、単球はFcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIを発現する。造血細胞上でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9 : 457-92 (1991) の第464頁の表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するために、例えば、米国特許第5,500,362号若しくは同5,821,337号又は米国特許第6,737,056 (Presta) に記載されているような生体内ADCCアッセイを実行してもよい。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、PBMC細胞及びNK細胞が挙げられる。その代わりに又はそれに加えて、目的の分子のADCC活性を、例えば、Clynes 外 PNAS (USA) 95 : 652-656 (1998) に開示されているような動物モデルにおいて生体内で評価してもよい。

20

30

【0133】

「補体依存性細胞障害」又は「CDC」とは、補体の存在下での標的細胞の溶解をいう。従来の補体経路の活性化は、同族抗原に結合している抗体(適切なサブクラス)に補体系(C1q)の第一成分を結合させることによって開始される。補体活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoro 外, J. Immunol. Methods 202 : 163 (1996) に記載されているようなCDCアッセイを実施することができる。改変Fc領域のアミノ酸配列及び増加若しくは減少したC1q結合能を有するポリペプチド変異体(変異型Fc領域を有するポリペプチド)は、例えば、米国特許第6,194,551号及びWO1999/51642号に記載されている。また、例えばIdusogie 外, J. Immunol. 164 : 4178-4184 (2000) も参照されたい。

40

【0134】

用語「Fc領域含有抗体」とは、Fc領域を含む抗体をいう。Fc領域のC末端リジン(EU番号付けシステムによれば残基447)は、例えば、抗体の精製中又は抗体をコードする核酸の組換え技術によって除去できる。したがって、本発明に係るFc領域を有する抗体を含む組成物は、K447を有する抗体、K447が全て除去された抗体又はK447残基を有する抗体と該残基を有しない抗体との混合物を含むことができる。

50

【0135】

「結合親和性」とは、一般に、分子（例えば抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば抗原）との間の非共有結合的な相互作用の総合的な強さをいう。特に断りのない限り、本明細書で使用するときに、「結合親和性」とは、結合対（例えば抗体と抗原）のメンバー間の1：1の相互作用を反映する固有の結合親和性をいう。パートナーYに対する分子Xの親和性は、一般に、解離定数（ K_d ）により表すことができる。親和性は、本明細書に記載されたものを含めて、当該技術分野において知られている一般的な方法によって測定できる。低親和性抗体は、一般に抗原にゆっくりと結合し、かつ、容易に解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は、一般にそれよりも速く抗原に結合し、かつ、長く結合した状態が維持される傾向がある。結合親和性を測定する様々な方法が当技術分野で知られており、それらのいずれも本発明の目的のために使用できる。結合親和性を測定するための特定の例示的及び代表的な実施形態を以下に説明する。

10

【0136】

一実施形態では、本発明に係る「 K_d 」又は「 K_d 値」は、次のアッセイで説明されるように、目的の抗体のFabバージョンとその抗原を用いて実施される放射性標識抗原結合アッセイ（RIA）によって測定される。抗原に対するFabの溶液結合親和性は、非標識抗原の滴定系列の存在下で、最小濃度の（ ^{125}I ）標識抗原でFabを平衡化し、その後結合した抗原を抗Fab抗体コートプレートで捕捉することによって測定される（例えばChen外，J. Mol. Biol. 293：865－881（1999）参照）。アッセイの条件を確立するために、MICROTITER（登録商標）マルチウェルプレート（サーモサイエンティフィック社）を、50mM炭酸ナトリウム（pH9.6）中捕獲用抗Fab抗体（Cappel Labs）の5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で一晩被覆し、その後PBS中2%（w/v）ウシ血清アルブミンにより室温で2～5時間（約23℃）にわたりブロックする。非吸着プレート（Nunc#269620）において、100pM又は26pMの ^{125}I －抗原を目的のFab連続希釈物と混合する（例えば、Presta外，Cancer Res. 57：4593－4599（1997）における抗VEGF抗体Fab-12の評価と一致）。所望のFabを一晩インキュベートする；しかし、このインキュベーションは、平衡に到達するのを確保するためにさらに長期間（例えば、約65時間）継続できる。その後、混合物を室温でインキュベート捕捉プレートに移す（例えば1時間）。次いで、溶液を除去し、そしてプレートをPBS中0.1%TWEEN-20（商標）で8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 μL /ウェルのシンチラント（MICROSCINT-20（商標）；Packard社）を添加し、そしてプレートを10分間TOPCOUNT（商標）ガンマカウンター（Packard社）でカウントする。20%以下の最大結合を与えるそれぞれのFabの濃度を、拮抗結合アッセイで使用するために選択する。

20

30

【0137】

別の実施形態によれば、 K_d 又は K_d 値は、固定された抗原CM5チップと共に25℃でBIACORE（登録商標）－2000又はBIACORE（登録商標）－3000（ピアコア社、米国ニュージャージー州ピスカタウェイ）を使用して表面プラズモン共鳴アッセイを用いて～10応答単位（RU）で測定される。簡単にいうと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIACORE社）を供給者の指示に従ってN-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（EDC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化する。抗原を5 μL /分の流速で注入する前に10mM酢酸ナトリウム、pH4.8で5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ （～0.2 μM ）まで希釈して結合タンパク質のおよそ10応答単位（RU）を達成する。抗原の注入後に、1Mエタノールアミンを注入して未反応群をブロックする。動態測定のために、Fabの2倍連続希釈物（0.78nM～500nM）を約25 μL /分の流速で25℃で0.05%TWEEN-20（商標）界面活性剤（PBST）と共にPBSに注入する。会合速度（ k_{on} ）及び解離速度（ k_{off} ）を、会合及び解離センサーグラムを同時にフィッティングすることにより、単純な1対1ラングミュア結合モデル（BIACORE（登録商標）

40

50

）評価ソフトウェアバージョン3.2）を使用して算出する。平衡解離定数（ K_d ）を、 k_{off}/k_{on} として算出する。例えば、Chen外，J. Mol. Biol. 293：865－881（1999）参照。 k_{on} 速度が上記表面プラズモン共鳴アッセイにより $106 M^{-1} s^{-1}$ を超える場合には、 k_{on} 速度は、分光光度計、例えばストップフロー装置分光光度計（テルアビブインスツルメンツ社）又は攪拌キュベットを有する8000シリーズSLM-AMINCO（商標）分光光度計（ThermoSpectronic社）で測定されるとき増加濃度の抗原の存在下でPBS中pH7.2において25℃で20nMの抗抗原抗体（Fab型）の蛍光発光強度の増加又は減少を測定する（励起＝295nm；発光＝340nm、16nmバンドパス）蛍光消光技術を使用することによって決定できる。

10

【0138】

また、本発明に係る「 k_{on} 速度」、「会合の速度」、「会合速度」又は「 k_{on} 」は、上記のようにBIACORE（登録商標）－2000又はBIACORE（登録商標）－3000システム（ピアコア社、米国ニュージャージー州ピスカタウェイ）を使用して決定できる。

【0139】

本明細書で使用するときに、用語「実質的に同様」又は「実質的に同一」とは、2つの数値（例えば、本発明の抗体に関連する一方及び基準／比較抗体に関連する他方）間の類似性の程度が十分に高く、そのため、当業者が、該2つの値の間の差が該値（例えば、 K_d 値）によって測定される生物学的特性の文脈内でほとんど又は全く生物学的及び／又は統計的に有意でないと見なすであろうことをいう。該2つの値間の差は、例えば、基準／比較値に応じて約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満及び／又は約10%未満である。

20

【0140】

本明細書で使用するときに、用語「実質的に減少」又は「実質的に異なる」とは、2つの数値（一般に分子に関連する一方及び基準／比較分子に関連する他方）間の類似性の程度が十分に高く、そのため、当業者が、該2つの値の間の差が該値（例えば、 K_d 値）によって測定される生物学的特性の文脈内で統計的に有意なものと見なすであろうことをいう。該2つの値間の差は、例えば、基準／分子に応じて約10%超、約20%超、約30%超、約40%超及び／又は約50%超である。

30

【0141】

「精製（された）」とは、分子がサンプル中においてそれが含まれるサンプルの少なくとも95重量%又は少なくとも98重量%の濃度で存在することを意味する。

【0142】

「単離（された）」核酸分子とは、例えばその天然の環境中において通常関連のある少なくとも1種の他の核酸分子から分離された核酸分子である。単離核酸分子は、通常核酸分子を発現する細胞に含まれる核酸分子をさらに含むが、該核酸分子は、染色体外に存在する又はその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【0143】

「単離（された）」タンパク質は、例えばその天然の環境中において通常関連する少なくとも1種の他の細胞成分から分離されたタンパク質である。いくつかの実施形態では、「単離」タンパク質は、そのタンパク質が通常は発現されない細胞内で発現したタンパク質である。いくつかの実施形態では、単離タンパク質は組換えタンパク質である。

40

【0144】

本明細書で使用するときに、用語「ベクター」とは、連結されている別の核酸を輸送できる核酸分子をいうものとする。一つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、これは追加のDNAセグメントを連結することができる環状二本鎖DNAをいう。別のタイプのベクターはファージベクターである。別のタイプのベクターは、追加のDNAセグメントをウイルスゲノムに連結することができるウイルスベクターである。所定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内で自律複製可能である（例えば、複製起点を有する細菌

50

ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)を宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、それによって宿主ゲノムと共に複製する。さらに、所定のベクターは、それらが機能的に連結される遺伝子の発現を指示することができる。本明細書においては、このようなベクターを「組換え発現ベクター」又は単に「発現ベクター」という。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、プラスミド形態の場合が多い。本明細書において、「プラスミド」及び「ベクター」は区別なく使用する場合がある。プラスミドはベクターの最も一般的に使用される形態だからである。

【0145】

本明細書において区別なく使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」とは、任意の長さのヌクレオチドの重合体をいい、DNA及びRNAを包含する。いくつかの実施形態では、核酸は、cDNA分子又はそのフラグメントである。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド若しくは塩基、及び／又はそれらのアナログ、或いはDNA若しくはRNAポリメラーゼにより又は合成反応により重合体中に組み込むことができる任意の基質とすることができる。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びそれらのアナログなどを含むことができる。存在する場合には、ヌクレオチド構造に対する修飾は、重合体の形成前又は後に付与できる。ヌクレオチド配列は、非ヌクレオチド成分により中断されていてもよい。ポリヌクレオチドは、標識への結合などの合成後になされる修飾を含むことができる。他のタイプの修飾としては、例えば、アナログによる天然型ヌクレオチドの1種以上の「キャップ」置換、ヌクレオチド内修飾、例えば、非荷電結合を有するもの(例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、カルバメートなど)及び荷電結合を有するもの(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート)、ペンダント部分を含有するもの、例えばタンパク質(例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリーL-リジンなど)、インターカレーターを有するもの(例えば、アクリジン、ソラレンなど)、キレート剤を有するもの(例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属など)、アルキル化剤を含有するもの、修飾結合を有するもの(例えば、 α アノマー核酸など)並びにポリヌクレオチドの未修飾形態が挙げられる。さらに、糖類中に通常存在するヒドロキシル基のいずれかは、例えば、ホスホネート基、ホスフェート基によって置換されていてよく、標準的な保護基によって保護されていてよく又は追加のヌクレオチドへのさらなる連結を調製するように活性化されていてよく、又は固体若しくは半固体支持体に結合されていてよい。5'及び3'末端OHは、リン酸化でき又はアミン若しくは1~20個の炭素原子の有機キャッピング基部分で置換できる。また、他のヒドロキシルを標準的な保護基に誘導体化することもできる。また、ポリヌクレオチドは、当該技術分野において一般に知らされているリボース又はデオキシリボース糖のアナログ形態、例えば、2'-O-メチルー、2'-O-アリルー、2'-フルオロー又は2'-アジドリボース、炭素環式糖アナログ、 α -アノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロース又はリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式アナログ及び塩基性ヌクレオシド、例えばアナログメチルリボシドなどを含むこともできる。1以上のホスホジエステル結合は別の連結基によって置換されていてよい。これらの別の連結基としては、実施形態が挙げられるが、これに限定されない。ホスフェートがP(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、(O)NR₂(「アミデート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO又はCH₂(「ホルムアセタール」)(ここで、それぞれのR又はR'は、独立して、H又はエーテル(-O-)結合を含有していてよい置換若しくは非置換アルキル(1~20C)、アリアル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル又はアラジル。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。上記説明は、RNA及びDNAを含めて、本明細書で引用される全てのポリヌクレオチドに当てはまる。

【0146】

本明細書で使用されるときに、「オリゴヌクレオチド」とは、一般的に、一般には全長約200未満のヌクレオチドである(必須ではない)、短い概して一本鎖の一般に合成ポ

10

20

30

40

50

リヌクレオチドをいう。用語「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」は相互に排他的ではない。ポリヌクレオチドのための上記説明は、オリゴヌクレオチドにも等しく十分に適用可能である。

【0147】

本明細書において区別なくに使用される用語「Smo」又は「SMO」又は「平滑化」とは、特に示さない限り、霊長類（例えばヒト）及び齧歯動物（例えば、マウス及びラット）などの哺乳類を含めて任意の脊椎動物源からの任意の天然平滑化タンパク質又は核酸をいう。この用語は、「全長」未プロセッシングSMO並びに細胞内でのプロセッシングにより得られるSMOの任意の形態を包含する。また、この用語は、SMOの天然型変異体、例えばスプライス変異体又は対立遺伝子変異体を包含する。いくつかの実施形態では、本明細書で使用するとき、「変異型SMO」又は「変異型SMOポリペプチド」又は「変異型SMOタンパク質」とは、ヒトSMOの位置281でのSMOの第2膜貫通に変異を有するSMO、ヒトSMOの位置408でのSMOの第5膜貫通ドメインに変異を有するSMO、ヒトSMOの位置459でのSMOの膜貫通ドメイン6に変異を有するSMO及び／又はヒトSMOの位置533若しくは535でのSMOの膜貫通ドメイン7に変異を有するSMOをいう。いくつかの実施形態では、本明細書中で使用されるとき、「変異型SMO」又は「変異型SMOポリペプチド」又は「変異型SMOタンパク質」とは、配列番号1の位置281、408、412、459、533及び／又は535に相当する1個以上のアミノ酸に変異を含む平滑化ポリペプチドをいう。いくつかの実施形態では、配列番号1の位置281、408、412、459、533及び／又は535に相当する1個以上のアミノ酸での変異は、W281C、I408V、A459V、S533N及び／又はW535Lを含む。同様に、変異型SMOタンパク質は、野生型ヒトSMOの上記位置の任意の1以上に変異を有すると記載される。本発明は、本明細書に記載の変異型ポリペプチド又は核酸のいずれかが配列識別子を基準にして説明できる又は野生型ヒトSMOに関連して説明できることを意図する。さらに、変異体は、配列番号1に関連して説明でき又は他の配列識別子のいずれかに関連して説明できる。

【0148】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるとき、「治療」（及び「治療する」）等のバリエーション）とは、治療される個体又は細胞の自然過程を改変するための臨床的介入をいい、これは、予防のため又は臨床病理経過中に実施できる。治療の望ましい効果としては、疾患の発症又は再発の予防、症状の緩和、疾患の任意の直接的又は間接的な病理学的結果の減少、転移の予防、疾患の進行速度の低下、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善が挙げられる。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、疾患若しくは障害の発症を遅らせる又は疾患若しくは障害の進行を遅らせるために使用される。いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるとき、「治療する」又は「治療」又は「緩和」とは、治療される状態の1つ以上の症状の重症度を改善し、緩和し、及び／又は減少させることをいう。一例として、癌を治療するとは、進行又は発症を改善し（患者の状態を改善する）、遅延し又は遅らせる、癌の1つ以上の症状の重症度を低下させることをいう。例えば、癌の治療としては、次の任意の1つ以上が挙げられる：腫瘍の大きさを減少させる、腫瘍サイズ増加の速度を減少させる、サイズの増加を停止させる、転移の数を減少させる、痛みを低減させる、生存率を増加させる及び無増悪生存期間を増大させる。

【0149】

「治療する」又は「治療」又は「緩和」とは、治療される状態の1つ以上の症状の重症度を改善し、緩和し、及び／又は減少させることをいう。一例として、癌を治療するとは、進行又は発症を改善し（患者の状態を改善する）、遅延し又は遅らせる、癌の1つ以上の症状の重症度を低下させることをいう。例えば、癌の治療としては、次の任意の1つ以上が挙げられる：腫瘍の大きさを減少させる、腫瘍サイズ増加の速度を減少させる、サイズの増加を停止させる、転移の数を減少させる、痛みを低減させる、生存率を増加させる及び無増悪生存期間を増大させる。「診断」とは、疾患又は腫瘍の識別特性を同定又は決定するプロセスをいう。癌の場合には、診断の方法を、重症度又は疾患進行に基づいてステ

ージング又は腫瘍分類として表現される場合もある。

【0150】

「診断」とは、疾患又は腫瘍の識別特性を同定又は決定するプロセスをいう。癌の場合には、診断の方法を、重症度又は疾患進行に基づいてステージング又は腫瘍分類として表現される場合もある。

【0151】

「個体」、「被験体」又は「患者」は、ヒトなどの脊椎動物である。所定の実施形態では、脊椎動物は哺乳動物である。哺乳動物としては、家畜（ウシなど）、競技用動物、ペット（ネコ、イヌ、及びウマなど）、霊長類、マウス及びラットが挙げられるが、これらに限定されない。所定の実施形態では、哺乳動物はヒトである。

10

【0152】

用語「医薬製剤」とは、活性成分の生物学的活性を有効とするような形態で、かつ、製剤が投与されるであろう被験体に対して許容できないほど毒性である追加の成分を全く含有しない製剤をいう。このような製剤は滅菌することができる。所定の実施形態では、医薬製剤は発熱物質を有しない。

【0153】

「無菌」製剤は、無菌的又は全て生微生物及びそれらの胞子を含まない。「有効量」とは、用量及び必要な期間にわたって所望の治療的又は予防的結果を達成するのに有効な量をいう。

【0154】

本発明の物質／分子の「治療有効量」は、所望の応答を誘発するために、個体の疾患状態、年齢、性別及び体重並びに物質／分子の能力などの要因に応じて変化する場合がある。治療有効量は、治療的に有益な効果が物質／分子の任意の毒性又は有害な影響を上回る量を含む。「予防有効量」とは、必要な用量及び期間にわたって所望の予防結果を達成するのに有効な量をいう。点滴的には、必ずしも必要ではないが、予防的用量は、疾患の初期段階の前又はその時に患者に使用されているため、予防有効量は治療有効量よりも少ないであろう。

20

【0155】

本明細書で使用するとき、用語「細胞毒性剤」とは、細胞の機能を阻害若しくは阻止し及び／又は細胞死若しくは破壊を生じさせる物質をいう。この用語は、放射性同位元素（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及び Lu の放射性同位体）、化学療法剤（例えば、メトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン又は他のインターカレート剤、酵素及びそのフラグメント、例えば核酸分解酵素、抗生物質、及び毒素、例えば小分子毒素又は細菌、真菌、植物若しくは動物起源の酵素的に活性化毒素（そのフラグメント及び／又は変異体を含む）、及び以下に開示する様々な抗腫瘍剤又は抗癌剤を包含することを意図する。他の細胞毒性剤を以下に記載する。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

30

【0156】

「毒素」は、細胞の成長及び増殖に有害な作用を及ぼすことのできる任意の物質である。

40

【0157】

「化学療法剤」は癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例としては、チオテパ及びシクロホスファミド（CYTOSAN（登録商標））などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピポスルファンなどのアルキルスルホン酸塩；ベンゾドパ、カルボコン、メツレドパ及びウレドパなどのアジリジン；エチレンイミン及びメチロールメラミン、例えばアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド及びトリメチロールメラミン；アセトゲニン（特にブラタシン及びブラタシン）；デルター9-テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、

50

MARINOL (登録商標) ; β -ラパコン ; ラパコール ; コルヒチン ; ベツリン酸 ; カンプトテシン (合成アナログトポテカン (HYCAMTIN (登録商標))、CPT-11 (イリノテカン、CAMPOTOSAR (登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン及び9-アミノカンプトテシンを含む) ; ブリオスタチン ; カリスタチン ; CC-1065 (そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む) ; ポドフィロトキシン ; ポドフィリン酸 ; テニポシド ; クリプトフィシン (特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8) ; ドラスタチン ; デュオカルマイシン (合成アナログのKW-2189及びCB1-TM1を含む) ; エレウテロビン ; パンクラチスタチン ; サルコジクチン ; スポンギスタチン ; クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード ; カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン及びラニムヌスチンなどのニトロソ尿素 ; エンジン抗生物質などの抗生物質 (例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシン γ 1I 及びカリケアマイシン ω 1I (例えばNicolaou外, Angew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994) 参照) ; CDP323、経口 α -4インテグリン阻害剤 ; ダイネミシンを含めてダイネミシン ; エスペラミシン ; ならびにネオカルチノスタチン発色団及び関連色素タンパク質エンジン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、ミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルビシン (ADRIAMYCIN (登録商標)、モルホリノードキシソルビシン、シアノモルホリノードキシソルビシン、2-ピロリノードキシソルビシン、ドキシソルビシン塩酸リポソーム注射剤 (DOXIL (登録商標))、リポソームドキシソルビシン TLC D-99 (MYOCET (登録商標))、ペグリル化リポソームドキシソルビシン (CAELYX (登録商標)) 及びデオキシドキシソルビシン)、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えばマイトマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン ; メトトレキセート、ゲムシタビン (GEMZAR (登録商標))、テガフル (UFTORAL (登録商標))、カペシタビン (XELODA (登録商標))、エポチロン及び5-フルオロウラシル (5-FU) などの抗代謝産物 ; デノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトトレキセートなどの葉酸アナログ ; フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリンアナログ ; アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジンなどのピリミジンアナログ ; カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン ; アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤 ; フロリン酸などの葉酸補充液 ; アセグラトン ; アルドホスファミド配糖体 ; アミノレブリン酸 ; エニルウラシル ; アムサクリン ; ベストラブシル ; ビサントレン ; エダトラキセート ; デホファミン ; デメコルチン ; ジアジキノン ; エルホルニチン ; 酢酸エリプチニウム ; エポチロン ; エトグルシド ; 硝酸ガリウム ; ヒドロキシウレア ; レンチナン ; ロニダイニン ; メイタンシン及びアンサマイトシンなどのメイタンシノイド ; ミトグアゾン ; ミトキサントロン ; モピダンモル ; ニトラエリン ; ペントスタチン ; フェナメット ; ピラルビシン ; ロソキサントロン ; 2-エチルヒドラジド ; プロカルバジン ; PSK (登録商標) 多糖類複合体 (JHS ナチュラルプロダクツ社、米国オレゴン州ユージーン) ; ラゾキサン ; リゾキシン ; シゾフィラン ; スピログルマニウム ; テヌアゾン酸 ; トリアジキノン ; 2, 2', 2'-トリクロロトリエチルアミン ; トリコテセン (特にT-2毒素、ベラクリンA、ロリジンA及びアングイジン) ; ウレタン ; ビンデシン (ELDISINE (登録商標)、FILDE

10

20

30

40

50

S I N（登録商標））；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド（「A r a - C」）；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセル（TAXOL（登録商標））、パクリタキセルのアルブミン 改変ナノ粒子製剤（ABRAXANE（商標））及びドセタキセル（TAXOTERE（登録商標））；クロランブシル；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチン、オキサリプラチン（例えば、ELOXATIN（登録商標））、及びカルボプラチンなどの白金剤；チューブリン重合が微小管形成を阻害するビンカ、例えばビンブラスチン（VELBAN（登録商標））、ビンクリスチン（ONCOVIN（登録商標））、ビンデシン（ELDISINE（登録商標）、FILDESIN（登録商標））、及びビノレルビン（ナベルビン）；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；ミトキサントロン；ロイコボリン；ノバントロン；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）。レチノイン酸などのレチノイド、例えばベキサロテン（TARGRETIN（登録商標））；クロドロネートなどのビスホスホネート（例えば、BONEFOS（登録商標）又はOSTAC（登録商標））、エチドロロン酸（DIDROCAL（登録商標））、NE-58095、ゾレドロロン酸／ゾレドロネート（ZOMETA（登録商標））、アレンドロネート（FOSAMAX（登録商標））、パミドロネート（AREDIA（登録商標））、チルドロネート（SKELID（登録商標））又はリセドロネート（ACTONEL（登録商標））。トロキサシタビン（1, 3-ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な細胞増殖に關与するシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えば、PKC- α 、Raf、H-Ras、及び上皮成長因子受容体（EGF-R）、例えばTHERATOPE（登録商標）ワクチン及び遺伝子治療ワクチンなどのワクチン、例えば、ALLOVECTIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチン、及びVAXID（登録商標）ワクチン；トポイソメラーゼ1阻害剤（例えば、LURTOTECAN（登録商標））；rmRH（例えば、ABARELIX（登録商標））；BAY439006（ソラフェニブ；バイエル社）；SU-11248（スニチニブ、SUTENT（登録商標）、ファイザー社）；ペリホシン、COX-2阻害剤（例えばセレコキシブ又はエトリコキシブ）、プロテオソーム阻害剤（例えばPS341）；ボルテゾミブ（ベルケイド（登録商標））；CCI-779；チピファルニブ（R11577）；オラフェニブ、ABT510；オブリメルセンナトリウム（GENASENSE（登録商標））などのBcl-2阻害剤；ピクサントロン；EGFR阻害剤（以下の定義を参照）；チロシンキナーゼ阻害剤（以下の定義を参照）；ラパマイシン（シロリムス、Rapamune（登録商標））などのセリントレオニンキナーゼ阻害剤；ロナファルニブ（SCH6636、SARASAR（商標））などのファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤；及び上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸又は誘導体；並びにCHOP（シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ビンクリスチン及びプレドニゾロンの併用療法の略語）などの上記の2種以上の組合せ、並びにFOLFOX（5-FU及びロイコボリンと併用したオキサリプラチン（ELOXATIN（商標））による治療レジメンの略語）が挙げられる。

【0158】

ここで定義される化学療法剤は、癌の増殖を促進する場合のあるホルモンの影響を調節し、減少させ、ブロックし又は阻害するように作用する「抗ホルモン剤」又は「内分泌治療薬」を包含する。これらのものは、ホルモン自体であってよく、混合アゴニスト／アンタゴニストプロファイルを有する抗エストロゲン、例えばタモキシフェン（NOLVADEX（登録商標））、4-ヒドロキシタモキシフェン、トレミフェン（FARESTON（登録商標））、イドキシフェン、ドロロキシフェン、ラロキシフェン（エビスタ）、トリオキシフェン、ケオキシフェン、SERM3などの選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）；フルベストラント（FASLODEX（登録商標））及びEM800などのアゴニスト特性ない純粋な抗エストロゲン（このような薬剤は、DNA結合を阻

10

20

30

40

50

害し、エストロゲン受容体（ER）の二量体化を遮断し、ER代謝回転を増大させ及び／又はERレベルを抑制することができる）；アロマターゼ阻害剤、例えばフォルメスタン及びエキセメスタン（AROMASIN（登録商標））ステロイド性アロマターゼ阻害剤並びにアナストロゾール（AROMASIN（登録商標））、レトロゾール（FEMARA（登録商標））及びアミノグルテチミドなどの非ステロイド性アロマターゼ阻害剤が挙げられるが、これらに限定されず、また、他のアロマターゼ阻害剤としては、ボロゾール（RIVISOR（登録商標））、酢酸メゲストロール（MEGASE（登録商標））、フアドロゾール、及び4（5）－イミダゾール；黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト、例えばロイプロリド（LUPRON（登録商標））及びELIGARD（登録商標））、ゴセレリン、ブセレリン及びトリプテレリン；性ステロイド、例えば酢酸メゲストロール及び酢酸メドロキシprogesteronなどのprogesterin、ジエチルスチルベストロール及びプレマリンなどのエストロゲン、並びにフルオキシメステロン、オールトランス型レチノイン酸及びフェンレチニドなどのアンドロゲン／レチノイド；オナプリストン；抗progesteron；エストロゲン受容体ダウンレギュレーター（ERDS）；フルタミド、ニルタミド及びビカルタミドなどの抗アンドロゲン；及び上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸又は誘導体；並びに上記の2種以上の組み合わせが挙げられる。

【0159】

本明細書で使用するときに、「増殖阻害剤」とは、試験管内又は生体内のいずれかにおいて細胞（SMOを発現する細胞など）の増殖を阻害する化合物又は組成物をいう。したがって、成長阻害剤は、S期において細胞（SMOを発現する細胞など）の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例としては、細胞周期の進行をブロックする（S期以外のところで）薬剤、例えばG1停止及びM期停止を誘発する薬剤が挙げられる。従来のM期ブロッカーとしては、ビンカ（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキサン、及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンなどが挙げられる。また、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5－フルオロウラシル及びara-CなどのG1を停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及する。さらなる情報は、村上外著、Mendelsohn及びIsrael編、The Molecular Basis of Cancer、第1章、「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」（W. B. Saunders, Philadelphia, 1995）、例えば、第13頁にある。タキサン（パクリタキセル及びドセタキセル）は、両方ともイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、ローヌ・プーランローラ社）は、パクリタキセルの半合成アナログ（TAXOL（登録商標）、ブリストル・マイヤーズスクイブ社）である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体からの微小管の集合を促進し、脱重合を阻害ことによって微小管を安定化するところ、これは、細胞の有糸分裂の阻害をもたらす。

【0160】

「変異型Smoアンタゴニスト」とは、ヒトSMOの281、408、459、533又は535位にアミノ酸置換を有するSMOの生物学的活性を阻害する化合物であって、この位置での野生型アミノ酸を任意の他のアミノ酸に変化させるものをいう。いくつかの実施形態では、SMOの生物学的活性は、ヘッジホッグによる刺激に関するシグナルをGli転写因子の活性化に伝達する能力である。

【0161】

本明細書で使用するときに、用語「ヘッジホッグ経路阻害剤」とは、細胞内のヘッジホッグシグナル伝達を阻害することができる薬剤をいうものとする。特定の実施形態では、ヘッジホッグアンタゴニストは、本明細書に記載される変異型SMOタンパク質のいずれかを発現する細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害することができる。いくつかの実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、配列番号1の281、408、459、5

3 3又は5 3 5に相当する1個以上のアミノ酸に変異を含む平滑化ポリペプチドを発現する細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害することができる。

【0162】

いくつかの実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、次の変異：W 2 8 1 C、I 4 0 8 V、A 4 5 9 V、S 5 3 3 N及び／又はW 5 3 5 Lのいずれかを含む平滑化ポリペプチドを発現する細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害することができる。

【0163】

I. 核酸

本発明の核酸は、単離変異型SMOコード配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、ビスモデギブに対して部分的に又は完全に耐性である変異型SMOタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、ヘッジホッグシグナル伝達経路におけるタンパク質をコードする遺伝子内に追加の突然変異を有する細胞においてビスモデギブに対して部分的に又は完全に耐性である変異型SMOタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、追加の変異は、本明細書に記載されたパッチ及び／又はS U F U突然変異のいずれかである。

【0164】

いくつかの実施形態では、本発明は、変異型SMOタンパク質をコードする単離核酸分子であって、該アミノ酸配列が野生型SMOアミノ酸配列の2 3 9位に対応するアミノ酸位置にアラニン以外のアミノ酸を含むものを提供する。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の核酸配列に対して少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であり、かつ、該核酸が配列番号1のヌクレオチド位置2 3 9に相当するアミノ酸位置にアラニン（A）以外のアミノ酸を含むSMOポリペプチドをコードするように少なくとも1つの変異を含む配列を含む。いくつかの実施形態では、いくつかの実施形態では、該核酸は、配列番号1の2 3 9位に相当するアミノ酸位置にバリン（V）をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の7 1 5、7 1 6及び／又は7 1 7位に対応するヌクレオチド位置で親の野生型SMOからの少なくとも1個の変異を有する。いくつかの実施形態では、パーセント同一性は、配列番号5と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%であるが、ただし、配列番号5の7 1 5、7 1 6及び／又は7 1 7位に相当するヌクレオチド位置には少なくとも1個の変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、本発明は、変異型SMOタンパク質をコードする単離核酸分子であって、該アミノ酸配列が野生型SMOアミノ酸配列の2 8 1位に対応するアミノ酸位置にトリプトファン以外のアミノ酸を含むものを提供する。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の核酸配列に対して少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であり、かつ、該核酸が配列番号1のヌクレオチド位置2 8 1に相当するヌクレオチド位置にトリプトファン（W）以外のアミノ酸を含むSMOポリペプチドをコードするように少なくとも1つの変異を含む配列を含む。いくつかの実施形態では、該核酸は、配列番号1の2 8 1位に相当するアミノ酸位置にシステイン（C）をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の8 4 1、8 4 2及び／又は8 4 3位に対応するヌクレオチド位置で親の野生型SMOからの少なくとも1個の変異を有する。いくつかの実施形態では、パーセント同一性は、配列番号5と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%であるが、ただし、配列番号5の8 4 1、8 4 2及び／又は8 4 3位に相当するヌクレオチド位置には少なくとも1個の変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、本発明は、変異型SMOタンパク質をコードする単離核酸分子であって、該アミノ酸配列が野生型SMOアミノ酸配列の4 0 8位に対応するアミノ酸位置にイソロイシン以外のアミノ酸を含むものを提供する。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の核酸配列に対して少なくとも80%、85%、

86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であり、かつ、該核酸が配列番号1のヌクレオチド位置408に相当するアミノ酸位置にイソロイシン（I）以外のアミノ酸を含むSMOポリペプチドをコードするように少なくとも1つの変異を含む配列を含む。いくつかの実施形態では、該核酸は、配列番号1の408位に相当するアミノ酸位置にバリン（V）をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の1222、1223及び／又は1224位に対応するヌクレオチド位置で親の野生型SMOからの少なくとも1個の変異を有する。いくつかの実施形態では、パーセント同一性は、配列番号5と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%であるが、ただし、配列番号5の1222、1223及び／又は1224位に相当するヌクレオチド位置には少なくとも1個の変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、本発明は、変異型SMOタンパク質をコードする単離核酸分子であって、該アミノ酸配列が野生型SMOアミノ酸配列の459位に対応するアミノ酸位置にアラニン以外のアミノ酸を含むものを提供する。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の核酸配列に対して少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であり、かつ、該核酸が配列番号1のヌクレオチド位置459に相当するアミノ酸位置にアラニン（A）以外のアミノ酸を含むSMOポリペプチドをコードするように少なくとも1つの変異を含む配列を含む。いくつかの実施形態では、該核酸は、配列番号1の459位に相当するアミノ酸位置にバリン（V）をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の1357、1358及び／又は1359位に対応するヌクレオチド位置で親の野生型SMOからの少なくとも1個の変異を有する。いくつかの実施形態では、パーセント同一性は、配列番号5と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%であるが、ただし、配列番号5の1375、1376及び／又は1377位に相当するヌクレオチド位置には少なくとも1個の変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、本発明は、変異型SMOタンパク質をコードする単離核酸分子であって、該アミノ酸配列が野生型SMOアミノ酸配列の533位に対応するアミノ酸位置にセリン以外のアミノ酸を含むものを提供する。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の核酸配列に対して少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であり、かつ、該核酸が配列番号1のヌクレオチド位置533に相当するアミノ酸位置にセリン（S）以外のアミノ酸を含むSMOポリペプチドをコードするように少なくとも1つの変異を含む配列を含む。いくつかの実施形態では、該核酸は、配列番号1の533位に相当するアミノ酸位置にアスパラギン（N）をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の1597、1598及び／又は1599位に対応するヌクレオチド位置で親の野生型SMOからの少なくとも1個の変異を有する。いくつかの実施形態では、パーセント同一性は、配列番号5と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%であるが、ただし、配列番号5の1597、1598及び／又は1599位に相当するヌクレオチド位置には少なくとも1個の変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、本発明は、変異型SMOタンパク質をコードする単離核酸分子であって、該アミノ酸配列が野生型SMOアミノ酸配列の535位に対応するアミノ酸位置にトリプトファン以外のアミノ酸を含むものを提供する。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の核酸配列に対して少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であり、かつ、該核酸が配列番号1のヌクレオチド位置535に相当するアミノ酸位置にトリプトファン（W）以外のアミノ酸を含むSMOポリペプチドをコードするように少なくとも1つの変異を含む配列を含む。いくつかの実施形態では、該核酸は、配列番号1の535位に相当するアミ

10

20

30

40

50

ノ酸位置にロイシン（L）をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の1603、1604及び／又は1605位に対応するヌクレオチド位置で親の野生型SMOからの少なくとも1個の変異を有する。いくつかの実施形態では、パーセント同一性は、配列番号5と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%であるが、ただし、配列番号5の1603、1604及び／又は1605位に相当するヌクレオチド位置には少なくとも1個の変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の核酸配列に対して少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であり、かつ、該核酸が表4に示されたアミノ酸変化のいずれか1つ以上を含むSMOポリペプチドをコードするように少なくとも1つの変異を含む配列を含む（例6参照）。

10

【0165】

また、本発明は、少なくとも20ヌクレオチド長であるフラグメントに上記変異の領域に及ぶような核酸のフラグメントも包含する。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドフラグメントは、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95又は100ヌクレオチド長である。これらのフラグメントは、全長変異型SMOコード核酸分子にまで上記変異の領域に及ぶ任意の長さとすることができる。単離された変異型SMO及びそれらのフラグメントを、例えばハイブリダイゼーションのために使用して、本発明の予後及び診断アッセイ用並びに組換え系における発現用のプライマー及びプローブを生成することができる（例えば、その免疫原として使用するための又は本明細書に記載された本発明のアッセイで使用するのための変異型SMOタンパク質又はその部分を生成することができる）。

20

【0166】

本発明は、本発明の方法で変異型SMO核酸分子を同定するために使用できる核酸プローブを提供する。変異型SMOを有することが疑われる組織又はSMOの状態が知られていない組織由来の核酸サンプルは、例えば、Sambrook外、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989)に記載されるような標準的な手順を使用して変異型SMOに特異的なプローブを用いてスクリーニングできる。あるいは、SMOをコードする核酸を組織から増幅し、そして本発明の特異的プローブでプローブして変異型SMOの有無を決定することができる。PCR法は当該分野で周知である（Sambrook外、前出；Dieffenbach外、PCR PRIMER: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1995）。

30

【0167】

変異型SMOをコードするヌクレオチド配列（又はそれらの相補体）は、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用を含めて分子生物学の分野において及びアンチセンスRNA及びDNAプローブの生成において様々な用途を有する。また、変異型SMOをコードする核酸は、本明細書に記載された組換え技術による変異型SMOポリペプチドの調製のためにも有用であり、その際、変異型SMOポリペプチドは、例えば、本明細書に記載される抗変異型SMO抗体の調製に使用できる。

40

【0168】

完全長の変異型SMO核酸又はその一部は、変異型SMOを同定するためのハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。

【0169】

場合によっては、プローブの長さは約20～約50塩基になる。ハイブリダイゼーションプローブは、全長変異型SMOヌクレオチド配列の少なくとも変異型の領域から誘導できる。

【0170】

50

例えば、スクリーニング法は、約40塩基の選択されたプローブを合成するために公知のDNA配列を用いて変異型SMOのコード領域を単離することを含む。ハイブリダイゼーションプローブは、様々な標識、例えば³²P又は³⁵Sなどの放射性ヌクレオチド又はアビジン／ビオチン結合系を介してプローブに結合したアルカリホスファターゼなどの酵素標識によって標識できる。本発明の変異型SMO遺伝子と相補的な配列を有する標識プローブを使用して、ヒトcDNA、ゲノムDNA又はmRNAのライブラリーをスクリーニングし、このようなライブラリーのどれにプローブがハイブリダイズするのかを決定することができる。ハイブリダイゼーション産物は、ポリアクリルアミドゲル上で分離できる。さらに、SMOの変異は、実施例に記載された方法を使用して決定できる。中程度のストリンジェンシー及び高ストリンジェンシーを含めたハイブリダイゼーション条件は、Sambrook外（前出）に記載されている。

10

【0171】

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列を比較し、そしてSMO及び変異型SMOについての既知の配列と整列させることができる。膜貫通ドメイン6のカルボキシ末端領域における第1、第2、第5、第6若しくは第7膜貫通ドメインのいずれか、又は膜貫通ドメイン7のカルボキシ末端領域での配列同一性は、当該技術分野において公知の方法を用いて決定できる。

【0172】

SMOコード核酸の他の有用なフラグメントとしては、変異型SMOのmRNA（センス）又は変異型SMOのDNA（アンチセンス）配列を標的にして結合することができる一本鎖核酸配列（RNA又はDNAのいずれか）を含むアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。本発明に係るアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、変異領域を含む変異型SMOのDNAのコード領域のフラグメントを含む。このようなフラグメントは、一般に約14～30ヌクレオチド、いくつかの実施形態では少なくとも約14ヌクレオチドを含む。所定のタンパク質をコードするcDNA配列に基づくアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを誘導する能力については、例えば、Stein and Cohen（1988）Cancer Res. 48：2659及びvan der Kroel外（1988）BioTechniques 6：958に記載されている。

20

【0173】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載の変異型SMO核酸のいずれかの発現を阻害することができる核酸を提供する。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの結合は、二本鎖の強化された分解、転写若しくは翻訳の早期の終結を含めたいくつかの手段の一つによって又は他の手段によって標的核酸配列の転写又は翻訳を阻止する二重鎖の形成をもたらす。このような方法は、本発明に包含される。このように、アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して変異型SMOタンパク質の発現を阻止することができ、その際、該変異型SMOタンパク質は、GDC-0449などの化学療法に対する哺乳動物における癌の耐性に所定の役割を果たすことができる。アンチセンスオリゴヌクレオチド又はセンスオリゴヌクレオチドは、さらに、修飾糖ホスホジエステル骨格（又はWO91/06629号に記載されているような他の糖結合）を有するオリゴヌクレオチドをさらに含み、このような糖結合は内因性ヌクレアーゼに耐性である。このような耐性糖結合を有するオリゴヌクレオチドは、生体内で安定である（すなわち、酵素分解に耐性であることができる）が、標的ヌクレオチド配列に結合できるように配列特異性を保持する。

30

40

【0174】

変異型SMOタンパク質の発現を阻害するのに有用なアンチセンス化合物の具体例としては、修飾骨格又は非天然ヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドが挙げられる。修飾骨格を有するオリゴヌクレオチドとしては、骨格中にリン原子を保持するもの及び骨格中にリン原子を有しないものが挙げられる。本明細書の目的のために、そして場合によっては当該技術分野で参照されるときに、それらのヌクレオシド間骨格にリン原子を有さない修飾オリゴヌクレオチドもオリゴヌクレオシドであるとみなすことができる。いくつ

50

かの実施形態では、修飾オリゴヌクレオチド骨格としては、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチル及び他のアルキルホスホネート、例えば3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート及びキラルホスホネート、ホスフィネート、ホスホラミデート、例えば、3'-アミノホスホラミデート及びアミノアルキルホスホラミデート、チオノホスホラミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホソホチリエステル、セレノホスフェート及び通常の3'-5'結合を有する、これらの2'-5'結合アナログ並びに1以上のヌクレオチド間結合が3'-3'、5'-5'又は2'-2'結合である反転した極性を有するものが挙げられる。いくつかの実施形態では、反転極性を有するオリゴヌクレオチドは、ほぼ3'ヌクレオチド間結合に単一の3'-3'結合、すなわち、無塩基（核酸塩基が存在しない又はその代わりにヒドロキシル基を有する）であってもよい単一の反転ヌクレオシド残基を含む。また、様々な塩、混合塩及び遊離酸形態も含まれる。リン含有結合の調製を教示する代表的な米国特許としては次のものが挙げられるが、これらに限定されない：米国特許第：3, 687, 808；4, 469, 863；4, 476, 301；5, 023, 243；5, 177, 196；5, 188, 897；5, 264, 423；5, 276, 019；5, 278, 302；5, 286, 717；5, 321, 131；5, 399, 676；5, 405, 939；5, 453, 496；5, 455, 233；5, 466, 677；5, 476, 925；5, 519, 126；5, 536, 821；5, 541, 306；5, 550, 111；5, 563, 253；5, 571, 799；5, 587, 361；5, 194, 599；5, 565, 555；5, 527, 899；5, 721, 218；5, 672, 697及び5, 625, 050。これらのそれぞれは参照により本明細書において援用する。

【0175】

いくつかの実施形態では、核酸は、修飾ヌクレオチド又は修飾オリゴヌクレオチド骨格を含む。いくつかの実施形態では、修飾オリゴヌクレオチド骨格は、短鎖アルキル又はシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子及びアルキル又はシクロアルキルヌクレオシド間結合、或いは1個以上の短鎖ヘテロ原子又は複素環ヌクレオシド間結合によって形成される、その中にリン原子を含まない骨格を有する。これらのものとしては、モルホリノ結合（ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される）；シロキサン骨格；硫化物、スルホキシド及びスルホン骨格；ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；リボアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；及びメチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格；スルホネート及びスルホンアミド骨格；アミド骨格；及び混合N、O、S及びCH₂成分部分を有する他のものが挙げられる。このようなオリゴヌクレオチドの調製を教示する代表的な米国特許としては次のものが挙げられるが、これらに限定されない：米国特許第：5, 034, 506；5, 166, 315；5, 185, 444；5, 214, 134；5, 216, 141；5, 235, 033；5, 264, 562；5, 264, 564；5, 405, 938；5, 434, 257；5, 466, 677；5, 470, 967；5, 489, 677；5, 541, 307；5, 561, 225；5, 596, 086；5, 602, 240；5, 610, 289；5, 602, 240；5, 608, 046；5, 610, 289；5, 618, 704；5, 623, 070；5, 663, 312；5, 633, 360；5, 677, 437；5, 792, 608；5, 646, 269及び5, 677, 439。これらのそれぞれは参照により本明細書において援用する。

【0176】

アンチセンスオリゴヌクレオチドのいくつかの実施形態では、ヌクレオチド単位の糖及びヌクレオシド間結合、すなわち骨格の両方を新規な基で置換する。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。このようなオリゴマー化合物の一つ、すなわち、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されているオリゴヌクレオチド模倣体をペプチド核酸（PNA）という。PNA化合物では、オリゴヌクレオチドの糖骨格を、アミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格で置換する

。核酸塩基は、保持され、かつ、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的又は間接的に結合している。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許としては、米国特許第5,539,082号；同5,714,331号；及び同5,719,262号が挙げられるが、これらに限定されない。これらのそれぞれは参照により本明細書で援用される。PNA化合物のさらなる教示は、Nielsen外(1991) Science 254:1497-1500にある。

【0177】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート骨格及び／又はヘテロ原子骨格、特に上で参照した米国特許第5489677に記載された $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ (メチレン(メチルイミノ)又はMMI骨格として知られている)、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 及び $-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 前記天然のホスホジエステル骨格は $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$ として表される)及び上で参照した米国特許第5602240号のアミド骨格を組み込んでいる。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、上で参照した米国特許第5,034,506号のモルホリノ骨格構造を有する。

【0178】

また、修飾オリゴヌクレオチドは、1個以上の置換糖部分を含むこともできる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、2'位に次のうちの1つを含む:OH;F;O-アルキル、S-アルキル又はN-アルキル;O-アルケニル、S-アルケニル又はN-アルケニル;O-アルキニル、S-アルキニル又はN-アルキニル;又はO-アルキル-O-アルキル、ここで、該アルキル、アルケニル及びアルキニルは、置換又は非置換 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキル又は $\text{C}_2\sim\text{C}_{10}$ アルケニル及びアルキニルであってよい。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、 $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ 及び $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ (ここで、n及びmは1～約10である)。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、2'位に次のうちの1つを含む: $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル又はO-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態学的特性を改善するための基又はオリゴヌクレオチドの薬力学的特性を改善するための基及び同様の特性を有他の置換基。いくつかの実施形態では、修飾としては、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH₂CH₂OCH₃、2'-O-(2-メトキシエチル)又は2'-MOEとしても知られている)(Martin外(1995)Helv. Chim. Acta 78:486-504)、すなわちアルコキシアルコキシ基である。いくつかの実施形態では、修飾としては、2-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち以下の実施例に記載されるような2'-DMAOEとしても知られている $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ 基、及び2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(当該技術分野においては2'-O-ジメチルアミノエトキシエチル又は2'-DMAEOEとしても知られている)、すなわち2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂が挙げられる。

【0179】

いくつかの実施形態では、修飾としては、2'-ヒドロキシル基が糖環の3'又は4'炭素原子に結合し、それによって二環糖部分を形成するロックド核酸(LNA)を含む。この結合は、いくつかの実施形態では、2'酸素原子及び4'炭素原子を架橋するメチレン($-\text{CH}_2-$)_n基(ここで、nは1又は2である)である。LNA及びその調製は、WO98/39352号及びWO99/14226号に記載されている。

【0180】

いくつかの実施形態では、修飾としては、2'-メトキシ(2'-O-CH₃)、2'

10

20

30

40

50

ーアミノプロポキシ ($2' - \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$)、 $2' - \text{アリル}$ ($2' - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH}_2$)、 $2' - \text{O-アリル}$ ($2' - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH}_2$) 及び $2' - \text{フルオロ}$ ($2' - \text{F}$) が挙げられる。 $2' - \text{修飾}$ は、アラビノ (上) 位置又はリボ (下) 位置にあってもよい。いくつかの実施形態では、 $2' - \text{アラビノ修飾}$ は $2' - \text{F}$ である。また、同様の修飾もオリゴヌクレオチド上、特に $3' \text{ 末端ヌクレオチド上の糖の } 3' \text{ 位又は } 2' - 5' \text{ 結合オリゴヌクレオチド及び } 5' \text{ 末端ヌクレオチドの } 5' \text{ 位にあることができる。}$ また、オリゴヌクレオチドは、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣物を有することもできる。このような修飾糖構造の調製を教示する代表的な米国特許第としては次のものが挙げられるがこれらに限定されない：米国特許第：4, 981, 957; 5, 118, 800; 5, 319, 080; 5, 359, 044; 5, 393, 878; 5, 446, 137; 5, 466, 786; 5, 514, 785; 5, 519, 134; 5, 567, 811; 5, 576, 427; 5, 591, 722; 5, 597, 909; 5, 610, 300; 5, 627, 053; 5, 639, 873; 5, 646, 265; 5, 658, 873; 5, 670, 633; 5, 792, 747; 及び 5, 700, 920。これらのそれぞれは参照によって本明細書で援用する。

【0181】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、核酸塩基 (当該分野では単に「塩基」と呼ばれる場合が多い) 修飾又は置換も含むことができる。本明細書で使用されるときに、「非修飾」又は「天然」核酸塩基には、プリン塩基のアデニン (A) 及びグアニン (G) 並びにピリミジン塩基のチミン (T)、シトシン (C) 及びウラシル (U) が含まれる。修飾核酸塩基としては、他の合成及び天然核酸塩基、例えば 5-メチルシトシン (5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの 6-メチル及び他のアルキル誘導体、2-プロピル並びにアデニン及びグアニンの他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び 2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニル ($-\text{C} = \text{C} - \text{CH}_3$ 又は $-\text{CH}_2 - \text{C} = \text{CH}$) ウラシル及びシトシン並びにピリミジン塩基の他のアルキル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル (シュードウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル及び他の 8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に 5-ブロモ、5-トリフルオロメチル及び他の 5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び 7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノアデニン、8-アザグアニン及び 8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び 7-デアザアデニン及び 3-デアザグアニン及び 3-デアザアデニンが挙げられる。さらに、修飾核酸塩基としては、三環系ピリミジン、例えばフェノキサジンシチジン (1H-ピリミド [5, 4-b] [1, 4] ベンゾキサジン-2 (3H)-オン)、フェノチアジンシチジン (1H-ピリミド [5, 4-B] [1, 4] ベンゾチアジン-2 (3H)-オン)、G-クランプ、例えば置換フェノキサジンシチジン (例えば、9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド [5, 4-b] [1, 4] ベンゾキサジン-2 (3H)-オン)、カルバゾールシチジン (2H-ピリミド [4, 5-b] インドール-2-オン)、ピリドインドールシチジン (H-ピリド [3', 2': 4, 5] ピロロ [2, 13-d] ピリミジン-2-オン) が挙げられる。また、修飾核酸塩基としては、プリン又はピリミジン塩基が他の複素環、例えば 7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、2-アミノピリジン及び 2-ピリドンで置換されたものが挙げられる。さらに、核酸塩基としては、米国特許第 3687808 号に開示されたもの、THE CONCISE ENCYCLOPEDIA OF POLYMER SCIENCE AND ENGINEERING, Kroschwitz, J. I. 著, John Wiley & Sons, 1990, pp. 858-859 に開示されているもの及び Englisch 外, ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION, Wiley-VCH, Germany, 1991, 30:613 に開示されているものが挙げられる。これらの核酸塩基のいくつかは、本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増大させるために特に有用である。これらのものとしては、5-

置換ピリミジン、6-アザピリミジン及びN-2、N-6及びO-6置換プリン、例えば2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル及び5-プロピニルシトシンが挙げられる。5-メチルシトシン置換は、核酸二重鎖の安定性を0.6~1.2℃増加させることが示されており（Sanghvi外、ANTISENSE RESEARCH AND APPLICATIONS, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278）、特に2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合であっても可能な塩基置換である。修飾核酸塩基の調製を教示する代表的な米国特許としては、米国特許第3,687,808号並びに次の米国特許が挙げられるが、これらに限定されない：4,845,205；5,130,302；5,134,066；5,175,273；5,367,066；5,432,272；5,457,187；5,459,255；5,484,908；5,502,177；5,525,711；5,552,540；5,587,469；5,594,121, 5,596,091；5,614,617；5,645,985；5,830,653；5,763,588；6,005,096；5,681,941及び5,750,692。これらのそれぞれを参照により本明細書において援用する。

【0182】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの別の修飾は、オリゴヌクレオチドに、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布又は細胞取り込みを強化する1個以上の部分又は結合体を化学的に連結することを含む。本発明の化合物は、第一級又は第二級ヒドロキシル基などの官能基に共有結合したコンジュゲート基を含むことができる。本発明のコンジュゲート基としては、インターカレーター、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬力学的特性を増強する基、及びオリゴマーの薬物動態特性を向上させる基が挙げられる。典型的なコンジュゲート基としては、コレステロール、脂質、陽イオン性脂質、リン脂質、陽イオン性リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン及び染料が挙げられる。本発明において、薬力学的特性を強化する基としては、オリゴマーの取り込みを改善し、分解に対するオリゴマーの耐性を向上させ、及び／又はRNAとの配列特異的ハイブリダイゼーションを強化する基が挙げられる。本発明において、薬物動態学的特性を強化する基としては、オリゴマーの取り込み、分布、代謝又は排出を改善する基が挙げられる。結合体部分としては、限定されないが、脂質部分、例えばコレステロール部分（Lettinger外、(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556）、コール酸（Manoharan外、(1994) Bioorg. Med. Chem. Lett. 4:1053-1060）、チオエーテル、例えば、ヘキシル-S-トリチル（Manoharan外、(1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:306-309；Manoharan外、(1993) Bioorg. Med. Chem. Lett. 3:2765-2770）、チオコレステロール（Oberhauser外、(1992) Nucl. Acids Res. 20:533-538）、チオコレステロール（Oberhauser外、(1992) Nucl. Acids Res. 20:533-538）、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオール又はウンデシル残基（Saison-Behmoaras外、(1991) EMBO J. 10:1111-1118；Kabanov外、(1990) FEBS Lett. 259:327-330；Svinarchuk外、(1993) Biochimie 75:49-54）、リン脂質、例えば、ジヘキサデシル-rac-グリセロール又はトリエチルアンモニウム1,2-ジオ-ヘキサデシル-rac-グリセロール-3-H-ホスホネート（Manoharan外、(1995) Tetrahedron Lett. 36:3651-3654；Shea外、(1990) Nucl. Acid Res. 18:3777-3783）、ポリアミン又はポリエチレングリコール鎖（Manoharan外、(1995) Nucleosides & Nucleotides 14:969-973）、又はアダマンタン酢酸（Manoharan外、(1995) Tetrahedron Lett. 36:3651-3654）、パルミチル部

10

20

30

40

50

分 ((M i s h r a 外. (1 9 9 5) B i o c h i m. B i o p h y s. A c t a 1 2 6 4 : 2 2 9 - 2 3 7) 或いはオクタデシルアミン又はヘキシルアミノカルボニルオキシコレステロール部分。本発明のオリゴヌクレオチドは、活性な薬剤物質、例えば、アスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、(S) - (+) - プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、2, 3, 5 - トリヨード安息香酸、フルフェナム酸、フォリン酸、ベンゾサイアジアザイド、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメタシン、バルビツレート、セファロスポリン、サルファ剤、抗糖尿病薬、抗菌剤又は抗生物質に結合できる。オリゴヌクレオチド-薬剤結合体及びその調製は、次の米国特許に記載されている：4, 828, 979 ; 4, 948, 882 ; 5, 218, 105 ; 5, 525, 465 ; 5, 541, 313 ; 5, 545, 730 ; 5, 552, 538 ; 5, 578, 717, 5, 580, 731 ; 5, 580, 731 ; 5, 591, 584 ; 5, 109, 124 ; 5, 118, 802 ; 5, 138, 045 ; 5, 414, 077 ; 5, 486, 603 ; 5, 512, 439 ; 5, 578, 718 ; 5, 608, 046 ; 4, 587, 044 ; 4, 605, 735 ; 4, 667, 025 ; 4, 762, 779 ; 4, 789, 737 ; 4, 824, 941 ; 4, 835, 263 ; 4, 876, 335 ; 4, 904, 582 ; 4, 958, 013 ; 5, 082, 830 ; 5, 112, 963 ; 5, 214, 136 ; 5, 082, 830 ; 5, 112, 963 ; 5, 214, 136 ; 5, 245, 022 ; 5, 254, 469 ; 5, 258, 506 ; 5, 262, 536 ; 5, 272, 250 ; 5, 292, 873 ; 5, 317, 098 ; 5, 371, 241, 5, 391, 723 ; 5, 416, 203, 5, 451, 463 ; 5, 510, 475 ; 5, 512, 667 ; 5, 514, 785 ; 5, 565, 552 ; 5, 567, 810 ; 5, 574, 142 ; 5, 585, 481 ; 5, 587, 371 ; 5, 595, 726 ; 5, 597, 696 ; 5, 599, 923 ; 5, 599, 928 ; 5, 688, 941 及び 6, 656, 730。そのそれぞれを参照により本明細書において援用する。

【0183】

所定の化合物の全ての位置を均一に修飾する必要はなく、実際には、上記修飾の複数を単一の化合物又はさらにはオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオシドに組み込むこともできる。また、本発明は、キメラ化合物であるアンチセンス化合物を含む。本発明において、「キメラ」アンチセンス化合物又は「キメラ」は、2つ以上の化学的に異なる領域を含み、各々が少なくとも1個の単量体単位から構成されるアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチド、すなわち、オリゴヌクレオチド化合物の場合にはヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、典型的には、少なくとも1つの領域を含み、その際、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドについて、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の増加、細胞取り込みの増加及び／又は標的核酸に対する結合親和性の増加を付与するように修飾されている。オリゴヌクレオチドのさらなる領域は、RNA : DNA 又は RNA : RNA ハイブリッドを切断することができる酵素の基質として機能することができる。一例として、RNA ーゼ H は、RNA : DNA 二重鎖の RNA 鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。したがって、RNA ーゼ H の活性化は RNA 標的の切断をもたらし、それにより遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の効率を大きく向上させる。その結果、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して、同等の結果が、キメラオリゴヌクレオチドを使用する場合に、より短いオリゴヌクレオチドで得られる場合が多い。上記のように、本発明のキメラアンチセンス化合物は、2つ以上のオリゴヌクレオチドの複合構造、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド及び／又はオリゴヌクレオチド模倣体として形成できる。いくつかの実施形態では、キメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの2' 修飾糖 (例えば、2' - O - (CH₂)₂ - O - CH₃) を3' 末端で取り込んでヌクレアーゼ耐性を付与し、及び少なくとも4個の連続2' - H 糖を有する領域を取り込んで RNA ーゼ H 活性を付与する。また、このような化合物は、当該技術分野においてハイブリッド又はギャップマーとも呼ばれている。いくつかの実施形態では、ギャップマーは、少なくとも4つの連続した2'

ーH糖を有する少なくとも1つの領域によって分離された3'末端及び5'末端に2'修飾糖（例えば2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃）の領域を有し、いくつかの実施形態では、ホスホロチオエート骨格結合を取り入れている。このようなハイブリッド構造の調製を教示する代表的な米国特許としては、次の米国特許が挙げられるが、これらに限定されない：5,013,830；5,149,797；5,220,007；5,256,775；5,366,878；5,403,711；5,491,133；5,565,350；5,623,065；5,652,355；5,652,356；及び5,700,922。そのそれぞれを参照により本明細書において援用する。

【0184】

本発明に従って使用されるアンチセンス化合物は、固相合成の周知の技術によって従来どおり日常的に行うことができる。このような合成のための装置は、例えば、アプライド・バイオシステムズ（カリフォルニア州フォスターシティー）を含めていくつかのベンダーによって販売されている。当該技術分野で知られているかかる合成のための任意の他の手段を追加的又は代替的に使用することができる。ホスホロチオエート及びアルキル化誘導体などのオリゴヌクレオチドを調製するために同様の技術を使用することが知られている。また、本発明の化合物を、取り込み、分布及び／又は吸収を補助するために、他の分子、分子構造若しくは化合物の混合物、例えばリボソーム、受容体標的分子、経口、直腸、局所又は他の製剤と混合し、カプセル化し、結合させ又は会合させることができる。このような取り込み、分布及び／又は吸収補助性剤の調製を教示する代表的な米国特許としては、次の米国特許が挙げられるが、これらに限定されない：5,108,921；5,354,844；5,416,016；5,459,127；5,521,291；5,543,158；5,547,932；5,583,020；5,591,721；4,426,330；4,534,899；5,013,556；5,108,921；5,213,804；5,227,170；5,264,221；5,356,633；5,395,619；5,416,016；5,417,978；5,462,854；5,469,854；5,512,295；5,527,528；5,534,259；5,543,152；5,556,948；5,580,575；及び5,595,756。そのそれぞれを参照により本明細書において援用する。

【0185】

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例としては、有機部分に共有結合したオリゴヌクレオチド、例えばWO90/10048号に記載されたもの、及びポリ（L-リシン）などの標的核酸配列に対するオリゴヌクレオチドの親和性を増加させる他の部分に結合したオリゴヌクレオチドが挙げられる。さらに、エリプチシンなどの挿入剤及びアルキル化剤又は金属錯体をセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合させて、標的ヌクレオチド配列に対するアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの結合特異性を改変することができる。

【0186】

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えばCaPO₄媒介DNAトランスフェクション、エレクトロポレーションを含めた任意の遺伝子導入法によって或いはエプスタイン・バーウイルスなどの遺伝子導入ベクターを使用することによって標的核酸配列を含む細胞に導入できる。一実施形態では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、好適なレトロウイルスベクターに挿入される標的核酸配列を含む細胞を、生体内又は生体外のいずれかにおいて組換えレトロウイルスベクターと接触させる。好適なレトロウイルスベクターとしては、マウスレトロウイルスM-MuLV、N2（M-MuLVに由来するレトロウイルス）又はDCT5A、DCT5B及びDCT5Cと命名されたダブルコピーベクターから誘導されるものが挙げられるが、これらに限定されない（WO90/13641参照）。

【0187】

WO91/04753に記載されるように、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、リガンド結合分子との複合体の形成により標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入

できる。好適なリガンド結合分子としては、細胞表面受容体、成長因子、他のサイトカイン又は細胞表面受容体に結合する他のリガンドが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、リガンド結合分子の結合は、その対応する分子若しくは受容体に結合するリガンド結合分子の能力を妨害せず、或いはセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド若しくはその共役バージョンが細胞に入るのを妨害しない。

【0188】

あるいは、WO 90/10448に記載されるように、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチド-脂質複合体の形成により標的核酸配列を含む細胞に導入してもよい。センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド-脂質複合体は、いくつかの実施形態では、内因性リパーゼにより細胞内で分解する。

10

【0189】

アンチセンス又はセンスRNA又はDNA分子は、一般に、少なくとも約5ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈において、用語「約」は、その参照した長さのプラスマイナス10%の参照ヌクレオチド配列長さを意味する。

20

【0190】

また、変異型SMOをコードするヌクレオチド配列を使用して、該SMOをコードする遺伝子をマッピングするための及び遺伝子疾患を有する個体の遺伝子分析のためのハイブリダイゼーションプローブを構築することもできる。本明細書で提供されるヌクレオチド配列は、*in situ* ハイブリダイゼーション、既知の染色体マーカーに対する連鎖解析及びライブラリーによるハイブリダイゼーションスクリーニングなどの公知の技術を用いて染色体及び染色体の特定の領域にマッピングできる。

30

【0191】

潜在的な変異型SMOアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスRNA又はDNA構築物であり、ここで、例えばアンチセンスRNA又はDNA分子は、標的mRNAにはハイブリダイズし、そしてタンパク質翻訳を阻害することによりmRNAの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術を使用して、三重らせん形成又はアンチセンスDNA若しくはRNAを介して遺伝子発現を制御することができ、どちらの方法もDNA又はRNAへのポリヌクレオチドの結合に基づく。例えば、本明細書における変異型SMOをコードする核酸を使用して、長さが約10~40塩基対のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計する。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に関与する遺伝子の領域に相補的であるように設計され（三重らせん-*Lee*外（1979）*Nucl. Acids Res.* 6:3073; *Cooney*外（1988）*Science* 241:456; *Dervan*外（1991）*Science* 251:1360を参照）、これにより、転写及び変異型SMOの産生を阻害する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、生体内でmRNAにハイブリダイズし、mRNA分子から変異型SMOへの翻訳を阻害する（*Okano*（1991）*Neurochem.* 56:560）; OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTI SENSE INH

40

50

INHIBITORS OF GENE EXPRESSION, CRC Press, Boca Raton, FL, 1988)。また、上記のオリゴヌクレオチドを細胞に送達することもでき、それによって、アンチセンスRNA又はDNAは、変異型SMOの産生を阻害するように生体内で発現できる。いくつかの実施形態では、アンチセンスDNAを使用する場合には、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の約-10及び+10位置間の翻訳開始部位から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドを使用できる。

【0192】

核酸のいずれかは、変異SMOタンパク質を発現し、そして天然の標的又は発現した変異型平滑化タンパク質（例えば、W281C、I408V、A459V、S533N及び／又はW535L変異を有する平滑化タンパク質）の結合相手を同定する際に使用するのに好適である。また、核酸を使用して、変異体平滑化生物活性を研究し、変異体平滑化及びその結合相手を様々な細胞及び組織から精製し、そしてヘッジホッグシグナル伝達経路のさらなる構成要素を同定することができる。

【0193】

II. 小分子

変異型SMOの潜在的なアンタゴニストは、GDC-0449によって野生型SMOに占拠される部位に結合する小分子を含み、それによって変異型SMOの生物学的活性を遮断する。小分子の例としては、小ペプチド又はペプチド様分子、例えば、可溶性ペプチド、及び合成非ペプチジル有機又は無機化合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0194】

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAに対する配列特異的ハイブリダイゼーションによって作用し、その後エンドヌクレアーゼにより切断される。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術によって同定できる。さらなる詳細については、例えば、Rossi (1994) Current Biology, 4: 469-471及びPCT公開WO97/33551号(1997年9月18日公開)を参照されたい。

【0195】

転写を阻害するために使用される三重らせん形成における核酸分子は一本鎖でありかつデオキシヌクレオチドから構成される。これらのオリゴヌクレオチドの塩基組成は、一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのかなり大きな伸張を必要とするフーグスティーン塩基対形成規則により三重ヘリックス形成を促進するように設計されている。さらなる詳細については、例えば、PCT公開WO97/33551(前出)を参照されたい。

【0196】

これらの小分子は、上で議論したスクリーニングアッセイの任意の1つ以上及び／又は当業者に周知の他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

【0197】

III. タンパク質

本発明は、単離された変異型SMOタンパク質を提供する。野生型ヒトSMOは、配列番号1に示されている。いくつかの実施形態では、変異型SMOタンパク質は、部分的に又は完全にビスモデギブに耐性である。いくつかの実施形態では、変異型SMOタンパク質は、ヘッジホッグシグナル伝達経路におけるタンパク質をコードする遺伝子に追加の変異を有する細胞内において部分的に又は完全にビスモデギブに耐性である。いくつかの実施形態では、追加の変異は、本明細書に記載のパッチ及び／又はSUFU変異のいずれかである。

【0198】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸配列を含む単離変異型SMOタンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の239位に対応するアミノ酸位置にアラニン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、9

10

20

30

40

50

2 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %又は100 %同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、アミノ酸位置239に置換が存在するものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %又は100 %同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該アミノ酸配列は、配列番号1の239位に相当するアミノ酸位置にアラニン（A）以外のアミノ酸を含むものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %又は100 %同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該SMOタンパク質は、配列番号1の239位に相当するアミノ酸位置にバリン（V）を含むものとする。

10

【0199】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸配列を含む単離変異型SMOタンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の281位に対応するアミノ酸位置にトリプトファン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %又は100 %同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、アミノ酸位置281に置換が存在するものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %又は100 %同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該アミノ酸配列は、配列番号1の281位に相当するアミノ酸位置にトリプトファン（W）以外のアミノ酸を含むものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %又は100 %同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該SMOタンパク質は、配列番号1の281位に相当するアミノ酸位置にシステイン（C）を含むものとする。

20

【0200】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸配列を含む単離変異型SMOタンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の408位に対応するアミノ酸位置にイソロイシン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %又は100 %同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、アミノ酸位置408に変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %又は100 %同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該アミノ酸配列は、配列番号1の408位に相当するアミノ酸位置にイソロイシン（I）以外のアミノ酸を含むものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %又は100 %同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該SMOタンパク質は、配列番号1の408位に相当するアミノ酸位置にバリン（V）を含むものとする。

30

40

【0201】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸配列を含む単離変異型SMOタンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の459位に対応するアミノ酸位置にアラニン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %又は100 %同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、アミノ酸位置459に変異が存在するものとする。い

50

くつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該アミノ酸配列は、配列番号1の459位に相当するアミノ酸位置にアラニン（A）以外のアミノ酸を含むものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該SMOタンパク質は、配列番号1の459位に相当するアミノ酸位置にバリン（V）を含むものとする。

【0202】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸配列を含む単離変異型SMOタンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の533位に対応するアミノ酸位置にセリン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、アミノ酸位置533に変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該アミノ酸配列は、配列番号1の533位に相当するアミノ酸位置にセリン（S）以外のアミノ酸を含むものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該SMOタンパク質は、配列番号1の533位に相当するアミノ酸位置にアスパラギン（N）を含むものとする。

【0203】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸配列を含む単離変異型SMOタンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の535位に対応するアミノ酸位置にトリプトファン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、アミノ酸位置535に変異が存在するものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該アミノ酸配列は、配列番号1の535位に相当するアミノ酸位置にトリプトファン（W）以外のアミノ酸を含むものとする。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むが、ただし、該SMOタンパク質は、配列番号1の535位に相当するアミノ酸位置にロイシン（L）を含むものとする。

【0204】

いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を含むが、ただし、該SMOタンパク質は、表4に示されたアミノ酸変化の少なくとも1つを含むものとする（例えば例6参照）。

【0205】

いくつかの実施形態では、変異型ヒトSMOは、アミノ酸281が「Xaa」（本願に関して、トリプトファン（W）以外の任意のアミノ酸を表す）として示される配列番号2

10

20

30

40

50

に示される。いくつかの実施形態では、X a aはシステイン（C）である。

【0206】

いくつかの実施形態では、変異型ヒトSMOは、アミノ酸408が「X a a」（本願に関して、イソロイシン（I）以外の任意のアミノ酸を表す）として示される配列番号6に示される。いくつかの実施形態では、X a aはバリン（V）である。

【0207】

いくつかの実施形態では、変異型ヒトSMOは、アミノ酸459が「X a a」（本願に関して、アラニン（A）以外の任意のアミノ酸を表す）として示される配列番号3に示される。いくつかの実施形態では、X a aはバリン（V）である。

【0208】

いくつかの実施形態では、変異型ヒトSMOは、アミノ酸533が「X a a」（本願に関して、セリン（S）以外の任意のアミノ酸を表す）として示される配列番号7に示される。いくつかの実施形態では、X a aはアスパラギン（N）である。

【0209】

いくつかの実施形態では、X a aはバリン（V）である。いくつかの実施形態では、変異型ヒトSMOは、アミノ酸535が「X a a」（本願に関して、トリプトファン（W）以外の任意のアミノ酸を表す）として示される配列番号4に示される。いくつかの実施形態では、X a aはロイシン（L）である。

【0210】

いくつかの実施形態では、変異型SMOタンパク質のいずれかは、配列番号1～9のいずれかの1位に相当するN末端メチオニンを欠失する。

【0211】

変異型SMO及びそのフラグメントは、本明細書に記載の変異型SMO核酸を使用して、当該技術分野で周知であるように組換え系で産生できる。このような核酸は、当該分野で周知のように、発現ベクターに組み込みこまれ、そしてタンパク質の提案された用途に応じて原核細胞又は真核細胞であることができる宿主細胞にトランスフェクトできる。例えば、変異型SMOの全長又はフラグメント（ここで、該フラグメントは、少なくとも、SMOの第二の膜貫通ドメイン及びヒトSMOの位置281、SMOの第5膜貫通ドメイン及びヒトSMOの位置408、SMOの第6膜貫通ドメイン及びヒトSMOの位置459、及び／又はSMOの第7膜貫通及び位置533又はヒトSMOの535を含む）を免

【0212】

いくつかの実施形態では、SMOタンパク質又はそのフラグメントは、野生型SMOポリペプチド（例えば、配列番号1のアミノ酸配列を有するSMOタンパク質）の同一の生物学的活性の少なくとも1つを有する。いくつかの実施形態では、変異型SMOタンパク質（例えば、配列番号1のアミノ酸459に相当するアミノ酸位置に変異を有するSMOタンパク質）は、野生型SMOタンパク質（例えば、配列番号1のアミノ酸配列を有するSMOタンパク質）と比較して基礎的な生物学的活性が増加している。用語「生物学的活性」、「生物活性」又は「機能性」とは、SMOタンパク質又はそのフラグメントが野生型SMOタンパク質に関連する機能の少なくとも1つを実施することができること、例えばヘッジホッグシグナル伝達経路を形質導入することができること及び／又はG l i 1の発現を誘導することができることを意味する。特定の実施形態では、SMOタンパク質は、キネシンモータータンパク質C o s t a l - 2を結合させる。用語「生物学的活性」、「生物活性」、及び「機能性」は、本明細書中において区別なく使用される。

【0213】

いくつかの実施形態では、SMOタンパク質のいずれか（例えば、本明細書に記載の変異型SMOタンパク質のいずれか）は、ヘッジホッグシグナルを伝達することが可能である。用語「能力を有する」又「することが可能である」とは、記載したタンパク質が適切な条件（例えば、生理学的条件又は標準的な実験室条件）下で上記生物活性を達成することを意味する。所定の実施形態では、用語「できる」とは、この能力を説明するために使

10

20

30

40

50

用できる（例えば、「結合することができる」又は所定の配列に「結合する」）。例えば、SMOタンパク質（例えば、本明細書に記載の変異型SMOタンパク質のいずれか）がヘッジホッグシグナル伝達を促進する能力を有する又はヘッジホッグシグナル伝達を促進することが可能である場合には、SMOタンパク質は、通常の生理学的条件下で細胞内におけるヘッジホッグシグナル伝達を促進することが可能である。当業者であれば、ポリペプチドが能力を有するかどうか又は記載された生物活性を達成することが可能かどうかを試験するためにどのような条件が必要となるのかを理解するであろう。

【0214】

いくつかの実施形態では、SMO及び本明細書に記載の変異型SMOタンパク質は、平滑化機能獲得型変異を含む。いくつかの実施形態では、機能獲得型平滑化変異は、構成的に活性な平滑化タンパク質をもたらす。所定の実施形態では、平滑化における変異は、特定の位置、例えばスクリーニングアッセイに関連して上記したような配列番号1における特定の位置に相当する位置のいずれかに変異を含む。例えば、WO2011/028950及びWO2012/047968を参照されたい。これらのそれぞれは参照により援用される。いくつかの実施形態では、平滑化変異は、配列番号1の535位に相当する位置での変異である。所定の実施形態では、変異は、配列番号1の562位に相当する位置での変異である。所定の実施形態では、変異は、配列番号1における535位又はその対応する位置でのW535Lである。いくつかの実施形態では、平滑化変異は、配列番号1のR562Q位に相当する変異である（配列番号1の562位又は562位に相当する位置でのR562Q変異）。いくつかの実施形態では、平滑化突然変異は、配列番号1の412位に相当する位置での変異、例えば配列番号1のこのような位置でのL412Fである。いくつかの実施形態では、平滑化変異は、所定の平滑化阻害剤に対して耐性にする変異を有する。いくつかの実施形態では、平滑化タンパク質は、配列番号1のアミノ酸位置又は配列番号1の518位に相当する位置に別のアミノ酸変化を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸変化は、配列番号1のアミノ酸位置518に相当するアミノ酸位置でのE518K又はE518A置換である。いくつかの実施形態では、平滑化タンパク質は、配列番号1のアミノ酸位置473又は配列番号1の473位に相当する位置にアミノ酸変化を含む。

【0215】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のSMOタンパク質のいずれか（例えば、本明細書に記載の変異型SMOタンパク質のいずれか）は、別の薬剤に融合されている。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は別のポリペプチドに融合されている。

【0216】

本明細書に記載の変異型SMOタンパク質のいずれかは、天然の標的又は変異型平滑化タンパク質（例えば、W281C、I408V、A459V、S533N及び／又はW535L変異を有する平滑化タンパク質）に対する結合相手を同定する際に使用するのに好適である。変異型SMOタンパク質を使用して、変異型平滑化生物活性を試験し、変異体平滑化及びその結合相手を様々な細胞及び組織から精製し、ヘッジホッグシグナル伝達経路のさらなる構成要素を同定することもできる。

【0217】

IV. 抗体

A. 抗変異型SMO抗体

一態様では、本発明は、SMO、特に変異型SMOに結合する抗体を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗体のいずれかは、本明細書に記載の変異型SMOポリペプチドのいずれかと結合する。例えば、変異型SMOのポリペプチドは、本発明の抗体が特異的に結合するエピトープを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号1に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含むSMOタンパク質に結合するが、ただし、配列番号1の281、408、459、533及び／又は535位に相当するアミノ酸位置に変異が存在するも

のとする。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号1のアミノ酸配列を有するSMOタンパク質には特異的に結合しない又は配列番号1のアミノ酸配列を有するSMOタンパク質と比較して変異SMOタンパク質を優先的に結合させる（例えば、結合は、変異型SMOタンパク質に選択的である）。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号1の281、408、459、533及び／又は535位に相当するアミノ酸位置のいずれかに変異を欠失するSMOタンパク質には結合しない。

【0218】

一実施形態では、抗SMO抗体はモノクローナル抗体である。一実施形態では、抗SMO抗体は抗体フラグメント、例えば、Fabフラグメント、Fab'-SH、Fv、scFv又は(Fab')₂フラグメントである。一実施形態では、抗変異SMO抗体は、キメラ、ヒト化、又はヒト抗体である。一実施形態では、抗SMO抗体は精製される。所定の実施形態では、組成物は、癌の治療のための医薬製剤である。

【0219】

1. 抗体フラグメント

本発明は抗体のフラグメントも包含する。抗体フラグメントは、酵素消化などの従来の手段又は組換え技術によって生成できる。所定の状況では、全抗体ではなく抗体フラグメントを使用する利点がある。フラグメントのサイズが小さければ、迅速なクリアランスが可能になり、固形腫瘍へのアクセス改善につながる可能性がある。所定の抗体フラグメントの検討については、Hudson外、(2003) Nat. Med. 9:129-134を参照されたい。

【0220】

様々な技術が、抗体フラグメントの生成のために開発されてきた。伝統的に、これらのフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解消化により誘導された（例えば、Morimoto外、Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)；及びBrennan外、Science, 229:81 (1985)）。しかし、これらのフラグメントは、現在は組換え宿主細胞により直接生成できる。Fab、Fv及びscFv抗体フラグメントは、全て大腸菌で発現させかつ分泌できるため、これらのフラグメントの大量の容易な生成が可能である。抗体フラグメントは、上記抗体ファージライブラリーから単離できる。あるいは、Fab'-SHフラグメントを大腸菌から直接回収し、そして化学的に結合させて(Fab')₂フラグメントを形成させることができる(Carter外、Bio/Technology 10:163-167 (1992))。別のアプローチによれば、(Fab')₂フラグメントは、組換え宿主細胞培養液から直接単離できる。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含む生体内半減期の増加したFab及び(Fab')₂フラグメントが米国特許第5869046号に記載されている。抗体フラグメントの生成のための他の技術は当業者には明らかであろう。所定の実施形態では、抗体は単鎖Fvフラグメント(scFv)である。WOを93/16185、米国特許第5571894号；及び同5587458号を参照されたい。Fv及びscFvは、定常領域を欠くそのままの結合部位を有する唯一の種である；したがって、これらのものは、生体内での使用中における低減した非特異的結合のために好適な場合がある。scFv融合タンパク質は、scFvのアミノ又はカルボキシ末端のいずれかでエフェクタータンパク質の融合を生じるように構築できる。Antibody Engineering, 著、Borrebaeck (前出)を参照されたい。また、抗体フラグメントは、例えば米国特許第5,641,870号に記載されるように「線状抗体」であってもよい。このような線状抗体は、単一特異性又は二重特異性であることができる。

【0221】

2. ヒト化抗体

本発明はヒト化抗体を包含する。非ヒト抗体をヒト化するための様々な方法が当該技術分野で知られている。例えば、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からそれに導入された1個以上のアミノ酸残基を有することができる。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「導入

」残基と呼ばれる場合が多く、これは典型的には「導入」可変ドメインから得られる。ヒト化は、本質的に、Winter及び共同研究者の方法に従って（Jones外．（1986）Nature 321：522－525；Riechmann外．（1988）Nature 332：323－327；Verhoeyen外．（1988）Science 239：1534－1536）、ヒト抗体の対応する配列の超可変領域配列を置換することによって実施できる。したがって、このような「ヒト化」抗体は、実質的にインタクトなヒト可変ドメイン未満が非ヒト種由来の対応する配列によって置換されているキメラ抗体である（米国特許第4,816,567号）。実際には、ヒト化抗体は、典型的にはいくつかの超可変領域残基及び場合によってはいくつかのFR残基が齧歯類抗体の相同部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。

10

【0222】

ヒト化抗体の作製に使用されるヒト可変ドメイン、すなわち軽鎖及び重鎖の両方の選択は、抗原性を低減するために重要である場合がある。いわゆる「ベストフィット法」によれば、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。その後、齧歯動物のものに最も近いヒト配列をヒト化抗体用のヒトフレームワークとして受け入れる。例えば、Sims外．（1993）J. Immunol. 151：2296；Chothia外．（1987）J. Mol. Biol. 196：901参照。別の方法は、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体のために使用することができる。例えば、Carte

20

。

【0223】

抗体を抗原及び他の好ましい生物学的特性に対する高い親和性を保持しつつヒト化することが一般に望ましい。この目標を達成するために、一つの方法によれば、ヒト化抗体は、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析のプロセスによって調製される。三次元免疫グロブリンモデルが一般に入手可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を例示し表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示の検査は、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能な役割の分析、すなわち、その抗原に結合する候補免疫グロブリンの能力に影響を及ぼす残基の分析を可能にする。このようにして、FR残基をレシピエント及びインポート配列から選択し組み合わせることができ、それによって、標的抗原に対する増大した親和性などの所望の抗体特性が達成される。一般に、超可変領域残基は、抗原結合への影響に直接的かつ最も実質的に関与する。

30

【0224】

3. ヒト抗体

本発明のヒト抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリーから選択されたFvクローン可変ドメイン配列と上記のような既知のヒト定常ドメイン配列とを組み合わせることによって構築することができる。あるいは、本発明のヒトモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法によって作製できる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫及びマウス・ヒト異種細胞株が、例えば、Kozbor J. Immunol., 133：3001（1984）；Brodeur外, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51－63（Marcel Dekker, Inc., New York, 1987）；及びBoerner外, J. Immunol., 147：86（1991）に記載されている。

40

【0225】

ここで、免疫時に、内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体の全レパートリーを産生することができるトランスジェニック動物（例えばマウス）を生成することが可能

50

である。例えば、キメラ及び生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域（JH）遺伝子のホモ接合性欠失が内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。このような生殖系列変異型マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの転移は、抗原投与時にヒト抗体の産生をもたらす。例えば、Jakobovits外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551(1993); Jakobovits外, Nature, 362:255(1993); Bruggemann外, Year in Immunol., 7:33(1993) 参照。

【0226】

また、遺伝子シャフリングを使用して、非ヒト、例えば齧歯類抗体からヒト抗体を誘導することもでき、その際、ヒト抗体は、出発非ヒト抗体に類似する親和性及び特異性を有する。「エピトープインプリンティング」とも呼ばれるこの方法によれば、本明細書に記載されるファージディスプレイ技術により得られた非ヒト抗体フラグメントの重鎖又は軽鎖可変領域のいずれかをヒトVドメイン遺伝子のレパートリーで置換し、非ヒト鎖／ヒト鎖scFv又はFabキメラの集団を生成する。抗原との選択により、非ヒト鎖／ヒト鎖キメラscFv又はFabが単離され、その際、ヒト鎖は、一次ファージディスプレイクローンにおける対応する非ヒト鎖を除去する際に破壊された抗原結合部位を復元する、すなわちエピトープは、ヒト鎖のパートナーの選択を支配（インプリント）する。このプロセスが残りの非ヒト鎖を置換するために繰り返されると、ヒト抗体が得られる（1993年4月1日に公開されたPCTWO93/06213を参照）。CDR移植による非ヒト抗体の伝統的なヒト化とは異なり、この技術は、非ヒト起源のFR又はCDR残基を全く持たない完全にヒトの抗体を与える。

【0227】

4. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2種の異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。所定の実施形態では、二重特異性抗体は、ヒト又はヒト化抗体である。所定の実施形態では、結合特異性の一方はSMOに対するものであり、他方は任意の他の抗原に対するものである。所定の実施形態では、二重特異性抗体は、SMOの2種の異なるエピトープに結合することができる。また、二重特異性抗体は、SMOを発現する細胞に細胞障害剤を局在化するために使用することもできる。これらの抗体は、SMO結合アームと、細胞障害剤、例えば、サポリン、抗インターフェロン α 、ピンカアルカロイド、鎖、メトトレキサート又は放射性同位体ハプテンリシンAなどを結合するアームとを有する。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体フラグメントとして調製できる（例えば、F(ab')₂二重特異性抗体）。

【0228】

二重特異性抗体を作製する方法は当該技術分野で知られている。伝統的には、二重特異性抗体の組換え産生は、2つの免疫グロブリン重鎖・軽鎖対の同時発現に基づくものであり、その際、2つの重鎖は異なる特異性を有する(Milstein and Cuello, Nature, 305:537(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のランダムな組み合わせのため、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、そのうちの1つだけが正しい二重特異性構造を有する。通常アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製はかなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の手順が1993年5月13日に公開されたWO93/08829号及びTrauncker外, EMBO J., 10:3655(1991)に記載されている。

【0229】

異なるアプローチによれば、所望の結合特異性（抗体・抗原組合せ部位）を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合させる。融合は、例えば、ヒンジ、CH2、及びCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインと行われる。所定の実施形態では、軽鎖結合に必要な部位を含む第1鎖定常領域（CH1）が融合部の少なくとも1つに存在する。免疫グロブリン重鎖融合体及び適宜免疫グロブリン

軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクターに挿入し、そして適切な宿主生物に同時形質移入する。これは、構築に使用される3つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす実施形態において、3つのポリペプチドフラグメントの相互の割合を調節する際に大きな融通性を与える。同じ比率の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高収率をもたらす場合又は比率が特に重要ではない場合には、1個の発現ベクターにおける2つのコード配列又は3つ全てのポリペプチド鎖を挿入することが可能である。

【0230】

このアプローチの一実施形態では、二重特異性抗体は、一方のアームにおける第1結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖と、他方のアームにおけるハイブリッド免疫グロブリン重鎖・軽鎖対（第2結合特異性を与える）とから構成される。この非対称構造は、望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせから所望の二重特異性化合物を分離するのを容易にすることが分かった。というのは、二重特異性分子の半分のみに免疫グロブリン軽鎖が存在すると分離の容易な方法が得られるからである。このアプローチは、WO 94/04690に開示されている。二重特異性抗体のさらなる詳細については、例えばSuresh外, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照されたい。

【0231】

別のアプローチによれば、一对の抗体分子間の界面は、組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーの割合を最大にするように操作できる。この界面は、抗体定常ドメインのC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの1個以上の小さなアミノ酸側鎖を、より大きな側鎖（例えば、チロシン又はトリプトファン）で置換する。この大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」が、大きなアミノ酸側鎖をより小さなもの（例えばアラニン又はスレオニン）と置換することによって第2抗体分子の界面に創り出される。これは、ホモダイマーなどの不要な他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるための機構を提供する。

【0232】

二重特異性抗体としては、架橋又は「ヘテロ結合体」抗体が挙げられる。例えば、ヘテロ結合体における抗体の一方はビオチンに結合し、他方はアビジンに結合することができる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を望ましくない細胞に標的化するために（米国特許第4,676,980号）、及びHIV感染の治療のために（WO 92/00373、WO 91/00360及びEP 03089）提案されている。ヘテロ結合体抗体は、任意の好都合な架橋法を用いて作製できる。好適な架橋剤は、当該技術分野において周知であり、多数の架橋技術と共に米国特許第4,676,980号に開示されている。

【0233】

また、抗体フラグメントから二重特異性抗体を産生する技術も文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を用いて調製できる。Brennan外, *Science*, 229:81 (1985)には、インタクトな抗体をタンパク分解により切断してF(ab')₂フラグメントを生成させる手順が記載されている。これらのフラグメントをジチオール錯化剤の亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元させて近接するジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。次いで、生成されたFab'フラグメントはチオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換する。その後、Fab'-TNB誘導体の一方をメルカプトエチルアミンで還元することによりFab'-チオールに再変換し、そして他方のFab'-TNB誘導体の等モル量と混合させて二重特異性抗体を形成させる。生成された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化用の薬剤として使用できる。

【0234】

近年の進歩により、大腸菌からFab'-SHフラグメントの直接回収が容易になり、これを化学的に結合させて二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby外, *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992)には、完全ヒト化二重特異性抗体F(ab')₂分子の産生が記載されている。各Fab'フラグメントを大腸菌から別々に分泌させ、そして試験管内で定方向化学カップリングを行って二重特異性抗体を

形成させた。このように形成された二重特異性抗体は、HER2受容体を過剰発現する細胞及び正常なヒトT細胞に結合できたのみならず、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘発した。

【0235】

また、組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体フラグメントを作製し分離する様々な技術も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを使用して生成された。Kostelny外, J. Immunol., 148(5):1547-1553(1992)。Fos及びJuntanパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により2種の異なる抗体のFab'部分に結合させた。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成させた後、再酸化させて抗体ヘテロダイマーを形成させた。また、この方法は、抗体ホモダイマーの生成にも利用できる。Hollinger外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993)に記載された「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体フラグメントを作製する別のメカニズムを提供した。これらのフラグメントは、同一鎖上の2個のドメイン間での対形成を可能にするには短すぎるリンカーにより軽鎖可変ドメイン(VL)に結合した重鎖可変ドメイン(VH)を含む。したがって、一方のフラグメントのVH及びVLドメインは、他方のフラグメントの相補的VL及びVHドメインと強制的に対形成させられ、これにより、2個の抗原結合部位が形成する。また、単鎖Fv(sFv)ダイマーの使用により二重特異性抗体フラグメントを作製する他の戦略も報告されている。Gruber外, J. Immunol., 152:5368(1994)参照。

【0236】

二価を超える価数を有する抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt外, J. Immunol., 147:60(1991)。

【0237】

5. 多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び/又は異化)できる。本発明の抗体は、3以上の抗原結合部位を有する多価抗体(IgMクラス以外である)であることができ(例えば四価抗体)、これは、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現によって容易に産生できる。多価抗体は、二量体化ドメイン及び3以上の抗原結合部位を含むことができる。所定の実施形態では、二量体化ドメインは、Fc領域又はヒンジ領域を含む(又はからなる)。このシナリオでは、抗体は、Fc領域及びFc領域に対してアミノ末端にある3以上の抗原結合部位を含むであろう。所定の実施形態では、多価抗体は、3~約8個の抗原結合部位を含む(又はからなる)。このような一実施形態では、多価抗体は、4個の抗原結合部位を含む(又はからなる)。多価抗体は、少なくとも1個のポリペプチド鎖(例えば、2個のポリペプチド鎖)を含み、該ポリペプチド鎖は、2個以上の可変ドメインを含む。例えば、ポリペプチド鎖は、VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fcを含むことができ、ここで、VD1は第1可変ドメインであり、VD2は第2可変ドメインであり、FcはFc領域のポリペプチド鎖であり、X1及びX2はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖は、VH-CH1-柔軟リンカー-VH-CH1-Fc領域鎖;又はVH-CH1-VH-CH1-Fc領域鎖を含むことができる。ここで、多価抗体は、少なくとも2個(例えば4個)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに含むことができる。ここで、多価抗体は、例えば、約2~約8個の軽鎖可変ドメインポリペプチドを含むことができる。ここで意図される軽鎖可変ドメインポリペプチドは、軽鎖可変ドメインを含み、任意にCLドメインをさらに含む。

【0238】

6. 単一ドメイン抗体

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は単一ドメイン抗体である。単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て若しくは一部又は軽鎖可変領域の全て若しくは一部を含む単一ポリペプチド鎖である。所定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、ヒト単一ド

メイン抗体である (D o m a n t i s 社、マサチューセッツ州ウォルサム；例えば、米国特許第 6, 2 4 8, 5 1 6 号を参照)。一実施形態では、単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て又は一部からなる。

【0239】

7. 抗体変異体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体のアミノ酸配列の修飾が意図される。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な変化を導入することによって又はペプチド合成によって調製できる。このような修飾としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失及び／又は挿入及び／又は置換が挙げられる。欠失、挿入及び置換の任意の組み合わせを行って最終構築物に到達させることができるが、ただし、該最終構築物は所望の特性を有するものとする。アミノ酸の変更は、その配列が作製された時に対象の抗体アミノ酸配列に導入できる。

【0240】

変異誘発のための可能な位置である抗体の所定の残基又は領域を同定するために有用な方法は、C u n n i n g h a m 及び W e l l s (1989) S c i e n c e, 244: 1081-1085に記載されているように「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれている。ここで、標的残基の残基又は基を同定し (a r g、a s p、h i s、l y s 及び g l u などの荷電残基)、そして中性又は負に荷電したアミノ酸 (例えば、アラニン又はポリアラニン) で置換してアミノ酸と抗原との相互作用に影響を及ぼす。その後、置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸の位置は、置換部位に又は置換部位について追加又は他の変異を導入することにより精製される。アミノ酸配列変異を導入する部位は予め決定されるが、突然変異の性質自体は予め決定する必要はない。例えば、所定の部位での突然変異の性能を分析するために、a l a スキャニング又はランダム突然変異誘発を標的コドン又は領域で実施し、そして発現した免疫グロブリンを所望の活性についてスクリーニングする。

【0241】

アミノ酸配列挿入としては、長さが1個の残基から100以上の残基を含むポリペプチドまでの範囲のアミノ末端及び／又はカルボキシル末端融合、並びに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が挙げられる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異体としては、酵素 (例えば A D E P T のための) 又は抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドに対する抗体のN末端又はC末端への融合物が挙げられる。

【0242】

所定の実施形態では、本発明の抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加又は減少させるように改変される。ポリペプチドのグリコシル化は、典型的にはN結合又はO結合のいずれかである。N結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合をいう。トリペプチド配列のアスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン (Xはプロリンを除く任意のアミノ酸である) は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合のための認識配列である。したがって、ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を創り出す。O結合グリコシル化とは、糖であるN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースのヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンへの結合をいうが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンも使用できる。

【0243】

抗体に対するグリコシル化部位の付加又は欠失は、好都合には、上記トリペプチド配列の一つ以上 (N結合グリコシル化部位について) を創出又は除去するようにアミノ酸配列を改変することによって達成される。また、改変は、元の抗体の配列への1以上のセリン又はスレオニン残基の付加、欠失又は置換によって行うこともできる (O結合グリコシル化部位について)。

【0244】

抗体がFc領域を含む場合には、それに結合する炭水化物を改変することができる。哺乳動物細胞によって産生される天然抗体は、典型的には、一般にFc領域のCH2ドメインのAsn297へのN-結合によって結合する分岐の二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Wright外. (1997) *TECH 15: 26-32*を参照されたい。オリゴ糖は、様々な炭水化物、例えばマンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、及びシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造の「ステム」においてGlcNAcに結合したフコースを含むことができる。いくつかの実施形態では、本発明の抗体におけるオリゴ糖の修飾は、所定の改善された特性を有する抗体変異体を作製するために行うことができる。

10

【0245】

例えば、Fc領域に結合した（直接的又は間接的に）フコースを欠失する炭水化物構造を有する抗体変異体が提供される。このような変異体は、改善したADCC機能を有することができる。例えば、米国特許出願公開US2003/0157108 (Presta, L.) ; US2004/0093621 (協和発酵工業株式会社) を参照されたい。「フコシル化」又は「フコース欠損」抗体変異体に関連する刊行物の例としては、次のものが挙げられる：US2003/0157108 ; WO2000/61739 ; WO2001/29246 ; US2003/0115614 ; US2002/0164328 ; US2004/0093621 ; US2004/0132140 ; US2004/0110704 ; US2004/0110282 ; US2004/0109865 ; WO2003/085119 ; WO2003/084570 ; WO2005/035586 ; WO2005/035778 ; WO2005/053742 ; WO2002/031140 ; Okazaki外. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004) ; Yamane-Ohnuki外. *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004)。フコシル化抗体を産生することができる細胞株の例としては、タンパク質フコシル化が欠損したLec13CHO細胞 (Ripka外. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)) ; 米国特許出願公開第US2003/0157108A1, Presta, L ; 及びWO2004/056312A1, Adams外. , 特に実施例11) 及び α -1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞などのノックアウト細胞株 (Yamane-Ohnuki外. *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004) ; Kanda, Y. 外. , *Biotechnol. Bioeng.* , 94(4):680-688 (2006) ; 及びWO2003/085107参照) が挙げられる。

20

30

【0246】

抗体変異体は、さらに二分オリゴ糖を有し、例えば、その際、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖は、GlcNAcをによって二分されている。このような抗体変異体は、減少したフコシル化及び／又は改善されたADCC機能を有することができる。このような抗体変異体の例は、例えばWO2003/011878 (Jean-Mairet外) ; 米国特許第6,602,684号 (Umana外) ; 及びUS2005/0123546 (Umana外) に記載されている。また、Fc領域に結合したオリゴ糖中に少なくとも1個のガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。このような抗体変異体は、改善したCDC機能を有することができる。このような抗体変異体は、例えばWO1997/30087 (Patel外) ; WO1998/58964 (Raju, S.) ; 及びWO1999/22764 (Raju, S.) に記載されている。

40

【0247】

所定の実施形態では、抗体変異体は、ADCCをさらに改善する1個以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の298、333及び／又は334位における置換（残基のEu番号付け）を有するFc領域を含む。このような置換は、上記変形例のいずれかとの組み合わせで行うことができる。

【0248】

50

特定の実施形態では、本発明は、いくつか、ただし全てではないエフェクター機能を有する抗体変異体を意図し、これは、生体内での抗体の半減期が重要であり、さらには特定のエフェクター機能（補体及びADCCなど）が不要又は有害であるである多くの用途のために望ましい候補となる。所定の実施形態では、抗体のFc活性は、所望の特性のみが維持されていることを確認するために測定される。試験管内及び／又は生体内細胞毒性アッセイを実施してCDC及び／又はADCC活性の減少／枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体（FcR）結合アッセイを実施して、抗体がFcγR結合を欠失している（そのためおそらくADCC活性を欠失している）が、FcRn結合能力を保持していることを確認することができる。ADCCを仲介する主要な細胞のNK細胞は、FcγRIIIのみを発現する一方で、単球はFcγRI、FcγRII及びFcγRIIIを発現する。造血細胞上でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, Ann. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)の第464頁の表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するインビトロアッセイの非限定的な例が米国特許第5,500,362号（例えばHellstrom, I. 外, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)）及びHellstrom, I. 外., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)；同5,821,337号（Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987) 参照）に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を使用することができる（例えば、フローサイトメトリーのためのACTI（商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Cell Technology社、カリフォルニア州マウンテンビュー；及びCytotox 96（登録商標））非放射性細胞毒性アッセイ（Promega社、ウィスコンシン州マディソン）参照）。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられる。あるいは又はさらに、目的の分子のADCC活性は、生体内で、例えば、Clynes 外, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)に開示されているような動物モデルにおいて評価できる。

【0249】

また、C1qの結合アッセイを実施して、抗体がC1qとを結合することができず、そのためCDC活性を欠いていることを確認することができる。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行うことができる（例えば、Gazzano-Santoro 外, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)；Cragg, M. S. 外, Blood 101:1045-1052 (2003)；及びCragg, M. S. 及びM. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004) 参照）。FcRn結合及び生体内クリアランス／半減期の決定は、当該技術分野に知られている方法を使用して実施できる（例えば、Petkova, S. B. 外, Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)を参照）。

【0250】

1個以上のアミノ酸置換を有する他の抗体改変体が提供される。置換突然変異について関心ある部位としては高度可変領域が挙げられるが、FR改変も考慮される。保存的置換は、「好ましい置換」の見出しで表1に示した。「例示的置換」で示される実質的な変化を表1に与えており、又はアミノ酸クラスを参照して以下でさらに説明するとおりである。アミノ酸置換を目的の抗体に導入し、生成物を、例えば、抗原結合の改善、免疫原性の低下、ADCC又はCDCの改善などといった所望の活性に対してスクリーニングすることができる。

【0251】

【表 1】

表 1

元の 残基	代表的な 置換	好ましい 置換
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn (N)	Gln ; His ; Asp, Lys ; Arg	Gln
Asp (D)	Glu ; Asn	Glu
Cys (C)	Ser ; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn ; Glu	Asn
Glu (E)	Asp ; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; ノルロイシン	Leu

【0252】

抗体の生物学的特性の改変は、(a) 例えばシート又はらせん立体構造としての置換領域におけるポリペプチド骨格の構造、(b) 標的部位での分子の電荷若しくは疎水性、又は(c) 側鎖のかさに影響を及ぼす置換を選択することによって達成できる。アミノ酸は、それらの側鎖の性質の類似性に依拠して分類できる(A. L. レーニンジャー、生化学、第2編、第73-75頁、ワース出版社、ニューヨーク(1975)):

(1) 非極性: Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M)

(2) 非荷電極性: Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)

(3) 酸性: Asp (D)、Glu (E)

(4) 塩基性: Lys (K)、Arg (R)、His (H)。

【0253】

10

20

30

40

50

あるいは、天然型残基を共通の側鎖特性に基づいてグループに分類できる：

- (1) 疎水性：N o r l o y i n s i n、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；
- (2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n；
- (3) 酸性：A s p、G l u；
- (4) 塩基性：H i s、L y s、A r g；
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：G l y、P r o；
- (6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【0254】

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスに交換することを必要とする。また、このような置換残基を保存的置換部位又は残りの（非保存的）部位に導入することもできる。

10

【0255】

置換変異体の一種は、親抗体（例えばヒト化又はヒト抗体）の1個以上の高頻度可変領域残基の置換を伴う。一般的に、さらなる発展のために得られた変異体は、それらが生成される親抗体に対して生物学的特性を変更（例えば、改善）しているであろう。典型的な置換変異体は、好都合にはファージディスプレイベースの親和性成熟技術を用いて生成できる親和性成熟抗体である。簡単に言えば、いくつかの超可変領域部位（例えば6～7部位）を変異させて、各部位に全ての可能なアミノ酸置換を生成する。このようにして生成された抗体は、各粒子内にパッケージングされたファージコートタンパク質（例えば、M13の遺伝子IIII産物）の少なくとも一部への融合物として繊維状ファージ粒子から表示される。その後、これらのファージディスプレイ変異体を、それらの生物学的活性（例えば結合親和性）についてスクリーニングする。修飾のための候補超可変領域部位を同定するために、スキニング変異誘発（例えば、アラニンスキニング）を実施して、抗原結合に有意に寄与する超可変領域残基を同定することができる。あるいは又はさらに、抗原・抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体と抗原との間の接触点を同定することが有益な場合がある。このような接触残基及び隣接残基は、本明細書に詳述されるものを含めて当技術分野において知られている技術に従う置換のための候補である。このような変異体が生成されたら、変異体のパネルを本明細書に記載されたものを含めて当該分野で公知の技術を用いてスクリーニングし、1以上の関連するアッセイにおいて優れた特性を有する変異体をさらなる開発のために選択できる。

20

30

【0256】

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当該技術分野において知られている様々な方法によって調製される。これらの方法としては、天然源からの単離（天然に存在するアミノ酸配列変異体の場合）、又はオリゴヌクレオチド伸介（若しくは部位特異的）突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及び抗体の以前に調製された変異体又は非変異体バージョンのカセット突然変異誘発による調製が挙げられる。

【0257】

本発明の抗体のFc領域に1個以上のアミノ酸修飾を導入し、それによりFc領域変異体を生成することが望ましい場合がある。Fc領域変異体は、ヒンジシステインのアミノ酸位置を含めて1以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば置換）を有するヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域）を含むことができる。

40

【0258】

この説明及び当該分野の教示によれば、いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、例えばFc領域において、野生型対応抗体と比較して1以上の改変を含むことができることが企図される。それにもかかわらず、これらの抗体は、それらの野生型対応物と比較して、治療上の有用性に必要な実質的に同じ特徴を維持する。例えば、所定の改変を、例えばWO99/51642に記載されるように改変した（すなわち改善又は減少した）C1q結合及び／又は補体依存性細胞傷害（CDC）をもたらすであろうFc領域において行うことができると考えられる。Fc領域変異体の他の例に関しては、例えばDuncan

50

& Winter, Nature 322:738-40 (1988); 米国特許第5, 648, 260号; 米国特許第5, 624, 821号; 及びWO94/29351も参照されたい。WO00/42072 (Presta) 及びWO2004/056312 (Lowman) には、FcRへの改善した又は減少した結合を有する抗体変異体が記載されている。これらの特許文献の内容を参照により本明細書で特に援用する。Shields外, J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)を参照されたい。半減期が増大し、かつ、新生児Fc受容体(FcRn)への結合が改善した抗体(これは胎児への母性IgGの移動を担当する(Guyer外, J. Immunol. 117:587 (1976) 及びKim外, J. Immunol. 24:249 (1994))がUS2005/0014934A1に記載されている(Hinton外)。これらの抗体は、中に1個以上の置換を有するFc領域を含み、これはFcRnへのFc領域の結合を改善する。改変されたFc領域アミノ酸配列及び増加又は減少したC1q結合能を有するポリペプチド変異体が米国特許第6, 194, 551B1号及びWO99/51642に記載されている。これらの特許文献の内容は、参照により本明細書で援用される。また、Idusogie外, J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)も参照されたい。

10

【0259】

別の態様では、本発明は、Fc領域を含むFcポリペプチドの界面に修飾を含む抗体を提供し、該修飾は、ヘテロダイマー化を容易にする及び／又は促進する。これらの修飾は、第1Fcポリペプチドに隆起を導入し、第2Fcポリペプチドにキャビティを導入することを含み、該隆起は、第1及び第2Fcポリペプチドの複合体形成を促進するようにキャビティ内に配置可能である。これらの修飾を有する抗体を生成する方法は、例えば米国特許第5731168号に記載されるように当該技術分野において知られている。

20

【0260】

さらに別の態様では、抗体の1個以上の残基がシステイン残基で置換されたシステイン操作抗体、例えば、「thioMAb」を生成することが望ましいことがある。所定の実施形態では、置換された残基は、抗体の接近可能な部位で生じる。システイン残基に置換することにより、反応性チオール基は、それによって抗体の接近可能な部位に配置され、そしてこれを使用して、本明細書でさらに説明するように薬物部分又はリンカー・薬物部分などの他の部分に抗体を結合する。所定の実施形態では、次の残基のいずれか1つ以上がシステインで置換されていてもよい：軽鎖のV205 (カバット番号付け)；A118の重鎖(EU番号付け)；及び重鎖のFcrのS400 (EU番号付け)。

30

【0261】

8. 抗体誘導体

本発明の抗体は、当該分野において知られておりかつ直ぐに利用できる追加の非タンパク質性部分を含むように修飾できる。いくつかの実施形態では、抗体の誘導体化に適した部分は水溶性重合体である。水溶性重合体の非限定的な例としては、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール／プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ1, 3-ジオキソラン、ポリ-1, 3, 6-トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸(単独重合体又はランダム共重合体のいずれか)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコール単独重合体、プロピレノキシド／エチレノキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール(例えばグリセロール)、ポリビニルアルコール及びこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中での安定性のため、製造の際に利点を有することができる。重合体は、任意の分子量のものであってよく、また、分岐又は非分岐であってよい。抗体に結合する重合体の数は様々なものであってよく、2種以上の重合体が結合される場合には、それらは同一又は異なる分子とすることができる。一般に、誘導体化に使用される重合体の数及び／又はタイプは、抗体誘導体が所定の条件下で治療に使用されるかどうかを問わず、改善されるべき抗

40

50

体の特定の性質又は機能（これらに限定されない）を含めた考慮に基づいて決定できる。

【0262】

別の実施形態では、抗体と、放射線に選択的に曝露することによって加熱できる及び非タンパク質部分との結合体が提供される。一実施形態では、非タンパク質部分はカーボンナノチューブである（Kam外，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102：11600-11605（2005））。放射線は任意の波長のものであることができ、通常の細胞に害を与えないが、抗体・非タンパク質部分に近い細胞が死滅する温度にまで非タンパク質部分を加熱する波長が挙げられるが、これらに限定されない。

【0263】

B. 抗体を作製する所定の方法

1. 所定のハイブリドーマベース法

本発明のモノクローナル抗体は、まずKohler外，Nature，256：495（1975）に記載され、さらにヒト・ヒトハイブリドーマに関するHong外，Hybridoma，14（3）：253-260（1995）、Harlow外，Antibodies：A Laboratory Manual（Cold Spring Harbor Laboratory Press，第2版，1988）；Hammerling外，Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681（Elsevier，N. Y.，1981）及びNi，Xiandai Mianyixue，26（4）：265-268（2006）に記載されたハイブリドーマ法を使用して作製できる。

【0264】

さらなる方法としては、例えば、ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒト天然IgM抗体の産生に関する米国特許第7189826号に記載されたものが挙げられる。ヒトハイブリドーマ技術（トリオーマ技術）がVollmers and Brandlein，Histology and Histopathology，20（3）：927-937（2005）及びVollmers and Brandlein，Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology，27（3）：185-91（2005）に記載されている。

【0265】

他の様々なハイブリドーマ技術については、例えば、US2006/258841；US006/183887（完全ヒト抗体）、US2006/059575；US2005/287149；US2005/100546；US2005/026229；並びに米国特許第7078492号及び同7153507号を参照されたい。ハイブリドーマ法を使用してモノクローナル抗体を産生するための例示的なプロトコルを以下に説明する。一実施形態では、ハムスターなどのマウス又は他の適切な宿主動物を免疫化して、免疫化に使用されるタンパク質に特異的に結合することになる抗体を産生する又は産生することのできるリンパ球を誘発する。抗体は、変異型SMO又はそのフラグメントを含むポリペプチド及びアジュバント、モノホスホリルリピドA（MPL）／トレハロースジコロリノミコレート（TDM）の複数回の皮下（sc）又は腹腔内（ip）注射により動物内で産生される（Ribi Immunochem. Research，Inc.，Hamilton，MT）。変異型SMO又はそのフラグメントを含むポリペプチドは、組換え方法などの当該技術分野で周知の方法を使用して調製でき、それらの方法のいくつかは、本明細書でさらに説明する。免疫化された動物からの血清を抗変異型SMO抗体についてアッセイし、そして任意に追加免疫を投与する。抗変異型SMO抗体を産生する動物からリンパ球を単離する。あるいは、リンパ球を試験管内で免疫化することができる。

【0266】

次いで、リンパ球をポリエチレングリコールなどの好適な融合剤を使用して骨髓腫細胞と融合させてハイブリドーマ細胞を形成させる。例えば、Goding，Monoclonal Antibodies：Principles and Practice，p

p. 59-103 (Academic Press, 1986) を参照されたい。効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの生産を支援し、しかも HAT 培地などの培地に対して感受性である骨髓腫細胞を使用することができる。例示的な骨髓腫細胞としては、マウス骨髓腫株、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター（米国カリフォルニア州サンディエゴ）から入手可能な MOPC-21 及び MPC-11 マウス腫瘍由来のもの、及びアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（米国メリーランド州ロックビル）から入手可能な SP-2 又は X63-AG8-653 細胞が挙げられるが、これらに限定されない。また、ヒト骨髓腫及びマウス・ヒトヘテロ骨髓腫細胞株もヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur 外, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

10

【0267】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、好適な培地、例えば未融合の親骨髓腫細胞の増殖又は生存を阻害する 1 種以上の物質を含有する培地中に播種し増殖させる。親骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT 又は HPR T) を欠く場合には、ハイブリドーマ用の培地は、典型的にはヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン (HAT 培地) を含み、それらの物質は、HGPRT 欠損細胞の増殖を阻害する。いくつかの実施形態では、例えば Even 外, Trends in Biotechnology, 24 (3), 105-108 (2006) に記載されるように、無血清ハイブリドーマ細胞培養方法を使用して、ウシ胎児血清などの動物由来の血清の使用を低減させる。

20

【0268】

ハイブリドーマ細胞培養の生産性を向上させるためのツールとしてのオリゴペプチドは、Franek, Trends in Monoclonal Antibody Research, 111-122 (2005) に記載されている。具体的には、標準的な培養培地を、所定のアミノ酸（アラニン、セリン、アスパラギン、プロリン）又はタンパク質加水分解物画分で富化し、そしてアポトーシスを、3~6 個のアミノ酸残基から構成される合成オリゴペプチドによって有意に抑制することができる。ペプチドはミリモル以上の濃度で存在する。

30

【0269】

ハイブリドーマ細胞が増殖している培養培地は、変異型 SMO に結合するモノクローナル抗体の産生についてアッセイすることができる。ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降やラジオイムノアッセイ (RIA) 又は酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) などの試験管内結合アッセイによって決定できる。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばスキャッチャード分析法によって決定できる。例えば、Munson 外, Anal. Biochem., 107: 220 (1980) を参照されたい。

【0270】

所望の特異性、親和性及び／又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定した後に、クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、そして標準的な方法により増殖させることができる。例えば、Goding (前出) を参照されたい。この目的に適した培養培地としては、例えば D-MEM 又は RPMI-1640 培地が挙げられる。さらに、ハイブリドーマ細胞は、動物において腹水腫瘍として生体内で増殖できる。サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、好適には、培養培地、腹水若しくは血清から又は例えばプロテイン A-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手順によって分離される。ハイブリドーマ細胞からのタンパク質の単離のための手順の一つが US 2005/176122 及び米国特許第 6919436 号に記載されている

40

50

。この方法は、結合プロセスにおいて、リオトロピック塩などの最小限の塩を使用すること、いくつかの実施形態では、また溶出プロセスにおいて少量の有機溶媒を使用することを含む。

【0271】

2. 所定のライブラリースクリーニング方法

本発明の抗体を、コンビナトリアルライブラリーを使用することによって作製して、1以上の所望の活性を有する抗体をスクリーニングすることができる。例えば、ファージディスプレイライブラリーを作製し、このようなライブラリーを所望の結合特性を有する抗体についてスクリーニングするための様々な方法が当該技術分野において知られている。このような方法は、Hoogenboom外、Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien外著, Human Press, Totowa, NJ, 2001)に一般的に記載されている。例えば、Lee外, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93に記載されているように目的の抗体を生成する方法の一つは、ファージ抗体ライブラリーを使用することである。

【0272】

原則として、合成抗体クローンは、ファージコートタンパク質に融合した抗体可変領域(Fv)の様々なフラグメントを表示するファージを含むファージライブラリーをスクリーニングすることによって選択される。このようなファージライブラリーは、所望の抗原に対するアフィニティークロマトグラフィーによって選別される。所望の抗原に結合することができるFvフラグメントを発現するクローンを抗原に吸着させ、それによってライブラリー中における非結合クローンから分離する。その後、結合クローンを抗原から溶出させ、そして抗原吸着/溶出の追加サイクルによりさらに濃縮することができる。本発明の抗体のいずれかは、Kabatt外, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3に記載されるように、好適な抗原スクリーニング手法を設計して目的のファージクローンを選択し、その後目的のファージクローン及び好適な定常領域(Fc)配列からのFv配列を使用して全長抗体クローンを構築することにより得ることができる。

【0273】

所定の実施形態では、抗体の抗原結合ドメインは、約110アミノ酸の2個の可変(V)領域、それぞれ軽(VL)鎖及び重(VH)鎖から形成され、両方とも3個の超可変ループ(HVR)又は相補性決定領域(CDR)を与える。可変ドメインは、Winter外, Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994)に記載されるように、VH及びVLが短い柔軟なペプチドを介して共有結合した単鎖Fv(scFv)フラグメント又はそれぞれ定常ドメインに融合しかつ非共有結合的に相互作用するFabフラグメントとしてファージ上に機能的に表示できる。本明細書で使用するときに、scFvコード化ファージクローン及びFabコードファージクローンを、まとめて「Fvファージクローン」又は「Fvクローン」という。

【0274】

VH及びVL遺伝子のレパートリーをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって別々にクローニングし、そしてファージライブラリーにおいてランダムに組み換えることができ、次いで、これをWinter外, Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994)に記載されるように抗原結合クローンについて探索することができる。免疫化源からのライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要なしに免疫原に高親和性抗体を与える。あるいは、Griffiths外, EMBO J, 12:725-734 (1993)に記載されるように、ナイーブなレパートリーをクローニングして、任意の免疫源なしに広範囲の非自己抗原のみならず自己抗原にヒト抗体の単一源を与える。最後に、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992)に記載されるように、ナイーブライブラリーを、幹細胞か

らの非再編成V遺伝子セグメントをクローニングし、そしてランダム配列を含有するPCRプライマーを使用して合成的に作製して高度可変CDR3領域をコードし、そして試験管内で再配置を達成することができる。

【0275】

所定の実施形態では、繊維状ファージを使用して、マイナーコートタンパク質pI I Iへの融合によって抗体フラグメントを表示する。抗体フラグメントは、例えばMarks外, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)に記載されているようにVH及びVLドメインが柔軟なポリペプチドスパーサーにより同じポリペプチド鎖に結合した一本鎖Fvフラグメント又はHoogenboom外, Nucleic Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)に記載されるように一方の鎖がpI I Iに融合され、他方が細菌宿主細胞のペリプラズムに分泌される(その際、Fabコートタンパク質構造の組立が野生型コートタンパク質の一部を置換することによってファージ表面上に表示されるようになる) Fabフラグメントとして表示できる。

10

【0276】

一般に、抗体遺伝子フラグメントをコードする核酸は、ヒト又は動物から収集した免疫細胞から得られる。抗変異型SMOクローンに有利なライブラリーが望ましい場合には、被験体を変異型SMOで免疫化して抗体応答を生じさせ、そして脾臓細胞及び／又は循環性B細胞その他の末梢血リンパ球(PBL)をライブラリー構築のために回収する。一実施形態では、抗変異型SMOクローンに有利なヒト抗体遺伝子フラグメントライブラリーは、機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子アレイを保有する(かつ機能的内因性抗体産生系を欠く)トランスジェニックマウスにおける抗変異型SMO抗体応答を生じさせることによって得られ、それによって変異型SMOの免疫化が変異型SMOに対するヒト抗体を産生するB細胞をもたらす。ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの作製について以下に説明する。

20

【0277】

抗変異型SMO反応性細胞集団のさらなる濃縮は、適切なスクリーニング手法を使用して変異型SMO特異的膜結合抗体を発現するB細胞を単離することによって、例えば変異型SMOアフィニティークロマトグラフィーを用いた細胞分離又は蛍光色素標識変異型SMOに対する細胞の吸着、その後のフロー活性化細胞選別(FACS)によって得ることができる。

30

【0278】

あるいは、非免疫化ドナーからの脾臓細胞及び／又はB細胞或いは他のPBLの使用により、可能な抗体レパートリーの良い提示が得られ、また、任意の動物(ヒト又は非ヒト)種を使用して抗体ライブラリーの構築が可能になり、その際、変異型SMOは抗原性ではない。試験管内抗体遺伝子構築物に組み込まれるライブラリーについて、幹細胞を被験体から採取して、再編成されていない抗体遺伝子セグメントをコードする核酸を与える。目的の免疫細胞は、様々な動物種、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ、オオカミ、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ウマ、及びトリ種などから得ることができる。

【0279】

抗体可変遺伝子セグメント(VH及びVLセグメントを含む)をコードする核酸を目的の細胞から回収し、そして増幅させる。再構成VH及びVL遺伝子ライブラリーの場合には、所望のDNAは、Orlandi外, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)に記載されるように、リンパ球からゲノムDNA又はmRNAを単離し、その後再構成VH及びVL遺伝子の5'及び3'末端に合致するプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、それによって発現のための多様なV遺伝子レパートリーを作製することができる。V遺伝子は、Orlandi外, (1989)及びWard外, Nature, 341: 544-546 (1989)に記載されるように、成熟Vドメインをコードするエクソンの5'末端でのバックプライマー及びJセグメント内に基づくフォワードプライマーを用いて、cDNA及びゲノムDNAから増幅できる。しかしながら、cDNAから増幅するために、バックプライマ

40

50

ーは、Jones外, *Biotechnol.*, 9:88-89 (1991)に記載されるようにリーダーエクソンに基づくこともでき、フォワードプライマーは、Sastrey外, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86:5728-5732 (1989)に記載されるように定常領域内に基づくこともできる。相補性を最大化するために、Orlandi外 (1989) 又はSastrey外 (1989) に記載されるように縮重をプライマーに組み込むことができる。所定の実施形態では、ライブラリーの多様性は、例えばMarks外, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)の方法に記載されるように又はOrum外, *Nucleic Acids Res.*, 21:4491-4498 (1993)の方法に記載されるように、免疫細胞核酸サンプル中に存在する利用可能な全てのVH及びVL配置を増幅するために各V遺伝子ファミリーに標的化されたPCRプライマーを使用することによって最大化される。発現ベクターへの増幅DNAのクローニングについては、まれな制限部位を、Orlandi外 (1989) に記載されるようにPCRプライマー内に一方の末端のタグとして又はClackson外, *Nature*, 352:624-628 (1991)に記載されるようにタグプライマーによるさらなるPCR増幅によって導入することができる。

【0280】

合成的に再配列したV遺伝子のレパートリーは、V遺伝子セグメントから試験管内で誘導できる。ヒトVH遺伝子セグメントの大部分はクローニングされ、配列決定され (Tomlinson外, *J. Mol. Biol.*, 227:776-798 (1992)に報告)、マッピングされている (Matsuda外, *Nature Genet.*, 3:88-94 (1993)に報告); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992)に記載されるように、これらのクローニングされたセグメント (H1及びH2ループの全ての主要なコンホメーションを含む) を使用して、多様な配列及び長さのH3ループコードするPCRプライマーで多様なVH遺伝子レパートリーを生成することができる。また、VHレパートリーは、Barbas外, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4457-4461 (1992)に記載されるように、単一の長の長いH3ループに焦点を当てた全ての配列多様性を使用して作製することもできる。ヒトVk及びVλセグメントはクローニングされ、配列決定されており (Williams and Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23:1456-1461 (1993)に報告)、そしてこれを使用して合成軽鎖レパートリーを作製することができる。VH及びVLの折りたたみの範囲並びにL3及びH3の長さに基づく合成V遺伝子レパートリーは、かなりの構造的多様性の抗体をコードすることになる。V遺伝子コードDNAの増幅後に、生殖系列V遺伝子セグメントは、Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992)の方法に従って新件環内で再配列できる。

【0281】

抗体フラグメントのレパートリーは、いくつかの方法でVH及びVL遺伝子レパートリーを組み合わせることによって構築できる。それぞれのレパートリーは異なるベクターで作製でき、例えばHogrefe外, *Gene*, 128:119-126 (1993)に記載されるようにこれらのベクターを試験管内で再結合させることができ、又はコンビナトリアル感染、例えばWaterhouse外, *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)に記載されたloxpシステムによって生体内で再結合させることができる。生体内組換えのアプローチは、大腸菌形質転換効率によって課されるライブラリーサイズの制限を克服するために、Fabフラグメントの2本鎖の性質を利用する。ナイーブVH及びVLレパートリーは、別々にクローニングされ、一方がファージミッドにクローニングされ、他方はファージベクターにクローニングされる。その後、これら2つのライブラリーをファージミッド含有細菌のファージ感染によって合成し、その結果、それぞれの細胞は異なる組合せを含み、ライブラリーサイズは、存在する細胞の数 (約 10^{12} クローン) によって制限されることになる。両方のベクターは、生体内組換えシグナルを含み、その結果、VH及びVL遺伝子は単一のレプリコンに組み換えられ、フ

ファージビリオンに同時パッキングされることになる。これら巨大なライブラリーは、良好な親和性（約 10^{-8} Mの K_d^{-1} ）の多数の抗体を与える。

【0282】

また、これらのレパートリーを、例えばBarbas外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991)に記載されるように同じベクターに連続的にクローニングし、又は例えばClackson外, Nature, 352:624-628 (1991)に記載されるようにPCRによって一緒にアセンブルし、その後クローニングすることができる。また、PCRアセンブリを使用して、VH及びVL DNAと、柔軟なペプチドスパーサーをコードするDNAとを結合させて単鎖Fv (scFv) レパートリーを形成させることもできる。さらに別の技術では、Embleton外, Nucl. Acids Res., 20:3831-3837 (1992)に記載されるように、「細胞内PCRアセンブリ」を使用して、PCRによってリンパ球内のVH及びVL遺伝子を組み合わせる、その後連結した遺伝子のレパートリーをクローニングする。

【0283】

ナイーブラライブラリーによって産生された抗体（天然又は合成のいずれか）は、中程度の解離定数（約 $10^6 \sim 10^7$ M $^{-1}$ の K_d^{-1} ）のものであることができるが、親和性成熟は、Winter外 (1994) (前出)に記載されるように二次ライブラリーから構築しかつ再選択することにより試験管内でも模倣できる。例えば、突然変異は、Hawkins外, J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)の方法又はGram外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-3580 (1992)の方法で、エラープロンポリメラーゼを使用することによって試験管内でランダムに導入できる (Leung外, Technique, 1:11-15 (1989)に報告)。さらに、親和性成熟を、1以上のCDRをランダムに突然変異させ、例えば選択された個々のFvクローンにおいて目的のCDRに及ぶランダム配列を有するプライマーによるPCRを使用して、より高い親和性クローンについてスクリーニングすることによって行うことができる。WO96/07754 (1996年3月14日公開)には、軽鎖遺伝子のライブラリーを作製するために、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定領域に変異誘発を誘導するための方法が記載されている。別の効果的なアプローチは、Marks外, Biotechnol., 10:779-783 (1992)に記載されるように、ファージディスプレイにより選択されたVH又はVLドメインと非免疫化ドナーから得られた天然型Vドメイン変異体のレパートリーとを再結合させ、数ラウンドの鎖再配置でさらに高い親和性についてスクリーニングすることである。この技術は、約 10^{-9} M以下の親和性を有する抗体及び抗体フラグメントの生成を可能にする。

【0284】

ライブラリーのスクリーニングは、当該技術分野において知られている様々な技術によって達成できる。例えば、変異型SMOを使用して吸着プレートのウェルを被覆し、吸着プレート上に固定された宿主細胞上で発現させ又は細胞選別に使用し、又はストレプトアビジン被覆ビーズによる捕獲のためにビオチンに結合させ、又はファージディスプレイライブラリーをパニングするための任意の他の方法で使用する。

【0285】

ファージライブラリサンプルと固定化変異型SMOとを、ファージ粒子の少なくとも一部分と吸着材とを結合させるのに適した条件下で接触させる。通常は、pH、イオン強度、温度等を含めた条件は、生理学的条件を模倣するように選択される。固相に結合したファージを洗浄した後に、例えばBarbas外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991)に記載されるように酸によって溶出させ、又は例えばMarks外, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)に記載されるようにアルカリにより溶出させ、又は変異型SMOの抗原競合により、例えばClackson外, Nature, 352:624-628 (1991)の抗原競合法に類似する手順で溶出させる。ファージは、1回目の選択で20~1,000倍

に濃縮できる。さらに、濃縮されたファージを細菌培養で増殖させ、そしてさらなる選択ラウンドに供することができる。

【0286】

選択効率は、洗浄中の解離動態及び単一のファージ上の複数の抗体フラグメントが同時に抗原と結合できるかどうかを含めて多くの要因に依存する。速い解離動態（及び弱い結合親和性）を有する抗体は、短時間の洗浄、多価ファージディスプレイ及び固相における抗原の高い被覆密度を使用することによって保持できる。高い密度は、多価相互作用を介してファージを安定化させるのみのならず、解離したファージの再結合にも有利である。遅い解離速度（及び良好な結合親和性）を有する抗体の選択は、Bass外., Proteins, 8:309-314 (1990) 及びWO92/09690に記載されるような長時間の洗浄及び一価ファージディスプレイ及びMarks外, Biotechnol., 10:779-783 (1992)に記載されるような抗原の低い被覆密度を使用することによって促進できる。

10

【0287】

僅かに異なる親和性を有する異なる親和性のファージ抗体間で変異型SMOについて選択することが可能である。しかしながら、選択された抗体のランダム変異（例えば、いくつかの親和性成熟技術で実施されるような）は、ほとんどが抗原に結合し、いくつかが高い親和性を有するなどの多数の変異体を生じさせる可能性がある。変異型SMOを制限すると、高い親和性のファージはまれにしか競合し得ない。より高い親和性の変異体を全て維持するために、ファージを過剰なビオチン化変異型SMOと共にインキュベートとすることができ、ただしビオチン化変異型SMOは変異型SMOについて一定の標的モル親和性定数よりも低いモル濃度である。その後、高親和性結合ファージをストレプトアビジン被覆常磁性ビーズによって捕獲できる。このような「平衡捕捉」は、抗体を、低い親和性を有するファージの大過剰から2倍程度に高い親和性を有する変異型クローンの単離を可能にする感受性でそれらの結合親和性に依拠して選択することを可能にする。また、固相に結合したファージを洗浄するのに使用される条件を操作して解離定数に基づいて区別することができる。

20

【0288】

抗変異型SMOクローンは活性に基づいて選択できる。所定の実施形態では、本発明は、例えばGDC-0449耐性腫瘍細胞などの変異型SMOを自然に発現する生細胞に結合する抗変異型SMO抗体を提供する。一実施形態では、本発明は、野生型SMOにおいてGDC-0449によって結合されたものと同じ領域に結合する抗変異型SMO抗体を提供する。このような抗変異型SMO抗体に相当するFvクローンは、（1）上記のようなファージライブラリーから抗変異型SMOクローンを単離し、そして任意に好適な細菌宿主内において集団を成長させることによりファージクローンの単離集団を増幅させ、（2）それぞれブロック性及び非ブロック性活性が望まれる変異型SMO及び第2タンパク質を選択し、（3）抗変異型SMOファージクローンを固定化変異型SMOに吸着させ、（4）過剰の第2タンパク質を使用して、第2タンパク質の結合決定基と重複又は共有する変異型SMO結合決定基を認識する任意の望ましくないクローンを溶出させ、及び（5）工程（4）後に吸着されたままのクローンを溶出させることによって選択できる。任意に、所望のブロック／非ブロック特性を有するクローンを、本明細書に記載の選択手順を一回以上繰り返すことによってさらに濃縮することができる。

30

40

【0289】

本発明のハイブリドーマ由来モノクローナル抗体又はファージディスプレイFvクローンを、DNAをコードする従来の手順を使用して容易に単離し、そして配列決定する（例えば、ハイブリドーマ又はファージDNA鋳型から目的の重鎖及び軽鎖コード領域を特異的に増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用することによって）。いったん単離されたら、DNAは、発現ベクター内に配置でき、次いでこれを大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞又はそうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髓腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトして

50

、組換え宿主細胞内で所望のモノクローナル抗体の合成を得る。抗体コードDNAの細菌における組換え発現に関する概説論文としては、Skerratt外, Curr. Opin. Immunol., 5:256(1993)及びPluckthun, Immunol. Revs., 130:151(1992)が挙げられる。

【0290】

本発明のFvクローンをコードするDNAを、重鎖及び／又は軽鎖定常領域をコードする既知のDNA配列と組み合わせて（例えば、適切なDNA配列はKabatt外（前出）から得ることができる）、全長又は部分長の重鎖及び／又は軽鎖をコードするクローンを形成することができる。IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE定常領域を含めて任意のアイソタイプの定常領域をこの目的のために使用できること、このような定常領域を任意のヒト又は動物種から得ることができることが分かるであろう。一方の動物種（ヒトなど）の可変ドメインDNAから誘導され、その後他方の動物種の定常領域DNAに融合させて「ハイブリッド」の完全長重鎖及び／又は軽鎖のためのコード配列を形成させたFvクローンは、ここで使用される「キメラ」及び「ハイブリッド」抗体の定義に包含される。所定の実施形態では、ヒト可変DNA由来のFvクローンをヒト定常領域DNAに融合させて全長又は部分長ヒト重鎖及び／又は軽鎖のためのコード配列を形成させる。

【0291】

また、本発明のハイブリドーマに由来する抗変異型SMO抗体をコードするDNAを、例えばハイブリドーマクローン由来の相同マウス配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することによって修飾できる（例えば、Morrison外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)の方法のように）。ハイブリドーマ又はFvクローン由来抗体又はそのフラグメントをコードするDNAを、免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部又は一部を共有結合させることによってさらに修飾できる。このように、本発明のFvクローン又はハイブリドーマクローン由来抗体の結合特異性を有する「キメラ」又は「ハイブリッド」抗体が調製される。

【0292】

3. ベクター、宿主細胞及び組換え方法

また、抗体は、組換え法を使用して製造することもできる。抗変異型SMO抗体の組換え生成のために、抗体をコードする核酸を単離し、そしてさらなるクローニング（DNAの増幅）又は発現のために複製可能なベクターに挿入する。抗体をコードするDNAは容易に単離でき、従来の手順を用いて配列決定できる（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用して）。多くのベクターが利用可能である。ベクター成分としては、一般的に、次の1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない：シグナル配列、複製起点、1個以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター及び転写終結配列。

【0293】

(a) シグナル配列成分

本発明の抗体は、組換えにより直接生成できるのみのならず、異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても生成でき、これは、いくつかの実施形態では、シグナル配列又は成熟タンパク質若しくはポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである。選択される異種シグナル配列は、いくつかの実施形態では、宿主細胞によって認識及びプロセッシング（すなわちシグナルペプチダーゼによって切断）されるものである。天然抗体シグナル配列を認識及びプロセッシングしない原核生物宿主細胞については、シグナル配列を、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp又は熱安定性エンテロトキシンIIリーダーから選択される原核生物シグナル配列によって置換する。酵母分泌のために、天然シグナル配列は、例えば、酵母インペルターゼリーダー、 α 因子リーダー（サッカロミセス及びクルイベロミセス α -因子リーダーを含む）又は酸性ホスファターゼリーダー、C. アルビカンスグルコアミラーゼリーダー又はWO90/13646号トに記載の信号に記載されたシグナルで置換できる。哺乳動物細胞発現では、哺乳

動物シグナル配列ならびにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペス g D シグナルが利用可能である。

【0294】

(b) 複製起点

発現ベクター及びクローニングベクターの両方は、1種以上の選択された宿主細胞内においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。一般に、クローニングベクターでは、この配列は、宿主染色体DNAとは独立にベクターが複製するのを可能にし、かつ、複製起点又は自律複製配列を含むものである。このような配列は、様々な細菌、酵母及びウイルスについてよく知られている。プラスミド pBR322 からの複製起点は、ほとんどのグラム陰性細菌に適しており、2 µ プラスミド起点は酵母に適しており、様々なウイルス起点 (SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV 又は BPV) は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般に、複製起点成分は、哺乳動物発現ベクターには必要ではない (SV40 起点が典型的にはそれのみで利用できる。これは初期プロモーターを含むからである)。

10

【0295】

(c) 選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、選択可能マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含むことができる。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質又は他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、又はテトラサイクリンに対する耐性を付与し、(b) 栄養要求性欠損を補完し、又は (c) 複合培地から利用できない重要な栄養素、例えば、Bacilli のための D-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子を供給するタンパク質をコードする。

20

【0296】

選択スキームの一例は、宿主細胞の成長を停止させる薬剤を使用する。異種遺伝子で首尾よく形質転換された細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を生成するため、選択レジメンを生き残る。このような優性選択の例は、薬剤ネオマイシン、ミコフェノール酸及びハイグロマイシンを使用する。

【0297】

哺乳動物細胞に好適な選択可能マーカーの他の例は、抗体コード核酸を取り込むことのできる細胞の同定を可能にするもの、例えば DHFR、グルタミンシンテターゼ (GS)、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン I 及び II、例えば、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなどである。

30

【0298】

例えば、DHFR 遺伝子で形質転換された細胞は、DHFR の競合的アンタゴニストであるメトトレキサート (Mtx) を含有する培養培地中で形質転換体を培養することによって同定される。これらの条件下では、DHFR 遺伝子は、任意の他の共形質転換核酸とともに増幅される。内因性 DHFR 活性を欠くチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株 (例えば、ATCC CRL-9096) を使用することができる。

【0299】

あるいは、GS 遺伝子で形質転換された細胞は、GS の阻害剤である L-メチオニンシルホキシミンを含む培地中で形質転換体 (Mtx) を培養することによって同定される。これらの条件下では、GS 遺伝子は、任意の他の共形質転換された核酸とともに増幅される。GS 選択／増幅系は、上記の DHFR 選択／増幅系と組み合わせて使用できる。

40

【0300】

別の方法として、形質転換された又は目的の抗体をコードする DNA 配列、野生型 DHFR 遺伝子及びアミノグリコシド 3'-ホスホトランスフェラーゼ (APH) など他の選択可能マーカーで同時形質転換された宿主細胞 (特に内因性 DHFR を含む野生型宿主) を、アミノグリコシド抗生物質、例えば、カナマイシン、ネオマイシン又は G418 などの選択可能マーカーに対する選択剤を含む培地中での細胞増殖により選択できる。米国特許第 4965199 を参照されたい。

50

【0301】

酵母での使用に好適な選択遺伝子は、酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である(Stinchcomb外, Nature, 282:39(1979))。trp1遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠く酵母の突然変異株に対する選択マーカー、例えばATCC番号44076又はPEP4-1を与える。Jones, Genetics, 85:12(1977)。そのときに、酵母宿主細胞ゲノムにおけるtrp1欠損の存在は、トリプトファンの不在下での増殖による形質転換を検出するのに効果的な環境を与える。同様に、Leu2欠損酵母株(ATCC20,622又は38,626)は、Leu2遺伝子を有する既知のプラスミドによって補完される。

【0302】

また、1.6μm環状プラスミドpKD1由来のベクターは、Kluyveromyces酵母の形質転換に使用できる。あるいは、組換えウシキモシンの大規模生産用の発現系がK.lactisについて報告されている。Van den Berg, Bio/Technology, 8:135(1990)。クルイベロミセスの産業的菌株による成熟組換えヒト血清アルブミンの分泌用の安定なマルチコピー発現ベクターも開示されている。Fleer外, Bio/Technology, 9:968-975(1991)。

【0303】

(d) プロモーター成分

発現及びクローニングベクターは、一般に、宿主生物によって認識され、かつ、抗体をコードする核酸に機能的に結合しているプロモーターを含む。原核生物宿主での使用に適したプロモーターとしては、phoAプロモーター、β-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼプロモーター、トリプトファン(trp)プロモーター系、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーターなどが挙げられる。しかしながら、他の公知の細菌プロモーターが好適である。また、細菌系で使用するためのプロモーターは、抗体をコードするDNAに機能的に連結されたシャイン・ダルガノ(SD)配列を有する。

【0304】

真核生物についてはプロモーター配列が知られている。実質的に全ての真核生物遺伝子が、転写が開始される部位からおよそ25~30塩基上流に位置するATリッチ領域を有する。多くの遺伝子の転写開始位置から70~80塩基上流に見出される別の配列は、NC A A T(ここで、Nは任意のヌクレオチドであることができる)領域である。大部分の真核生物遺伝子の3'末端は、コード配列の3'末端にポリAテールを付加するためのシグナルであることができるA A T A A A配列である。これらの配列の全ては、真核生物発現ベクターに好適に挿入される。

【0305】

酵母宿主で使用するのに好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ又は他の糖分解酵素、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ及びグルコキナーゼのためのプロモーターが挙げられる。

【0306】

増殖条件によって制御される転写のさらなる利点を有する誘導性プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、並びにマルトース及びガラクトース利用に関与する酵素のプロモーター領域である。酵母発現での使用に適したベクター及びプロモーターは、さらにEP73,657に記載されている。また、酵母エンハンサーも酵母プロモーターと共に有利に使用される。

【0307】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗体転写は、例えば、ウイルス、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（アデノウイルス2など）、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、シミアンウイルス40（SV40）のゲノムから得られるプロモーター又は異種哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター若しくは免疫グロブリンプロモーター、ヒートショックプロモーターによって制御できるが、ただし、このようなプロモーターは宿主細胞系と適合性であることを条件とする。

【0308】

SV40ウイルスの初期及び後期プロモーターは、好都合には、SV40ウイルスの複製起点をも含むSV40制限フラグメントとして得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、HindIII制限フラグメントとして簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウイルスを使用する哺乳動物宿主内でDNAを発現する系が米国特許第4,419,446号に開示されている。この系の修飾が米国特許第4,601,978号に記載されている。また、単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞におけるヒト β インターフェロンcDNAの発現についてのReyes外, Nature 297:598-601(1982)も参照されたい。あるいは、ラウス肉腫ウイルス長末端リピートをプロモーターとして使用することができる。

10

【0309】

(e) エンハンサーエレメント成分

20

高等真核生物による本発明の抗体をコードするDNAの転写は、ベクターにエンハンサー配列を挿入することによって増大される場合が多い。現在、哺乳動物遺伝子（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、及びインスリン）からの多くのエンハンサー配列が知られている。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用するであろう。例としては、複製起点の後期側にあるSV40エンハンサー（100～270bp）、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側にあるポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。また、真核生物プロモーターの活性化のための増強要素についてのYaniv, Nature 297:17-18(1982)も参照されたい。エンハンサーは、抗体コード配列に対して5'又は3'位でベクターにスプライシングできるが、ただし、いくつかの実施形態では、プロモーターから5'位に位置する。

30

【0310】

(f) 転写終結成分

また、真核生物宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト又は他の多細胞生物由来の有核細胞）において使用される発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含有するであろう。このような配列は、真核生物又はウイルスDNA又はcDNAの5'及び場合によっては3'非翻訳領域から一般に入手できる。これらの領域は、抗体をコードするmRNAの非翻訳部分においてポリアデニル化フラグメントとして転写されるヌクレオチドセグメントを含む。有用な転写終結成分の一つは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。WO94/11026及びそこに開示された発現ベクターを参照されたい。

40

【0311】

(g) 宿主細胞の選択及び形質転換

ここで、ベクターにおいてDNAをクローニングする又は発現させるのに好適な宿主細胞は、上記原核生物、酵母菌又は高等真核生物細胞である。この目的に適した原核生物としては、グラム陰性又はグラム陽性生物などの真性細菌、例えば腸内細菌科、例えば大腸菌、例えばE. coli、エンテロバクター、エルビニア、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ、例えば, Salmonella typhimurium、セラチア、例えばSerratia marcescans及び赤痢菌属、並びに桿菌、例えばB. subtilis及びB. licheniformis（例えば、1989年4月12日に公

50

開されたDD266710に開示された*B. licheniformis* 41P)、シュードモナス属、例えば*P. aeruginosa*及びストレプトマイセス属が挙げられる。可能な*E. coli*クローニング宿主の一つは、*E. coli* 294 (ATCC 31, 446)であるが、そのような*E. coli* B、*E. coli* X1776 (ATCC 31, 537)及び*E. coli* W3110 (ATCC 27, 325)などの他の株も好適である。これらの例は限定ではなく例示である。

【0312】

全長抗体は、抗体融合タンパク質及び抗体フラグメントは、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が必要とされない場合、例えば治療用抗体がそれ自体腫瘍細胞破壊に有効性を示す細胞傷害性剤（例えば毒素）に結合する場合には細菌内で産生できる。全長抗体は、血液循環においてより長い半減期を有する。*E. coli*での酸性はより速く、よりコスト効率的である。細菌内における抗体フラグメント及びポリペプチドの発現については、例えば米国特許第5648237号(Carter外)、米国特許第5789199号(Joly外)、米国特許第5840523号(Simmons外)を参照されたい。これらには、発現及び分泌を最適化するための翻訳開始領域(TIR)及びシグナル配列が記載されている。また、*E. coli*内における抗体フラグメントの発現を記載するCharlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo著, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254も参照されたい。発現後、抗体を可溶性画分中の*E. coli*細胞ペーストから単離することができ、そして例えばアイソタイプに応じてプロテインA又はGカラムに通して精製することができる。最終の精製は、例えばCHO細胞内で発現した抗体を精製するための方法と同様に実施できる。

【0313】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母などの真核微生物は、抗体コードベクターのための好適なクローニング又は発現宿主である。*Saccharomyces cerevisiae*又は一般的なパン酵母が下等真核生物宿主微生物の中で最も一般的に使用されている。しかしながら、多数の他の属、種及び菌株が本明細書で一般的に入手可能でありかつ有用であり、例えば、*Schizosaccharomyces pombe*; クレイペロミセス宿主、例えば、*K. lactis*、*K. fragilis* (ATCC 12, 424)、*K. bulgaricus* (ATCC 16, 045)、*K. wickerhamii* (ATCC 24, 178)、*K. waltii* (ATCC 56, 500)、*K. drosophilae* (ATCC 36, 906)、*K. thermotolerans*及び*K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402, 226); *Pichia pastoris* (EP 183, 070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244, 234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*、例えば*Schwanniomyces occidentalis*; 及び糸状菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム及びアスペルギルス宿主、例えば*A. nidulans*及び*A. niger*などがある。治療用タンパク質の産生のための酵母及び糸状菌の使用を議論する総説については、例えば、Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)を参照されたい。

【0314】

経路が「ヒト化」されており、部分的又は完全にヒトのグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす所定の真菌及び酵母株を選択することができる。例えばLi外., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006) (ピキア・パストリスにおけるグリコシル化経路のヒト化を記載する)及びGerngross (前出)を参照されたい。

【0315】

グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）からも誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。多数

10

20

30

40

50

のバキュロウイルス株及び変異体並びに宿主からの対応する許容昆虫宿主細胞、例えば *Spodoptera frugiperda* (毛虫)、*Aedes aegypti* (蚊)、*Aedes albopictus* (蚊)、*Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ)、及び *Bombyx mori* などが同定されている。トランスフェクションのための様々なウイルス株、例えば、*Autographa californica* NPV の L-1 変異体及び *Bombyx mori* NPV の Bm-5 株が公的に入手可能であり、このようなウイルスは、特に *Spodoptera frugiperda* 細胞のトランスフェクションのために、本発明に係るウイルスとして使用できる。

【0316】

また、綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、ウキクサ (ウキクサ)、アルファルファ (*M. truncatula*)、及びタバコの植物細胞培養物も宿主として利用することができる。例えば、米国特許第 5959177 号、同 6040498 号、同 6420548 号、同 7125978 号及び同 6417429 号 (トランスジェニック植物内で抗体を産生するため PLANTIBODIES (商標) 技術を記載する) を参照されたい。

【0317】

脊椎動物細胞を宿主として使用することができ、また培養中の脊椎動物細胞の増殖 (組織培養) が日常的な手順になっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40 によって形質転換されたサル腎臓 CV1 株 (COS-7、ATCC CRL1651) ; ヒト胚腎臓株 (懸濁培養での増殖のためにサブクロニングされた 293 又は 293 細胞、Graham 外, J. Gen. Virol. 36:59 (1977)) ; ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL10) ; マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)) ; サル腎細胞 (CV1 ATCC CCL70) ; アフリカミドリザル腎細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587) ; ヒト子宮頸癌細胞 (HELA、ATCC CCL2) ; イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL34) ; バッファローラット肝細胞 (BRL3A、ATCC CRL1442) ; ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL75) ; ヒト肝細胞 (Hep G2、HB8065) ; マウス乳腺腫瘍 (MMT060562、ATCC CCL51) ; TRI 細胞 (Mather 外, Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)) ; MRC5 細胞 ; FS4 細胞 ; 及びヒト肝癌株 (Hep G2) である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、例えば DHFR-CHO 細胞 (Urlaub 外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)) 及び骨髓腫細胞株、例えば NS0 及び SP2/0 などが挙げられる。抗体産生に適した所定の哺乳動物宿主細胞系の総説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo 著, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 255-268 を参照されたい。

【0318】

宿主細胞は、抗体の産生のために上記発現又はクローニングベクターで形質転換され、そしてプロモーターを誘導し、形質転換体を選択し又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適切に改変された従来の栄養培地中で培養される。

【0319】

(h) 宿主細胞の培養

本発明の抗体を産生するために使用される宿主細胞は、様々な培地で培養できる。例えばハムの F10 (シグマ社)、最小必須培地 (MEM) (シグマ社)、RPMI-1640 (シグマ社) 及びダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、シグマ社) などの市販の培地が宿主細胞の培養に好適である。

【0320】

さらに、Ham 外, Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnes 外, A

10

20

30

40

50

nal. Biochem. 102:255 (1980)、米国特許第4767704号；同4657866号；同4927762号；同4560655号；又は同5122469号；WO90/03430；WO87/00195；又は再発行米国特許第30985号に記載された培地のいずれかを宿主細胞のための培養培地として使用することができる。これらの培地のいずれは、ホルモン及び／又は他の成長因子（例えば、インスリン、トランスフェリン若しくは上皮増殖因子など）、塩類（塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩など）、緩衝液（HEPESなど）、ヌクレオチド（アデノシン及びチミジンなど）、抗生物質（ゲンタマイシン（商標）など）、微量元素（マイクロモル範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物であると定義される）、グルコース又は同等のエネルギー源を必要に応じて補充できる。また、他の任意の必要な補充物質が当業者に知られている適当な濃度で含まれていてもよい。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞で使用されるものであり、当業者には明らかであろう。

【0321】

(i) 抗体の精製

組換え技術を使用する場合には、抗体を細胞内、細胞膜周辺腔内で産生することができる又は培地に直接分泌させることができる。抗体が細胞内で産生される場合には、第一工程として、粒状の破片、宿主細胞又は溶解フラグメントのいずれかを、例えば、遠心分離や限外濾過によって除去する。Carter外, Bio/Technology 10:163-167 (1992)には、E. coliの細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順が記載されている。簡単に述べると、細胞ペーストを約30分にわたって酢酸ナトリウム（pH3.5）、EDTA及びフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）の存在下で柔らかくする。細胞破片を遠心分離により除去することができる。抗体を培地中に分泌させる場合には、このような発現系からの上清を、一般に、まず、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmiconやMillipore Pellicon限外濾過ユニットを使用して濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を、タンパク質分解を阻害する上記の任意の工程に含めることができ、また、抗生物質を外來性の汚染物の成長を防止するために含めることができる。

【0322】

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製できる。アフィニティーリガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテインAを使用して、ヒト $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 又は $\gamma 4$ 重鎖に基づいて抗体を精製することができる（Lindmark外, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)）。プロテインGが全てのマウスアイソタイプ及びヒト $\gamma 3$ に推奨される（Guss外, (1986) EMBO J. 5:1567-1575）。アフィニティーリガンドが結合するマトリックスはアガロースである場合が多いが、他のマトリックスも利用可能である。制御された細孔ガラス又はポリ（スチレンジビニル）ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスは、アガロースで達成できるよりも速い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体が C_H3 ドメインを含む場合には、Bakerbond ABX（商標）樹脂（J. T. Baker, Phillipsburg, NJ）が精製に有用である。また、タンパク質精製のための他の技術、例えばイオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上でのクロマトグラフィー、陰イオン又は陽イオン交換樹脂（ポリアスパラギン酸カラムなど）上でのヘパリンSEPHAROSE（商標）クロマトグラフィーでのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE及び硫酸アンモニウム沈殿も回収されるべき抗体に応じて利用可能である。

【0323】

任意の予備的精製工程後に、目的の抗体と汚染物とを含む混合物を、約2.5～4.5のpHの溶離緩衝液を使用して低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、いくつかの実施形態では低塩濃度（例えば、約0～0.25Mの塩）で実施できる。

【0324】

一般に、研究、試験及び臨床に使用するための抗体を調製する様々な方法が当該分野で十分に確立されており、これは上記方法と整合し及び／又は目的の特定の抗体について当業者により適切とみなされている。

【0325】

C. 免疫複合体

また、本発明は、化学療法剤、薬剤、成長阻害剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物若しくは動物起源の酵素的に活性な毒素又はそのフラグメント）又は放射性同位体（すなわち、放射性結合体）といった1種以上の細胞毒性剤にコンジュゲートした抗体を含む（区別なく「抗体・薬剤結合体」又は「ADC」という。）免疫複合体を提供する。

10

【0326】

免疫複合体は、癌の治療において細胞傷害性薬剤、すなわち、細胞を死滅させる又は細胞の成長若しくは増殖を阻害する薬剤の局所送達のために使用されている（Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5: 543-549; Wu外 (2005) Nature Biotechnology 23 (9): 1137-1146; Payne, G. (2003) i3: 207-212; Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19: 605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Deliv. Rev. 26: 151-172; 米国特許第4975278号）。免疫複合体は、腫瘍への薬剤成分の標的送達及び細胞内蓄積を可能にし、ここで、非結合型薬物の全身投与は、正常細胞のみならず排除しようとする腫瘍細胞に対する許容できないレベルの毒性もたらしめることがある（Baldwin外, Lancet (Mar. 15, 1986) pp. 603-05; Thorpe (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」, Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (A. Pinchera外著) pp. 475-506。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の両方がこれらの戦略において有用であると報告されている（Rowland外, (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21: 183-87）。これらの方法において使用される薬物としては、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキサート及びビンデシンが挙げられる（Rowland外 (1986) 前出）。抗体・毒素複合体で使用される毒素は、細菌毒素、例えばジフテリア毒素、植物毒素、例えばリシン、小分子毒素、例えばゲルダナマイシン（Mandler外 (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92 (19): 1573-1581; Mandler外 (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10: 1025-1028; Mandler外 (2002) Bioconjugate Chem. 13: 786-791）、メイタンシノイド（EP 1391213; Liu外, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. US A 93: 8618-8623）、及びカリケアマイシン（Lode外 (1998) Cancer Res. 58: 2928; Hinman外 (1993) Cancer Res. 53: 3336-3342）が挙げられる。毒素は、DNA結合、又はトポイソメラーゼ阻害、チューブリン結合を含めたメカニズムによってそれらの細胞毒性効果を発揮することができる。いくつかの細胞傷害性薬剤は、大きな抗体又はタンパク質受容体リガンドに結合した場合には非活性又は低活性になる傾向がある。

20

30

40

【0327】

ZEVALIN（登録商標）（イブリツモマブチウキセタン、バイオジェン／Idc社）は、正常及び悪性Bリンパ球の表面に見出されるCD20抗原に対するマウスIgG1カップモノクローナル抗体とチオ尿素リンカー・キレート剤によって結合した111In又は90Y放射性同位体とから構成される抗体・放射性同位元素複合体である（Wis

50

eman外(2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman外(2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig外(2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig外(2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。ZEVALLINはB細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)に対して活性を有するが、投与はほとんどの患者では重症及び長期の血球減少をもたらす。MYLOTARG(商標)(ゲムツズマブ・オゾガミシン、Wyeth Pharmaceuticals社)、すなわちカリケアマイシンに結合したhuCD33抗体から構成される抗体・薬剤複合体が注射による急性骨髄性白血病の治療のために2000年に承認された(Drugs of the Future(2000)25(7):686; 米国特許第4970198号; 同5079233号; 同5585089号; 同5606040号; 同5693762号; 同5739116号; 同5767285号; 同5773001号)。カンツズマブ・メルタンシン(Immunogen社)、すなわちメイタンシノイド薬剤部分DM1にジスルフィドリンカーSPPを介して結合したhuC242抗体からなる抗体・薬剤複合体は、結腸、膀胱、胃、及び他の癌などのCanAgを発現する癌の治療のためにフェーズII試験に進んでいる。MLN-2704(Millennium Pharm.、ZL Biologics、Immunogen社)、すなわちメイタンシノイド薬剤部分DM1に結合した抗前立腺特異的膜抗原(PSMA)モノクローナル抗体からなる抗体・薬剤複合体が前立腺腫瘍の潜在的な治療のために開発中である。アウリスタチンペプチド、オーリスタチンE(AE)及びモノメチルアウリスタチン(MMAE)、すなわちドラスタチンの合成アナログは、キメラモノクローナル抗体cBR96(癌細胞上のルイスYに特異的)及びcAC10(血液悪性腫瘍上のCD30に特異的)にコンジュゲートされ(Doronina外(2003) Nature Biotechnol. 21(7):778-784)、そして治療開発中である。

【0328】

所定の実施形態では、免疫複合体は、抗体及び化学療法剤又は他の毒素を含む。免疫複合体の生成に有用な化学療法剤は本明細書に記載されている(例えば上記)。使用することができる酵素的に活性な毒素及びそのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖(緑膿菌由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンタンパク質、Phytolacca americanaタンパク質(PAPI、PAPII及びPAP-S)、momordica charantia阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonaria officinalis阻害剤、ゲロニン、マイトゲリン、レストリクトシン、エノマイシン及びトリコテセンが挙げられる。例えば1993年10月28日に公開されたWO93/21232を参照されたい。様々な放射性核種が放射結合抗体の産生のために利用可能である。例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及び ^{186}Re が挙げられる。抗体と細胞障害剤との複合体は、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル(スベリン酸ジスクシンイミジルなど)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)、ビスアジド化合物(例えばビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート(トルエン2, 6-ジイソシアネートなど)及びビス活性フッ素化合物(1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンなど)を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素をVitetta外, Science, 238:1098(1987)に記載されるように調製することができる。炭素14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン酢酸(MX-DTPA)が放射性ヌクレオチドの抗体への結合のためのキレート剤の例である。WO94/11026を参照されたい。

【0329】

また、抗体とカリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコセン及びCC1065並びに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体といった1種以上の小分子毒素との結合体もここでは意図される。

【0330】

1. メイタンシン及びメイタンシノイド

いくつかの実施形態では、免疫複合体は、1種以上のメイタンシノイド分子に結合した抗体（全長又はフラグメント）を含む。

【0331】

メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害することによって作用する有糸分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初に、東アフリカの低木 *Maytenus serrata* から単離された（米国特許第3,896,111号）。その後、ある種の微生物もメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルなどのメイタンシノイドを産生することが発見された（米国特許第4,151,042号）。合成メイタンシノール並びにその誘導体及びアナログは、例えば次の米国特許に開示されている：4,137,230；4,248,870；4,256,746；4,260,608；4,265,814；4,294,757；4,307,016；4,308,268；4,308,269；4,309,428；4,313,946；4,315,929；4,317,821；4,322,348；4,331,598；4,361,650；4,364,866；4,424,219；4,450,254；4,362,663；及び4,371,533。

【0332】

メイタンシノイド薬剤部分は、抗体薬剤複合体における魅力的な薬剤部分である。というのは、これらのものは、(i)発酵又は化学修飾、発酵産物の誘導体化によって比較的準備しやすく、(ii)抗体に対する非ジスルフィドリンカーによる結合に適した官能基を有する誘導体化に適しており、(iii)血漿中で安定であり、及び(iv)様々な腫瘍細胞株に対して有効だからである。

【0333】

メイタンシノイドを含む免疫複合体、その製造方法及びそれらの治療用途は、例えば、米国特許第5,208,020号、同5,416,064号並びに欧州特許EP0425235B1に開示されている。これらの開示をここに明示的に援用する。Liu外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242に結合したDM1と示されるメイタンシノイドを含む免疫複合体が記載されている。この複合体は、培養された結腸癌細胞に対して極めて細胞毒性であることが分かり、また生体内腫瘍増殖アッセイにおいて抗腫瘍活性を示した。Charlton外, Cancer Research 52:127-131 (1992) には、メイタンシノイドがヒト結腸癌細胞株上の抗原に結合するマウス抗体A7又はHER-2/neu発癌遺伝子に結合する他のマウスモノクローナル抗体TA-1にジスルフィドリンカーを介して結合した免疫複合体が記載されている。TA-1メイタンシノイド複合体の細胞毒性は、細胞当たり 3×10^5 のHER-2表面抗原を発現するヒト乳癌細胞株SK-BR-3について試験管内で試験された。この薬剤複合体は、遊離メイタンシノイド剤に類似する細胞障害度を達成したところ、これは、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増やすことによって増大できた。A7メイタンシノイド複合体は、マウスにおいて低い全身性細胞障害性を示した。

【0334】

抗体・メイタンシノイド複合体は、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性を有意に減少させることなく、メイタンシノイド分子に抗体を化学的に結合させることにより調製される。例えば、米国特許第5,208,020号参照（その開示は本明細書において参照により援用される）。抗体分子当たり結合した平均3～4個のメイタンシノイド分子は、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞の細胞毒性を増強するのに有効性を示したが、毒素／抗体の1分子であっても裸抗体の使用について細

胞傷害性を増強することが期待される。メイタンシノイドは、当該分野で周知であり、かつ、既知の技術によって合成又は天然源から単離できる。好適なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5, 208, 020号並びに他の特許及び上で言及した非特許刊行物に開示されている。いくつかの実施形態では、メイタンシノイドは、芳香族環又はメイタンシノール分子の他の位置で修飾されたメイタンシノール及びメイタンシノールアナログ、例えば様々なメイタンシノールエステルである。

【0335】

当該技術分野においては、抗体・メイタンシノイド複合体を作製するために知られている多くの結合基、例えば米国特許第5, 208, 020号又は欧州特許第0425235 B1号、Chari外, Cancer Research 52:127-131 (1992) 及び2004年10月8日に出願された米国特許出願公開第10/960602号に記載されたものが存在する。これらの開示はここに明示的に援用される。リンカー成分SMCCを含む抗体・メイタンシノイド複合体は、2004年10月8日に出願された米国特許出願公開第10/960602号に開示されるように調製できる。連結基としては、上記特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定基、光不安定基、ペプチダーゼ不安定基、又はエステラーゼ不安定性基、ジスルフィド及びチオエーテル基をいくつかの実施形態で使用する事ができる。追加の連結基は、本明細書に記載及び例示されている。

【0336】

抗体及びメイタンシノイドとの複合体は、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (ジメチルアジピミデートHClなど)、活性エステル (スベリン酸ジスクシンイミジルなど)、アルデヒド (グルタルアルデヒドなど)、ビスアジド化合物 (ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス(p-ジアゾニウム)エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート (トルエン2, 6-ジイソシアネートなど) 及びビス活性フッ素化合物 (1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンなど) を使用して作製できる。いくつかの実施形態では、カップリング剤としては、ジスルフィド結合を与えるためのN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP) (Carlsson外, Biochem. J. 173:723-737 (1978)) 及びN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート (SPP) が挙げられる。

【0337】

リンカーは、結合の種類に応じて、様々な位置でメイタンシノイド分子に結合できる。例えば、エステル結合は、従来のカップリング技術を使用してヒドロキシル基との反応により形成できる。この反応は、ヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で生じることができる。一実施形態では、結合は、メイタンシノール又はメイタンシノールアナログのC-3位で形成される。

【0338】

2. アウリスタチン及びドラスタチン

いくつかの実施形態では、免疫複合体は、ドラスタチン又はドラスタチンペプチドアナログ及び誘導体、アウリスタチンに結合した抗体を含む (米国特許第5635483号; 同5780588号)。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管ダイナミクス、GTP加水分解並びに核及び細胞分裂に干渉することが示されており (Woynke外 (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)、また抗癌 (米国特許第5663149号) 及び抗真菌活性 (Pettit外1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965) を有する。ドラスタチン又はアウリスタチン薬剤部分は、ペプ

チド薬剤部分のN（アミノ）末端又はC（カルボキシル）末端を介して抗体に結合できる（WO02/088172）。

【0339】

代表的なアウリスタチンの実施形態としては、「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」、2004年11月5日出願された米国特許出願公開第10/983340号に開示されたN末端結合モノメチルアウリスタチン薬剤部分DE及びDFを含む。これらの開示は、その全体が参照により援用される。

【0340】

典型的には、ペプチド系薬剤部分は、2個以上のアミノ酸及び／又はペプチドフラグメント間でペプチド結合を形成することによって調製できる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野でよく知られている液相合成法に従って調製できる（E. Schroder and K. Lubke, 「The Peptides」, volume 1, pp76-136, 1965, Academic Pressを参照）。アウリスタチン／ドラスタチン薬剤部分は、次の方法に従って調製できる：米国特許第5635483号；米国特許第5780588号；Pettit外（1989）J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465；Pettit外（1998）Anti-Cancer Drug Design 13:243-277；Pettit, G. R. 外, Synthesis, 996, 719-725；及びPettit外（1996）J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863。また、Doronina（2003）Nat Biotechnol 21（7）:778-784；「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」、2004年11月5日出願された米国特許出願公開第10/983340号も参照されたい。これらの文献は、その全体が参照により援用される（例えば、リンカーに結合したMMAE及びMMAFなどのモノメチルバリン化合物を調製するリンカー及び方法が開示される）。

【0341】

3. カリケアマイシン

他の実施形態では、免疫複合体は、1個以上のカリケアマイシン分子に結合した抗体を含む。抗生物質のカリケアマイシンファミリーは、ピコモル以下の濃度で二本鎖DNA破壊を生じさせることができる。カリケアマイシンファミリーの結合体の調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号（全てアメリカンシアナミド社）を参照されたい。使用可能なカリケアマイシンの構造的アナログとしては、 γ 1I、 α 2I、 α 3I、N-アセチル- γ 1I、PSAG及び θ 1Iが挙げられるが、これらに限定されない（Hinman外, Cancer Research 53:3336-3342（1993）、Lode外, Cancer Research 58:2925-2928（1998）及び上記American Cyanamid社の米国特許）。抗体が結合できる他の抗腫瘍剤は、抗葉酸剤であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAの両方は細胞内に作用部位を有し、かつ、形質膜を容易に通過しない。したがって、抗体仲介インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞取り込みは、細胞障害効果を大きく向上させる。

【0342】

4. 他の細胞毒性剤

抗体に結合できる他の抗腫瘍剤としては、BCNU、ストレプトゾイシン、ビンクリスチン及び5-フルオロウラシル、米国特許第5053394号、同5770710号に記載されているLL-E33288複合体としてまとめて知られている薬剤ファミリー並びにエスペラマイシン（米国特許第5877296号）が挙げられる。

【0343】

使用できる酵素的に活性な毒素及びそのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフ

テリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖 (*Pseudomonas aeruginosa* 由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、*Aleurites fordii* タンパク質、ジアンタンパク質、*Phytolacca americana* タンパク質 (PAPI、PAPII、及びPAP-S)、*Phytolacca americana* 阻害剤、クルシン、クロチン、*sapaonaria officinalis* 阻害剤、ゲロニン、マイトゲリン、レストリクトシン、エノマイシン及びトリコテセンが挙げられる。例えば、1993年10月28日に公開されたWO93/21232を参照されたい。

【0344】

本発明は、抗体と核酸分解活性を有する化合物（例えば、リボヌクレアーゼ又はデオキシなどのDNAエンドヌクレアーゼ；DNAアーゼ）との間に形成された免疫複合体を意図する。

【0345】

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高放射性原子を含むことができる。様々な放射性同位体が放射性結合抗体の産生のために利用可能である。例としては、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及び Lu の放射性同位体が挙げられる。結合体を検出に使用する場合には、このものは、シンチグラフィー研究用の放射性原子、例えば tc^{99m} 又は I^{123} 、又は核磁気共鳴 (NMR) イメージング (磁気共鳴映像、MRI としても知られている) 用のスピン標識、例えば ヨウ素 123、ヨウ素 131、インジウム 111、フッ素 19、炭素 13、窒素 15、酸素 17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含むことができる。

【0346】

放射性又は他の標識を公知の方法で結合体に導入することができる。例えば、ペプチドを生合成することができ、或いは例えば、水素の代わりにフッ素 19 を伴う好適なアミノ酸前駆体を使用する化学アミノ酸合成によって合成することができる。 tc^{99m} 又は I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及び In^{111} などの標識を、ペプチドのシステイン残基を介して結合させることができる。イットリウム-90 を、リジン残基を介して結合させることができる。ヨードゲン法 (Fraker 外 (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:49-57) を使用してヨウ素-123 を組み込むことができる。「*Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy*」(Chatal, CRC Press 1989) には他の方法が詳細に説明されている。

【0347】

抗体と細胞障害剤との複合体は、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えば N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート (SMCC)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (ジメチルアジピミデート HCl など)、活性エステル (スベリン酸ジスクシンイミジルなど)、アルデヒド (グルタルアルデヒドなど)、ビスアジド化合物 (ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビスジアゾニウム誘導体 (ビス(p-ジアゾニウム)エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート (トルエン 2, 6-ジイソシアネートなど)、及びビス活性フッ素化合物 (1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンなど) を使用して作製できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta 外, *Science* 238:1098 (1987) に記載されるように調製できる。炭素-14 標識 1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン酢酸 (MX-DTPA) が放射性ヌクレオチドの抗体への結合のための代表的なキレート剤である。WO94/11026 を参照されたい。このリンカーは、細胞内で細胞毒性薬剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であることができる。例えば、酸不安定リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー (Charlton 外, *Cancer Research*, 52:127-131 (1992) ; 米国特許第 5, 208,

10

20

30

40

50

020号)を使用することができる。

【0348】

これらの化合物としては、次の架橋試薬で調製されるADC：市販されているBMP S、EMCS、GMB S、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIA B、SMCC、SMPB、SMPH、スルホEMCS、スルホGMB S、スルホKMUS、スルホMBS、スルホSIA B、スルホSMCC及びスルホSMPB並びにSVSB（スクシンイミジル（4-ビニルスルホン）ベンゾエート）が挙げられるが、これらに限定されない（例えば、米国イリノイ州ロックフォードのピアス・バイオテクノロジー社から）。第467～498頁、2003年～2004年のアプリケーションハンドブック及びカタログを参照されたい。

10

【0349】

5. 抗体薬剤複合体の調製

抗体薬剤複合体（ADC）において、抗体（Ab）は、リンカー（L）を介して1種以上の薬剤部分（D）、例えば抗体当たり約1～約20個の薬剤部分（ $P=1\sim 20$ ）に結合される。以下に示す式のADCは、いくつかの経路によって、（1）抗体の求核基と二価のリンカー試薬とを反応させて共有結合を介して $Ab-L$ を形成させ、その後薬剤部分Dと反応させること；及び（2）薬剤部分の求核基と二価のリンカー試薬とを反応させて共有結合を介して $D-L$ を形成させ、その後抗体の求核基と反応させることを含めて当業者に知られている有機化学反応、条件及び試薬を使用して調製できる。ADCを調製するためのさらなる方法は、本明細書に記載されている。

20

$Ab(LD)_p$

【0350】

リンカーは、1種以上のリンカー成分から構成できる。例示的なリンカー成分としては、6-マレイミドカプロイル（「MC」）、マレイミドプロパノイル（「MP」）、バリニン-シトルリン（「val-cit」）、アラニン-フェニルアラニン（「ala-phe」）、p-アミノベンジルオキシカルボニル（「PAB」）、N-スクシンイミジル4-（2-ピリジルチオ）ペンタノエート（「SPP」）、N-スクシンイミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（「SMCC」）、及びN-スクシンイミジル（4-ヨードアセチル）アミノベンゾエート（「SIA B」）が挙げられる。さらなるリンカー成分は、当該分野で公知であり、いくつかは本明細書に記載される。また、「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」、2004年11月5日出願された米国特許出願公開第10/983340号も参照されたい。その内容は、その全体が参照により本明細書で援用される。

30

【0351】

いくつかの実施形態では、リンカーはアミノ酸残基を含むことができる。例示的なアミノ酸リンカー成分としては、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドが挙げられる。例示的なジペプチドとしては、バリニン-シトルリン（vc又はval-cit）、アラニン-フェニルアラニン（af又はala-phe）が挙げられる。例示的なトリペプチドとしては、グリシン-バリニン-シトルリン（gly-val-cit）及びグリシン-グリシン-グリシン（gly-gly-gly）が挙げられる。アミノ酸リンカー成分を含むアミノ酸残基としては、天然型並びにマイナーアミノ酸及び非天然型アミノ酸アナログ、例えばシトルリンが挙げられる。アミノ酸リンカー成分は、特定の酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C及びD、又はプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の選択性の点で設計及び最適化できる。

40

【0352】

抗体上の求核基としては、次のものが挙げられるが、これらに限定されない：（i）N末端アミン基、（ii）側鎖アミン基、例えばリジン、（iii）側鎖チオール基、例えばシステイン、及び（iv）糖ヒドロキシル基又は抗体がグリコシル化されるアミノ基。アミン、チオール及びヒドロキシル基は求核性であり、（i）NHSエステル、HOBT

50

エステル、ハロホルメート及び酸ハロゲン化物などの活性エステル；(i i) ハロアセトアミドなどのアルキル及びベンジルハロゲン化物；(i i i) アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド基を含めたリンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基と共有結合を形成するように反応することができる。所定の抗体は、還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、D T T (ジチオスレイトール) などの還元剤で処理することによる、リンカー試薬との結合のための反応を行ってもよい。このようにして、それぞれのシステイン架橋は、理論的には、2種の反応性のチオール求核基を形成することになる。追加の求核基をリシンと2-イミノチオラン(トラウト試薬)との反応により抗体に導入し、アミンをチオールに転化させることができる。反応性のチオール基は、1、2、3、4個以上のシステイン残基を導入することによって抗体(又はそのフラグメント)に導入することができる(例えば、1個以上の非天然システインアミノ酸残基を含む変異型抗体を調製する)。

10

【0353】

また、抗体薬剤複合体を、リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基と反応することができる求電子性部分を導入するための抗体の修飾によって生成することもできる。グリコシル化抗体の糖を、例えばヨウ素酸酸化試薬で酸化させて、リンカー試薬又は薬剤部分のアミン基と反応することができるアルデヒド又はケトン基を形成させることができる。得られたイミンシッフ塩基は安定な結合を形成することができ、又はこれを例えば水素化ホウ素試薬によって還元して安定なアミン結合を形成させることができる。一実施形態では、グリコシル化抗体の炭水化物部分とガラクトースオキシダーゼ又はメタ過ヨウ素酸ナトリウム(20)のいずれかとの反応が、薬剤上の適当な基と反応することができるタンパク質中におけるカルボニル(アルデヒド及びケトン)基を生じさせることができる(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。別の実施形態では、N末端セリン又はスレオニン残基を含むタンパク質はメタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応し、第1アミノ酸の代わりにアルデヒドを生成することができる(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; 米国特許第5362852号)。このようなアルデヒドは、薬剤部分又はリンカー求核試薬と反応することができる。

【0354】

同様に、薬剤部分上の求核基としては、次のものが挙げられるが、これらに限定されない：アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、及び(i) N H Sエステル、H O B tエステル、ハロホルメート、及び酸ハロゲン化物などの活性エステル；(i i) アルキル及びベンジルハロゲン化物などのハロアセトアミド；(i i i) アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド基を含めてリンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基と共有結合を形成するように反応することができるアリールヒドラジド基。

30

【0355】

あるいは、抗体及び細胞毒性剤を含む融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成によって作製できる。DNAの長さは、互いに隣接する又は複合体の所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域によって分離する複合体の2つの部分をコードするそれぞれの領域を含むことができる。

40

【0356】

さらに別の実施形態では、抗体は腫瘍プレターゲットングにおける利用のための「受容体」(例えばストレプトアビジン)に結合でき、その際、抗体・受容体複合体を患者に投与し、その後クリアリング剤を使用して循環系から未結合複合体を除去し、その後細胞傷害性薬剤(例えば放射性ヌクレオチド)に結合する「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。様々な放射性核種が放射結合抗体の生成のために利用可能である。例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、及び ^{186}Re が挙げられる。

【0357】

V. 方法

50

A. 抗体を有する変異型 SMO の診断方法及び検出方法

一態様では、本発明の抗体は、生物学的サンプル中における変異型 SMO の存在を検出するために有用である。本明細書で使用するときに、用語「検出する」は、定量的又は定性的検出を包含する。所定の実施形態では、生物学的サンプルは、細胞又は腫瘍組織などの組織を含む。

【0358】

一態様では、本発明は、生物学的サンプル中の変異型 SMO の存在を検出する方法を提供する。所定の実施形態では、この方法は、変異型 SMO に対する抗変異型 SMO 抗体の結合を許容する条件下で該生物学的サンプルと該抗変異型 SMO 抗体とを接触させ、そして該複合体が抗変異型 SMO 抗体と変異型 SMO との間で形成されるかどうかを検出する

10

【0359】

一態様では、本発明は、変異型 SMO の発現に関連する薬剤耐性などの変異型 SMO の発現に関連する疾患又は状態を診断する方法を提供する。所定の実施形態では、この方法は、試験細胞と抗変異型 SMO 抗体とを接触させ；変異型 SMO に対する抗変異 SMO 抗体の結合を検出することによって該試験細胞による変異型 SMO の発現レベルを決定し（定量的又は定性的に）；及び試験細胞による変異型 SMO の発現レベルと対照細胞（例えば、試験細胞と同じ組織起源の正常細胞又は野生型 SMO を正常細胞に匹敵するレベルで発現する細胞）による変異型 SMO の発現レベルとを比較することを含み、該対照細胞と比較したときにさらに高い試験細胞による変異型 SMO 発現レベルが変異型 SMO の発現増加と関連する疾患の存在を示す。所定の実施形態では、試験細胞は、変異型 SMO の発現の増加に関連する疾患を有することが疑われる個体から得られる。所定の実施形態では、疾患は、癌又は腫瘍などの細胞増殖性障害である。例えば、腫瘍サンプルでは、SMO 発現の不均一性が存在する場合があると認められる。したがって、例えば、サンプル中において、サンプル中の細胞のサブセットのみが変異型 SMO を発現することができ、そのような発現は、例えば、薬剤耐性と関連するものに十分であると認めら得る。したがって、発現を評価することは、サンプル中における発現を評価し、そしてサンプル中における細胞のサブセットにおいて変異型 SMO タンパク質を検出することを含む。

20

【0360】

診断できる又は薬剤耐性が本発明の抗体を使用して評価できる例示的な疾患としては、髄芽腫、膵臓癌、基底細胞癌が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0361】

所定の他の方法を使用して、変異型 SMO に対する抗体の結合を検出することができる。このような方法としては、当該技術分野で周知の抗原-結合アッセイ、例えばウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイとして、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテイン A イムノアッセイ及び免疫組織化学（IHC）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0362】

所定の実施形態では、抗体は標識される。標識としては、直接検出される標識又は部分（例えば、蛍光、発色、高電子密度、化学発光、及び放射性標識など）並びに酵素又はリガンドなどの、例えば酵素反応又は分子間相互作用を介して間接的に検出される部分が挙げられるが、これらに限定されない。例示的な標識としては、放射性同位元素の³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、及び¹³¹I、蛍光団、例えば希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ（米国特許第 4,737,456 号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、HRP などの色素前駆体を酸化するために過酸化水素を使用する酵素と結合された複素環式オキシダーゼ、例えばウリカーゼ及

40

50

びキサンチンオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、又はミクロペルオキシダーゼ、ピオチン／アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定なフリーラジカルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0363】

所定の実施形態では、抗体は不溶性マトリックスに固定化される。固定化は、溶液中で遊離したままの任意の変異型SMOから抗変異SMO抗体を分離することを伴うことができる。これは、従来、アッセイ手順の前に抗変異型SMO抗体を不溶化させることによって、水不溶性マトリックス又は表面への吸着によって（Bennich外、米国特許第3720760号）、又は共有結合によって（例えば、グルタルアルデヒド架橋を使用して）、又は抗変異型SMO抗体と変異型SMOとの間の複合体の形成後に、例えば免疫沈降によって抗変異型SMO抗体を不溶化することによって達成されている。

10

【0364】

診断又は検出の上記実施形態のいずれかは、抗変異SMO抗体の代わりに又はそれに加えて本発明の免疫複合体を使用して実施できると解される。

【0365】

B. 核酸プローブによる変異型SMOの検出方法

一態様では、本明細書に記載される核酸プローブは、生物学的サンプル中の変異型SMO核酸の存在を検出するために有用である。本明細書で使用するときに、用語「検出する」は、定量的又は定性的な検出を包含する。所定の実施形態では、生物学的サンプルは、腫瘍組織などの細胞又は組織を含む。

20

【0366】

一態様では、本発明は、生物学的サンプル中における変異型SMOをコードする核酸の存在を検出する方法を提供する。所定の実施形態では、この方法は、生物学的サンプルからの核酸とここに記載されるプローブとを接触させ、ストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションを許容する条件下に該プローブを該核酸にハイブリダイズさせ、そして、該複合体が該プローブと該核酸サンプルとの間に形成されているかどうかを検出することを含む。

【0367】

変異型SMOをコードする核酸は、当該分野で知られている任意の方法を用いて検出できる。この方法としては、本明細書に記載されるプローブの使用、又はPCR増幅、rtPCR配列決定、一本鎖高次構造多型（SSCP）、DNAの示差制限消化、ハイブリダイゼーション又は当該技術分野において周知任意の他の方法が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0368】

これらの方法では、細胞内での当該変異型SMOの検出は、変異型SMOの発現増加に関連する疾患の存在を示す（すなわち、GDC-0449などのSm α 阻害剤による治療に対する耐性）。所定の実施形態では、試験細胞は、変異型SMOの発現に関連した耐性腫瘍を有すると疑われる個体から得られる。上で詳述したように、突然変異は、腫瘍サンプルからの細胞のサブセットなどのサンプルからの細胞のサブセットに存在することができる。

40

【0369】

本発明の抗体を用いて診断することができる例示的な疾患としては、髄芽腫、膵臓癌、基底細胞癌が挙げられるが、これらに限定されない。

【0370】

C. 細胞ベースアッセイでの変異型SMOの検出方法

変異型SMOは、当該技術分野で知られている細胞ベースアッセイで検出することができる。この方法としては、変異型SMOを含む疑いのある腫瘍サンプル又は組織の組織学的製剤の試験管内免疫組織化学染色における腫瘍サンプルなどの細胞サンプルの表面への変異型SMO検出抗体の結合が挙げられるが、これらに限定されない。組織サンプルをGDC-0449及びヘッジホッグと接触させる機能アッセイは、Hhシグナル伝達が起こ

50

るかどうかを決定する（例えば、経路成分の活性化、G l i の発現等を測定することによって）。G D C - 0 4 4 9 を使用して破壊することができる H h シグナル伝達経路を使用した任意の機能的アッセイを本発明の方法で使用して変異型 S M O の存在及び活性を決定することができる。

【0371】

D. 変異型 S M O に結合する化合物のスクリーニング方法

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に開示された変異型 S M O タンパク質のいずれかを発現する細胞内においてヘッジホッグシグナリングを阻害することができるヘッジホッグ経路阻害剤のスクリーニング方法を提供する。いくつかの実施形態では、スクリーニングは、単剤又は離散数の薬剤のものである。いくつかの実施形態では、スクリーニングは、薬剤のプールのものである。いくつかの実施形態では、スクリーニングは、ハイスループットスクリーニングである。いくつかの実施形態では、スクリーニングは、化合物の 1 以上のライブラリーのものである（例えば、小分子のライブラリー、アンチセンスオリゴヌクレオチドのライブラリー、又は抗体若しくはペプチドのライブラリー）。いくつかの実施形態では、スクリーニングは、一次アッセイ単独又は一次アッセイと 1 回以上の二次アッセイを含むことができる。いくつかの実施形態では、薬剤をアッセイ（例えばヘッジホッグシグナル伝達アッセイ）（例えば、本明細書に記載の又は当該技術分野において既知の G l i 1 の発現アッセイのいずれかを使用して薬剤に応答した G l i 1 の核酸又はタンパク質の発現を試験することによって）、変異型 S M O タンパク質結合アッセイ（例えば、本明細書に記載の変異型 S M O 結合アッセイのいずれかを使用することによって）、細胞増殖アッセイ（例えば、本明細書に記載の又は当該技術分野において既知の細胞増殖アッセイのいずれかを使用することによって）評価できる。スクリーニングアッセイでの使用は、変異型 S M O タンパク質及び本発明の核酸のための代表的な使用である（例えば、変異型 S M O タンパク質を、細胞を含まない又は細胞ベースアッセイで 사용할ことができる）；変異型 S M O 核酸をベクターに与え、そして使用してスクリーニングアッセイに好適な宿主細胞又は宿主生物内で変異型 S M O タンパク質を発現させることができる。

【0372】

本発明は、変異型 S M O に結合する化合物をスクリーニングするための方法を提供する。いかなる特定の動作モードに限定されるものではないが、G D C - 0 4 4 9 が野生型 S M O を結合させ、変異型 S M O を結合しない方法では、変異型 S M O の阻害剤として作用する化合物が変異型 S M O を結合することが期待される。したがって、変異型 S M O タンパク質又はそのフラグメント、例えば膜貫通領域 6（T M 6）の全て又は一部を含むフラグメントを発現させ、そして当該分野で知られている任意の手段により化合物のライブラリーを使用して結合アッセイを実施することができる。また、G D C - 0 4 4 9 の潜在的な接触点に基づくモデリング手法を使用して G D C - 0 4 4 9 のバリエーションによって表される化合物の小さなライブラリーを使用し、その後変異型 S M O 及び G D C - 0 4 4 9 のバリエーションについて同様の接触点をモデリングすることができる。このようなモデリングプログラム及びアルゴリズムは、当該技術分野で知られている任意のものであることができる。野生型及び変異型 S M O の両方の阻害剤である、変異型 S M O 及び野生型 S M O を結合する化合物を同定することができる。あるいは、変異型 S M O に結合するが、野生型 S M O には結合しないため、変異型 S M O 用の阻害剤である化合物を発見することができる。所定の実施形態では、結合及び／又はいくつかの他の読出し（例えば、ヘッジホッグシグナル伝達）を評価し、そして野生型 S M O 又は好適な対照（例えば、空のベクター）の場合と比較する。

【0373】

一実施形態では、スクリーニングされる化合物は、G D C - 0 4 4 9 の変異体などの小分子化合物である。他の実施形態では、変異型 S M O を結合する化合物は、野生型 S M O に対する G D C - 0 4 4 9 の結合部位と同じ領域にあるエピトープを特異的に認識する抗体である。一実施形態では、抗体は、変異型 S M O の T M 6 のカルボキシ末端部分の領域

に結合し、変異型 SMO 活性を阻害する。

【0374】

その代わりに又はそれに加えて、化合物は、変異型 SMO 活性を阻害する能力についてスクリーニングできる。これらの実施形態では、これらの化合物が変異型 SMO を発現する細胞におけるヘッジホッグシグナル伝達を阻害することができることを評価することができる。これらのアッセイは、無傷のヘッジホッグシグナリング経路を有するが野生型 SMO の代わりに又はそれに加えて変異を有する組換え SMO を発現する細胞で実施できる。これらのアッセイでは、候補阻害剤の存在下又は非存在下でヘッジホッグとインキュベートしたときに活性なヘッジホッグシグナル伝達を有する細胞の能力を決定する。ヘッジホッグシグナリングが候補化合物の存在下で阻害される場合には、このような化合物はヘッジホッグ阻害剤である。いくつかの実施形態では、細胞は野生型及び変異型 SMO の両方を発現し、GDC-0449 及び候補阻害剤と共にインキュベートできる。他の実施形態では、細胞は変異型 SMO のみを発現し、Hh 及び候補阻害剤単独（すなわち、GDC-0449 の非存在下で）でインキュベートできる。Hh シグナル伝達がそのような細胞において減少する又は阻害される場合には、その化合物は変異型 SMO の阻害剤である。

【0375】

いくつかの実施形態では、本発明は、ヘッジホッグ経路阻害剤を同定する方法を提供し、該方法は次の工程を含む：細胞と所定量の試験薬剤とを接触させ、該細胞は、ヘッジホッグタンパク質に応答し又はヘッジホッグシグナル伝達経路の増加したヘッジホッグシグナル伝達及び／又は活性を有し、該細胞は、本明細書に記載の変異型 SMO タンパク質のいずれかを発現し、及び（b）対照と比較して、該試験薬剤が細胞内におけるヘッジホッグシグナル伝達を阻害するかどうかを決定し、ここで、該試験薬剤が対照に対して該細胞内におけるヘッジホッグシグナル伝達を阻害する場合には、該試験剤をヘッジホッグ経路阻害剤として同定する。いくつかの実施形態では、対照（又は比較のための基準）は、野生型 SMO タンパク質（例えば、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する SMO タンパク質）を発現する細胞である。いくつかの実施形態では、対照は、試験剤と接触させた細胞と同じ変異型 SMO タンパク質を発現する細胞であり、ここで、該対照は、変異型 SMO タンパク質が部分的に又は完全に耐性である対照薬剤で処理されていない又は処理されている。いくつかの実施形態では、対照薬剤は、ビスモデギブ、LY2940680、LDE225 及び／又は化合物 5 である。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、変異型 SMO タンパク質に結合するが、野生型 SMO タンパク質には結合しない。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、変異型 SMO タンパク質と野生型 SMO タンパク質の両方に結合する。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、野生型 SMO タンパク質を発現する細胞よりも変異型 SMO タンパク質を発現する細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害するのに有効である。

【0376】

いくつかの実施形態では、本発明は、ヘッジホッグ経路阻害剤を同定する方法を提供し、該方法は次の工程を含む：細胞と所定量の薬剤とを接触させ、該細胞はヘッジホッグタンパク質に応答し或いはヘッジホッグシグナル伝達経路の増大したヘッジホッグシグナル伝達及び／又は活性を有し、該細胞は本明細書に記載の変異型 SMO タンパク質のいずれかを発現し、及び（b）対照と比較して、該薬剤が細胞の成長及び／又は増殖を阻害するかどうかを決定し、その際、該薬剤が対照に対して細胞の成長及び／又は増殖を阻害する場合には、その薬剤をヘッジホッグ経路阻害剤として同定する。いくつかの実施形態では、対照は、野生型 SMO タンパク質（例えば、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する SMO タンパク質）を発現する細胞である。いくつかの実施形態では、対照は、試験剤と接触させた細胞と同じ変異型 SMO タンパク質を発現する細胞であり、該対照は、変異型 SMO タンパク質が部分的に又は完全に耐性である対照薬剤で処理されない又は処理される。いくつかの実施形態では、対照薬剤は、ビスモデギブ、LY2940680、LDE225 及び／又は化合物 5 である。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、変異型 SMO タンパク質に結合するが、野生型 SMO タンパク質には結合しない。いくつかの実施形態では、

試験薬剤は、変異型 SMO タンパク質及び野生型 SMO タンパク質の両方に結合する。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、野生型 SMO タンパク質を発現する細胞よりも変異型 SMO タンパク質を発現する細胞の成長及び／又は増殖を阻害するのに有効である。

【0377】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のスクリーニング方法で使用される細胞は、培養物中である。いくつかの実施形態では、培養中に細胞と接触した薬剤は、細胞培養物中の細胞の少なくとも 10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % 又は 100 % でヘッジホッグシグナル伝達を部分的に又は完全に阻害するのに十分である。いくつかの実施形態では、培養中の細胞と接触した薬剤は、細胞培養物中の細胞の少なくとも 10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % 又は 100 % の細胞増殖速度及び／又は生存率を減少させるのに十分であり、該細胞は、ヘッジホッグを発現若しくは過剰発現している又は活性なヘッジホッグシグナル伝達を有する。

10

【0378】

他の実施形態では、細胞は動物の細胞である。いくつかの実施形態では、動物は、哺乳動物又は他の脊椎動物である。いくつかの実施形態では、動物は出生後である。いくつかの実施形態では、動物は小児である。いくつかの実施形態では、動物は成体である。細胞を試験管内で参照する場合には、細胞は、哺乳動物などの任意の脊椎動物種、例えば齧歯類、ハムスター又はヒトであることができる。試験管内又は生体内において、細胞は癌細胞、例えば原発性癌細胞、転移癌細胞又は癌細胞株である。いくつかの実施形態では、細胞は髄芽腫細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は基底細胞癌細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は母斑性基底細胞癌細胞である。いくつかの実施形態では、細胞はゴーリン症候群細胞である。

20

【0379】

いくつかの実施形態では、細胞は、ヘッジホッグシグナル伝達経路遺伝子内に 1 以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、1 以上の変異はパッチされた状態である。いくつかの実施形態では、パッチ突然変異は機能喪失変異である。いくつかの実施形態では、1 以上の変異は平滑化されている。いくつかの実施形態では、平滑化変異は、平滑化機能獲得型突然変異である。いくつかの実施形態では、機能獲得型平滑化突然変異は構成的に活性な平滑化タンパク質をもたらす。いくつかの実施形態では、1 以上の変異は、サプレッサー融合状態であり、細胞はサプレッサー融合 (SuFu) 機能喪失を有する。いくつかの実施形態では、SuFu 変異は SuFu 活性の部分的な機能喪失をもたらす。いくつかの実施形態では、SuFu 変異は完全な機能喪失 SuFu 活性をもたらす。いくつかの実施形態では、SuFu 突然変異はビスモデギブに対する耐性を付与する。

30

【0380】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のスクリーニング方法のいずれかで試験される薬剤は小分子である。他の実施形態では、薬剤はポリペプチドである。他の実施形態では、薬剤は siRNA アンタゴニストである。

【0381】

本明細書に記載のスクリーニング方法のいずれかのいくつかの実施形態では、変異型 SMO DNA は細胞内で外因的に発現する。いくつかの実施形態では、変異型 SMO DNA は細胞内で安定に発現する。いくつかの実施形態では、変異型 SMO DNA は細胞内で一時的に発現する。

40

【0382】

本発明で利用できる様々なヘッジホッグ経路阻害剤の増殖阻害効果は、当該分野において知られている方法によって、例えば変異型 SMO ポリペプチドを内因的に発現又はそれぞれの変異型 SMO 遺伝子によるトランスフェクション後に発現する細胞を使用して評価できる。例えば、変異型 SMO をコードする DNA をトランスフェクトした適切な腫瘍細胞株及び細胞を、本発明のヘッジホッグ経路阻害剤により数日間 (例えば、2 ~ 7 日) にわたって様々な濃度で処理し、そしてクリスタルバイオレット、MTT で染色し又はいく

50

つかの他の比色若しくはルシフェラーゼベース（例えばCell Titer Glo）アッセイで分析することができる。増殖を測定する別の方法は、このようなヘッジホッグ経路阻害剤の存在下又は非存在下で、処理された細胞による³H-チミジン取り込みを比較することによる。処理後に、細胞を集め、そしてDNAに取り込まれた放射能の量をシンチレーションカウンターで定量する。適切なポジティブコントロールは、選択された細胞株を、成長阻害抗体又はその細胞株の増殖を阻害することが知られている小分子により処理することを含む。生体内での腫瘍細胞の成長阻害は、当該分野において知られている様々な方法で決定できる。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、ヘッジホッグシグナル伝達経路遺伝子内の1以上の変異を有するものである。いくつかの実施形態では、このようなヘッジホッグ経路阻害剤は、試験管内又は生体内でのヘッジホッグ発現腫瘍細胞の細胞増殖を、未処理の腫瘍細胞と比較して約10～25%、約25～100%、30～100%、約50～100%又は約又は70～100%阻害する。成長阻害は、細胞培養において約0.5～30 µg/ml、約0.5 nM～200 nM、約200 nM～1 µM、約1～5 µM又は約5～10 µMのヘッジホッグ経路阻害剤濃度で測定でき、その際、成長阻害は、腫瘍細胞のアンタゴニストへの曝露後1～10日で決定される。アンタゴニストは、約1 µg/kg～約100 mg/kg体重のアンタゴニスト及び/又はアゴニストの投与が抗体又は小分子アンタゴニストの最初の投与から約5日～3ヶ月以内、いくつかの実施形態では約5～30日以内に腫瘍サイズの減少又は腫瘍細胞増殖をもたらす場合には生体内での増殖阻害である。

10

【0383】

20

いくつかの実施形態では、細胞死を誘導するヘッジホッグ経路阻害剤を選択するために、例えばヨウ化プロピジウム（PI）、トリパンプルー又は7AAD取り込みで示される時の膜の完全性の喪失を対照と比較して評価することができる。PI取り込みアッセイは、補体及び免疫エフェクター細胞の非存在下で実施できる。いくつかの実施形態では、変異型SMOタンパク質を発現する発現腫瘍細胞を、培地のみ又は適切なヘッジホッグ経路阻害剤を含有する培地と共にインキュベートする。細胞を3日間インキュベートする。各処理後に細胞を洗浄し、そして細胞塊を除去するために35 mmのストレーナキャップ付き12×75管（管当たり1 ml、処理群当たり3個の管）に等分する。次いで、管にPI（10 µg/ml）を入れる。サンプルを、FACSCAN（登録商標）フローサイトメーター及びFACSCONVERT（登録商標）Cell Questソフトウェア（Be

30

【0384】

いくつかの実施形態では、変異型SMOポリペプチド上のエピトープに結合するヘッジホッグ経路阻害剤をスクリーニングするために、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow and David Lane著（1988）に記載されているような日常的なクロスブロッキングアッセイを実施できる。このアッセイを使用して、試験抗体、ポリペプチド、オリゴペプチド又は他の有機分子が既知のヘッジホッグ経路阻害剤と同じ部位又はエピトープに結合するかどうかを決定することができる。その代わりに又はそれに加えて、エピトープマッピングを当該分野で公知の方法によって実施できる。例えば、変異型SMOタンパク質配列を、例えばアラニンスキニング又は免疫学的に異なるGPCRタンパク質とキメラを作製することによって突然変異誘発して接触残基を同定することができる。変異型抗原を最初にポリクローナル抗体との結合について試験して適切な折り畳みを確保する。別の方法では、変異型SMOタンパク質の異なる領域に相当するペプチドを、試験抗体又は試験抗体及び特徴付けられた又は既知のエピトープを有する抗体との競合アッセイで使用する。

40

【0385】

いくつかの実施形態では、変異型SMOタンパク質又は候補のヘッジホッグ経路阻害剤

50

を、固相上、例えばマイクロタイタープレート上に共有又は非共有結合によって固定化する。非共有結合は、一般的に、固体表面を変異型SMOタンパク質又は候補のヘッジホッグシグナル伝達因子の溶液で被覆し、そして乾燥させることによって達成される。あるいは、固定化される変異型SMOの標的部分に特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を使用して固体表面に固定することができる。このアッセイは、検出可能な標識によって標識できる非固定化成分を固定化成分、固着成分を含む被覆表面に添加することにより実施できる。反応が完了したら、未反応成分を例えば洗浄により除去することができ、そして固体表面に固着した複合体を検出する。元の非固定化成分が検出可能な標識を有する場合には、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が生じたことを示す。元の非固定化成分が標識を有しない場合には、複合体形成を、例えば固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体を使用することにより検出することができる。

10

【0386】

候補のヘッジホッグ経路阻害剤が相互作用するがここで同定したヘッジホッグシグナル伝達ポリペプチドには直接結合しない場合には、そのポリペプチドとの相互作用を、タンパク質・タンパク質相互作用を検出するための周知の方法によってアッセイすることができる。このようなアッセイとしては、伝統的なアプローチ、例えば架橋、共免疫沈降及び勾配又はクロマトグラフィーカラムによる同時精製が挙げられる。さらに、タンパク質・タンパク質相互作用は、Chevray and Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789-5793 (1991)に開示されるようにFields及び共同研究者が記載した酵母ベース遺伝子系を使用することによって監視できる (Fields and Song, Nature (London), 340: 245-246 (1989); Chien外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9578-9582 (1991))。酵母GAL4などの多くの転写活性化因子は、2個の物理的に別個のモジュールドメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写・活性化ドメインとして機能する。上記刊行物に記載の酵母発現系（一般に「2ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性を利用し、2種のハイブリッドタンパク質を使用する。すなわち、標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合した一方、候補活性化タンパク質が活性化ドメインに融合した他方。GAL4活性化プロモーターの制御下でのGAL1-LacZレポーター遺伝子の発現は、タンパク質・タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用性ポリペプチドを含むコロニーを、βガラクトシダーゼに対する発色基質を使用して検出する。2ハイブリッド技術を用いた2種の特異的タンパク質間のタンパク質・タンパク質相互作用を同定するための完全なキット (MATCHMAKER (商標)) がClontech社から市販されている。また、この系は、特定のタンパク質相互作用に参与するタンパク質ドメインをマッピングするのみならず、これら相互作用にとって重要なアミノ酸残基を特定するように拡張することもできる。

20

30

【0387】

アッセイは、当該技術分野でよく特徴付けられているタンパク質・タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ及び細胞ベースアッセイを含めて多様な形式でできる。

40

【0388】

ヘッジホッグシグナル伝達ポリペプチド及び他の細胞内又は細胞外成分（例えば、Costal-2）との相互作用を妨害する薬剤を、当業者に周知の手段によって試験することができる。いくつかの実施形態では、変異型SMOポリペプチド及び細胞内又は細胞外成分を含む反応混合物を、2種の物質の相互作用及び結合条件下及び時間にわたって調製する。いくつかの実施形態では、候補化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応を試験化合物の不存在下及び存在下で実施する。また、プラセボを、ポジティブコントロールを提供するために第3反応混合物に添加することができる。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は細胞外成分との結合（複合体形成）を上記のように監視する。試験薬剤を含有する反応混合物中ではなく対照反応における複合体の形成は、その試験薬剤が

50

試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を妨害することを示す。

【0389】

本発明は、上記アッセイ工程のいずれか1つ又は組み合わせを使用してヘッジホッグ経路阻害剤を同定するための方法を意図する。換言すれば、様々なスクリーニングアッセイを組み合わせ、例えば特定の活性を有するアンタゴニスト同定し又は一方のアッセイで変異型SMOに拮抗する薬剤が無関係のアッセイにおいてヘッジホッグシグナル伝達を阻害することを確認することができる。同定の任意のアッセイ又は方法について、結果を、ポジティブ及び／又はネガティブコントロールを含めた1以上の適切な対照と比較することができる。

【0390】

ヘッジホッグ経路阻害剤をスクリーニング及び／又は同定するための上記のアッセイ方法のいずれかについて、薬剤を単独で又はプールでスクリーニングすることができる。薬剤を、薬剤のライブラリー又は候補薬剤のセットからスクリーニングすることができる。スクリーニングできる好適な薬剤としては、抗体、抗体フラグメント、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、RNAi及び小分子（例えばプロモドメイン阻害剤）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0391】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるスクリーニング方法のいずれかにおいて使用される細胞は、活性化をもたらす又はヘッジホッグシグナル伝達を増加させる遺伝子内において1以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、1以上の変異は、機能のパッチ喪失をもたらすパッチ遺伝子である。いくつかの実施形態では、パッチ遺伝子における1以上の変異は、次の突然変異のうちの1つ以上を有するパッチタンパク質をコードする変異遺伝子をもたらす：S616G、fs251、E380*、Q853*、W926*、P1387S、sp2667、Q501H、fs1017、FS108又はA1380V。

【0392】

いくつかの実施形態では、ヘッジホッグシグナル伝達の活性化をもたらす又は増加させる遺伝子内に1以上の変異は平滑化された状態であり、細胞は平滑化変異を有する。いくつかの実施形態では、平滑化変異は、平滑化機能獲得型突然変異である。いくつかの実施形態では、機能獲得型平滑化変異は構成的に活性な平滑化タンパク質をもたらす。WO2011/028950及びWO2012/047968を参照されたい。これらの各々は参照により援用される。いくつかの実施形態では、平滑化突然変異は、配列番号1の535位に相当する位置での変異である。特定の実施形態では、変異は、配列番号1の562位に相当する位置での変異である。特定の実施形態では、変異は、535位又は配列番号1におけるその対応する位置でのW535Lである。いくつかの実施形態では、平滑化変異は、配列番号1のR562Q位に相当する突然変異である（562位又は配列番号1の562位に相当する位置でのR562Q変異）。いくつかの実施形態では、平滑化突然変異は、配列番号1の412位に相当する位置での突然変異、例えば配列番号1のそのような位置でのL412Fである。いくつかの実施形態では、平滑化変異は、所定の平滑化阻害剤に対して耐性にする別の変異を有する。いくつかの実施形態では、平滑化タンパク質は、配列番号1のアミノ酸位置518又は配列番号1の518位に相当する位置にアミノ酸変化を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸変化は、配列番号1のアミノ酸位置518に相当するアミノ酸位置でのE518K又はE518A置換である。いくつかの実施形態では、平滑化タンパク質は、配列番号1のアミノ酸位置473又は配列番号1の473位に相当する位置にアミノ酸変化を含む。

【0393】

いくつかの実施形態では、1以上の変異は、ヘッジホッグ遺伝子であり、かつ、ヘッジホッグタンパク質の過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、過剰発現したヘッジホッグタンパク質はソニックヘッジホッグタンパク質である。いくつかの実施形態では、過剰発現したヘッジホッグ蛋白質はインディアンヘッジホッグタンパク質である。いくつ

10

20

30

40

50

かの実施形態では、過剰発現したヘッジホッグ蛋白質にはデザートヘッジホッグタンパク質である。

【0394】

いくつかの実施形態では、1以上の変異はサプレッサー融合状態であり、細胞はサプレッサー融合（SuFu又はSUFU）機能喪失を有する。いくつかの実施形態では、これはSuFu活性における機能喪失をもたらす。いくつかの実施形態では、SuFu変異は、髄芽腫、髄膜腫、腺様嚢胞癌、基底細胞癌及び横紋筋肉腫癌細胞内にある。いくつかの実施形態では、SuFu変異は、Brugieres外，2012，JCO，30（17）：2087－2093に記載の突然変異のいずれかである。この文献はその全体が本明細書で援用される。いくつかの実施形態では、SuFu変異は、表2A若しくは表2Bに記載の変異のいずれか又はBrugieres外，2012，JCO，30（17）：2087－2093に記載の突然変異のいずれかである。この文献はその全体が本明細書で援用される。

【0395】

【表2A】

表2A. 生殖細胞系列SUFU変異

MBの診断時の年齢	組織学的サブタイプ	関連する症状	変異の承継	変異
4年	線維形成	発育遅延	NA	10qでの隣接遺伝子の欠失
		前頭隆起、隔離症		IVS1-1A→T
NA	線維形成	なし	NA	143insA
NA	線維形成	放射線場での髄膜腫	NA	
8ヶ月	MBEN	大頭症、手掌及び足底のくぼみ	継承	c.1022+1G>A
<1ヶ月	MBEN	なし	継承	c.72delC
<3ヶ月	MBEN	なし	継承	c.72delC
<1ヶ月	MBEN	なし	継承	c.72insC
6-12ヶ月	線維形成/結節	なし	継承	c.72insC
<6ヶ月	線維形成/結節	なし	継承	c.72insC
12-24ヶ月	MB NOS	なし	継承	c.72insC
22ヶ月	線維形成/結節	なし	NA	c.846insC
23ヶ月	線維形成/結節	なし	NA	c.1022 + 1G>A

略語：MB、髄芽腫；MBEN、広範な小結節形成を有するMB；NA、利用できず；NOS、特定されず。

【0396】

【表 2 B】

表 2 B. 生殖細胞病原性 S U F U 変異

エクソン/イントロン	変異の種類	ヌクレオチド変化 (配列番号9)	結果 (配列番号8)	腫瘍分析
1 イントロン1	スプライス→フレームシフト	c.182+3A>T	p.Thr55fs	利用できず
2 エクソン2	フレームシフト	c.294_295dupCT	p.Tyr99fs	利用できず
3 イントロン2	スプライス→フレームシフト	c.318-10delT	p.Phe107fs	野生型対立遺伝子の欠失
4 エクソン3	大きな重複	c.318-?_454+?dup	p.Glu106-?_Glu152+?dup	UV (c.1022+5G>A)
5 エクソン3	ミスセンス	c.422T>G	p.Met141Arg	利用できず
6 エクソン9	ナンセンス	c.1123C>T	p.Gln375X	利用できず
7 エクソン9	フレームシフト	c.1149_1150dupCT	p.Cys384fs	野生型対立遺伝子の欠失
8 イントロン10	スプライス→フレームシフト	c.1297-1G>C	p.?	利用できず

略称：UV、未知の変異体。

【0397】

いくつかの実施形態では、S u F u 変異は、配列番号 8 において次のアミノ酸位置のいずれかに相当する位置に変異を含む：位置 15、184、123、295、187。所定の実施形態では、S u F u 変異は、P15L、Q184X、R123C、L295fs、又は P187L のいずれか 1 以上を含み、ここで、該変異はその位置又は配列番号 8 における上記位置に相当する位置にある。いくつかの実施形態では、S u F u 変異は、配列番号 9 における c. 1022+1G>A (IVS8-1G>T)、c. 72delC、c. 72insC、143insA、c. 846insC、又は IVS1-1A->T に相当する変異のいずれかである。いくつかの実施形態では、S u F u 変異は、Taylor 外 (2002) Nat Genet 31:306-310 (例えば、IVS8-1G>T (=c. 1022+1G>A)、1129del、P15L 及び Ng の 2 つ (全て +LOH)) ; Slade 外 (2011) Fam Cancer 10:337-342, 2011 (例えば、c. 1022+1G>A ; c. 848insC) ; Pastorino 外 (2009) Am J Med Genet A 149A:1539-1543 (例えば、c. 1022+1G>A) ; Ng 外 (2005) Am J Med Genet A 134:399-403 (例えば、143insA ; IVS1-1A>T) ; Kijima 外 (2012) Fam Cancer 11:565-70 (例えば、c. 550C>T (Q184X)) ; Aavikko 外 (2012) Am J Hum Genet 91:520-526 (例えば、c. 367C>T (R123C)) ; Stephens 外 (2013) J Clin Invest 123:2965-2968 (例えば、x881_882insG (L295fs)) ; 又は Reifemberger 外 (2005) Brit J Dermatology 152:43-51 (例えば、c560C>T (P187L)) に記載された変異のいずれかである。

【0398】

いくつかの実施形態では、細胞はヒト細胞であり、第 10 染色体重複及び／又は 10q の一部の欠失を有し、ここで、該部分は S U F U 及び P T E N を含む。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態では、細胞は F s 1 0 1 7 S U F U 変異を含む。

【0399】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のスクリーニング方法のいずれかにおいて使用される細胞は、ヘッジホッグシグナル伝達経路が活性な細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ヘッジホッグシグナル伝達経路が構成的に活性な細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ヘッジホッグ蛋白質又はヘッジホッグアゴニストで刺激された細胞である。いくつかの実施形態では、細胞におけるヘッジホッグ経路の活性は、G l i ルシフェラーゼレポーターアッセイにおける G l i 1 のレベル又は活性を監視することによって決定される。

【0400】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のスクリーニング方法のいずれかにおいて使用される細胞は、培養中の細胞である。いくつかの実施形態では、本発明は、複数の細胞を含む培養物を接触させることを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、細胞は脊椎動物におけるものである。いくつかの実施形態では、細胞は哺乳動物におけるものであり、細胞を接触させることが哺乳動物にヘッジホッグシグナル伝達阻害剤を投与することを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物はヒト被験体である。いくつかの実施形態では、細胞は癌細胞であり及び／又は哺乳動物は癌と診断された哺乳動物である。いくつかの実施形態では、癌細胞は、次よりなる群から選択される癌細胞である：結腸、肺、前立腺、皮膚、血液、肝臓、腎臓、乳房、膀胱、骨、脳、髄芽細胞腫、肉腫、基底細胞癌、胃癌、卵巣癌、食道癌、膵臓癌、又は精巣癌細胞。いくつかの実施形態では、癌細胞は、髄芽腫細胞、基底細胞癌細胞、又は母斑性基底細胞癌細胞（ゴーリン症候群細胞）である。

【0401】

特定の実施形態では、薬剤をヘッジホッグ経路阻害剤として同定したら、その薬剤を製剤化し、さらに細胞又は動物ベースアッセイで評価することができる。例えば、薬剤は、細胞又は動物ベース癌モデルで試験して抗癌剤としての有効性を評価することができる。

【0402】

V I . 治療方法

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載の平滑化変異のいずれかを有する平滑化タンパク質を発現する細胞の分化状態、生存及び／又は増殖を調節する方法に関する。いくつかの実施形態では、細胞は、被験体（例えば、ヒト患者）におけるものである。いくつかの実施形態では、細胞は培養中のものであり、この方法は、試験管内方法を含む。所定の実施形態では、細胞は癌細胞である。所定の実施形態では、細胞は、望ましくない又は異常な細胞増殖によって特徴づけられる。いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載の平滑化突然変異のいずれかを発現する平滑化タンパク質を含む又はそれを発現させるために予め決定されている。所定の実施形態では、細胞は、ヒト S M O 野生型に対して配列番号 1 の 2 8 1、4 0 8、4 5 9、5 3 3 及び／又は 5 3 5 のいずれか一つ以上に相当するアミノ酸に変異を含む平滑化ポリペプチドを発現するように予め決定されている。いくつかの実施形態では、細胞は、配列番号 1 の W 2 8 1 C、I 4 0 8 V、A 4 5 9 V、S 5 3 3 N 及び／又は W 5 3 5 L に相当するアミノ酸に次の置換のいずれかを発現する平滑化ポリペプチドを発現する。

【0403】

いくつかの実施形態では、本発明は、細胞内においてヘッジホッグシグナル伝達を減少させる方法を提供し、該細胞は、本明細書に記載の平滑化突然変異のいずれかを発現する平滑化タンパク質を発現し、該細胞はヘッジホッグタンパク質に応答する又はヘッジホッグシグナル伝達経路の遺伝子内に 1 以上の変異を含み（例えば、ヘッジホッグシグナル伝達経路の構成要素）、該 1 以上の変異は、リガンドの非存在下でヘッジホッグシグナル伝達経路のヘッジホッグシグナル伝達及び／又は活性化を増大させ、該方法は、該細胞と薬剤の有効量とを接触させる工程を含み、該薬剤はヘッジホッグ経路阻害剤である。いくつかの実施形態では、薬剤は、変異型平滑化タンパク質を選択的に結合させかつ阻害する化合

物である。いくつかの実施形態では、薬剤は細胞内において変異型平滑化タンパク質の下流で作用するヘッジホッグシグナル伝達経路の成分を阻害する。他の実施形態では、薬剤はプロモドメイン阻害剤である。

【0404】

いくつかの実施形態では、本発明は、癌を有する被験体を抗癌治療剤で治療する方法を提供し、該被験体は、変異型SMOタンパク質を含む及び／又はそれを発現することが決定されており、該変異型SMOタンパク質は、配列番号1の239位に相当する位置にアラニン以外のアミノ酸を有する。いくつかの実施形態では、本発明は、細胞内においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害する方法を提供し、該細胞は、配列番号1の239位に相当する位置にアラニン以外のアミノ酸を有する変異型SMOタンパク質を発現する。いくつかの実施形態では、本発明は、次の工程を含む、癌を有する被験体を診断する方法を提供する：(a) 該被験体からサンプルを得、(b) 該サンプルを配列番号1の239位に対応する位置にアラニン以外のアミノ酸を有する変異型SMOタンパク質をコードする核酸の存在について試験し、該サンプルが変異型SMOタンパク質を含む場合には、該被験体は癌を有する。いくつかの実施形態では、癌は基底細胞癌である。いくつかの実施形態では、変異型SMOタンパク質は、配列番号1のアミノ酸位置239に対応するアミノ酸位置にバリンを有する。

10

【0405】

いくつかの実施形態では、本発明は、細胞の望ましくない成長、増殖又は生存を阻害する方法を提供し、該細胞は、本明細書に記載の平滑化突然変異のいずれかを有する平滑化タンパク質を発現し、該細胞はヘッジホッグタンパク質に応答する又はヘッジホッグシグナル伝達経路の遺伝子内に1以上の変異を含み、該1以上の変異は、リガンドの非存在下でヘッジホッグシグナル伝達経路のヘッジホッグシグナル伝達及び／又は活性化を増大させ、該方法は、細胞と薬剤の有効量とを接触させる工程を含み、該薬剤はヘッジホッグ経路阻害剤である。いくつかの実施形態では、薬剤は変異型平滑化タンパク質を選択的に結合させかつ阻害する薬剤である。いくつかの実施形態では、薬剤は細胞内の変異型平滑化タンパク質の下流で作用するヘッジホッグシグナル伝達経路の成分を阻害する。いくつかの実施形態では、薬剤はプロモドメイン阻害剤である。

20

【0406】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍細胞の成長、増殖又は生存を阻害する方法を提供し、該腫瘍細胞は、本明細書に記載の平滑化突然変異のいずれかを有する平滑化タンパク質を発現し、該細胞はヘッジホッグタンパク質に応答する又はヘッジホッグシグナル伝達経路の遺伝子内に1以上の変異を含み、該1以上の変異は、リガンドの非存在下でヘッジホッグシグナル伝達経路のヘッジホッグシグナル伝達及び／又は活性化を増大させ、該方法は、細胞と薬剤の有効量とを接触させる工程を含み、該薬剤はヘッジホッグ経路阻害剤である。いくつかの実施形態では、薬剤は変異型平滑化タンパク質を選択的に結合させかつ阻害する薬剤である。いくつかの実施形態では、薬剤は細胞内の変異型平滑化タンパク質の下流で作用するヘッジホッグシグナル伝達経路の成分を阻害する。他の実施形態では、薬剤はプロモドメイン阻害剤である。いくつかの実施形態では、この方法は、それを必要とする患者に薬剤を投与することを含む。

30

40

【0407】

いくつかの実施形態では、ここに開示された方法のいずれかで処理された細胞は、活性化をもたらす又はヘッジホッグシグナル伝達を増加させる遺伝子内に1以上の変異を含み、ここで、該変異は上記のとおりである。

【0415】

いくつかの実施形態では、細胞はヒト細胞であり、第10染色体重複及び／又は10qの一部の欠失を有し、ここで、該部分はSUFU及びPTENを含む。いくつかの実施形態では、細胞はFs1017 SUFU変異を含む。

【0416】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかで処理された細胞は、ヘッ

50

ジホッグシグナル伝達経路が活性な細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ヘッジホッグシグナル伝達経路が構成的に活性な細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ヘッジホッグ蛋白質又はヘッジホッグアゴニストで刺激された細胞である。いくつかの実施形態では、細胞におけるヘッジホッグ経路の活性は、G l i ルシフェラーゼレポーターアッセイにおける G l i 1 のレベル又は活性を監視することによって決定される。

【0417】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかで処理された細胞は、培養中の細胞である。いくつかの実施形態では、本発明は、複数の細胞を含む培養物を接触させることを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、細胞は脊椎動物におけるものである。いくつかの実施形態では、細胞は哺乳動物におけるものであり、細胞を接触させることが哺乳動物にヘッジホッグシグナル伝達阻害剤を投与することを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物はヒト被験体である。いくつかの実施形態では、細胞は癌細胞であり及び／又は哺乳動物は癌と診断された哺乳動物である。いくつかの実施形態では、癌細胞は、次よりなる群から選択される癌細胞である：結腸、肺、前立腺、皮膚、血液、肝臓、腎臓、乳房、膀胱、骨、脳、髄芽細胞腫、肉腫、基底細胞癌、胃癌、卵巣癌、食道癌、膵臓癌、又は精巣癌細胞。いくつかの実施形態では、癌細胞は、髄芽腫細胞、基底細胞癌細胞、又は母斑性基底細胞癌細胞（ゴーリン症候群細胞）である。

【0418】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示された方法のいずれかにおいて使用されるヘッジホッグ経路阻害剤は、本明細書に記載の変異型平滑化タンパク質のいずれかの発現を阻害するポリヌクレオチド分子である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド分子は、本明細書に開示された変異型平滑タンパク質のいずれかをコードする核酸に特異的にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、アンチセンス分子は、野生型平滑化タンパク質（例えば、配列番号1の配列を有するタンパク質をコードする核酸）をコードする核酸にはハイブリダイズしない。いくつかの実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、本明細書に開示される変異型平滑化ポリペプチドのいずれかをコードするmRNA転写物を標的とするRNAiアンタゴニストである。いくつかの実施形態では、RNAiアンタゴニストはsiRNAである。いくつかの実施形態では、siRNAは、19～23ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、siRNAは二本鎖であり、かつ、一方又は両方の末端に短いオーバーハングを含む。いくつかの実施形態では、siRNAは、本明細書に開示された変異型平滑化ポリペプチドのいずれかをコードするmRNA転写物を標的とする。いくつかの実施形態では、RNAi又はsiRNAは、野生型平滑化タンパク質（例えば、配列番号1の配列を有するタンパク質をコードする核酸）をコードするmRNA転写物を標的とししない。いくつかの実施形態では、RNAiはshRNAを含む。

【0419】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示された方法のいずれかにおいて使用されるヘッジホッグ経路阻害剤は、本明細書に記載の変異型平滑化ポリペプチドのいずれかに特異的に結合する小分子である。いくつかの実施形態では、小分子は、ヘッジホッグシグナル伝達経路における平滑化の下流で作用するポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、小分子は、ヘッジホッグシグナル伝達経路とは異なる経路におけるポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、小分子はプロモドメイン阻害剤である。いくつかの実施形態では、プロモドメイン阻害剤はBRD4阻害剤である。いくつかの実施形態では、プロモドメイン阻害剤は、Ciceri外，2014，Nature Chemical Biology，10：305－312；Muller外，2014，Med Chem Commun，5：288－296；Garnier外，2014，24（2）：185－199に記載されたプロモドメイン阻害剤のいずれかである。これらの文献のそれぞれは、その全体が本明細書で援用される。いくつかの実施形態では、プロモドメイン阻害剤は、BI-2536及びTG-101348によるI-BET762、JQ1、JQ2、BRD4である。

【0420】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示された方法のいずれかにおいて使用されるヘッジホッグ経路阻害剤は、本明細書に記載変異型平滑化ポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ヘッジホッグシグナル伝達経路における平滑化の下流で作用するポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。

【0421】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかに従って薬剤と接触した細胞は、ヘッジホッグシグナル伝達経路の追加の阻害剤（例えば、HPI）とも接触する。いくつかの実施形態では、ヘッジホッグシグナル伝達経路の追加の阻害剤は、ベラトラム型のステロイド系アルカロイドである。いくつかの実施形態では、ベラトラム型ステロイド系アルカロイドはシクロパミン若しくはKAAD-シクロパミン又はその任意の機能的誘導体である（例えばIPI-269609又はIPI-926）。いくつかの実施形態では、ベラトラム型ステロイド系アルカロイドはジェルビン又はその任意の機能的誘導体である。いくつかの実施形態では、追加の阻害剤は、ビスモデギブ、ソニデギブ、BMS-833923、PF-04449913、LY2940680、又はその任意の機能的誘導体である。いくつかの実施形態では、追加の阻害剤は、シュロソウ属アルカロイド又はビスモデギブとは化学的に無関係の平滑化阻害剤であり、ソニデギブ、BMS-833923、PF-04449913、LY2940680、Erivedge、BMS-833923（XL319）、LDE225（エリスモデギブ）、PF-04449913、NVP-LDE225、NVP-LEQ506、TAK-441、XL-319、LY-2940680、SEN450、イトラコナゾール、MRT-10、MRT-83、又はPF-04449913が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、追加の阻害剤は、Amakye外、Nature Medicine, 19(11):1410-1422に開示されている化合物のいずれかである（その全体が本明細書で援用される）。いくつかの実施形態では、ヘッジホッグシグナル伝達経路の追加の阻害剤は抗体である。いくつかの態様では、抗体は、ヘッジホッグタンパク質に結合する、例えば特異的に結合する抗体である。いくつかの実施形態では、ヘッジホッグシグナル伝達経路の追加の阻害剤はRNAiアンタゴニストである。

【0422】

治療又は診断を必要とする被験体としては、異常なヘッジホッグシグナル伝達をすでに有するものと並びに異常なヘッジホッグシグナル伝達を阻害すべきも又はそれ有しやすいものが挙げられる。例えば、被験体又は哺乳動物は、本発明の方法に従って、ヘッジホッグ経路阻害剤を受けた後に、患者が次の一つ以上の観察可能な及び／又は測定可能な減少又は非存在を示した場合には異常なヘッジホッグシグナル伝達に対する治療に成功している：腫瘍細胞の数の減少又は該細胞の非存在；腫瘍サイズの減少；軟組織及び骨への癌の広がりを含めた末梢器官への腫瘍細胞浸潤阻害（すなわちある程度緩やか、いくつかの実施形態では停止）；腫瘍転移の阻害（すなわち、ある程度緩やか、いくつかの実施形態では停止）；腫瘍増殖のある程度までの阻害；及び／又は特定の癌に関連する症状の一以上のある程度までの軽減；罹患率及び死亡率の減少並びに生命問題の質の改善。このようなヘッジホッグ経路阻害剤が増殖を阻害する及び／又は既存の癌細胞を死滅させることができる程度にまで、このものは細胞増殖抑制性及び／又は細胞傷害性であることができる。また、これらの兆候又は症状の低減は、患者が感じることができる。さらに、ヘッジホッグ経路阻害剤に対する暴露の成功（特に腫瘍応答が全く測定されない場合）は、皮膚パンチ生検又は毛包におけるGli1の発現によって監視できる（ビスモデギブに対して行ったとおり）。

【0423】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるヘッジホッグ経路阻害剤のいずれかによる治療を受けた被験体は、ビスモデギブに耐性である変異型平滑化タンパク質を発現する。いくつかの実施形態では、被験体は、本明細書に記載の平滑化突然変異のいずれかを含む

平滑化タンパク質を発現する。所定の実施形態において、被験体は、配列番号1の281、408、459、533及び／又は535のいずれか1つ以上に対応するアミノ酸に変異を含む平滑化ポリペプチドを発現する。いくつかの実施形態では、被験体は、配列番号1のW281C、I408V、A459V、S533N及び／又はW535Lに対応するアミノ酸で変異を含む平滑化ポリペプチドを発現する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療方法のいずれかで治療される前に、被験体は、本明細書に記載の平滑化突然変異のいずれかを含む平滑化タンパク質を発現することが決定されている。所定の実施形態では、本明細書に記載の治療方法のいずれかで治療される前に、被験体は、配列番号1の281、408、459、533／又は535のいずれか一つ以上に対応するアミノ酸に変異を含む平滑化ポリペプチドを発現するように決定されている。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療方法のいずれかで治療される前に、被験体は、配列番号1のW281C、I408V、A459V、S533N及び／又はW535Lに対応するアミノ酸に変異を含む平滑化ポリペプチドを発現するように決定されている。

10

【0424】

疾患における治療及び改善の成功を評価するための上記パラメーターは、医師によく知られている日常的手法によって容易に測定可能である。癌治療について、有効性は、例えば、疾患の進行までの時間（TTP）を評価し及び／又は応答速度（RR）を決定することによって測定できる。転移は、ステージング試験及び転移の程度を決定するためのカルシウムレベル及び他の酵素に関する試験によって決定できる。また、CTスキャンを行って、腫瘍又は癌の外側の領域に広がりを見ることもできる。予後予測、診断及び／又は治療のプロセスに関連する本発明は、例えばGli1の発現の決定及び評価を伴う。

20

【0425】

疾患（例えば癌）の治療、その症状の緩和又は診断の治療の目的のための「哺乳動物」とは、ヒト、家畜及び農場動物、動物園、スポーツ又はペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギ、フェレットなどを含めて哺乳動物として分類される任意の動物をいう。いくつかの実施形態では、哺乳動物はヒトである。いくつかの実施形態では、哺乳動物は出生後である。いくつかの実施形態では、哺乳動物は小児である。いくつかの実施形態では、哺乳動物は成体である。

【0426】

1種以上の追加の治療剤との「併用」投与としては、任意の順序での同時（同時期）及び連続投与を含む。

30

【0427】

特定の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、本明細書に記載の癌のいずれかから選択される癌又は腫瘍の1個以上の細胞がヘッジホッグ経路の成分に変異を含む癌、例えば、本明細書に記載の突然変異のいずれかの治療に使用される。腫瘍が所定のレベルの不均一性を有する場合の細胞を含むことが一般に分かりかつここで特に注目すべきである。したがって、腫瘍における細胞の全てが必ずしも特定の有害な変異を含むわけではない。したがって、本発明は、変異が腫瘍の全ての細胞に存在しない場合であっても治療を受ける癌又は腫瘍細胞がヘッジホッグ経路の成分に変異、例えば本明細書に記載の変異のいずれかを有する細胞を含む方法を意図する。

40

【0428】

さらに、ヘッジホッグ経路阻害剤の使用は、影響を受けた組織及び／又は細胞が高いヘッジホッグ経路活性化を示す疾患を特に標的とすることができると考えられる。Gli1の及びGli2を含めてヘッジホッグシグナル伝達経路によって活性化されるGli遺伝子の発現は、広範囲の組織及び疾患にわたってヘッジホッグシグナル伝達と最も一貫して相関するのに対し、Gli3はいくぶん相関が少ない。Gli遺伝子は、ヘッジホッグシグナル伝達の完全な効果を発揮するために必要な多くの遺伝子の発現を活性化する転写因子をコードする。しかし、Gli3の転写因子は、ヘッジホッグエフェクター遺伝子のレプレッサーとして作用する場合があるため、Gli3の発現はヘッジホッグシグナル伝達経路の効果の減少を引き起こすことがある。Gli3が転写活性化因子又はリプレッサー

50

として作用するかどうかは、翻訳後の事象に依存するため、G l i 3 タンパク質の活性化形態を検出する（リプレッシング形態に対して）ための方法（ウェスタンブロットなど）もヘッジホッグ経路活性化の信頼できる指標であることが予想される。G l i 1 遺伝子は、広範囲の癌、過形成及び未熟肺で強く発現するため、ヘッジホッグ経路の相対的な活性化のためのマーカーとして機能する。また、高いG l i 1 遺伝子発現を有する未熟肺などの組織もヘッジホッグ阻害剤の影響を強く受ける。したがって、G l i 1 遺伝子発現の検出を強力な予測ツールとして使用して、ヘッジホッグアンタゴニストを用いた治療の恩恵に受ける組織及び疾患を同定することができる。いくつかの実施形態では、G l i 1 の発現レベルは、転写物の直接検出によって又はタンパク質のレベル若しくは活性の検出によって検出される。転写物は、G l i 1 の転写産物又はそこから合成されたc D N A に対するハイブリダイゼーション又はプローブに主に依存する広範囲の技術のいずれかを用いて検出できる。よく知られている技術としては、ノーザンブロッティング、逆転写P C R 及び転写物レベルのマイクロアレイ分析が挙げられる。G l i 1 タンパク質のレベルを検出するための方法としては、ウェスタンブロット法、免疫沈降法、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動（二次元S D S - P A G E : いくつかの実施形態では、G l i 1 タンパク質の位置が決定されている基準物と比較する）、及び質量分析が挙げられる。質量分析を一連の精製工程と組み合わせて、特定のサンプル中における多数の異なるタンパク質レベルのハイスループット同定を可能にすることができる。また、質量分析及び二次元S D S - P A G E を使用して、タンパク質分解事象、ユビキチン化、リン酸化、脂質修飾を含めてタンパク質に対する転写後修飾を同定することができる。また、G L I 活性を、基質D N A への結合解析又は標的プロモーターの試験管内転写活性化により評価することもできる。ゲルシフトアッセイ、D N A フットプリンティングアッセイ及びD N A - タンパク質架橋アッセイは、D N A 上のG U 結合部位に結合することができるタンパク質の存在を評価するために使用できる全ての方法である。J M o I . M e d 77 (6) : 459-68 (1999) ; C e l l 100 (4) : 423-34 (2000) ; D e v e l o p m e n t 127 (19) : 4923-4301 (2000)。

【0429】

G l i 1 はヘッジホッグ活性化の間に非常に普遍的に発現されるので、G l i 1 過剰発現の程度は、ヘッジホッグ経路阻害剤が有効な治療となることを決定するのに有用なはずである。いくつかの実施形態では、G l i 1 は、正常対照細胞／組織／被験体において少なくとも2倍程度に高いレベルで発現するはずである。いくつかの実施形態では、G l i 1 の発現は、正常細胞／組織／被験体において4、6、8又は10倍程度高い。

【0430】

所定の実施形態では、G l i 1 の転写レベルが測定され、異常に高いG l i 1 のレベルを示す病変又は疾患組織がヘッジホッグ経路阻害剤で治療される。他の実施形態では、治療を受ける状態は、たとえG l i 1 の発現レベルの測定を治療される組織で行っていない場合であっても、ヘッジホッグ経路の異常活性化と有意な相関を有することが知られている。未成熟肺組織、肺癌（例えば、アデノ癌腫、 broncho肺胞腺癌、小細胞癌）、乳癌（例えば、下乳管癌腫、下部小葉癌腫、管状癌腫）、前立腺癌（例えば腺癌）、及び良性前立腺過形成は、全て、所定の場合にG l i 1 の発現レベルの強い上昇を示す。したがって、G l i 1 の発現レベルは、組織のどれをヘッジホッグ経路阻害剤で治療する必要があるのかを決定するための強力な診断デバイスである。さらに、尿路上皮細胞の癌（例えば、膀胱癌、他の尿生殖器の癌）が所定の場合にG L I - L レベルの上昇を有するという実質的に相関的な証拠が存在する。例えば、染色体9 q 22 上のヘテロ接合性の欠失は、膀胱癌において一般的であることが知られている。P t c h 1 遺伝子はこの位置に位置し、P t c h 1 機能欠失は、おそらく多くの他のタイプの癌と同様に過剰増殖の部分的な原因である。したがって、このような癌は、高G l i 1 の高発現を示し、かつ、ヘッジホッグアンタゴニストでの治療に特に適していると考えられる。

【0431】

所定の実施形態では、本明細書に記載のヘッジホッグ経路阻害剤のいずれかは、p t c

h-1 及び／又は p t c j-2 変異、例えば、p a t c h-1 又は p a t c h-2 機能喪失変異を有する腫瘍を有する被験体を治療するために使用される。また、p t c h-1 及び p t c h-2 の発現は、ヘッジホッグシグナル伝達経路によって活性化されるが、典型的には g l i 遺伝子と同程度ではなく、その結果として、ヘッジホッグ経路活性化のマーカーとしての g l i 遺伝子に劣る。ヘッジホッグ経路は高度に活性であるが、所定の組織では、p t c h-1 又は p t c h-2 の一つのみが発現する。例えば、精巣の発達において、デザートヘッジホッグが重要な役割を果たし、ヘッジホッグ経路が活性化されるが、p t c-2 ののみが発現する。したがって、これらの遺伝子は、ヘッジホッグ経路の活性化のためのマーカーとして個別には信頼できないが、両方の遺伝子の同時測定がヘッジホッグアンタゴニストで治療される組織のためのさらに有用な指標として意図される。

10

【0432】

脊椎動物における分化組織の秩序空間配置の形成の際のヘッジホッグシグナル伝達の幅広い関与を考慮すると、本発明のヘッジホッグ経路阻害剤は、異なる脊椎動物組織のアレイを生成及び／又は維持するための方法で、試験管内及び生体内の両方で使用できるであろう。ヘッジホッグ経路阻害剤は、適宜、上記性剤のいずれかであることができる。

【0433】

いくつかの実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、悪性髄芽腫及び他の原発性 CNS 悪性神経外胚性腫瘍のための治療計画の一部として使用することができる。髄芽細胞腫、原発性脳腫瘍は、小児における最も一般的な脳腫瘍である。髄芽腫は、後頭蓋窩に発生する原始神経外胚葉 (P N E T) 腫瘍である。これらのものは、全ての小児脳腫瘍の約 25% を占める。組織学的には、これらのものは、真のロゼットで一般的に配置された小円形細胞腫瘍であるが、アストロサイト、上皮細胞又はニューロンへの分化を示すことができる。P N E T は、松果体 (松果体芽腫) 及び大脳を含む脳の他の領域で発生する可能性がある。テント上領域に生じるものは、一般的に悪化した予後を有する。

20

【0434】

髄芽腫／P N E T は、切除後の CNS における任意の場所で再発することが知られており、さらには骨に転移することがある。したがって、治療前評価は、「転移の見落とし」の可能性を排除するために脊髄の検査を含むべきである。主としてこの目的のために脊髄造影の代わりにガドリニウム増強 M R I が行われており、C S F の細胞診が日常的な手順として術後に得られる。

30

【0435】

いくつかの実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、上皮細胞腫の治療プログラムの一部として使用される。上皮腫は、小児における小児脳腫瘍の約 10% を占める。肉眼的に、これらのものは、脳室の上皮内側から発生する腫瘍であり、顕微鏡的にロゼット、カナル、及び血管周囲ロゼットを形成する。上皮腫が報告された 51 人の子供の C H O P シリーズでは、3/4 が組織学的に良性であり、約 2/3 が第四脳室領域から生じ、3/1 がテント上領域に示された。プレゼンテーション時の年齢は、誕生時と 4 年との間にピークがある。年齢の中央値は約 5 年である。この疾患を有する多くの子供は乳児であるため、彼らはマルチモーダル治療を必要とする場合が多い。

【0436】

40

いくつかの実施形態では、様々な腫瘍におけるヘッジホッグシグナル伝達の関与に基づく本発明のヘッジホッグ経路阻害剤又は開発中のこのような組織におけるヘッジホッグ若しくはその受容体の発現を使用して、調節不全ヘッジホッグ活性を有する腫瘍の増殖を阻害することができる。このような腫瘍としては、次のものが挙げられるが、これらに限定されない：ゴーリン症候群に関連する腫瘍 (例えば、髄芽腫、髄膜腫など)、p t c h 変異に関連する腫瘍 (例えば、血管腫、横紋筋肉腫など)、G l i 1 の増幅に起因する腫瘍 (例えば、グリア芽細胞腫、肉腫等)、S m o 機能不全に起因する腫瘍 (例えば、基底細胞癌等)、T R C 8、P T C ホモログに結合する腫瘍 (例えば、腎癌、甲状腺癌等)、E x t-1 関連腫瘍 (例えば、骨癌など)、S f t/x 誘導腫瘍 (例えば、肺癌、軟骨肉腫等)、ヘッジホッグ蛋白質を過剰発現する腫瘍及び他の腫瘍 (例えば、乳癌、尿生殖器癌

50

(例えば、腎臓、膀胱、尿管、前立腺など)、副腎癌、消化管癌(例えば胃、腸等)。

【0437】

いくつかの実施形態では、本発明のヘッジホッグ経路阻害剤は、癌のいくつかの形態を治療するために使用することもできる。これらの癌としては、次のものが挙げられるが、これらに限定されない：前立腺癌、膀胱癌、肺癌(小細胞及び非小細胞を含む)、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、子宮頸癌、子宮内膜又は他の子宮癌、卵巣癌、精巣癌、陰茎癌、陰癌、尿道癌、胆嚢癌、食道癌又は膵臓癌。追加の癌のタイプとしては、骨格筋又は平滑筋の癌、胃癌、小腸癌、唾液腺癌、肛門癌、直腸癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、下垂体癌、及び鼻咽頭癌が挙げられる。さらに、本発明のヘッジホッグアンタゴニストで治療することができる癌の典型的な形態は、ヘッジホッグ発現細胞を含む癌が挙げられる。本発明のヘッジホッグアンタゴニストで治療できる癌のさらなる例示的な形態は、G l i 発現する細胞を含む癌が挙げられる。一実施形態では、癌は、p a t c h - 1 の変異によっては特徴付けられない。いくつかの実施形態では、癌は、平滑化及び／又はS u F u 変異によって特徴付けられる。

10

【0438】

所定の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤を使用して基底細胞癌を有する被験体を治療することができる。所定の実施形態では、基底細胞癌は母斑性基底細胞癌である。所定の実施形態では、被験体はゴーリン症候群を有する。

【0439】

上記は、本発明のヘッジホッグ経路阻害剤のための試験管内及び生体内での使用の単なる例示である。ヘッジホッグ経路阻害剤は、変異型平滑化タンパク質(例えば、W 2 8 1 C、I 4 0 8 V、A 4 5 9 V、S 5 3 3 N及び／又はW 5 3 5 L 変異を有する平滑化タンパク質)についての天然標的又は結合相手を同定する際に使用して、変異型平滑化生物活性を研究し、変異型平滑化及びその結合相手を様々な細胞や組織から精製し、及びヘッジホッグシグナル伝達経路のさらなる構成要素を同定するのにも好適である。

20

【0440】

特定の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、開示された抗体のいずれかである。本発明の抗体は、例えば試験管内、生体内及び生体外での治療法で使用できる。一態様では、本発明は、癌を治療し、望ましくない細胞増殖を阻害し、癌の転移を阻害し、及び腫瘍細胞のアポトーシスを生体内又は試験管内のいずれかで誘導するための方法を提供し、この方法は、変異型S M O に対する抗体の結合を許容する条件下で、本発明の抗体に細胞を暴露することを含む。特定の実施形態では、細胞は、骨髄性白血病細胞、肺癌細胞、胃癌細胞、乳癌細胞、前立腺癌細胞、腎細胞、癌細胞及び神経膠芽腫細胞である。一実施形態では、本発明の抗体は、変異型S M O の活性を阻害するために使用することができ、この方法は、変異型S M O の活性が阻害されるように本発明の抗体に変異型S M O をさらすことを含む。

30

【0441】

一態様において、本発明は、個体に本発明の抗体の有効量を投与することを含む癌の治療方法を提供する。所定の実施形態では、癌を治療するための方法は、個体に本発明の抗体を含む薬学的製剤の有効量及び任意に以下に与えるものなどの少なくとも1種の追加の治療剤を投与することを含む。

40

【0442】

本発明の抗体は、治療において単独で又は他の組成物と組み合わせて使用できる。例えば、本発明の抗体は、少なくとも1種の追加の治療剤及び／又はアジュバントと同時投与できる。所定の実施形態では、追加の治療剤は抗V E G F 抗体である。

【0443】

上記したこのような併用投与は、併用療法(複数の治療薬が同じ又は別個の製剤中に含まれる場合)及び別々の投与(この場合には、本発明の抗体の投与は、追加の治療剤及び／又はアジュバントの投与前、同時及び／又は後に行うことができる)を包含する。本発明の抗体は、放射線療法と併用できる。

50

【0444】

一実施形態では、本発明の抗体は、変異型SMOの発現及び／又は活性の増大に関連する疾患に罹患している個体に変異型SMOを結合させるための方法に使用され、この方法は該個体に抗体を投与することを含み、それによって、該個体において変異型SMOを結合させる。一実施形態では、変異型SMOは、ヒト変異型SMOであり、個体はヒトである。

【0445】

本発明の抗体（及び任意の追加の治療剤又はアジュバント）は、非経口、皮下、腹腔内、肺内及び鼻腔内及び局所治療のために必要であれば病巣内投与を含めて任意の適切な手段によって投与できる。非経口注射としては、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与が挙げられる。さらに、抗体は、特に抗体の漸減用量で、パルス注入によって好適に投与される。投与は、投与が短期であるか長期であるかに部分的に依存して、任意の適切な経路、例えば静脈内又は皮下注射などの注射によることができる。

【0446】

本発明の抗体の結合標的の位置を、抗体の調製及び投与の際に考慮することができる。結合標的が細胞内分子である場合には、本発明の所定の実施形態は、結合標的が位置する細胞に導入される抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。一実施形態では、本発明の抗体は、細胞内抗体として細胞内で発現できる。本明細書で使用するときに、用語「細胞内抗体」とは、Marasco, Gene Therapy 4:11-15 (1997); Kontermann, Methods 34:163-170 (2004); 米国特許第6004940号及び同6329173号; 米国特許出願公開第2003/0104402号及びPCT公開WO2003/077945号に記載されているように、細胞内で発現しかつ標的分子に選択的に結合することができる抗体又はその抗原結合部分をいう。例えば、遺伝子治療を使用して細胞内抗体を生成することに関する、1996年3月14日公開されたWO96/07321も参照されたい。

【0447】

細胞内抗体の細胞内発現は、所望の抗体又はその抗原結合部分をコードする核酸（抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする遺伝子に通常関連する野生型リーダー配列及び分泌シグナルを欠失する）を標的細胞に導入することによって達成できる。本発明の抗体の全て又は一部をコードする1個以上の核酸を標的細胞に送達することができ、それによって、細胞内標的ポリペプチドに結合しかつ標的ポリペプチドの活性を調節することができる1個以上の細胞内抗体が発現するようにする。細胞に核酸を導入する任意の標準的な方法を使用することができ、この方法としては、マイクロインジェクション、弾道的注入、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、リポソーム、並びに目的の核酸を有するレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス及びワクシニアベクターによるトランスフェクションが挙げられるが、これらに限定されない。

【0448】

所定の実施形態では、核酸（任意にベクター内に含まれる）は、生体内及び生体外方法で患者の細胞に導入できる。生体内送達の一例では、核酸を、例えば治療的介入が必要とされる部位に直接患者に注射する。生体内送達の別の例では、核酸を、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスIウイルス、又はアデノ随伴ウイルスなど）及び脂質ベースの系（遺伝子の脂質仲介移入に有用な脂質は、例えばDOTMA、DOPE及びDC-Cholである）によるトランスフェクションを使用して細胞に導入する。所定の遺伝子マーキング及び遺伝子治療プロトコルの概説については、Anderson外, Science 256:808-813 (1992) 及びWO93/25673並びにそこに引用される参考文献を参照されたい。生体外治療の例では、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入し、そして改変された細胞を患者に直接投与するか、患者に移植される多孔性膜内にカプセル化する（例えば、米国特許第4892538号及び同5283187号を参照されたい）。核酸の生体外送達のために一般的に使用されるベクターは、レトロウイルスベクターである。

【0449】

別の実施形態では、内部移行抗体が提供される。抗体は、細胞への抗体の送達を増強するという所定の特徴を有することができ、又はそのような特性を有するように修飾できる。これを達成するための技術は当該技術分野で知られている。例えば、抗体の陽イオン化は、細胞への取り込みを促進することが知られている（例えば、米国特許第6703019号参照）。また、リポフェクション又はリポソームを使用して細胞内に抗体を送達することもできる。抗体フラグメントを使用する場合には、標的タンパク質に特異的に結合する最も小さな阻害フラグメントが有利なことがある。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、ペプチド分子を、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するように設計することができる。このようなペプチドは、化学的に合成でき及び／又は組換えDNA技術によって作製できる。例えば、Marasco外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893 (1993)を参照されたい。

10

【0450】

標的細胞に抗体が入ることを、当該分野で公知の他の方法によって高めることができる。例えば、HIV Tat又はアンテナペディアホメオドメインタンパク質から誘導されるものなどの所定の配列を、細胞膜を横切る異種タンパク質の効率的な取り込みを導くことができる。例えば、Chen外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96:4325-4329を参照されたい。

【0451】

抗体の結合標的が脳内に位置する場合には、本発明の所定の実施形態は、血液脳関門を横断するための抗体を提供する。血液脳関門を横切って分子を輸送するためのいくつかの公知のアプローチが存在し、物理的方法、脂質ベースの方法、細胞ベースの方法、並びに受容体及びチャネルベース方法が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0452】

血液脳関門を横切って抗体を輸送する物理的方法としては、血液脳関門を完全に回避すること、又は血液脳関門に開口部を作製することが挙げられるが、これらに限定されない。回避方法としては、脳への直接注射（例えば、Papanastassiou外, Gene Therapy 9:398-406 (2002)参照）、間質注入／対流増強送達（例えば、Bobo外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994)）、及び送達デバイスを脳に移植すること（例えば、Gil 30
ll外, Nature Med. 9:589-595 (2003)；及びGliadel Wafers（商標）、Guildford Pharmaceuticalを参照）が挙げられる。関門に開口を作製する方法としては、次のものが挙げられるが、これらに限定されない：超音波（例えば、米国特許出願公開第2002/0038086号参照）、浸透圧（例えば高張マンニトールの投与による（Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989)）、例えばブラジキニン又は透過剤A-7による透過処理（例えば米国特許第5112596号、同5268164号、同5506206号及び同56864 40
16号参照）、及び抗体をコードする遺伝子を含むベクターによる血液脳関門にまたがるニューロンの形質移入（例えば米国特許出願公開第2003/0083299号参照）。

【0453】

血液脳関門を横切って抗体を輸送する脂質ベースの方法としては、血液脳関門の血管内皮上の受容体に結合する抗体結合フラグメントに結合するリポソーム内に抗体を封入すること（例えば、米国特許出願公開第20020025313号参照）及び低密度リポタンパク質粒子（例えば米国特許出願公開第20040204354号参照）又はアポリポタンパク質E（例えば米国特許出願公開第20040131692号参照）に抗体を被覆することが挙げられるが、これらに限定されない。

【0454】

血液脳関門を横切って抗体を輸送する幹細胞ベースの方法は、目的の抗体を発現する神

50

経前駆細胞（NPC）を遺伝子操作し、その後治療されるべき個体の脳に幹細胞を移植することを伴う。Behrstock外（2005）Gene Ther. 15, 2005年12月15日先行オンライン出版を参照されたい（神経栄養因子GDNFを発現するように遺伝子操作されたNPCは、齧歯類及び霊長類モデルの脳に移植されたときにパーキンソン病の症状を低減させたことを報告する）。

【0455】

受容体及びバリアとして血液脳にわたって抗体を輸送するチャンネルベースの方法としては、グルココルチコイド遮断薬を使用して血液脳関門の透過性を増大させること（例えば、米国特許出願公開第2002/0065259号、同2003/0162695号、及び同2005/0124533号を参照）；カリウムチャンネルを活性化すること（例えば米国特許出願公開第2005/0089473号を参照）、ABC薬剤トランスポーターを阻害すること（例えば米国特許出願公開第2003/0073713号を参照）；抗体にトランスフェリンをコーティングし、1個以上のトランスフェリンレセプターの活性を調節すること（例えば米国特許出願公開第2003/0129186号を参照）及び抗体を陽イオン化すること（例えば米国特許第5004697号を参照）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0456】

本発明の抗体は、医学的実用性に合わせた様式で処方、投薬及び投与されるであろう。ここで考慮する要因としては、治療される特定の疾患、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、及び医療従事者に知られている他の要因が挙げられる。抗体は、問題の疾患を予防又は治療するために現在使用されている1種以上の薬剤と共に処方される必要はないが、適宜そのように処方される。このような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、疾患又は治療の種類及び上記他の要因に依存する。これらは、一般に本明細書に記載するのと同じ用量及び投与経路、又は上記投与量の1～99%、又は任意の用量かつ適切であると経験的／臨床的に判断された任意の経路によって使用される。

【0457】

疾患の予防又は治療について、本発明の抗体の適切な用量（単独で又は1種以上の他の追加の治療剤と組み合わせて使用される場合）は、治療される疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体を予防又は治療目的で投与するかどうか、以前の治療、患者の病歴及び抗体に対する応答、及び主治医の裁量に依存する。抗体は、一度に又は一連の治療にわたって患者に好適に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば1回以上の別々の投与によるか、連続注入によるかを問わず抗体の約 $1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 15\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1\text{mg}/\text{kg}\sim 10\text{mg}/\text{kg}$ ）を患者への投与のための初期候補用量とすることができる。典型的な1日投与量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲内であろう。状態によっては数日以上にわたる反復投与については、治療は、一般に疾患の症状の所望の抑制が生じるまで持続されるであろう。抗体の例示的な投与量は、約 $0.05\text{mg}/\text{kg}\sim 10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲内であろう。したがって、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 又は $10\text{mg}/\text{kg}$ （又はその任意の組み合わせ）の1以上の用量を患者に投与することができる。このような用量は、間欠的に、例えば毎週又は3週間毎に投与できる（例えば、患者が抗体の約2～約12、例えば、約6用量を受けるように）。初期のより高い負荷用量、その後1回以上のより低い用量を投与することができる。典型的な投薬レジメンは、抗体の約 $4\text{mg}/\text{kg}$ の初期負荷用量、その後約 $2\text{mg}/\text{kg}$ の毎週の維持用量を投与することを含む。しかしながら、他の投薬レジメンも有用なことがある。この治療の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易に監視される。

【0458】

上記の治療方法のいずれかを、抗変異型SMO抗体の代わりに又はそれに加えて本発明の免疫複合体を使用して実施できることと解される。

【0459】

V I I . 医 薬 製 剤

いくつかの実施形態では、本明細書に記載したヘッジホッグ経路阻害剤又は本発明に係るヘッジホッグ経路阻害剤のいずれかを、医薬組成物に製剤化することができる。

【0460】

本発明に従って使用されるヘッジホッグ経路阻害剤の医薬組成物は、所望の純度を有する薬剤と任意の薬学的に許容されるキャリア、賦形剤又は安定剤とを混合させることによって保存のために凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で調製できる (Remington: The Science of Practice of Pharmacy, 第20版, Gennaro, A. 外著, Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000))。許容されるキャリア、賦形剤、又は安定剤は、使用される投薬量及び濃度ではレシピエントに対して非毒性であり、緩衝液、例えばアセテート、トリス、ホスフェート、シトレート及び他の有機酸；アスコルビン酸及びメチオニンを含めた抗酸化剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウムなど）；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性重合体；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース若しくはデキストリンを含めた単糖類、二糖類及び他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；トレハロース及び塩化ナトリウムなどの等張剤；スクロース、マンニトール、トレハロース若しくはソルビトールなどの糖；ポリソルベートなどの界面活性剤；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば亜鉛タンパク質錯体）；及び／又はTWEEN（登録商標）、PLURONICS（登録商標）若しくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【0461】

いくつかの実施形態では、本開示に係る及び／又は本明細書に記載されるヘッジホッグ経路阻害剤の製剤のいずれかは、治療される特定の適応症のために適宜2種以上の活性化化合物、いくつかの実施形態では、互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を有するものを含有することができる。所定の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤及び第2活性物質は、一緒に製剤化されることを認識すべきである（例えば、製剤又は組成物は両方の薬剤を含有する）。他の実施形態では、2種（又はそれ以上）の活性剤は別々に製剤化され、それによって、別々の製剤と一緒に又は別々に市場に出し、販売し、保存し、又は使用することができる。別々に製剤化される場合には、本発明は、これらのものを同じ又は異なる時点で投与することができ、所定の実施形態では組み合わせ、そして同時に投与することができることを意図する。

【0462】

例えば、上記治療剤に加えて、製剤に、追加の抗体、例えば、第2治療剤又は他の標的に対する抗体（例えば腫瘍の増殖に影響する増殖因子）を含めることが望ましい場合がある。いくつかの実施形態では、製剤中にヘッジホッグ阻害剤（例えばロボトニキニン）を含めることが望ましい。あるいは又はさらに、組成物は、化学療法剤、細胞傷害剤、サイトカイン、成長阻害剤、抗ホルモン剤、及び／又は心臓保護剤をさらに含むことができる。このような分子は、意図する目的のために有効な量で組み合わせて適切に存在する。いくつかの実施形態では、追加の活性化化合物はステロイド系アルカロイドである。いくつかの実施形態では、ステロイドアルカロイドは、シクロパミン若しくはKAAD-シクロパミン若しくはジェルピン又はその任意の機能的誘導体である（例えばIPI-269609又はIPI-926）。いくつかの実施形態では、追加の活性化化合物はビスモデギブ、ソニデギブ、BMS-833923、PF-04449913、LY2940680又はその任意の誘導体である。いくつかの実施形態では、追加の活性化化合物は、Amakye外、Nature Medicine, 19(11):1410-1422に開示された

10

20

30

40

50

化合物のいずれかである（その全体が本明細書で援用される）。いくつかの実施形態では、追加の活性化化合物は、veratrumアルカロイド又はビスモデギブとは化学的に無関係の別の平滑化阻害剤であり、これらのものとしては、次のものが挙げられるがこれらに限定されない：Erivedge、BMS-833923（XL319）、LDE225（エリスモデギブ）、PF-04449913、NVP-LDE225、NVP-LEQ506、TAK-441、XL-319、LY-2940680、SEN450、イトラコナゾール、MRT-10、MRT-83、又はPF-04449913。上記のように、本発明は、第2活性物質をヘッジホッグ経路阻害剤と一緒に処方した製剤（例えば、2種の活性剤を含む単一の製剤として）並びに2種の活性剤が2種の別個の製剤又は組成物中に存在する実施形態を意図する。

10

【0463】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されたような本発明のヘッジホッグ経路阻害剤のいずれかを、例えばコロイド状薬物送達系（例えばリポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンにおけるコアセルベーション技術又は界面重合、例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン・マイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセルによって調製されたマイクロカプセル中に封入することができる。このような技術は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy（前出）に開示されている。

【0464】

いくつかの実施形態では、本発明のヘッジホッグ経路阻害剤のいずれかは、持続放出製剤に製剤化される。持続放出製剤の好適な例としては、抗体を含む固体疎水性重合体の半透性マトリクスが挙げられ、該マトリックスは成形品、例えば、フィルム又はマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（メタクリル酸2-ヒドロキシエチル）又はポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とγエチル-L-グルタメートとの共重合体、非分解性エチレン・酢酸ビニル、LUPRONDEPOT（登録商標）などの分解性乳酸・グリコール酸共重合体（乳酸・グリコール酸共重合体及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフィア）、及びポリD（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

20

30

【0465】

本発明の方法に使用するための本開示の組成物の量は、標準的な臨床技術によって決定でき、かつ、特定の適応症又は用途に応じて変更できる。有効用量は、試験管内又は動物モデル試験系から導出される用量反応曲線から推定できる。

【0466】

所定の実施形態では、本発明の組成物は、医薬製剤を含めて非発熱性である。換言すれば、所定の実施形態において、組成物は発熱物質を実質的に含まない。一実施形態では、本発明の製剤は、内毒素及び／又は関連する発熱物質を実質的に含まない発熱物質非含有製剤である。内毒素としては、微生物内部に閉じ込められ、かつ、微生物が破壊又は死滅した場合にのみ放出される毒素が挙げられる。発熱物質としては、細菌及び他の微生物の外膜からの発熱誘発性の熱安定性物質（糖タンパク質）が挙げられる。これらの物質はいずれも、ヒトに投与された場合に発熱、低血圧及びショックを引き起こす可能性がある。潜在的に有害な影響のため、内毒素の量が低くても、静脈内投与された薬学的薬剤溶液から除去しなければならない。食品医薬品局（「FDA」）は、静脈内薬物用途のために1時間以内で体重キログラム当たり用量につき5内毒素単位（EU）という上限を設定している（The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26（1）：223（2000））。治療用タンパク質を比較的大用量及び／又は長期間にわたって（例えば患者の一生にわたって）投与する場合には、有害で危険な内毒素が少量であっても危険な場合がある。特定の実施形態では、組成物中における内毒素及び発熱物質レベルは、10EU/mg

40

50

未満、5 EU/mg 未満、1 EU/mg 未満、0.1 EU/mg 未満、0.01 EU/mg 未満、又は0.001 EU/mg 未満である。

【0467】

いくつかの実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、無菌製剤に製剤化される。これは、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

【0468】

IX. 製品及びキット

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるヘッジホッグ経路阻害剤などの本発明のヘッジホッグ経路阻害剤は製品に製造される。同様に、本発明のポリペプチド及び核酸、例えば変異型 SMO ポリペプチドも製品として製造できる。いくつかの実施形態では、製品は、容器と、ヘッジホッグシグナル伝達の全体又は一部の阻害のための又はヘッジホッグシグナル伝達経路の活性化に起因する疾患又は状態の治療のための使用を指示する該容器に関する又はそれに関連するラベル又はパッケージ挿入物を備える。他の実施形態では、製品は、容器と、スクリーニングアッセイにおける使用を示す該容器に関する又はそれに関連するラベル又は添付文書を備える。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、注射器などが挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成できる。いくつかの実施形態では、容器は、癌の症状を治療するのに有効な組成物を保持し、かつ、無菌のアクセスポートを有することができる（例えば、容器は、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアルであることができる）。組成物中における少なくとも1種の活性剤はヘッジホッグ経路阻害剤である。ラベル又はパッケージ挿入物は、ヘッジホッグ経路阻害剤を投与するための又は SMO ポリペプチド若しくは核酸若しくはベクター若しくは宿主細胞を使用するための説明書をさらに備える。さらに、製品は、注射用静菌水（BWF I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液及びデキストロース溶液などの薬学的に許容される緩衝液を含む第2容器を備えることができる。製品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含めて、商業的見地及び使用者の見地から望ましい他の材料をさらに備えることができる。

【0469】

いくつかの実施形態では、様々な他の目的のために、例えば変異型 SMO タンパク質発現細胞死滅アッセイ、細胞からのヘッジホッグシグナル伝達ポリペプチドの精製又は免疫沈降のために有用なキットを提供する。変異型 SMO タンパク質の単離及び精製のために、キットは、ビーズ（例えばセファロースビーズ）に結合したそれぞれの変異型 SMO タンパク質結合試薬を含むことができる。試験管内、例えば ELISA 又はウェスタンブロットでの変異型 SMO タンパク質の検出及び定量のために当該分子を含むキットを提供することができる。いくつかの実施形態では、製品と同様に、キットは、容器と、該容器に関する又はそれに関連したラベル又は添付文書を備える。

【0470】

いくつかの実施形態では、容器は、本発明で使用可能な少なくとも1種のヘッジホッグ経路阻害剤を含む組成物を保持する。いくつかの実施形態では、例えば希釈剤及び緩衝液、対照抗体を含有する追加の容器を含めることができる。いくつかの実施形態では、ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物の説明並びに目的の試験管内又は診断使用のための指示を提供することができる。

【実施例】

【0471】

実施例

本発明を一般的に説明してきたが、これは以下の実施例を参照することによって理解されるであろう。実施例は、単に本発明の特定の態様及び実施形態を例示する目的のために含まれるに過ぎず、本発明を限定するものではない。

【0472】

例 1

ビスモデギブ耐性基底細胞癌の遺伝子分析。

標的治療（例えば癌治療）に対する臨床応答は、薬剤耐性を付与する遺伝子変異の獲得のため短命な場合がある。耐性機構の同定は、新たな治療戦略を導くと考えられる。不適切なHhシグナル伝達は、基底細胞癌（BCC）を含めたいくつかの癌に関連する。PTCHにおける機能喪失変異（～90%）及びSMOにおける活性化変異（～10%）は、BCCにおける主要なドライバーである。ビスモデギブ（GDC-0449）に対する耐性の臨床的メカニズムを、再発基底細胞癌のエキソーム、RNA及びコピー数を使用して同定した。

【0473】

図2に示すように、ビスモデギブ耐性は、ビスモデギブ耐性BCC患者におけるヘッジホッグ経路シグナル伝達の上昇と関連していた。ビスモデギブ耐性BCCのエキソーム配列決定及びコピー数分析*の結果を以下の表3に示す。

【0474】

【表3】

表3

患者	発癌ドライバー	見込まれる耐性機構
MG	PTCH1.spc1504（生殖細胞系列）	SMO.W535L
JT	SMO.W535L（体細胞）	未知
KL	PTCH1.P1387S,PTCH1.Q853*	未知
*PT20764	PTCH1.Fs1017（フレームシフト（生殖細胞系列）及びLOH）	SMO.W281C（G>T）
*PT20741	PTCH1.A1380V	SUFU.Fs241
*PT20849	PTCH1.S616G（スプライシング及びLOH）	Het.SUFU欠失,Het.PTEN欠失
*PT20840	PTCH1.Q501H（スプライシング及びLOH）	SMO.A459V（C>T）
*PT20842	PTCH1.Fs108（フレームシフト及びLOH）	SMO.A459V（C>T）

【0475】

遺伝子型の決定から、追加ビスモデギブ耐性腫瘍におけるSMO-A459V変異の第3例が明らかになった。SMO-A459Vは、分析を受けた9名の耐性患者のうちの3名における治療後生検で見出された反復突然変異である。SMO-A459V変異は、治療後のみに存在し、42個の独立した治療未経験BCCサンプルには存在しなかった（図3を参照されたい）。SMO-A459V変異はSMOを活性化することができた。

【0476】

また、SMO-W281C変異は再発BCCでも検出された。図4に示すように、SMO-W281Cはビスモデギブ結合ポケットである。

【0477】

WT-SMO、SMO-W281C、SMO-A459V、PTCH又は空ベクター（EV）を、GLI1ルシフェラーゼレポーターを有するC3H10T1/2細胞に同時トランスフェクトした。SMO-A459Vは、PTCH1及びビスモデギブに対する感受性が低下した活性化突然変異であることが示された（図5A～5C。エラーバーは標準偏差を表す）。SMO-W281Cは、SMO-WTと同程度にPTCH1阻害に感受性である（図5D～5E。エラーバーは標準偏差を表す）。示された構築物がトランスフェクトされた293細胞を、5nMの³H-ビスモデギブ又は50μMの冷却ビスモデギブと共に又はそれなしでインキュベートした。特異的結合＝合計－非特異的結合（図5E。エラーバーは標準偏差を表す）。

【0478】

臨床SMO変異の2つのサブグループがあるように思われる。（1）薬剤感受性が減少

10

20

30

40

50

した活性化（A 4 5 9 V及びW 5 3 5 L含む）及び（2）P t c h感受性を維持し、依然としてビスモデギブ結合ポケットの立体構造を崩壊させる変異（D 4 7 3 H及びW 2 8 1 Cを含む）。

【0479】

例2：ビスモデギブ耐性及び未処理B C Cのゲノム解析

ビスモデギブ耐性に関連する変異を同定するために、ゴーリン症候群（n = 5）及び散発性（n = 6）患者からのB C C及び追加のゴーリン患者からのホルマリン固定パラフィン包埋（F F P E）サンプルの標的S M Oシーケンシングの全エキソームシーケンシング（W E S）を実施した。全ての患者は、最初にはビスモデギブについて臨床上の利益を経験したが、その後治療を受ける間に進行した。

10

【0480】

患者の4名からの2つの別個の生検を採取し、それによって、ビスモデギブ耐性B C Cから合計16の生検を分析した。患者は、最初に転移（図6 B）又は局所的に進行したB C C（図6 C）について診断し、そして薬剤耐性病変がB C C（図6 D）であったことを組織学的に確認した。比較のために、未処置ゴーリン症候群（n = 16）及び散発性（n = 27）B C C患者からの腫瘍をW E Sに供した。2つの別個の生検を、合計48の未処置B C C生検を与えるゴーリン患者のうち5名から得た。ゴーリン患者からの未処理B C Cのサンプルの平均体細胞突然変異率は33.5 /メガベース（Mb）であり、6.2 ~ 68.9 /Mbに変化し、そして散発性患者については2.4 ~ 162.2 /Mbの範囲で50.5 /Mbであった。これらの割合は、黒色腫（L a w r e n c e外，2013）を含めた他の癌と比較して高い。体細胞突然変異スペクトルのグローバル分析から、両方のコホートにおいてシトシンからチミン（C > T）への塩基転位型突然変異に対する優位性が明らかになったが、これは紫外線光誘導突然変異誘発を示す（M i l l e r，1985）。

20

【0481】

R N A配列を使用する再発B C C生検（n = 11）の転写分析から、H h標的遺伝子G L I 1が正常皮膚サンプルの回収よりも10倍高く発現した（D E S e q 2、p < 0.003）ことが明らかになった（図6 E）。さらに、G L I 1発現レベルは、増殖マーカーM K I 6 7の発現レベルと高度に相関していた（R = 0.96）が、これは、B C Cの再成長を促すH hシグナル伝達の再活性化と一致する。したがって、分析は、ビスモデギブによってS M O阻害を回避するようにH hシグナル伝達を再活性化する遺伝的メカニズムを同定することに重点を置いた。この目的のために、選択された癌遺伝子の突然変異（K a n d o t h外，2013）及び標準的なH h経路成分を同定した。次に、ビスモデギブ耐性B C Cにおけるゲノムワイドコピー数変化及びL O Hを、一塩基多型（S N P；n = 11）及び比較ゲノムハイブリダイゼーション（C G H；n = 4）アレイを使用して決定した。

30

【0482】

例3：B C C開始におけるP T C H 1及びS M O変異

B C C遺伝学に関する以前の報告と一致して（a y a r a m a n外，2014；R e i f e n b e r g e r外，2005）、再発ゴーリンの全て（100%）及び散発性B C Cの過半数（75%）は、腫瘍サプレッサーP T C H 1に変異を示したが、これは遺伝子の全長にわたって発生しかつおそらく有害である：7つは切断であり、4つはエクソンのスプライシングに影響を与える可能性があり、2つはC o n d e lアルゴリズムによって有害であることが予測される（G o n z a l e z - P e r e z a n d L o p e z - B i g a s，2011）。また、ゴーリン患者B C C（P T 12）もP T C H 1の変化によって開始された可能性があった。P T C H 1の変化なしの再発散発性腫瘍（n = 2）は、既知の発癌性突然変異S M O - W 5 3 5 Lを保持した（X i e外，1998）。これらP T C H 1及びS M O変異体は、最初に応答し、その後ビスモデギブ耐性を示したB C Cにおける開始事象である可能性が高い。

40

【0483】

50

P T C H 1 変異体の頻度に関する同様の傾向が未処置ゴーリン（90%）及び散発性（78%）のB C Cで観察され、3つの散発例において既知の発癌S M O変異を同定した（図7）。再発B C Cは、ゴーリン（50%）と散発性（57%）例との間で同様のT P 5 3 変異体頻度を示した一方で、未処置コホートT P 5 3 変異体では、ゴーリンB C C（24%）よりも散発性B C C（59%）でより頻繁に観察されたが、これは、未処置の散発性B C Cで観察された高い変異率を反映している可能性がある。

【0484】

例4：S M O 変異体のビスモデギブ依存選択

驚くべきことに、再発腫瘍生検の大半は、薬剤標的S M Oに変異を保有し（11/16；69%）、ほとんどがP T C H 1 変異体と同時に生じた。比較すると、S M O 変異体は、未処置ゴーリンB C Cには完全に存在しておらず、4/27（15%）の未処置散発性B C Cに存在していた。再発B C Cで同定されたS M O 変異を図8 Aに概説している。S M O - L 4 1 2 F、S M O - W 5 3 5 L 及び S M O - S 5 3 3 N 変異は、発癌ドライバーとして以前に報告されている（Rei f e n b e r g e r 外, 1998；S w e e n e y 外, 2014；X i e 外, 1998）のに対し、S M O - W 2 8 1 C 及び S M O - V 3 2 1 M は、近年、ビスモデギブ耐性B C Cで同定された（B r i n k h u i z e n 外, 2014）。未処置B C Cコホート又はH h 誘導癌の依然のゲノム解析では観察されなかったS M O - I 4 0 8 V 及び S M O - A 4 5 9 V （B r a s t i a n o s 外, 2013；C l a r k 外, 2013；J a y a r a m a n 外, 2014；K o o l 外, 2014；Rei f e n b e r g e r 外, 1998）を含めて、4種のS M O 変異が発見されたが、これは、これらのものがビスモデギブ耐性に関与することを強く示唆するものである。この研究からの全てのS M O の変異は、T M 領域内に位置し（図8 B 及び図9 A）、かつ、いくつかの種からS M O タンパク質間で高度に保存された残基にアミノ酸置換を付与するが、これはS M O 機能におけるそれらの重要性を反映している可能性がある。

【0485】

耐性機構は、デノボで又はさらに可能なのは治療前の腫瘍中に存在するマイナーサブクロンの選択により取得できる。両方のシナリオでは、治療による薬剤耐性の原因となる変化の濃縮が観察されるであろうことが予想された。S M O 変異体の薬物依存選択を評価するために、処置前の腫瘍における変異の検出及び治療後にS M O 変異を保有する腫瘍細胞の割合について検討した。この目的のために、6名の患者から入手可能であった処置前F F P E 腫瘍サンプルを配列決定し、そして治療後腫瘍クローンを分析した。S M O - A 4 5 9 V は、3名の患者からの治療後生検における検出されたが、対応する治療前生検ではバックグラウンドレベルを超えて検出可能ではなかった（図8 C）。同様に、S M O - V 3 2 1 M に相当するヌクレオチド変化のみが治療後サンプルにおいてバックグラウンドレベルを超えて検出可能であったが、これは、デノボで生じた又はアッセイの検出限界を下回るレベルで最初に存在したS M O の変異細胞の薬剤誘導選択と一致する（図8 D 及び8 E）。興味深いことに、以前に報告されたS M O - L 4 1 2 F 変異は、患者P T 1 1 からの処置前及び処置後サンプルの両方で検出されたが、これは、この変異体がこの腫瘍のための発癌性ドライバーである可能性が高いことを示唆するものである（図8 F）。変異型ヌクレオチドの頻度は、治療の際に減少するように見えることに注意されたい；これは、治療後サンプルにおける正常組織の高レベルの汚染によるものである。コピー数お酔いb S N P アレイ分析から、この腫瘍は、P T C H 1 については最初に2倍体であり、治療後にP T C H 1 のコピー数喪失を取得したことが明らかになった。理論に拘束されることを望まないが、この患者が最初にビスモデギブに応答するという事実（図8 H）は、この発癌性突然変異においてP T C H 1 レベルの減少（コピー喪失による）が薬剤にさらされても腫瘍の再成長を促進する場合あるという可能性を提起する。

【0486】

S M O 変異が再発B C Cにおいて支配的なクローンに存在したかどうかに対処するために、P T C H 1 及びS M O 変異体の腫瘍細胞割合を、W E S からの対立遺伝子頻度並びにコピー数及びS N P アレイからの腫瘍内容物情報を使用して計算した（G r e e n m a n

外, 2010; Nik-Zainal 外, 2012; Stjernqvist 外, 2011)。ヘテロ接合性生殖細胞系列 P T C H 1 変異は、ゴーリン患者由来の生検における正常皮膚及び観察される場合には腫瘍細胞における後の L O H の汚染の原因となった。P T O 9 を除いて、S M O は、再発 B C C では二倍体であったため、完全クローンヘテロ接合性 S M O 変異体の予想される対立遺伝子頻度は、腫瘍内容物の 50% であり、その後これを観察された対立遺伝子頻度と比較した。P T C H 1 変異は腫瘍細胞の > 80% に存在したが、これは、これらの腫瘍における発癌ドライバーである P T C H 1 における有害事象と一致する。通常の汚染及び観察される対立遺伝子頻度に基づいて、全ての S M O 変異は、これらのビスモデギブ耐性 B C C における腫瘍細胞の > 60% に存在すると推定されたが、これは、薬剤治療の際におけるそれらの選択性と一致する。

10

【0487】

例 5：S M O の薬剤結合ポケットの変異はビスモデギブに対する耐性を付与する

この研究で発見された S M O 変異の性質への洞察を得るために、近年解明された S M O T M 領域の結晶構造を利用した (W a n g 外, 2013)。S M O 構造上へのビスモデギブの計算ドッキングから、S M O - W 2 8 1、S M O - V 3 2 1 及び S M O - I 4 0 8 が薬剤結合ポケットの近くに位置していることが明らかになった (D B P; 図 10 A)。S M O - W 2 8 1 の芳香族インドールは、ビスモデギブのピリジン環とのエッジ・ツー・フェイススタッキング相互作用を形成し、かつ、狭い疎水性ポケットを形成するのに役立ち、これは、S M O - W 2 8 1 C 変異体の嵩高性の低い硫黄に対する置換により破壊される (図 10 B、中央のパネル)。さらに、バリリン 3 2 1 からメチオニンへの変異は、W 2 8 1 の配置を妨害しやすく、薬剤結合に二次的な効果を発揮する (図 10 B、右のパネル)。W 2 8 1 とは異なり、残基 I 4 0 8 は、試験した計算モデルでは薬剤とは直接接触しない；その代わりに、このものは、結合ポケット残基 H 4 7 0 及び V 4 0 4 に対してそのデルタメチル基でパックされるが、これは、これを失ったときに、これらの残基の立体構造を変化させることにより結合に影響を及ぼすと予想される (図 10 C)。

20

【0488】

D B P における変異の機能的影響を試験するために、G l i ルシフェラーゼベース H h レポーターアッセイを使用した。D B P 変異は、ビスモデギブの I C 50 を、80 nM の I C 50 を有する S M O - W T のそれに対して 12 ~ 49 倍増加させた (図 12 A)。これらの I C 50 値は、このアッセイにおける S M O の過剰発現のため過剰推定値であることに留意すべきである (D i j k g r a a f 外, 2011)。それぞれの D B P 変異体は、S M O - W T と比較して、基礎活性の小さな増加 (< 1.5 倍) を示したが (図 11 A)、ほとんどの S M O - I 4 0 8 V は P T C H 1 の過剰発現によって容易に阻害された (図 11 B)。次に、S M O - I 4 0 8 V 及び S M O - W 2 8 1 C に対する [3H] 標識ビスモデギブの結合を試験したところ、これらは、それぞれ I C 50 の最小及び最大の増加を示した (図 12 A)。両方の変異体は、S M O - W T と同様の細胞表面レベルで発現したが、ビスモデギブ結合障害を示した (図 12 B 及び 11 C)。

30

【0489】

前臨床腫瘍モデルにおいて、H h 経路は、腫瘍退縮を誘導するために転写レベルで、> 90% 阻害されなければならないことが実証されている (W o n g 外, 2011)。ビスモデギブの存在下での細胞増殖に対するこれらの S M O 変異の影響をよく理解するために、小脳顆粒ニューロン前駆体 (C G N P) 細胞のウイルス形質導入のためのアッセイを開発した。以前から、H h 誘導腫瘍細胞は培養中にそれらの H h 経路依存性を急速に失うことが注目されている (S a s a i 外, 2006)。しかし、C G N P は、H h 依存的に生体内で増殖し、かつ、有限期間にわたる培養中に H h 経路依存性を維持する (W e c h s l e r - R e y a a n d S c o t t, 1999)。P t c h 1 l o x p / l o x p T p 5 3 l o x p / l o x p R o s a 2 6 L S L - t d T o m a t o (P P T) p u p から同定された C G N P に、S M O 変異体を強化緑色蛍光タンパク質 (e G F P) ・ C r e 融合タンパク質と共に発現するレンチウイルス構築物を感染させた (図 12 C)。C r e リコンビナーゼは、P t c h 1 の欠失を誘導するため、形質導入 C G N P のみを外因性

40

50

ソニックヘッジホッグリガンドの非存在下で増殖させることを確実にする（SHH；図11D）。これにより、様々なSMO変異体がSHHリガンドを除去後にビスモデギブ及び他の阻害剤の存在下での増殖を促進させる能力を試験することが可能になった。メチル- [3H] -チミジン取り込みによる増殖を監視すると同時に、Cre依存タンデム二量体（tdTomato）発現により、感染細胞の可視化及び定量化が可能になった。また、この系は、良好なモデル患者遺伝学を可能にした。というのは、SMO変異のほとんどがTP53変異を保有しかつPTCH1の喪失によって誘導される腫瘍で同定されたからである。SMO-WT及びCreを感染させたPPT-CGNPは、 ~ 22 nMのIC50を有しており、増殖は最大100 nMのビスモデギブで阻害された。これに対し、全てのDBP変異は、ビスモデギブ感受性に劇的な影響を及ぼし、感染細胞は、高レベルのビスモデギブで増殖し続けた（ > 1 μ M；図12D）。驚くべきことに、SMO-W281Cを感染させた細胞は、5 μ Mのビスモデギブの存在下であってもほぼ未処置のレベルで増殖し続けたが、これは、おそらく薬剤結合におけるこれらの残基の直接的な役割を反映するものである。CGNPは、Cre依存性tdTomatoレポーター発現のための蛍光活性化細胞選別（FACS）分析によって同様の頻度で感染し、しかも、SMO変異体は、定量的逆転写（定量RT）PCRによって同等のレベルで発現したことが確認された。

10

【0490】

例6：SMO薬剤結合ポケットの突然変異によるビスモデギブに対する耐性の予測

他のDBP変異が薬物耐性を促進することができるかどうかを調査するために、計算モデルを使用してビスモデギブの4.5 Å内に位置する原子により21 SMO残基を同定した（図13A）。アルゴリズムを使用して、この研究からのSMO-W281C及びSMO-I408Vを含めて、これらのDBP残基への非同義変化をもたらした160種の異なる一塩基変異体を同定した（表4）。

20

【0491】

表4：ビスモデギブ及びLY2940680の両方の4.5オングストローム内の原子によるSMO残基の同定

【表 4－1】

表 4：ビスモデギブ及びLY2940680の両方の4.5オングストローム内の原子によるSMO残基の同定

AA位置	AA	コドン	非同義一塩基変化	AA変化	C/G>T/A変化	変異コメント
219	N	AAC	TAC、GAC、CAC、ATC、AGC、ACC、AAA、AAG	Y、D、H、I、S、T、K、K	なし	N219Dはビスモデギブ及びLDE225に対する感受性を減少させた(この研究及びBuonamici外. 2010)
221	L	CTC	ATC、TTC、GTC、CAC、CGC、CCC	I、F、V、H、R、P	F	L221RはLDE225に対する感受性を減少させた(Buonamici外. 2010)
230	M	ATG	TTG、GTG、CTG、AAG、AGG、ACG、ATA、ATT、ATC	L、V、L、K、R、T、I、I、I	I	
281	W	TGG	AGG、GGG、CGG、TAG、TTG、TCG、TGA、TGT、TGC	R、G、R、*、L、S、*、C、C	*	W281C、この研究及びBrinkhuizen外. 2014
325	L	CTG	ATG、GTG、CAG、CGG、CCG	M、V、Q、R、P	なし	
384	D	GAC	AAC、TAC、CAC、GTC、GGC、GCC、GAA、GAG	N、Y、H、V、G、A、E、E	N	D384Nはビスモデギブ及びLDE225に対する感受性を減少させた(この研究及びBuonamici外. 2010)
389	I	ATT	TTT、GTT、CTT、AAT、AGT、ACT、ATG	F、V、L、N、S、T、M	なし	
391	F	TTT	ATT、GTT、CTT、TAT、TGT、TCT、TTA、TTG	I、V、L、Y、C、S、L、L	なし	
394	Y	TAC	AAC、GAC、CAC、TTC、TGC、TCC、TAA、TAG	N、D、H、F、C、S、*、*	なし	
400	R	CGT	AGT、TGT、GGT、CAT、CTT、CCT	S、C、G、H、L、P	C	R400A、部分的に機能性(Dijkgraaf外. 2011)
408	I	ATC	TTC、GTC、CTC、AAC、AGC、ACC、ATG	F、V、L、N、S、T、M	なし	I408V、この研究
470	H	CAC	AAC、TAC、GAC、CTC、CGC、CCC、CAA、CAG	N、Y、D、L、R、P、Q、Q	Y	H470A発現せず(Dijkgraaf外. 2011)
477	Q	CAG	AAG、TAG、GAG、CTG、CGG、CCG、CAT、CAC	K、*、E、L、R、P、H、H	E	

10

20

30

40

【表 4 - 2】

AA位置	AA	コドン	非同義一塩基変化	AA変化	C/G>T/A変化	変異コメント
480	W	TGG	AGG、GGG、CGG、TAG、TTG、TCG、TGA、TGT、TGC	R、G、R、*、L、S、*、C、C	*	W480A発現せず(Dijkgraaf外. 2011)
481	E	GAG	AAG、TAG、CAG、GTG、GGG、GCG、GAT、GAC	K、*、Q、V、G、A、D、D	K	
484	F	TTC	ATC、GTC、CTC、TAC、TGC、TCC、TTA、TTG	I、V、L、Y、C、S、L、L	なし	
515	L	CTT	ATT、TTT、GTT、CAT、CGT、CCT	I、F、V、H、R、P	F	L515Aは発現し、活性化し、ビスモデギブによる1mM阻害に対して感受性である(Dijkgraaf外. 2011)
518	E	GAG	AAG、TAG、CAG、GTG、GGG、GCG、GAT、GAC	K、*、Q、V、G、A、D、D	K	E518K及びE518Aはビスモデギブに対する感受性を減少させた(Dijkgraaf外. 2011)
521	N	AAC	TAC、GAC、CAC、ATC、AGC、ACC、AAA、AAG	Y、D、H、I、S、T、K、K	なし	N521A発現せず(Dijkgraaf外. 2011)
522	L	CTG	ATG、GTG、CAG、CGG、CCG	M、V、Q、R、P	なし	
525	M	ATG	TTG、GTG、CTG、AAG、AGG、ACG、ATA、ATT、ATC	L、V、L、K、R、T、I、I、I	I	
321	V	GTG	ATG、TTG、CTG、GAG、GGG、GCG	M、L、L、E、G、A	M	V321M、この研究及びBrinkhuizen外. 2014
387	S	AGT	TGT、GGT、CGT、AAT、ATT、ACT、AGA、AGG	C、G、R、N、I、T、R、R	N	S387Nはビスモデギブ及びLDE225に対する感受性を減少させた(この研究及びBuonamici外. 2010)
459	A	GCC	ACC、TCC、CCC、GAC、GTC、GGC	T、S、P、D、V、G	V	A459V、この研究
473	D	GAC	AAC、TAC、CAC、GTC、GGC、GCC、GAA、GAG	N、Y、H、V、G、A、E、E	N	D473H(Yauch外. 2009)Pを除く全てaaはビスモデギブに対する感受性を減少させた(Dijkgraaf外. 2011)

配列番号1の位置219、221、281、384、408及び518に対応するアミノ酸はビスモデギブ結合ポケット内にある。配列番号1の位置321、387、459及び473に対応するアミノ酸は、臨床変異に関連するが、変異したときにビスモデギブの4.5オングストローム内には見出されない。SMO-D473はこの方法では同定されなかったが、SMOの結晶構造から、D473は、R400、H470、E518及びN521を含めて、ビスモデギブに直接接触する数個の残基と共に水素結合ネットワークを形成することが明らかになった(Wang外, 2013; Yauch外, 2009)。SMO-E518は、変異したときにビスモデギブ感受性に影響を与える残基としてアラニンスキャン突然変異誘発によって依然に同定された(Dijkgraaf外, 2011)。また、このアプローチは、N219及びD384を含めて、以前にSMO阻害剤ソニデジブ(LDE225)に対する耐性の前臨床モデルに参与した残基も同定した(表4; Buonamici外, 2010)が、これは、水素結合ネットワークを介してSMOコンホメーションを安定化させることが予想される(図13B)。驚くべきことに、SMO-N219D、SMO-D384N及びSMO-S387Nは、全て、GliルシフェラーゼベースのHhレポーターアッセイにおいてSMO-WTと比較してビスモデギブに対する感受性の減少を示した(図13C)。さらに、SMO阻害剤LY2940680及びビスモデギブは、14個の接触残基を共有することが分かった(表4)。理論に束縛されるものではないが、これは、化学的に異なる阻害剤が重複SMO残基と相互作用し、しかも阻害剤間での交差耐性が临床上生じる可能性があることを示唆するものである。

【0493】

例7：薬剤結合ポケットの範囲外のSMO変異はビスモデギブ耐性を付与する

また、ビスモデギブ結合ポケットに対して遠位に位置するSMO変異もビスモデギブ耐性に関連していた(図14A)。興味深いことに、SMO-A459Vは、SMO-WTに対して基礎活性の増加を示したが、確立された発癌性変異よりも少ない程度であった(図14B)。この活性上昇は、ビスモデギブ(図15A)及びPTCH1過剰発現の両方による阻害に対する感受性の減少と相関しており、SMO-A459VはそれぞれビスモデギブのIC50を約9倍にシフトさせた。さらに、試験した全ての活性化変異体は、SMO-WTに匹敵するレベルの細胞表面発現にもかかわらず、ビスモデギブ結合障害を示した(図15B及び15C)。

【0494】

PPT CGNPアッセイを使用して、ビスモデギブの存在下での増殖に及ぼす非DBP SMO変異の影響を調査した。CGNPを発現するSMO-A459V及びSMO-W535Lは、高濃度のビスモデギブで増殖し続けた(図14C及び15D)。これらのデータは、GPCRについて観察されたように、活性化を促進し、アンタゴニストに対する親和性を減少させるようにSMO構造を不安定化させるDBPの外部の変異と一致する(GETHER外, 1997)。しかし、これらの変異によって、DBPに及ぼす潜在的なアロステリック効果を除外することはできない。PTCH1野生型でありかつ発癌性SMO変異を保有するいくつかのBCC(PT01、PT07及びPT11からの)は、これらのSMO変異がビスモデギブ阻害に対する感受性を減少させるという事実にもかかわらず、初期に治療に応答した(図15A)。これは、ビスモデギブに対するSMO変異体の感受性におけるPTCH1の機能喪失についての役割を示唆する可能性がある。

【0495】

例8：ビスモデギブ耐性を克服する治療オプション

複数のSMO変異がビスモデギブに対する耐性を付与することができることを確立されたので、次に、化学的に異なるSMO阻害剤がビスモデギブ耐性克服することができるかどうかに対処した。LY2940680及びLDE225は、近年、様々な癌のための臨床試験中であり(Clinicaltrials.gov)、化合物5は、SMO-D473Hに対する前臨床有効性を示したSMO阻害剤である(Dijkgraaf外, 2011)。全ての化合物が同様にPPT CGNPを発現するSMO-WTの増殖を抑制したが、SMO変異体発現細胞は、異なる程度にもかかわらず増殖し続けた(図16A)。

この観察された様々なSMO阻害剤間の交差耐性は構造予測と一致し、これは、SMOアンタゴニストを組み合わせることが、獲得した耐性を克服するのに好適な治療オプションではないことを示唆する。さらに、再発腫瘍における再発SUFU及びGLI2変異体の同定から、SMOの下流Hh経路の構成要素を標的とすることについて論じることが可能である。これまでに開発されたGLI阻害剤は、有効性及び生物学的利用能に欠けるが、最近の研究から、ブロモドメイン含有タンパク質BRD4がGLIプロモーターを占有し、Hh経路の転写出力のために必要であることが分かった（Long外，2014；Tang外，2014）。ビスモデギブ耐性SMO変異体を発現するPPT CGNPは、ブロモドメイン阻害剤JQ1の存在下で増殖の減少を示した（図16B）。

【0496】

10

例2～9のための材料及び方法

患者及び組織試料

ビスモデギブ治療患者からの試料を、連邦政府のガイドラインに従って書面によるインフォームドコンセントを受けた後及び臨床研究SHH3925g、SHH4476g及びSTEVEに参加する貢献センターの治験審査委員会（IRB）により承認されたとおりに収集した。ビスモデギブ耐性メカニズムの解析のために、生検を、従来技術に記載されたとおり、予め治療上の研究者評価臨床的利益を経験した、局所進行性又は転移性BCCを有する12人の患者から疾患進行時に得た（Lorussio外，2011；Sekulic外，2012）。43人の未治療患者から生検を採取し、ミシガン大学及びスタンフォード大学のIRBによって承認されたプロトコルに従って比較のために配列決定した。

20

【0497】

ゲノム解析

15個のビスモデギブ耐性BCCサンプル、48個の未処置BCC及び52個の一致血液サンプルからのDNAをWESに供した。腫瘍生検のWESは、67倍を超える最小平均被覆率で達成された。コピー数の変化を、SNP又はCGHアレイによってビスモデギブ耐性BCCについて評価した。11個の抵抗性BCCサンプルからのRNAを、RNA-seqに供した。7個のFFPEサンプルからのDNAを、パイロシーケンシングによって分析した。5個の正常皮膚サンプルからのRNA配列データ（ProteoGene社から入手）を、BCC患者サンプルとの比較のためにベースライン遺伝子発現として使用した。

30

【0498】

動物

全てのマウスは、ジェネンテック社の動物使用ガイドライン及びカリフォルニア州立法的・倫理的実践に適合した、ジェネンテック社の動物ケア及び使用委員協会によって承認されたプロトコルに従って飼育し、維持した。

【0499】

機能分析

SMO変異体は、記載されたとおりにpRK5-SMOベクターで生成し（Dijkgraaf外，2011；Yauch外，2009）、そして記載されたとおりにGliルシフェラーゼレポーターアッセイで利用し（Dijkgraaf外，2011）又は一次CGNP培養の形質導入用のレンチウイルスベクターにクローン化した。増殖は、メチルー[3H]ーチミジン取り込みを使用してアッセイした（Kool外，2014）。SMO変異体に対する[3H]ービスモデギブの結合を、記載されたとおりにHEK-293細胞で実施した（Dijkgraaf外，2011）。

40

【0500】

患者サンプル

再発腫瘍サンプルを、寄付センターでの連邦及び治験審査委員会（IRB）のガイドラインに従って書面によるインフォームドコンセントを受けた後に採取した。未処置の散発性BCCサンプルをミシガン大学IRB承認プロトコルのHUM00069052及びH

50

UM00050085に従って得た。未処置ゴーリン患者サンプルを、スタンフォード大学IRB承認プロトコル2012-029に従って得た。

【0501】

組織学

FFPE及びO. C. T. 化合物 (Tissue-Tek) 包埋サンプルを切断し、そして標準的な手順に従ってH&E染色した。画像を、Zeiss Axioskop 2顕微鏡 (Zeiss社) を使用して得た。

【0502】

DNA及びRNA単離

冷凍BCC腫瘍をBullet ブレンダー (Next Advance) 又はTissue Lyzer (Qiagen) のいずれかを使用して、RLTプラス溶解緩衝液 (Qiagen) 中でホモジナイズした。核酸を、製造業者のプロトコルに従ってAllprep DNA/RNAミニキット (Qiagen) で単離した。FFPE腫瘍切片を、マクロ解剖し、脱パラフィンし、そしてAllprep DNA/RNA FFPEキット (Qiagen) を使用して抽出した。

【0503】

エキソーム捕捉及び配列決定

エキソーム捕捉を、Agilent SureSelect (カリフォルニア州サンタクララ、) ヒト全エキソームキット (50Mb) を使用して実施した。エキソーム捕捉ライブラリーを、HiSeq2000 (イルミナ、CA) で配列決定して2×75bpペア

【0504】

バリエーションコーリング

エキソーム配列をUCSCヒトゲノム (GRCh37/hg19) にgsnap (Wu及びNacu, 2010) バージョン2013-10-10を使用してパラメータ「-M 2-n 10-B 2-i 1-pairmax-dna=1000-terminal-threshold=1000-gmap-mode=none-clip-overlap」でアラインさせた。局所的再アラインメントを、GATK Indel Realignerを使用して実施した (DePristo外, 2011)。重複読み取り値を、ピカードを使用して除去した。腫瘍及び対応する正常サンプルファイルについての体細胞バリエーションコーリングを、デフォルトパラメータのVariantTools 2を使用して実行した

(<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/VariantTools.html>)。dbSNP構築物131で表される (Sherry外, 2001) がCOSMIC v62には存在しない (Forbes外, 2010) 既知の生殖系列変異体を、全てのサンプルについてフィルタリングした。遺伝子機能に及ぼす全ての非同義体細胞変異の効果を、Condelを使用して予測した (Gonzalez-Perez and Lopez-Bigas, 2011)。全ての変異体に、Ensemblリリース63を使用して注釈をつけた。

【0505】

RNA配列決定及びデータ解析

RNA-seqライブラリーを、TruSeq RNAサンプル調製キット (Illumina, CA) を使用して調製した。ライブラリーは、レーン当たり3回多重化し、そしてHiSeq2000で配列決定してサンプル当たり少なくとも~3000万ペアエンド (2×75bp) の測定値を得た。RNA-seq測定値を、gsnap (Wu and Nacu, 2010) バージョン2013-10-10を使用してパラメータ「-M 2-n 10-B 2-i 1-N 1-w 200000-E 1-pairmax-rna=200000-clip-overlap」でUCSCヒトゲノム (GRCh37/hg19) にアラインメントした。遺伝子当たりの発現数を、ペア内で調和的にかつNCBI及びEnsembl遺伝子アノテーションによって定義されるような各遺伝子座及びRefSeq mRNA配列にユニークにアラインメントする測定値の数をカウントすることによって得た。差次的遺伝子発現解析を、Bioconductor

10

20

30

40

50

onductor DESeq2パッケージ (Anders and Huber, 2010) を使用して実行した。

【0506】

配列データ処理

全ての配列決定読み取り値を、Bioconductor ShortReadパッケージを使用して品質について評価した (Morgan外, 2009)。全てのサンプルが正しく識別されたことを確認するために、全てのエキソーム及びRNA-seqデータ変異体を相互比較し、そしてBioconductor VariantTools2パッケージを使用して遺伝的整合性を確認した。全ての患者対サンプルは正しく一致し、90%カットオフを使用した他の患者とは一致しなかった。

10

【0507】

比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH)

腫瘍サンプルを、AgilentヒトゲノムCGH1Mマイクロアレイでアッセイした。ヒト男性ゲノムDNA (Promega P/N G1471) を基準として使用した。バックグラウンド減算信号強度の個々のlog2比を、Agilent特徴抽出ソフトウェアバージョン10.7から得た。LOG2比を、ゲノムGC含量についての1MBウィンドウを使用してGC含量波効果について補正した (Diskin外, 2008)。各プローブについて得られたlog2比の値を、cghFLassoアルゴリズムを使用して1つのサンプル及びその時の染色体にセグメント化した (Tibshirani and Wang, 2008)。セグメンテーションを、パラメータ $\lambda_1 = 0$ 及び $\lambda_2 = 1000 \times$ 現在の染色体上のプローブの割合を使用して行った。所定のセグメントのゲノム範囲内の全てのプローブは、そのセグメント内のプローブの平均コピー数の値が与えられた。

20

【0508】

SNPアレイ

Illumina HumanOmni2.5-8アレイを、(Rudin外, 2012) によって開発された方法の以前に使用された修正バージョンを使用して処理した。上記のように、正常サンプルの大きなパネルを使用して、各SNPについて2つのプローブの挙動を学習させた。現在の分析について、450個のHapMap正常サンプルを使用した。上記のように、各サンプル中における各プローブについての生信号を、所定の対立遺伝子の0、1又は2の真の基礎的コピーがPICNICの隠れマルコフモデルで必要とされるように1、2又は3にマッピングされたスケールに変換した。各対立遺伝子のためのプローブA及びBについてのこれらの値を使用して、コピー数比 (CNR、式1) 及びシータ (式2) を算出した。CNRを、全サンプル倍数、すなわち、ゲノム全体の平均コピー数に対する所定の遺伝子座での総コピー数の比として解釈できる。CNR値を、ゲノムGC含量についての1Mbウィンドウを使用してGC含量波効果に対して補正した (Diskin外, 2008)。

30

式1: $CNR = (A + B) / 4$

式2: $\text{シータ} = 2 / \pi \times \text{アークタンジェント} (B / A)$

【0509】

40

続いて、CNR及びシータを、ゼロコピーが存在するときのCNRについてのバックグラウンド値 α を推定するPICNICの前処理ステップに入力した； π 、正常細胞汚染からのシグナルのフラクシオン及び； ϕ 、グローバル倍数性又は全ての調査SNP位置にわたる平均コピー数。この推定は、ゲノムに沿ったCNRの初期セグメンテーションを必要とする。本研究では、cghFLasso ($\lambda_1 = 0$ 及び $\lambda_2 = 1000$ のL2L1VITPath (Tibshirani and Wang, 2008)) を使用し、これは、CBS (Venkatraman and Olshen, 2007) 又はPICNICの内部アルゴリズムのいずれかよりもより正確なセグメンテーションを与えることが分かった。さらに、 π 、 α 及び ϕ 推定するためのPICNICの手順を修正してX及びY染色体についての性特異的予想コピー数 (p_i) を使用した。最後に

50

、これら3つのパラメータについてのP I C N I Cの元の事前分布は、この配列のプラットフォームには不適切であることが分かった。その代わりに、 α を、0.7の平均値及び0.05の標準偏差を有するガウシアンとしてモデル化し； π を、0.05のアルファパラメータ及び100のベータパラメータを揺するベータ分布としてモデル化し；及び ϕ を、6.7143の形状パラメータ及び0.35のスケールパラメータを有するガンマ分布としてモデル化した。

【0510】

α 、 π 及び ϕ を各サンプルについて推定した後に、P I C N I CのHMMを適用してデータをセグメント化し、そして整数対立遺伝子特異的コピー数を生成した。対立遺伝子特異的コピー数の少ない方がゼロに等しかったゲノムセグメントは、LOHの領域である。

10

【0511】

HMMフィットは、一般に、ほとんどのサンプルにおいてほとんどの染色体について非常に正確であったが、CNRが隣接する2つの整数の期待値の間にある場合があることが観察された。これは、生物学的な事実の反映ではないと考えられる2つの隣接するHMM状態間でジッタを生成した。これに対処するために、P I C N I CのHMMによって生成される総コピー数の整数推定値をc g h F L a s s o (CNR)によって生成される制約のない値で置換した。報告総コピー数を生成し、そして正常汚染について調節するために、 α 、 π 及び θ の推定値をP I C N I Cに従ってc g h F L a s s o結果に適用した：

式3. $\delta = (1 - \alpha) / ((2\pi) + \phi(1 - \pi))$

式4.

20

【数1】

$$CN_i = ((\widehat{CNR}_i - \alpha) / \delta - p_i \pi) / (1 - \pi)$$

【0512】

腫瘍細胞割合

腫瘍細胞割合を記載されるとおりに算出した(N i k - Z a i n a l 外, 2012)。簡単に言えば、所定の変異を有する腫瘍細胞を、以下の式を使用して決定した：

【数2】

$$f = \min\left(1, \frac{r}{R} \frac{\rho \eta_T + (1 - \rho) \eta_N}{\rho}\right)$$

30

ここで、 r は、SNPアレイによって決定されるとき、腫瘍細胞である生検中における細胞の割合であり； r は、目的の基準にわたるR全読み値から外れる変異型対立遺伝子を報告する読み値の数であり；HT及びHNは、それぞれ腫瘍及び正常ゲノムにおけるその基準でのゲノムのコピー数である。全ての頻度をパーセンテージに変換した。いくつかの腫瘍細胞頻度は100%を超えた。というのは、このモデルは、生殖細胞変異を占めず又は中立のLOHをコピーしないからである。検証された生殖細胞変異について、次式を、汚染組織内の異なる比率での変異読み値を考慮して調節した：

40

【数3】

$$f = \min\left(1, \frac{r}{R} \rho \eta_T + (1 - \rho) \eta_N\right)$$

【0513】

ビスモデギブ結合モデル

LY2940680 (PDB ID: 4JKV) が結合したSMOの結晶構造は、ドッキングのための出発点として機能した。Maestroバージョン9.5 (シュレーディンガー社) で利用可能なシュレーディングプログラムパッケージソフトを使用して、PrepWizを有するタンパク質調、Ligprepを有するビスモデギブのリガンド調製及びグライドスタンダードプレシジョンとのドッキングを実施し、グライドドッキング

50

ステップで次の変更を除いて全てのステップについてデフォルトパラメータを保持した。フィフティポーズを、歪み補正項をオンにしてポストドッキング最小化を行うために含めた。トップ10のポーズを分析のために書きこみ、これらの全ては同様の結合モードを示した。ピリジン隣接オルトクロロフェニル環は、ほぼ同じ位置にとどまり、アミドのねじれ角の変化により、メチルスルホン及びその結合環の位置のわずかな変化が生じた。トップポーズを本研究の数値のために選択したが、上記変化は、突然変異の効果に関するいかなる解釈も変更していないであろう。図2B、図3A～C、図5A～B及び図6Aは、MOE2013.0801（ケミカル・コンピューティング・グループ社）を使用して作製された。結合ポケット及びIle-408相互作用について示された表面領域は溶媒アクセス可能である。

10

【0514】

パイロシーケンシング

変異特異的PCR（BSP）プライマーを、PyroMarkアッセイデザインソフトウェアV2.0（Qiagen社）を使用して設計した。PCRプライマーを、フォワード又はリバースプライマーのいずれかでの5'ビオチン標識で合成して、ストレプトアビジンセファロースビーズへのPCR産物の結合を容易にした。配列決定プライマーを、PyroMarkアッセイデザインソフトウェアV2.0（Qiagen社）を使用して5'ビオチン標識PCRプライマーの逆方向で設計した。ゲノムDNA（20ng）を、プラチナムPCRスーパーミックス（Invitrogen社）を使用して25μl反応で増幅させ、そしてPCR産物の20μlをPyromark Q24（Qiagen社）でのシーケンシングのために使用した。PCR産物を、10分間にわたってストレプトアビジンセファロースビーズと共にインキュベートし、その後70%エタノール、Pyromark変性溶液、そしてPyromark洗浄緩衝液で洗浄した。次いで、変性したPCR産物を、0.3μMの配列決定プライマーを使用して配列決定した。パイログラムを可視化し、そして配列の品質を評価し、そしてSMO位置L412及びA549での変異体%を、PyroMarkソフトウェアバージョン2.0.4（Qiagen社）を使用して決定した。

20

【0515】

コピー数アッセイ

ゲノムDNAを、血液、治療前後の腫瘍サンプルから単離し、そして反応あたり10ngを四重TaqManアッセイ（アプライドバイオシステムズ／ライフテクノロジーズ）における鋳型として使用して、CopyCallerソフトウェア（アプライドバイオシステムズ／ライフテクノロジーズ）でPTCH1及びRNase P（基準）コピー数を決定した。

30

【0516】

リアルタイムRT-PCR

総RNAの1～4μgを、大容量cDNAキット（アプライドバイオシステムズ／ライフテクノロジーズ社）を使用して逆転写させた。定量的PCR反応を、TaqManユニバーサルPCRマスターミックス（アプライドバイオシステムズ／ライフテクノロジーズ社）を使用して実施した。遺伝子特異的Taqmanプライマー／プローブ配列は請求により入手可能である。

40

【0517】

プラスミド

SMOの点変異体を、QuickChange II部位特異的突然変異誘発キット（ストラタジーン社）を用いてpRK5-SMOで生成した。SMOの点変異体を、pRK5-SMO-Flag及びpRK7-gD-SMO-mycにクローニングした。pRK5-PTCH1及びpRK5-eGFPは先に記載した（Yauch外，2009）。HhルシフェラーゼレポーターGli-B S構築物は先に記載され（Murone外，1999）、Renillaトランスフェクション対照プラスミドPRL-TKはプロメガ社製である。pGEIGCは、pGIPZ（オープンバイオシステムズ社）のZeo^R-CM

50

Vic-tGFP-IRES-Puro^R-shRNA-WREの内容物をEF1αプロモーター、多重クローニング部位(MCS)、内部リボソーム侵入部位(IRES)及び強化緑色蛍光タンパク質(EGFP-Cre; Harfe外, 2004)のC末端に融合したCreリコンビナーゼを含むフラグメントで置換することによって作製されたHIVベースの自己不活性化レンチウイルスベクターである。全ての構築物を配列決定により確認した; クローニングの詳細、ベクターマップ及び配列ファイルは請求により入手可能である。

【0518】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

C3H10T1/2細胞(ATCC)を、6ウェルプレートに、4mMのグルタミン、10mMのヘペスpH7.2及び10%FBSを含むDMEM高グルコース中において 1.75×10^5 細胞/ウェルで播種した。16時間後に、細胞に、Gene Juice クション試薬(Novagen社製)を使用してウェル当たり400ngの発現構築物、400ngの9×G11-B5及び200ngのpRL-TKをトランスフェクトした。PTCH1阻害実験のために、細胞に、200ngのSMO発現構築物及び空ベクターに対する様々なPTCH1比を含む200ngの追加DNAをトランスフェクトした。6時間後に、1個のウェルからの細胞をトリプシン処理し、そして12ウェルプレートの4個のウェルにわたって再分配した。16時間後に、培地のFBS含有量を0.5%に減少させて一次繊毛の形成を誘導し、そして小分子Hh阻害剤を示された濃度で添加した。ホタルルシフェラーゼ活性を24時間後にデュアルGloルシフェラーゼアッセイシステム(Promega社)を使用して決定し、Wallac EnVisionプレートリーダー(Perkin Elmer社)を使用して読み取った。値をrenillaルシフェラーゼ活性で割ってトランスフェクション効率を正規化した。個々の実験を二重又は三重で行い、そして少なくとも1回繰り返した。用量反応データをグラフパッドプリズムにおける4パラメータ式にフィットさせた:

【数4】

$$Y = 1 + \frac{1-B}{(1+10^{((\log IC_{50}-X)H))}}$$

ここで、「Y」は、阻害剤を含まない対照の割合として算出された正規化G11-ルシフェラーゼシグナル又は正規化チミジン取り込みであり、「X」は阻害剤濃度である。上及び下の(B)の値は、各サンプルについて等しくなるように制約される。「H」はヒルスロープである。

【0519】

[³H]ービスモデギブ結合アッセイ

2×10^6 個のHEK-293細胞を10cmプレートに播種し、16時間後にGene Juice(Novagen社)を使用して空ベクター又はSMOの発現構築物のいずれかの3μgを細胞にトランスフェクションした。細胞を40時間後に1mMのEDTAを有するPBS中で回収し、そして室温で10分間にわたり4%PFAを含むPBSで固定し、その後、これらのものを1mMのEDTAを含むPBSで3回洗浄し、ウェル当たり100,000個の細胞で96ウェルプレートにプレーティングした。細胞を、室温で1時間にわたり5nMの[³H]ービスモデギブ(Seelcia)と共に50μMの非標識ビスモデギブの存在下又は非存在下でインキュベートし、続いてFiltermate細胞ハーベスター(パーキンエルマー社)を使用してフィルタープレート(パーキンエルマー社)に移した。MicroScint流体(パーキンエルマー社)の40μmをウェル毎に添加し、1分当たりのカウントを、パーキンエルマートップカウントNXTを使用して評価した。全てのサンプルを3回分析した。特異的結合を、全結合から非特異的結合を減算することにより過剰量の非標識ビスモデギブとの競合後に算出した。

【0520】

gD-SMO細胞表面発現のFACS分析

1×10⁶個のHEK-293細胞を10cmプレートに播種し、6時間後にGene Juice (Novagen社)を使用してgD-SMO発現構築物3μgを細胞にトランスフェクトした。細胞を48時間後に1mMのEDTAを有するPBS中で除去し、その後、抗gD抗体(5B6、1μg/ml)と共に30分間インキュベートし、その後1:100ビオチン-SP共役Affinipureヤギ抗マウスIgG及び1:50R-フィコエリトリン結合ストレプトアビジン(両方ともジャクソンイムノリサーチ研究所)と共に20分間インキュベートした。細胞をヨウ化プロピジウム(500ng/ml)に再懸濁し、HTS FACS Calibur (BD Biosciences社)で分析した。

10

【0521】

ウイルス産生及び力価測定

HEK-293T細胞を、15cmの皿にトランスフェクションの24時間前に10%熱不活性化FBSを含むDMEM高グルコース中1.5×10⁶個の細胞/プレートで播種した。レンチウイルス上清を、6μgのpGEGC-SMO、12μgのパッケージベクターΔ8.9(Zufferey外, 1997)、3μgのエンベロープベクターPVS-VG(Clontech社)及びトランスフェクション試薬Gene Juice (Novagen社)を使用して同時トランスフェクションにより調製した。培地をトランスフェクション後12時間で交換し、そしてウイルス上清を24時間後に採取し、0.45μmのPESフィルター(ナルゲン社)に通して濾過し、そしてさらなる処理まで4℃で保存した。ウイルス上清を1時間30分にわたって100,000×gでの超遠心分離によって200倍に濃縮した(Zufferey and Trono, 2000)。ウイルスペレットをCGNP培地に再懸濁し、-80℃で保存した。ウイルス力価を、6ウェルプレートに2×10⁵細胞/ウェルで播種したHEK-293T細胞について測定した。細胞を12時間にわたって付着させ、その後培地を1:400又は1:4000希釈ウイルス濃縮物2mlで置換した。ウェル当たりの細胞数をウイルスの添加の時点で計数し、6ウェルの平均を使用してウイルス力価を算出した。ウイルス上清を60時間にわたって細胞上に残し、その後、細胞を採取し、FACSによる蛍光タンパク質発現について分析した。ウイルス力価を、ウイルス濃縮物の1μl当たり、方程式[細胞数/100×%蛍光細胞]×1000に従って形質導入単位(TU)/mlで算出した(Zufferey and Trono, 2000)。15%未満の蛍光細胞をもたらした形質導入のみを力価の計算に使用した。

20

30

【0522】

マウス

Ptch1^{loxP}株はR. Toftgard及びS. Teglund氏から提供された(スウェーデン国ストックホルムカロリンスカ研究所; Kasper et al., 2011)。Tp53^{loxP}株はA. Berns氏から提供された(オランダ国アムステルダム オランダ癌研究所; Jonkers外, 2001年)。Rosa26^{LSL}・tdTomato株は、Jackson Labs社から購入した(在庫番号: 007909; Madisen外, 2010)。全てのマウスを、カリフォルニア州法的及び倫理的プラクティスに従ってジェネンテック社の動物使用ガイドラインに従って飼育し、維持した。

40

【0523】

CGNPの単離及び形質導入

出生後5~7日のPtch1^{loxP/loxP}Rosa26^{LSL}・tdTomatoTp53^{loxP/loxP}マウスからの小脳を37℃で10分間にわたって0.05%トリプシンで解離させた。細胞を、4℃で10分間にわたって514×gでの遠心分離によって回収し、1×B27(ビタミンAなし; Life Technologies社)、0.45%グルコース(シグマアルドリッチ社)、25mMの塩化カリウム、0.4%ウシ血清アルブミン(シグマアルドリッチ社)、2mMのグルタミン、100U/mlのペニシリン(Life Tec

50

hnologies社)、100 µg/mlのストレプトマイシン(Life Technologies社)、200 ng/mlのオクチル化組換えSHHを含むCGNP培地(Neurobasal培地中に再懸濁させ、そして0.45 µmフィルター(ファルコン社)に通して濾過した。細胞をポリ-D-リジン被覆6ウェルプレート(Corning社)に5×10⁵個の細胞/ウェルで播種し、1の感染多重度(MOI)でレンチウイルスに感染させた。24時間後に、細胞をトリプシン処理により回収し、CGNP培地中で収集し、そして下流の用途のために再播種した。

【0524】

メチルー [³H]ーチミジン取り込み

増殖に及ぼすHPISの影響を調査するために、ウイルス形質導入CGNPを、ポリ-D-リジン被覆96ウェルプレート(Corning社)にSHHなしCGNP培地中において25,000細胞/ウェルで播種した。阻害剤の濃度を三重ウェルで試験し、この濃度は、ビスモデギブについては25、50、100、250、500、1000及び5000 nM、LDE225については500 nM、LY2940680については500 nM、化合物5については500 nM、JQ1については1 µM及びDMSOについては0.1% (最高濃度ビヒクル対照)であった。24時間後に、細胞を1 µCi/mLのメチルー [³H]ーチミジン(アマシャム/GEヘルスケア社)でパルスし、そしてさらに16~24時間培養した。細胞を、96ウェルフィルタープレート(パーキンエルマー)上にFiltermateセルハーベスター(パーキンエルマー社)を使用して回収し、そして取り込まれた放射線を、TopCount NXT(パーキンエルマー社)での液体シンチレーション分光光度法により定量した。

【0525】

化合物

GDC-0449、化合物5及びJQ-1を、WO2006028956、WO2007059157及びFilippakopoulos外、2010に記載されているように調製した。LDE225(HY-16582)及びLY2940680(HY-13242)はMedchemExpress社製のものであった。

【0526】

引用文献

- Amakye, D., Jagani, Z., and Dorsch, M. (2013). Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nature medicine* 19, 1410-1422. 30
- Atwood, S. X., Li, M., Lee, A., Tang, J. Y., and Oro, A. E. (2013). GLI activation by atypical protein kinase C iota/lambda regulates the growth of basal cell carcinomas. *Nature* 494, 484-488.
- Brastianos, P. K., Horowitz, P. M., Santagata, S., Jones, R. T., McKenna, A., Getz, G., Ligon, K. L., Palescandolo, E., Van Hummelen, P., Ducar, M. D., et al. (2013). Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations. *Nature genetics* 45, 285-289.
- Brinkhuizen, T., Reinders, M. G., van Geel, M., Hendriksen, A. J., Paulussen, A. D., Winnepenninckx, V. J., Keymeulen, K. B., Soetekouw, P. M., van Steensel, M. A., and Mosterd, K. (2014). Acquired resistance to the Hedgehog pathway inhibitor vismodegib due to smoothened mutations in treatment of locally advanced basal cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 40
- Buonamici, S., Williams, J., Morrissey, M., Wang, A., Guo, R., Vattay, A., Hsiao, K., Yuan, J., Green, J., Ospina, B., et al. (2010). Interfering with resistance to smoothened antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med* 2, 51ra70.
- Chang, A. L., and Oro, A. E. (2012). Initial assessment of tumor regrowth after vismodegib in advanced Basal cell carcinoma. *Archives of dermatology* 148, 1324-1325. 50

- Clark, V. E., Erson-Omay, E. Z., Serin, A., Yin, J., Cotney, J., Ozduman, K., Avsar, T., Li, J., Murray, P. B., Henegariu, O., et al. (2013). Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science* 339, 1077- 1080.
- Das Thakur, M., and Stuart, D. D. (2013). The evolution of melanoma resistance reveals therapeutic opportunities. *Cancer research* 73, 6106-6110.
- Dijkgraaf, G. J., Aliche, B., Weinmann, L., Januario, T., West, K., Modrusan, Z., Burdick, D., Goldsmith, R., Robarge, K., Sutherlin, D., et al. (2011). Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothened mutants and downstream mechanisms of drug resistance. *Cancer research* 71, 435-444. 10
- Gether, U., Ballesteros, J. A., Seifert, R., Sanders-Bush, E., Weinstein, H., and Kobilka, B. K. (1997). Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. Agonist-independent activation due to conformational flexibility. *The Journal of biological chemistry* 272, 2587-2590.
- Gonzalez-Perez, A., and Lopez-Bigas, N. (2011). Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel. *American journal of human genetics* 88, 440-449.
- Greenman, C. D., Bignell, G., Butler, A., Edkins, S., Hinton, J., Beare, D., Swamy, S., Santarius, T., Chen, L., Widaa, S., et al. (2010). PICNIC: an algorithm to predict absolute allelic copy number variation with microarray cancer data. *Biostatistics* 11, 164-175. 20
- Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P. G., Gailani, M. R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Unden, A. B., Gillies, S., et al. (1996). Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 85, 841-851.
- Inukai, M., Toyooka, S., Ito, S., Asano, H., Ichihara, S., Soh, J., Suehisa, H., Ouchida, M., Aoe, K., Aoe, M., et al. (2006). Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer research* 66, 7854-7858.
- Jayaraman, S. S., Rayhan, D. J., Hazany, S., and Kolodney, M. S. (2014). Mutational landscape of basal cell carcinomas by whole-exome sequencing. *The Journal of investigative dermatology* 134, 213-220. 30
- Johnson, R. L., Rothman, A. L., Xie, J., Goodrich, L. V., Bare, J. W., Bonifas, J. M., Quinn, A. G., Myers, R. M., Cox, D. R., Epstein, E. H., Jr., and Scott, M. P. (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 272, 1668-1671.
- Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J. F., Wyczalkowski, M. A., et al. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333-339.
- Katritch, V., Cherezov, V., and Stevens, R. C. (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annual review of pharmacology and toxicology* 53, 531-556. 40
- Kijima, C., Miyashita, T., Suzuki, M., Oka, H., and Fujii, K. (2012). Two cases of nevoid basal cell carcinoma syndrome associated with meningioma caused by a PTCH1 or SUFU germline mutation. *Fam Cancer* 11, 565-570.
- Kool, M., Jones, D. T., Jager, N., Northcott, P. A., Pugh, T. J., Hovestadt, V., Piro, R. M., Esparza, L. A., Markant, S. L., Remke, M., et al. (2014). Genome Sequencing of SHH Medulloblastoma Predicts Genotype-Related Response to Smoothened Inhibition. *Cancer cell* 25, 393-405.
- Lackner, M. R., Wilson, T. R., and Settleman, J. (2012). Mechanisms of acqui 50

red resistance to targeted cancer therapies. *Future Oncol* 8, 999-1014.

• Lee, Y., Kawagoe, R., Sasai, K., Li, Y., Russell, H. R., Curran, T., and McKinnon, P. J. (2007). Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis. *Oncogene* 26, 6442-6447.

• Long, J., Li, B., Rodriguez-Blanco, J., Pastori, C., Volmar, C. H., Wahlestedt, C., Capobianco, A., Bai, F., Pei, X. H., Ayad, N. G., and Robbins, D. J. (2014). The BET bromodomain inhibitor I-BET151 acts downstream of Smoothened to abrogate the growth of Hedgehog driven cancers. *The Journal of biological chemistry*.

• LoRusso, P. M., Rudin, C. M., Reddy, J. C., Tibes, R., Weiss, G. J., Borad, M. J., Hann, C. L., Brahmer, J. R., Chang, I., Darbonne, W. C., et al. (2011). Phase I trial of hedgehog pathway inhibitor vismodegib (GDC-0449) in patients with refractory, locally advanced or metastatic solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 2502-2511. 10

• Metcalfe, C., Alicke, B., Crow, A., Lamoureux, M., Dijkgraaf, G. J., Peale, F., Gould, S. E., and de Sauvage, F. J. (2013). PTEN loss mitigates the response of medulloblastoma to Hedgehog pathway inhibition. *Cancer research* 73, 7034-7042.

• Miller, J. H. (1985). Mutagenic specificity of ultraviolet light. *J Mol Biol* 182, 45-65. 20

• Nedelcu, D., Liu, J., Xu, Y., Jao, C., and Salic, A. (2013). Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothened in Hedgehog signaling. *Nature chemical biology* 9, 557-564.

• Negrini, S., Gorgoulis, V. G., and Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 220-228.

• Nik-Zainal, S., Van Loo, P., Wedge, D. C., Alexandrov, L. B., Greenman, C. D., Lau, K. W., Raine, K., Jones, D., Marshall, J., Ramakrishna, M., et al. (2012). The life history of 21 breast cancers. *Cell* 149, 994-1007. 30

• Oro, A. E., Higgins, K. M., Hu, Z., Bonifas, J. M., Epstein, E. H., Jr., and Scott, M. P. (1997). Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science* 276, 817-821.

• Pastorino, L., Ghiorzo, P., Nasti, S., Battistuzzi, L., Cusano, R., Marzocchi, C., Garre, M. L., Clementi, M., and Scarra, G. B. (2009). Identification of a SUFU germline mutation in a family with Gorlin syndrome. *Am J Med Genet A* 149A, 1539-1543.

• Pesz, K. A., Bieniek, A., Makowska, I., and Sasiadek, M. M. (2013). Basal cell carcinoma of the skin: whole genome screening by comparative genome hybridization revisited. *Journal of cutaneous pathology* 40, 25-29. 40

• Pricl, S., Cortelazzi, B., Dal Col, V., Marson, D., Laurini, E., Fermeiglia, M., Licitra, L.,

• Pilotti, S., Bossi, P., and Perrone, F. (2014). Smoothened (SMO) receptor mutations dictate resistance to vismodegib in basal cell carcinoma. *Molecular oncology*.

• Reifemberger, J., Wolter, M., Knobbe, C. B., Kohler, B., Schonicke, A., Schwarwachter, C., Kumar, K., Blaschke, B., Ruzicka, T., and Reifemberger, G. (2005). Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 152, 43-51.

• Reifemberger, J., Wolter, M., Weber, R. G., Megahed, M., Ruzicka, T., Lichte 50

r, P., and Reifenger, G. (1998). Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer research* 58, 1798-1803.

• Sasai, K., Romer, J. T., Lee, Y., Finkelstein, D., Fuller, C., McKinnon, P. J., and Curran, T. (2006). Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: implications for preclinical studies. *Cancer research* 66, 4215-4222.

• Sekulic, A., Migden, M. R., Oro, A. E., Dirix, L., Lewis, K. D., Hainsworth, J. D., Solomon, J. A., Yoo, S., Arron, S. T., Friedlander, P. A., et al. (2012). Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine* 366, 2171-2179. 10

• Smith, M. J., Beetz, C., Williams, S. G., Bhaskar, S. S., O'Sullivan, J., Anderson, B., Daly, S. B., Urquhart, J. E., Bholah, Z., Oudit, D., et al. (2014). Germline Mutations in SUFU Cause Gorlin Syndrome-Associated Childhood Medulloblastoma and Redefine the Risk Associated With PTCH1 Mutations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*.

• Stjernqvist, S., Ryden, T., and Greenman, C. D. (2011). Model-integrated estimation of normal tissue contamination for cancer SNP allelic copy number data. *Cancer informatics* 10, 159-173.

• Stone, D. M., Murone, M., Luoh, S., Ye, W., Armanini, M. P., Gurney, A., Phillips, H., Brush, J., Goddard, A., de Sauvage, F. J., and Rosenthal, A. (1999). Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *Journal of cell science* 112 (Pt 23), 4437-4448. 20

• Svard, J., Heby-Henricson, K., Persson-Lek, M., Rozell, B., Lauth, M., Bergstrom, A., Ericson, J., Toftgard, R., and Teglund, S. (2006). Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Developmental cell* 10, 187-197.

• Sweeney, R. T., McClary, A. C., Myers, B. R., Biscocho, J., Neahring, L., Kwei, K. A., Qu, K., Gong, X., Ng, T., Jones, C. D., et al. (2014). Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. *Nature genetics* 46, 722-725. 30

• Tang, Y., Gholamin, S., Schubert, S., Willardson, M. I., Lee, A., Bandopadhyay, P., Bergthold, G., Masoud, S., Nguyen, B., Vue, N., et al. (2014). Epigenetic targeting of Hedgehog pathway transcriptional output through BET bromodomain inhibition. *Nature medicine* 20, 732-740.

• Taylor, M. D., Liu, L., Raffel, C., Hui, C. C., Mainprize, T. G., Zhang, X., Agatep, R., Chiappa, S., Gao, L., Lowrance, A., et al. (2002). Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nature genetics* 31, 306-310.

• Wang, C., Wu, H., Katritch, V., Han, G. W., Huang, X. P., Liu, W., Siu, F. Y., Roth, B. L., Cherezov, V., and Stevens, R. C. (2013). Structure of the human smoothened receptor bound to an antitumour agent. *Nature* 497, 338-343. 40

• Wang, G. Y., So, P. L., Wang, L., Libove, E., Wang, J., and Epstein, E. H., Jr. (2011). Establishment of murine basal cell carcinoma allografts: a potential model for preclinical drug testing and for molecular analysis. *The Journal of investigative dermatology* 131, 2298-2305.

• Wechsler-Reya, R. J., and Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22, 103-114.

• Wong, H., Alicke, B., West, K. A., Pacheco, P., La, H., Januario, T., Yauch, R. L., de Sauvage, F. J., and Gould, S. E. (2011). Pharmacokinetic-pharmacodynamic 50

mic analysis of vismodegib in preclinical models of mutational and ligand-dependent Hedgehog pathway activation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 4682-4692.

• Xie, J., Murone, M., Luoh, S. M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J. M., Lam, C. W., Hynes, M., Goddard, A., et al. (1998). Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 391, 90-92.

• Yauch, R. L., Dijkgraaf, G. J., Alicke, B., Januario, T., Ahn, C. P., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Callahan, C. A., Tang, T., et al. (2009). Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science* 326, 572-574. 10

• Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* 11, R106.

• DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., Philippakis, A. A., del Angel, G., Rivas, M. A., Hanna, M., et al. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics* 43, 491-498.

• Diskin, S. J., Li, M., Hou, C., Yang, S., Glessner, J., Hakonarson, H., Bucan, M., Maris, J. M., and Wang, K. (2008). Adjustment of genomic waves in signal intensities from whole-genome SNP genotyping platforms. *Nucleic acids research* 36, e126. 20

• Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., Morse, E. M., Keates, T., Hickman, T. T., Felletar, et al. (2010). Selective Inhibition of BET bromodomains. *Nature* 468, 1067-1073.

• Forbes, S. A., Bindal, N., Bamford, S., Cole, C., Kok, C. Y., Beare, D., Jia, M., Shepherd, R., Leung, K., Menzies, A., et al. (2011). COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic acids research* 39, D945-950.

• Forbes, S. A., Tang, G., Bindal, N., Bamford, S., Dawson, E., Cole, C., Kok, Y., Jia, M., Ewing, R., Menzies, A., et al. (2010). COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer. *Nucleic acids research* 38, D652-657. 30

• Gonzalez-Perez, A., and Lopez-Bigas, N. (2011). Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel. *American journal of human genetics* 88, 440-449.

• Harfe, B. D., Scherz, P. J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A. P., and Tabin, C. J. (2004). Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* 118, 517-528.

• Jonkers, J., Meuwissen, R., van der Gulden, H., Peterse, H., van der Valk, M., and Berns, A. (2001). Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nature genetics* 29, 418-425. 40

• Kasper, M., Jaks, V., Are, A., Bergstrom, A., Schwager, A., Svard, J., Teglund, S., Barker, N., and Toftgard, R. (2011). Wounding enhances epidermal tumorigenesis by recruiting hair follicle keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 4099-4104.

• Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunken, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., et al. (2010). *Nature neuroscience* 13, 133-140.

• Morgan, M., et al. (2009). *Bioinformatics* 25, 2607-2608.

• Murone, M. et al., (1999). *Current biology: CB* 9, 76-84.

• Rudin, C et al., (2012). *Nature genetics* 44, 1111-1116. 50

- ・ Sherry, S et al., (2001). Nucleic acids research 29, 308-311.
- ・ Tibshirani, R., and Wang, P. (2008). Biostatistics 9, 18-29.
- ・ Venkatraman, E. et al., (2007). Bioinformatics 23, 657-663.
- ・ Wu, T. et al., (2010). Bioinformatics 26, 873-881.

【0527】

参照による援用

本明細書に記載の全ての刊行物及び特許文献は、それぞれの刊行物又は特許文献が具体的かつ個別に参照により援用されることが示されたかのように本明細書においてその全体が参照によって援用される。

【0528】

10

本発明の特定の実施形態を議論してきたが、上記明細書は例示であって限定的なものではない。当業者であれば、本明細書の及び特許請求の範囲の検討により本発明の多くのバリエーションが明らかになるであろう。本発明の全範囲は、特許請求の範囲をそれらの均等の全範囲と共に、及び明細書をこのようなバリエーションと共に参照することによって決定すべきである。上記実施例は、例示のみを目的とし、特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。

【0529】

配列表

配列番号1：ヒト野生型平滑化アミノ酸配列 (GenBankアクセッション番号NP_005622.1)

20

Met	Ala	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	Arg	Gly	Pro
Glu	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu
Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Pro	Gly	Arg	Gly	Ala
Ala	Ser	Ser	Gly	Asn	Ala	Thr	Gly	Pro	Gly
Pro	Arg	Ser	Ala	Gly	Gly	Ser	Ala	Arg	Arg
Ser	Ala	Ala	Val	Thr	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro
Leu	Ser	His	Cys	Gly	Arg	Ala	Ala	Pro	Cys
Glu	Pro	Leu	Arg	Tyr	Asn	Val	Cys	Leu	Gly
Ser	Val	Leu	Pro	Tyr	Gly	Ala	Thr	Ser	Thr
Leu	Leu	Ala	Gly	Asp	Ser	Asp	Ser	Gln	Glu
Glu	Ala	His	Gly	Lys	Leu	Val	Leu	Trp	Ser
Gly	Leu	Arg	Asn	Ala	Pro	Arg	Cys	Trp	Ala
Val	Ile	Gln	Pro	Leu	Leu	Cys	Ala	Val	Tyr
Met	Pro	Lys	Cys	Glu	Asn	Asp	Arg	Val	Glu
Leu	Pro	Ser	Arg	Thr	Leu	Cys	Gln	Ala	Thr
Arg	Gly	Pro	Cys	Ala	Ile	Val	Glu	Arg	Glu
Arg	Gly	Trp	Pro	Asp	Phe	Leu	Arg	Cys	Thr
Pro	Asp	Arg	Phe	Pro	Glu	Gly	Cys	Thr	Asn
Glu	Val	Gln	Asn	Ile	Lys	Phe	Asn	Ser	Ser
Gly	Gln	Cys	Glu	Val	Pro	Leu	Val	Arg	Thr
Asp	Asn	Pro	Lys	Ser	Trp	Tyr	Glu	Asp	Val
Glu	Gly	Cys	Gly	Ile	Gln	Cys	Gln	Asn	Pro
Leu	Phe	Thr	Glu	Ala	Glu	His	Gln	Asp	Met
His	Ser	Tyr	Ile	Ala	Ala	Phe	Gly	Ala	Val
Thr	Gly	Leu	Cys	Thr	Leu	Phe	Thr	Leu	Ala
Thr	Phe	Val	Ala	Asp	Trp	Arg	Asn	Ser	Asn
Arg	Tyr	Pro	Ala	Val	Ile	Leu	Phe	Tyr	Val
Asn	Ala	Cys	Phe	Phe	Val	Gly	Ser	Ile	Gly
Trp	Leu	Ala	Gln	Phe	Met	Asp	Gly	Ala	Arg
Arg	Glu	Ile	Val	Cys	Arg	Ala	Asp	Gly	Thr

30

40

50

Met	Arg	Leu	Gly	Glu	Pro	Thr	Ser	Asn	Glu	
Thr	Leu	Ser	Cys	Val	Ile	Ile	Phe	Val	Ile	
Val	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Met	Ala	Gly	Val	Val	
Trp	Phe	Val	Val	Leu	Thr	Tyr	Ala	Trp	His	
Thr	Ser	Phe	Lys	Ala	Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr	
Gln	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Thr	Ser	Tyr	Phe	
His	Leu	Leu	Thr	Trp	Ser	Leu	Pro	Phe	Val	
Leu	Thr	Val	Ala	Ile	Leu	Ala	Val	Ala	Gln	
Val	Asp	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Gly	Ile	Cys	
Phe	Val	Gly	Tyr	Lys	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Arg	10
Ala	Gly	Phe	Val	Leu	Ala	Pro	Ile	Gly	Leu	
Val	Leu	Ile	Val	Gly	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ile	
Arg	Gly	Val	Met	Thr	Leu	Phe	Ser	Ile	Lys	
Ser	Asn	His	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Glu	Lys	
Ala	Ala	Ser	Lys	Ile	Asn	Glu	Thr	Met	Leu	
Arg	Leu	Gly	Ile	Phe	Gly	Phe	Leu	Ala	Phe	
Gly	Phe	Val	Leu	Ile	Thr	Phe	Ser	Cys	His	
Phe	Tyr	Asp	Phe	Phe	Asn	Gln	Ala	Glu	Trp	
Glu	Arg	Ser	Phe	Arg	Asp	Tyr	Val	Leu	Cys	
Gln	Ala	Asn	Val	Thr	Ile	Gly	Leu	Pro	Thr	20
Lys	Gln	Pro	Ile	Pro	Asp	Cys	Glu	Ile	Lys	
Asn	Arg	Pro	Ser	Leu	Leu	Val	Glu	Lys	Ile	
Asn	Leu	Phe	Ala	Met	Phe	Gly	Thr	Gly	Ile	
Ala	Met	Ser	Thr	Trp	Val	Trp	Thr	Lys	Ala	
Thr	Leu	Leu	Ile	Trp	Arg	Arg	Thr	Trp	Cys	
Arg	Leu	Thr	Gly	Gln	Ser	Asp	Asp	Glu	Pro	
Lys	Arg	Ile	Lys	Lys	Ser	Lys	Met	Ile	Ala	
Lys	Ala	Phe	Ser	Lys	Arg	His	Glu	Leu	Leu	
Gln	Asn	Pro	Gly	Gln	Glu	Leu	Ser	Phe	Ser	
Met	His	Thr	Val	Ser	His	Asp	Gly	Pro	Val	30
Ala	Gly	Leu	Ala	Phe	Asp	Leu	Asn	Glu	Pro	
Ser	Ala	Asp	Val	Ser	Ser	Ala	Trp	Ala	Gln	
His	Val	Thr	Lys	Met	Val	Ala	Arg	Arg	Gly	
Ala	Ile	Leu	Pro	Gln	Asp	Ile	Ser	Val	Thr	
Pro	Val	Ala	Thr	Pro	Val	Pro	Pro	Glu	Glu	
Gln	Ala	Asn	Leu	Trp	Leu	Val	Glu	Ala	Glu	
Ile	Ser	Pro	Glu	Leu	Gln	Lys	Arg	Leu	Gly	
Arg	Lys	Lys	Lys	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys	Lys	
Glu	Val	Cys	Pro	Leu	Ala	Pro	Pro	Pro	Glu	
Leu	His	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Thr	40
Ile	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln	Leu	Pro	Arg	Gln	
Lys	Cys	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Ala	Trp	Gly	
Ala	Gly	Asp	Ser	Cys	Arg	Gln	Gly	Ala	Trp	
Thr	Leu	Val	Ser	Asn	Pro	Phe	Cys	Pro	Glu	
Pro	Ser	Pro	Pro	Gln	Asp	Pro	Phe	Leu	Pro	
Ser	Ala	Pro	Ala	Pro	Val	Ala	Trp	Ala	His	
Gly	Arg	Arg	Gln	Gly	Leu	Gly	Pro	Ile	His	
Ser	Arg	Thr	Asn	Leu	Met	Asp	Thr	Glu	Leu	
Met	Asp	Ala	Asp	Ser	Asp	Phe				

【0530】

配列番号 2 : SMOのアミノ酸位置 281 に変異を有するヒト平滑化アミノ酸配列

Met	Ala	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	Arg	Gly	Pro	
Glu	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	
Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Pro	Gly	Arg	Gly	Ala	
Ala	Ser	Ser	Gly	Asn	Ala	Thr	Gly	Pro	Gly	
Pro	Arg	Ser	Ala	Gly	Gly	Ser	Ala	Arg	Arg	
Ser	Ala	Ala	Val	Thr	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	
Leu	Ser	His	Cys	Gly	Arg	Ala	Ala	Pro	Cys	
Glu	Pro	Leu	Arg	Tyr	Asn	Val	Cys	Leu	Gly	
Ser	Val	Leu	Pro	Tyr	Gly	Ala	Thr	Ser	Thr	10
Leu	Leu	Ala	Gly	Asp	Ser	Asp	Ser	Gln	Glu	
Glu	Ala	His	Gly	Lys	Leu	Val	Leu	Trp	Ser	
Gly	Leu	Arg	Asn	Ala	Pro	Arg	Cys	Trp	Ala	
Val	Ile	Gln	Pro	Leu	Leu	Cys	Ala	Val	Tyr	
Met	Pro	Lys	Cys	Glu	Asn	Asp	Arg	Val	Glu	
Leu	Pro	Ser	Arg	Thr	Leu	Cys	Gln	Ala	Thr	
Arg	Gly	Pro	Cys	Ala	Ile	Val	Glu	Arg	Glu	
Arg	Gly	Trp	Pro	Asp	Phe	Leu	Arg	Cys	Thr	
Pro	Asp	Arg	Phe	Pro	Glu	Gly	Cys	Thr	Asn	
Glu	Val	Gln	Asn	Ile	Lys	Phe	Asn	Ser	Ser	20
Gly	Gln	Cys	Glu	Val	Pro	Leu	Val	Arg	Thr	
Asp	Asn	Pro	Lys	Ser	Trp	Tyr	Glu	Asp	Val	
Glu	Gly	Cys	Gly	Ile	Gln	Cys	Gln	Asn	Pro	
Leu	Phe	Thr	Glu	Ala	Glu	His	Gln	Asp	Met	
His	Ser	Tyr	Ile	Ala	Ala	Phe	Gly	Ala	Val	
Thr	Gly	Leu	Cys	Thr	Leu	Phe	Thr	Leu	Ala	
Thr	Phe	Val	Ala	Asp	Trp	Arg	Asn	Ser	Asn	
Arg	Tyr	Pro	Ala	Val	Ile	Leu	Phe	Tyr	Val	
Asn	Ala	Cys	Phe	Phe	Val	Gly	Ser	Ile	Gly	
Xaa	Leu	Ala	Gln	Phe	Met	Asp	Gly	Ala	Arg	30
Arg	Glu	Ile	Val	Cys	Arg	Ala	Asp	Gly	Thr	
Met	Arg	Leu	Gly	Glu	Pro	Thr	Ser	Asn	Glu	
Thr	Leu	Ser	Cys	Val	Ile	Ile	Phe	Val	Ile	
Val	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Met	Ala	Gly	Val	Val	
Trp	Phe	Val	Val	Leu	Thr	Tyr	Ala	Trp	His	
Thr	Ser	Phe	Lys	Ala	Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr	
Gln	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Thr	Ser	Tyr	Phe	
His	Leu	Leu	Thr	Trp	Ser	Leu	Pro	Phe	Val	
Leu	Thr	Val	Ala	Ile	Leu	Ala	Val	Ala	Gln	
Val	Asp	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Gly	Ile	Cys	40
Phe	Val	Gly	Tyr	Lys	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Arg	
Ala	Gly	Phe	Val	Leu	Ala	Pro	Ile	Gly	Leu	
Val	Leu	Ile	Val	Gly	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ile	
Arg	Gly	Val	Met	Thr	Leu	Phe	Ser	Ile	Lys	
Ser	Asn	His	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Glu	Lys	
Ala	Ala	Ser	Lys	Ile	Asn	Glu	Thr	Met	Leu	
Arg	Leu	Gly	Ile	Phe	Gly	Phe	Leu	Ala	Phe	
Gly	Phe	Val	Leu	Ile	Thr	Phe	Ser	Cys	His	
Phe	Tyr	Asp	Phe	Phe	Asn	Gln	Ala	Glu	Trp	
Glu	Arg	Ser	Phe	Arg	Asp	Tyr	Val	Leu	Cys	50

Gln	Ala	Asn	Val	Thr	Ile	Gly	Leu	Pro	Thr	
Lys	Gln	Pro	Ile	Pro	Asp	Cys	Glu	Ile	Lys	
Asn	Arg	Pro	Ser	Leu	Leu	Val	Glu	Lys	Ile	
Asn	Leu	Phe	Ala	Met	Phe	Gly	Thr	Gly	Ile	
Ala	Met	Ser	Thr	Trp	Val	Trp	Thr	Lys	Ala	
Thr	Leu	Leu	Ile	Trp	Arg	Arg	Thr	Trp	Cys	
Arg	Leu	Thr	Gly	Gln	Ser	Asp	Asp	Glu	Pro	
Lys	Arg	Ile	Lys	Lys	Ser	Lys	Met	Ile	Ala	
Lys	Ala	Phe	Ser	Lys	Arg	His	Glu	Leu	Leu	
Gln	Asn	Pro	Gly	Gln	Glu	Leu	Ser	Phe	Ser	10
Met	His	Thr	Val	Ser	His	Asp	Gly	Pro	Val	
Ala	Gly	Leu	Ala	Phe	Asp	Leu	Asn	Glu	Pro	
Ser	Ala	Asp	Val	Ser	Ser	Ala	Trp	Ala	Gln	
His	Val	Thr	Lys	Met	Val	Ala	Arg	Arg	Gly	
Ala	Ile	Leu	Pro	Gln	Asp	Ile	Ser	Val	Thr	
Pro	Val	Ala	Thr	Pro	Val	Pro	Pro	Glu	Glu	
Gln	Ala	Asn	Leu	Trp	Leu	Val	Glu	Ala	Glu	
Ile	Ser	Pro	Glu	Leu	Gln	Lys	Arg	Leu	Gly	
Arg	Lys	Lys	Lys	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys	Lys	20
Glu	Val	Cys	Pro	Leu	Ala	Pro	Pro	Pro	Glu	
Leu	His	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Thr	
Ile	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln	Leu	Pro	Arg	Gln	
Lys	Cys	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Ala	Trp	Gly	
Ala	Gly	Asp	Ser	Cys	Arg	Gln	Gly	Ala	Trp	
Thr	Leu	Val	Ser	Asn	Pro	Phe	Cys	Pro	Glu	
Pro	Ser	Pro	Pro	Gln	Asp	Pro	Phe	Leu	Pro	
Ser	Ala	Pro	Ala	Pro	Val	Ala	Trp	Ala	His	
Gly	Arg	Arg	Gln	Gly	Leu	Gly	Pro	Ile	His	
Ser	Arg	Thr	Asn	Leu	Met	Asp	Thr	Glu	Leu	
Met	Asp	Ala	Asp	Ser	Asp	Phe				30

【0531】

配列番号3: SMOのアミノ酸位置459に変異を有するヒト平滑化アミノ酸配列

Met	Ala	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	Arg	Gly	Pro	
Glu	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	
Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Pro	Gly	Arg	Gly	Ala	
Ala	Ser	Ser	Gly	Asn	Ala	Thr	Gly	Pro	Gly	
Pro	Arg	Ser	Ala	Gly	Gly	Ser	Ala	Arg	Arg	
Ser	Ala	Ala	Val	Thr	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	
Leu	Ser	His	Cys	Gly	Arg	Ala	Ala	Pro	Cys	
Glu	Pro	Leu	Arg	Tyr	Asn	Val	Cys	Leu	Gly	40
Ser	Val	Leu	Pro	Tyr	Gly	Ala	Thr	Ser	Thr	
Leu	Leu	Ala	Gly	Asp	Ser	Asp	Ser	Gln	Glu	
Glu	Ala	His	Gly	Lys	Leu	Val	Leu	Trp	Ser	
Gly	Leu	Arg	Asn	Ala	Pro	Arg	Cys	Trp	Ala	
Val	Ile	Gln	Pro	Leu	Leu	Cys	Ala	Val	Tyr	
Met	Pro	Lys	Cys	Glu	Asn	Asp	Arg	Val	Glu	
Leu	Pro	Ser	Arg	Thr	Leu	Cys	Gln	Ala	Thr	
Arg	Gly	Pro	Cys	Ala	Ile	Val	Glu	Arg	Glu	
Arg	Gly	Trp	Pro	Asp	Phe	Leu	Arg	Cys	Thr	
Pro	Asp	Arg	Phe	Pro	Glu	Gly	Cys	Thr	Asn	50

Glu	Val	Gln	Asn	Ile	Lys	Phe	Asn	Ser	Ser	
Gly	Gln	Cys	Glu	Val	Pro	Leu	Val	Arg	Thr	
Asp	Asn	Pro	Lys	Ser	Trp	Tyr	Glu	Asp	Val	
Glu	Gly	Cys	Gly	Ile	Gln	Cys	Gln	Asn	Pro	
Leu	Phe	Thr	Glu	Ala	Glu	His	Gln	Asp	Met	
His	Ser	Tyr	Ile	Ala	Ala	Phe	Gly	Ala	Val	
Thr	Gly	Leu	Cys	Thr	Leu	Phe	Thr	Leu	Ala	
Thr	Phe	Val	Ala	Asp	Trp	Arg	Asn	Ser	Asn	
Arg	Tyr	Pro	Ala	Val	Ile	Leu	Phe	Tyr	Val	
Asn	Ala	Cys	Phe	Phe	Val	Gly	Ser	Ile	Gly	10
Trp	Leu	Ala	Gln	Phe	Met	Asp	Gly	Ala	Arg	
Arg	Glu	Ile	Val	Cys	Arg	Ala	Asp	Gly	Thr	
Met	Arg	Leu	Gly	Glu	Pro	Thr	Ser	Asn	Glu	
Thr	Leu	Ser	Cys	Val	Ile	Ile	Phe	Val	Ile	
Val	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Met	Ala	Gly	Val	Val	
Trp	Phe	Val	Val	Leu	Thr	Tyr	Ala	Trp	His	
Thr	Ser	Phe	Lys	Ala	Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr	
Gln	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Thr	Ser	Tyr	Phe	
His	Leu	Leu	Thr	Trp	Ser	Leu	Pro	Phe	Val	
Leu	Thr	Val	Ala	Ile	Leu	Ala	Val	Ala	Gln	20
Val	Asp	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Gly	Ile	Cys	
Phe	Val	Gly	Tyr	Lys	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Arg	
Ala	Gly	Phe	Val	Leu	Ala	Pro	Ile	Gly	Leu	
Val	Leu	Ile	Val	Gly	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ile	
Arg	Gly	Val	Met	Thr	Leu	Phe	Ser	Ile	Lys	
Ser	Asn	His	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Glu	Lys	
Ala	Ala	Ser	Lys	Ile	Asn	Glu	Thr	Met	Leu	
Arg	Leu	Gly	Ile	Phe	Gly	Phe	Leu	Xaa	Phe	
Gly	Phe	Val	Leu	Ile	Thr	Phe	Ser	Cys	His	
Phe	Tyr	Asp	Phe	Phe	Asn	Gln	Ala	Glu	Trp	30
Glu	Arg	Ser	Phe	Arg	Asp	Tyr	Val	Leu	Cys	
Gln	Ala	Asn	Val	Thr	Ile	Gly	Leu	Pro	Thr	
Lys	Gln	Pro	Ile	Pro	Asp	Cys	Glu	Ile	Lys	
Asn	Arg	Pro	Ser	Leu	Leu	Val	Glu	Lys	Ile	
Asn	Leu	Phe	Ala	Met	Phe	Gly	Thr	Gly	Ile	
Ala	Met	Ser	Thr	Trp	Val	Trp	Thr	Lys	Ala	
Thr	Leu	Leu	Ile	Trp	Arg	Arg	Thr	Trp	Cys	
Arg	Leu	Thr	Gly	Gln	Ser	Asp	Asp	Glu	Pro	
Lys	Arg	Ile	Lys	Lys	Ser	Lys	Met	Ile	Ala	
Lys	Ala	Phe	Ser	Lys	Arg	His	Glu	Leu	Leu	40
Gln	Asn	Pro	Gly	Gln	Glu	Leu	Ser	Phe	Ser	
Met	His	Thr	Val	Ser	His	Asp	Gly	Pro	Val	
Ala	Gly	Leu	Ala	Phe	Asp	Leu	Asn	Glu	Pro	
Ser	Ala	Asp	Val	Ser	Ser	Ala	Trp	Ala	Gln	
His	Val	Thr	Lys	Met	Val	Ala	Arg	Arg	Gly	
Ala	Ile	Leu	Pro	Gln	Asp	Ile	Ser	Val	Thr	
Pro	Val	Ala	Thr	Pro	Val	Pro	Pro	Glu	Glu	
Gln	Ala	Asn	Leu	Trp	Leu	Val	Glu	Ala	Glu	
Ile	Ser	Pro	Glu	Leu	Gln	Lys	Arg	Leu	Gly	
Arg	Lys	Lys	Lys	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys	Lys	50

Glu	Val	Cys	Pro	Leu	Ala	Pro	Pro	Pro	Glu
Leu	His	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Thr
Ile	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln	Leu	Pro	Arg	Gln
Lys	Cys	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Ala	Trp	Gly
Ala	Gly	Asp	Ser	Cys	Arg	Gln	Gly	Ala	Trp
Thr	Leu	Val	Ser	Asn	Pro	Phe	Cys	Pro	Glu
Pro	Ser	Pro	Pro	Gln	Asp	Pro	Phe	Leu	Pro
Ser	Ala	Pro	Ala	Pro	Val	Ala	Trp	Ala	His
Gly	Arg	Arg	Gln	Gly	Leu	Gly	Pro	Ile	His
Ser	Arg	Thr	Asn	Leu	Met	Asp	Thr	Glu	Leu
Met	Asp	Ala	Asp	Ser	Asp	Phe			

10

【0532】

配列番号4: SMOのアミノ酸位置535に変異を有するヒト平滑化アミノ酸配列

Met	Ala	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	Arg	Gly	Pro
Glu	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu
Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Pro	Gly	Arg	Gly	Ala
Ala	Ser	Ser	Gly	Asn	Ala	Thr	Gly	Pro	Gly
Pro	Arg	Ser	Ala	Gly	Gly	Ser	Ala	Arg	Arg
Ser	Ala	Ala	Val	Thr	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro
Leu	Ser	His	Cys	Gly	Arg	Ala	Ala	Pro	Cys
Glu	Pro	Leu	Arg	Tyr	Asn	Val	Cys	Leu	Gly
Ser	Val	Leu	Pro	Tyr	Gly	Ala	Thr	Ser	Thr
Leu	Leu	Ala	Gly	Asp	Ser	Asp	Ser	Gln	Glu
Glu	Ala	His	Gly	Lys	Leu	Val	Leu	Trp	Ser
Gly	Leu	Arg	Asn	Ala	Pro	Arg	Cys	Trp	Ala
Val	Ile	Gln	Pro	Leu	Leu	Cys	Ala	Val	Tyr
Met	Pro	Lys	Cys	Glu	Asn	Asp	Arg	Val	Glu
Leu	Pro	Ser	Arg	Thr	Leu	Cys	Gln	Ala	Thr
Arg	Gly	Pro	Cys	Ala	Ile	Val	Glu	Arg	Glu
Arg	Gly	Trp	Pro	Asp	Phe	Leu	Arg	Cys	Thr
Pro	Asp	Arg	Phe	Pro	Glu	Gly	Cys	Thr	Asn
Glu	Val	Gln	Asn	Ile	Lys	Phe	Asn	Ser	Ser
Gly	Gln	Cys	Glu	Val	Pro	Leu	Val	Arg	Thr
Asp	Asn	Pro	Lys	Ser	Trp	Tyr	Glu	Asp	Val
Glu	Gly	Cys	Gly	Ile	Gln	Cys	Gln	Asn	Pro
Leu	Phe	Thr	Glu	Ala	Glu	His	Gln	Asp	Met
His	Ser	Tyr	Ile	Ala	Ala	Phe	Gly	Ala	Val
Thr	Gly	Leu	Cys	Thr	Leu	Phe	Thr	Leu	Ala
Thr	Phe	Val	Ala	Asp	Trp	Arg	Asn	Ser	Asn
Arg	Tyr	Pro	Ala	Val	Ile	Leu	Phe	Tyr	Val
Asn	Ala	Cys	Phe	Phe	Val	Gly	Ser	Ile	Gly
Trp	Leu	Ala	Gln	Phe	Met	Asp	Gly	Ala	Arg
Arg	Glu	Ile	Val	Cys	Arg	Ala	Asp	Gly	Thr
Met	Arg	Leu	Gly	Glu	Pro	Thr	Ser	Asn	Glu
Thr	Leu	Ser	Cys	Val	Ile	Ile	Phe	Val	Ile
Val	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Met	Ala	Gly	Val	Val
Trp	Phe	Val	Val	Leu	Thr	Tyr	Ala	Trp	His
Thr	Ser	Phe	Lys	Ala	Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr
Gln	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Thr	Ser	Tyr	Phe
His	Leu	Leu	Thr	Trp	Ser	Leu	Pro	Phe	Val

20

30

40

50

Leu	Thr	Val	Ala	Ile	Leu	Ala	Val	Ala	Gln	
Val	Asp	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Gly	Ile	Cys	
Phe	Val	Gly	Tyr	Lys	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Arg	
Ala	Gly	Phe	Val	Leu	Ala	Pro	Ile	Gly	Leu	
Val	Leu	Ile	Val	Gly	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ile	
Arg	Gly	Val	Met	Thr	Leu	Phe	Ser	Ile	Lys	
Ser	Asn	His	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Glu	Lys	
Ala	Ala	Ser	Lys	Ile	Asn	Glu	Thr	Met	Leu	
Arg	Leu	Gly	Ile	Phe	Gly	Phe	Leu	Ala	Phe	
Gly	Phe	Val	Leu	Ile	Thr	Phe	Ser	Cys	His	10
Phe	Tyr	Asp	Phe	Phe	Asn	Gln	Ala	Glu	Trp	
Glu	Arg	Ser	Phe	Arg	Asp	Tyr	Val	Leu	Cys	
Gln	Ala	Asn	Val	Thr	Ile	Gly	Leu	Pro	Thr	
Lys	Gln	Pro	Ile	Pro	Asp	Cys	Glu	Ile	Lys	
Asn	Arg	Pro	Ser	Leu	Leu	Val	Glu	Lys	Ile	
Asn	Leu	Phe	Ala	Met	Phe	Gly	Thr	Gly	Ile	
Ala	Met	Ser	Thr	Xaa	Val	Trp	Thr	Lys	Ala	
Thr	Leu	Leu	Ile	Trp	Arg	Arg	Thr	Trp	Cys	
Arg	Leu	Thr	Gly	Gln	Ser	Asp	Asp	Glu	Pro	
Lys	Arg	Ile	Lys	Lys	Ser	Lys	Met	Ile	Ala	20
Lys	Ala	Phe	Ser	Lys	Arg	His	Glu	Leu	Leu	
Gln	Asn	Pro	Gly	Gln	Glu	Leu	Ser	Phe	Ser	
Met	His	Thr	Val	Ser	His	Asp	Gly	Pro	Val	
Ala	Gly	Leu	Ala	Phe	Asp	Leu	Asn	Glu	Pro	
Ser	Ala	Asp	Val	Ser	Ser	Ala	Trp	Ala	Gln	
His	Val	Thr	Lys	Met	Val	Ala	Arg	Arg	Gly	
Ala	Ile	Leu	Pro	Gln	Asp	Ile	Ser	Val	Thr	
Pro	Val	Ala	Thr	Pro	Val	Pro	Pro	Glu	Glu	
Gln	Ala	Asn	Leu	Trp	Leu	Val	Glu	Ala	Glu	
Ile	Ser	Pro	Glu	Leu	Gln	Lys	Arg	Leu	Gly	30
Arg	Lys	Lys	Lys	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys	Lys	
Glu	Val	Cys	Pro	Leu	Ala	Pro	Pro	Pro	Glu	
Leu	His	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Thr	
Ile	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln	Leu	Pro	Arg	Gln	
Lys	Cys	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Ala	Trp	Gly	
Ala	Gly	Asp	Ser	Cys	Arg	Gln	Gly	Ala	Trp	
Thr	Leu	Val	Ser	Asn	Pro	Phe	Cys	Pro	Glu	
Pro	Ser	Pro	Pro	Gln	Asp	Pro	Phe	Leu	Pro	
Ser	Ala	Pro	Ala	Pro	Val	Ala	Trp	Ala	His	
Gly	Arg	Arg	Gln	Gly	Leu	Gly	Pro	Ile	His	40
Ser	Arg	Thr	Asn	Leu	Met	Asp	Thr	Glu	Leu	
Met	Asp	Ala	Asp	Ser	Asp	Phe				

【0533】

配列番号5 (野生型SMO) atggcgcgtg cccgccagc gcgggggccc gagctcccgc tctggggct
gctgctgtg ctgctgtgg gggacccggg ccggggggcg gcctcgagcg ggaacgcgac cgggcctggg cc
tcggagcg cgggcgggag cgcgaggagg agcgcggcgg tgactggccc tccgccgccc ctgagccact gcggc
cgggc tgccccctgc gagccgtgc gctacaact gtgcctgggc tcgggtgtgc cctacggggc cactcca
ca ctgtggccg gagactcgga ctcccaggag gaagcgcacg gcaagctcgt gctctggctg ggctccgga
atccccccg ctgtgggca gtgatccagc ccctgtgtg tgccgtatac atgccaagt gtgagaatga cc
gggtggag ctgccagcc gtaccctctg ccaggccacc cgaggccct gtgccatcgt ggagaggag cgggg

ctggc ctgacttctt gcgctgcact cctgaccgct tccctgaagg ctgcacgaat gaggtgcaga acatcaag
 tt caacagtta gccagtgcg aagtgccctt ggctcgaca gacaaccca agagctggta cgaggacgtg
 gagggtcg gcattcagtg ccagaaccg ctcttcacag aggtgagca ccaggacatg cacagctaca tgc
 cggcctt cggggcgcgc acgggcctct gcacgtctt caccctggcc acattcgtgg ctgactggcg gaactc
 gaat cgctaccctg ctgttattct ctctacgtc aatgcgtgct tctttgtggg cagcattggc tggctggcc
 c agttcatgga tgggtcccgc cgagagatcg tctgccgtgc agatggcacc atgaggcttg gggagcccac
 ctccaatgag actctgtcct gcgtcatcat ctttgcacg gtgtactacg cctgatggc tgggtgtggt tgg
 tttgtgg tcttcaccta tgcttgccac acttcttca aagccctggg caccacctac cagcctctct cgggc
 aagac ctctacttc cactgtcga cctggctact cccctttgtc ctactgtgg caatccttgc tgtggcgc
 ag gtggatgggg actctgtgag tggcatttgt tttgtgggt acaagaacta ccgataccgt gcgggcttgc
 tgctggcccc aatggcctg gtgtcatcg tgggaggcta ctcttcacg cgaggagtca tgactctgtt ctc
 catcaag agcaaccacc cgggctgct gattgagaag gctgccagca agatcaacga gaccatgctg cgctg
 ggca tttttggctt cctggcctt ggctttgtgc tcattacctt cagctgccac ttctacgact tttcaacc
 a ggctgagtg gagegcagct tccgggacta tgtgtatgt caggccaatg tgaccatcgg gctgccacc a
 agcagccca tccctgactg tgagatcaag aatgcccgga gccttctggt ggagaagatc aacctgttg ccat
 gtttgg aactggcgc gccatgagca cctgggtctg gaccaaggcc acgtgtcga tctggaggcg tacctgg
 tgc aggtgactg ggcagagtga cgatgagcca aagcggatca agaagagca gatgattgcc aaggccttct
 ctaagcggca cgagctcctg cagaaccag gccaggagct gtccttcagc atgcacactg tgtcccacga cg
 ggccctg gcgggcttgg ctttgacct caatgagccc tcagctgatg tctctctgc ctgggccag catgt
 cacca agatgggtggc tgggagagga gccatactgc cccaggatat ttctgtcacc cctgtggcaa ctccagtg
 cc cccagaggaa caagccaacc tgtggctggt tgaggcagag atctcccag agctgcagaa gcgcctgggc
 cggaagaaga agaggaggaa gaggaagaag gaggtgtgcc cgttgccgc gccccctgag ctccacccc ctg
 cccctgc cccagatc attctcgac tgcctcagct gcccgcgag aaatgcctgg tggctgcagg tgcctg
 ggga gctggggact ctgcccga gggagcgtgg accctggtct ccaaccatt ctgccagag cccagtc
 c ctccagatcc atttctgccc agtgcaccgg cccctgtggc atgggtcat ggccgcgac agggcctggg g
 cctattcac tccgcacca acctgatgga cacagaactc atggatgcag actcggactt ctga

10

20

【0534】

配列番号6：SMOのアミノ酸位置408に変異を有するヒト平滑化アミノ酸配列

Met	Ala	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	Arg	Gly	Pro	
Glu	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	
Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Pro	Gly	Arg	Gly	Ala	
Ala	Ser	Ser	Gly	Asn	Ala	Thr	Gly	Pro	Gly	
Pro	Arg	Ser	Ala	Gly	Gly	Ser	Ala	Arg	Arg	
Ser	Ala	Ala	Val	Thr	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	
Leu	Ser	His	Cys	Gly	Arg	Ala	Ala	Pro	Cys	
Glu	Pro	Leu	Arg	Tyr	Asn	Val	Cys	Leu	Gly	
Ser	Val	Leu	Pro	Tyr	Gly	Ala	Thr	Ser	Thr	
Leu	Leu	Ala	Gly	Asp	Ser	Asp	Ser	Gln	Glu	
Glu	Ala	His	Gly	Lys	Leu	Val	Leu	Trp	Ser	
Gly	Leu	Arg	Asn	Ala	Pro	Arg	Cys	Trp	Ala	
Val	Ile	Gln	Pro	Leu	Leu	Cys	Ala	Val	Tyr	
Met	Pro	Lys	Cys	Glu	Asn	Asp	Arg	Val	Glu	
Leu	Pro	Ser	Arg	Thr	Leu	Cys	Gln	Ala	Thr	
Arg	Gly	Pro	Cys	Ala	Ile	Val	Glu	Arg	Glu	
Arg	Gly	Trp	Pro	Asp	Phe	Leu	Arg	Cys	Thr	
Pro	Asp	Arg	Phe	Pro	Glu	Gly	Cys	Thr	Asn	
Glu	Val	Gln	Asn	Ile	Lys	Phe	Asn	Ser	Ser	
Gly	Gln	Cys	Glu	Val	Pro	Leu	Val	Arg	Thr	
Asp	Asn	Pro	Lys	Ser	Trp	Tyr	Glu	Asp	Val	
Glu	Gly	Cys	Gly	Ile	Gln	Cys	Gln	Asn	Pro	

30

40

50

Leu	Phe	Thr	Glu	Ala	Glu	His	Gln	Asp	Met	
His	Ser	Tyr	Ile	Ala	Ala	Phe	Gly	Ala	Val	
Thr	Gly	Leu	Cys	Thr	Leu	Phe	Thr	Leu	Ala	
Thr	Phe	Val	Ala	Asp	Trp	Arg	Asn	Ser	Asn	
Arg	Tyr	Pro	Ala	Val	Ile	Leu	Phe	Tyr	Val	
Asn	Ala	Cys	Phe	Phe	Val	Gly	Ser	Ile	Gly	
Trp	Leu	Ala	Gln	Phe	Met	Asp	Gly	Ala	Arg	
Arg	Glu	Ile	Val	Cys	Arg	Ala	Asp	Gly	Thr	
Met	Arg	Leu	Gly	Glu	Pro	Thr	Ser	Asn	Glu	
Thr	Leu	Ser	Cys	Val	Ile	Ile	Phe	Val	Ile	10
Val	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Met	Ala	Gly	Val	Val	
Trp	Phe	Val	Val	Leu	Thr	Tyr	Ala	Trp	His	
Thr	Ser	Phe	Lys	Ala	Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr	
Gln	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Thr	Ser	Tyr	Phe	
His	Leu	Leu	Thr	Trp	Ser	Leu	Pro	Phe	Val	
Leu	Thr	Val	Ala	Ile	Leu	Ala	Val	Ala	Gln	
Val	Asp	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Gly	Ile	Cys	
Phe	Val	Gly	Tyr	Lys	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Arg	
Ala	Gly	Phe	Val	Leu	Ala	Pro	Xaa	Gly	Leu	
Val	Leu	Ile	Val	Gly	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ile	20
Arg	Gly	Val	Met	Thr	Leu	Phe	Ser	Ile	Lys	
Ser	Asn	His	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Glu	Lys	
Ala	Ala	Ser	Lys	Ile	Asn	Glu	Thr	Met	Leu	
Arg	Leu	Gly	Ile	Phe	Gly	Phe	Leu	Ala	Phe	
Gly	Phe	Val	Leu	Ile	Thr	Phe	Ser	Cys	His	
Phe	Tyr	Asp	Phe	Phe	Asn	Gln	Ala	Glu	Trp	
Glu	Arg	Ser	Phe	Arg	Asp	Tyr	Val	Leu	Cys	
Gln	Ala	Asn	Val	Thr	Ile	Gly	Leu	Pro	Thr	
Lys	Gln	Pro	Ile	Pro	Asp	Cys	Glu	Ile	Lys	
Asn	Arg	Pro	Ser	Leu	Leu	Val	Glu	Lys	Ile	30
Asn	Leu	Phe	Ala	Met	Phe	Gly	Thr	Gly	Ile	
Ala	Met	Ser	Thr	Trp	Val	Trp	Thr	Lys	Ala	
Thr	Leu	Leu	Ile	Trp	Arg	Arg	Thr	Trp	Cys	
Arg	Leu	Thr	Gly	Gln	Ser	Asp	Asp	Glu	Pro	
Lys	Arg	Ile	Lys	Lys	Ser	Lys	Met	Ile	Ala	
Lys	Ala	Phe	Ser	Lys	Arg	His	Glu	Leu	Leu	
Gln	Asn	Pro	Gly	Gln	Glu	Leu	Ser	Phe	Ser	
Met	His	Thr	Val	Ser	His	Asp	Gly	Pro	Val	
Ala	Gly	Leu	Ala	Phe	Asp	Leu	Asn	Glu	Pro	
Ser	Ala	Asp	Val	Ser	Ser	Ala	Trp	Ala	Gln	40
His	Val	Thr	Lys	Met	Val	Ala	Arg	Arg	Gly	
Ala	Ile	Leu	Pro	Gln	Asp	Ile	Ser	Val	Thr	
Pro	Val	Ala	Thr	Pro	Val	Pro	Pro	Glu	Glu	
Gln	Ala	Asn	Leu	Trp	Leu	Val	Glu	Ala	Glu	
Ile	Ser	Pro	Glu	Leu	Gln	Lys	Arg	Leu	Gly	
Arg	Lys	Lys	Lys	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys	Lys	
Glu	Val	Cys	Pro	Leu	Ala	Pro	Pro	Pro	Glu	
Leu	His	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Thr	
Ile	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln	Leu	Pro	Arg	Gln	
Lys	Cys	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Ala	Trp	Gly	50

A l a	G l y	A s p	S e r	C y s	A r g	G l n	G l y	A l a	T r p
T h r	L e u	V a l	S e r	A s n	P r o	P h e	C y s	P r o	G l u
P r o	S e r	P r o	P r o	G l n	A s p	P r o	P h e	L e u	P r o
S e r	A l a	P r o	A l a	P r o	V a l	A l a	T r p	A l a	H i s
G l y	A r g	A r g	G l n	G l y	L e u	G l y	P r o	I l e	H i s
S e r	A r g	T h r	A s n	L e u	M e t	A s p	T h r	G l u	L e u
M e t	A s p	A l a	A s p	S e r	A s p	P h e			

【0535】

配列番号7：SMOのアミノ酸位置533に変異を有するヒト平滑アミノ酸配列

M e t	A l a	A l a	A l a	A r g	P r o	A l a	A r g	G l y	P r o	10
G l u	L e u	P r o	L e u	L e u	G l y	L e u	L e u	L e u	L e u	
L e u	L e u	L e u	G l y	A s p	P r o	G l y	A r g	G l y	A l a	
A l a	S e r	S e r	G l y	A s n	A l a	T h r	G l y	P r o	G l y	
P r o	A r g	S e r	A l a	G l y	G l y	S e r	A l a	A r g	A r g	
S e r	A l a	A l a	V a l	T h r	G l y	P r o	P r o	P r o	P r o	
L e u	S e r	H i s	C y s	G l y	A r g	A l a	A l a	P r o	C y s	
G l u	P r o	L e u	A r g	T y r	A s n	V a l	C y s	L e u	G l y	
S e r	V a l	L e u	P r o	T y r	G l y	A l a	T h r	S e r	T h r	
L e u	L e u	A l a	G l y	A s p	S e r	A s p	S e r	G l n	G l u	20
G l u	A l a	H i s	G l y	L y s	L e u	V a l	L e u	T r p	S e r	
G l y	L e u	A r g	A s n	A l a	P r o	A r g	C y s	T r p	A l a	
V a l	I l e	G l n	P r o	L e u	L e u	C y s	A l a	V a l	T y r	
M e t	P r o	L y s	C y s	G l u	A s n	A s p	A r g	V a l	G l u	
L e u	P r o	S e r	A r g	T h r	L e u	C y s	G l n	A l a	T h r	
A r g	G l y	P r o	C y s	A l a	I l e	V a l	G l u	A r g	G l u	
A r g	G l y	T r p	P r o	A s p	P h e	L e u	A r g	C y s	T h r	
P r o	A s p	A r g	P h e	P r o	G l u	G l y	C y s	T h r	A s n	
G l u	V a l	G l n	A s n	I l e	L y s	P h e	A s n	S e r	S e r	
G l y	G l n	C y s	G l u	V a l	P r o	L e u	V a l	A r g	T h r	
A s p	A s n	P r o	L y s	S e r	T r p	T y r	G l u	A s p	V a l	30
G l u	G l y	C y s	G l y	I l e	G l n	C y s	G l n	A s n	P r o	
L e u	P h e	T h r	G l u	A l a	G l u	H i s	G l n	A s p	M e t	
H i s	S e r	T y r	I l e	A l a	A l a	P h e	G l y	A l a	V a l	
T h r	G l y	L e u	C y s	T h r	L e u	P h e	T h r	L e u	A l a	
T h r	P h e	V a l	A l a	A s p	T r p	A r g	A s n	S e r	A s n	
A r g	T y r	P r o	A l a	V a l	I l e	L e u	P h e	T y r	V a l	
A s n	A l a	C y s	P h e	P h e	V a l	G l y	S e r	I l e	G l y	
T r p	L e u	A l a	G l n	P h e	M e t	A s p	G l y	A l a	A r g	
A r g	G l u	I l e	V a l	C y s	A r g	A l a	A s p	G l y	T h r	
M e t	A r g	L e u	G l y	G l u	P r o	T h r	S e r	A s n	G l u	40
T h r	L e u	S e r	C y s	V a l	I l e	I l e	P h e	V a l	I l e	
V a l	T y r	T y r	A l a	L e u	M e t	A l a	G l y	V a l	V a l	
T r p	P h e	V a l	V a l	L e u	T h r	T y r	A l a	T r p	H i s	
T h r	S e r	P h e	L y s	A l a	L e u	G l y	T h r	T h r	T y r	
G l n	P r o	L e u	S e r	G l y	L y s	T h r	S e r	T y r	P h e	
H i s	L e u	L e u	T h r	T r p	S e r	L e u	P r o	P h e	V a l	
L e u	T h r	V a l	A l a	I l e	L e u	A l a	V a l	A l a	G l n	
V a l	A s p	G l y	A s p	S e r	V a l	S e r	G l y	I l e	C y s	
P h e	V a l	G l y	T y r	L y s	A s n	T y r	A r g	T y r	A r g	
A l a	G l y	P h e	V a l	L e u	A l a	P r o	I l e	G l y	L e u	50

Val	Leu	Ile	Val	Gly	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ile
Arg	Gly	Val	Met	Thr	Leu	Phe	Ser	Ile	Lys
Ser	Asn	His	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Glu	Lys
Ala	Ala	Ser	Lys	Ile	Asn	Glu	Thr	Met	Leu
Arg	Leu	Gly	Ile	Phe	Gly	Phe	Leu	Ala	Phe
Gly	Phe	Val	Leu	Ile	Thr	Phe	Ser	Cys	His
Phe	Tyr	Asp	Phe	Phe	Asn	Gln	Ala	Glu	Trp
Glu	Arg	Ser	Phe	Arg	Asp	Tyr	Val	Leu	Cys
Gln	Ala	Asn	Val	Thr	Ile	Gly	Leu	Pro	Thr
Lys	Gln	Pro	Ile	Pro	Asp	Cys	Glu	Ile	Lys
Asn	Arg	Pro	Ser	Leu	Leu	Val	Glu	Lys	Ile
Asn	Leu	Phe	Ala	Met	Phe	Gly	Thr	Gly	Ile
Ala	Met	Xaa	Thr	Trp	Val	Trp	Thr	Lys	Ala
Thr	Leu	Leu	Ile	Trp	Arg	Arg	Thr	Trp	Cys
Arg	Leu	Thr	Gly	Gln	Ser	Asp	Asp	Glu	Pro
Lys	Arg	Ile	Lys	Lys	Ser	Lys	Met	Ile	Ala
Lys	Ala	Phe	Ser	Lys	Arg	His	Glu	Leu	Leu
Gln	Asn	Pro	Gly	Gln	Glu	Leu	Ser	Phe	Ser
Met	His	Thr	Val	Ser	His	Asp	Gly	Pro	Val
Ala	Gly	Leu	Ala	Phe	Asp	Leu	Asn	Glu	Pro
Ser	Ala	Asp	Val	Ser	Ser	Ala	Trp	Ala	Gln
His	Val	Thr	Lys	Met	Val	Ala	Arg	Arg	Gly
Ala	Ile	Leu	Pro	Gln	Asp	Ile	Ser	Val	Thr
Pro	Val	Ala	Thr	Pro	Val	Pro	Pro	Glu	Glu
Gln	Ala	Asn	Leu	Trp	Leu	Val	Glu	Ala	Glu
Ile	Ser	Pro	Glu	Leu	Gln	Lys	Arg	Leu	Gly
Arg	Lys	Lys	Lys	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys	Lys
Glu	Val	Cys	Pro	Leu	Ala	Pro	Pro	Pro	Glu
Leu	His	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Thr
Ile	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln	Leu	Pro	Arg	Gln
Lys	Cys	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Ala	Trp	Gly
Ala	Gly	Asp	Ser	Cys	Arg	Gln	Gly	Ala	Trp
Thr	Leu	Val	Ser	Asn	Pro	Phe	Cys	Pro	Glu
Pro	Ser	Pro	Pro	Gln	Asp	Pro	Phe	Leu	Pro
Ser	Ala	Pro	Ala	Pro	Val	Ala	Trp	Ala	His
Gly	Arg	Arg	Gln	Gly	Leu	Gly	Pro	Ile	His
Ser	Arg	Thr	Asn	Leu	Met	Asp	Thr	Glu	Leu
Met	Asp	Ala	Asp	Ser	Asp	Phe			

10

20

30

【0536】

配列番号8：融合（SuFu）アミノ酸配列のヒトサプレッサー（GenBankアクセス番号NM_016169.2）

40

MAELRPSGAPGPTAPPAPGPTAPPASFPPGLHAIYGE
 CRRLYPDQPNPLQVTAIVKYWLGGPDPDLDYVSMYRNVGSP
 SANIPEHWHYISFGLSDLYGDNRVHEFTGTDGPSGFGFEL
 TFRCLKRETGESAPPTWPAELMQGLARYVFQSENTFCSGDH
 VSWHSPLDNSESRIQHMLLTEDPQMMPVQTPFGVVTFLLQI
 VGVCTEELHSAQQWNGQGILELLRTVPIAGGPWLITDMRR
 GETIFEIDPHLQERVVDKGIETDGSNLSGVSAKCAWDDLSR
 PPEDDEDSRSICIGTQPRRLSGKDTEQIRETLRRGLEINS
 KPVLPPINPQRQNGLAHDRAPSRKDSLESDSSTAIIPHEL

50

I R T R Q L E S V H L K F N Q E S G A L I P L C L R G R L L H G R H F T Y K S I
T G D M A I T F V S T G V E G A F A T E E H P Y A A H G P W L Q I L L T E E F V
E K M L E D L E D L T S P E E F K L P K E Y S W P E K K L K V S I L P D V V F D
S P L H

【0537】

配列番号9：溶融（SuFu）cDNA配列のヒトサプレッサー（GenBankアクセ
ッション番号NM_016169.2）

C G C C G T G C G C A G G C G C G G A G C T A G A C C T C G C T G C A G C C C C
C A T C G C C C T C G G G G A G T C T C A C C C A C C G A G T C C G C C C G C T G
G C C C G T C A G T G C T C T C C C C G T C G T T T G C C C T C T C C A G T T C
C C C C A G T G C C T G C C C T A C G C A C C C C G A T G G C G G A G C T G C G
G C C T A G C G G C G C C C C C G G C C C C A C C G C G C C C C C G G C C C C T
G G C C C G A C T G C C C C C C C G G C C T T C G C T T C G C T C T T T C C C C
C G G G A C T G C A C G C C A T C T A C G G A G A G T G C C G C C G C C T T T A
C C C T G A C C A G C C G A A C C C G C T C C A G G T T A C C G C T A T C G T C
A A G T A C T G G T T G G G T G G C C C A G A C C C C T T G G A C T A T G T T A
G C A T G T A C A G G A A T G T G G G G A G C C C T T C T G C T A A C A T C C C
C G A G C A C T G G C A C T A C A T C A G C T T C G G C C T G A G T G A T C T C
T A T G G T G A C A A C A G A G T C C A T G A G T T T A C A G G A A C A G A T G
G A C C T A G T G G T T T T G G C T T T G A G T T G A C C T T T C G T C T G A A
G A G A G A A A C T G G G G A G T C T G C C C C A C C A A C A T G G C C C G C A
G A G T T A A T G C A G G G C T T G G C A C G A T A C G T G T T C C A G T C A G
A G A A C A C C T T C T G C A G T G G G G A C C A T G T G T C C T G G C A C A G
C C C T T T G G A T A A C A G T G A G T C A A G A A T T C A G C A C A T G C T G
C T G A C A G A G G A C C C A C A G A T G C A G C C C G T G C A G A C A C C C T
T T G G G G T A G T T A C C T T C C T C C A G A T C G T T G G T G T C T G C A C
T G A A G A G C T A C A C T C A G C C C A G C A G T G G A A C G G G C A G G G C
A T C C T G G A G C T G C T G C G G A C A G T G C C T A T T G C T G G C G G G C
C C T G G C T G A T A A C T G A C A T G C G G A G G G G A G A G A C C A T A T T
T G A G A T C G A T C C A C A C C T G C A A G A G A G A G T T G A C A A A G G C
A T C G A G A C A G A T G G C T C C A A C C T G A G T G G T G T C A G T G C C A
A G T G T G C C T G G G A T G A C C T G A G C C G G C C C C C G A G G A T G A
C G A G G A C A G C C G G A G C A T C T G C A T C G G C A C A C A G C C C C G G
C G A C T C T C T G G C A A A G A C A C A G A G C A G A T C C G G G A G A C C C
T G A G G A G A G G A C T C G A G A T C A A C A G C A A A C C T G T C C T T C C
A C C A A T C A A C C C T C A G C G G C A G A A T G G C C T C G C C C A C G A C
C G G G C C C C G A G C C G C A A A G A C A G C C T G G A A A G T G A C A G C T
C C A C G G C C A T C A T T C C C C A T G A G C T G A T T C G C A C G C G G C A
G C T T G A G A G C G T A C A T C T G A A A T T C A A C C A G G A G T C C G G A
G C C C T C A T T C C T C T C T G C C T A A G G G G C A G G C T C C T G C A T G
G A C G G C A C T T T A C A T A T A A A A G T A T C A C A G G T G A C A T G G C
C A T C A C G T T T G T C T C C A C G G G A G T G G A A G G C G C C T T T G C C
A C T G A G G A G C A T C C T T A C G C G G C T C A T G G A C C C T G G T T A C
A A A T T C T G T T G A C C G A A G A G T T T G T A G A G A A A A T G T T G G A
G G A T T T A G A A G A T T T G A C T T C T C C A G A G G A A T T C A A A C T T
C C C A A A G A G T A C A G C T G G C C T G A A A A G A A G C T G A A G G T C T
C C A T C C T G C C T G A C G T G G T G T T C G A C A G T C C G C T A C A C T A
G C C T G G G C T G G G C C C T G C A G G G G C C A G C A G G G A G C C C A G C
T G C T C C C C A G T G A C T T C C A G T G T A A C A G T T G T G T C A A C G A
G A T C T C C A C A A A T A A A A G G A C A A G T G T G A G G A A G A C T G C G

10

20

30

40

50

CAGTGCCACCCCGCAGCCCAAGTGGGGTGCCATGCACAGGC
CACAGGCCCTCCACCTCACCTCCAGCTCAGGGGCGGCACC
CCGCCGCTGGCTAAGCCTTGTGACCCATCAGGCCAGTGAG
TGGGCAAAATGCGGACCCCTCCCTGCGCTGCAGCCTGCACAGA
TTCTGGTTTGTAGGTTTGTACTCTGGACCCCTGGCTGTGCCCC
TAGGTGGAGACAGCCCTCTTTCTCACCTACCCCTGCGGC
ACAGCCCAAGCAGGAGGGAGGCGGACAGCCAGATGCAGAGC
GAGTGGATGCACTTCCCAGCTCATCTCTGGAAGCCTTTGC
TACTCAAGCTCCTCTGGCCGCGGGAACAATTCTCTGATCA
TGTTTTGGTTTTTCTTCTTCTTATTTTATTTTGTAGAAACC
GGGTGGTATTTTATTTGCTCTGCAAAGATGTCCAGAAGCCA
TGTATATAATGTTTTTTAAACAGAACTTCATTCCCCGTTG
AACTTTTCGCATTCTCTGACAGAGGCCCTAGGGCTGTATCTC
TCCCTGGGCTGCCACCAGAGAAGGTGCTTGGTGTTCGCCCT
GCCAGCCCAGAGCCCTGGAGGAGCCGGCTGCACAGAGAGG
CTTTTCTTCCCAGCTGGGGCCTGATGGAGCCCGGGGCAGGG
GGAGAGTAGAGACACTCCCTTGTGCAGCTTTGAGCCTAGT
TTAGCTGGGGGCCAGGGAGGGGGTGCTACTGTTTTTCCAAGTG
AATGGGTCTCAAAGACTTGGTGACCCCAAGCCTCATCTTCT
AGGCCTTTTTCCATCCAACCAGGCCTACCTGGGAGAGGGTG
AGGTTCAGCACATCACACACCATCCCCACTGTCATTTCAGG
GCCTGGGTCTCCAGCTCTGTAAACCAGTCCTGTCCCATTTTC
CTCAGTCCCTGGGGCCTCCCAGCCTTTCAGGCCTGTAGGGCTG
CCTTACTAAAAATTGAAAAAT
CCACCTCTTAACATCTCTTTTCACTTTTGGTTTTTGCTAACAC
TGCTCTCTGCTGCCCTCCCATCCTCCCTGTATCCATTTCAT
GCCCTATCTTTTCATTCTCCACTCCTAATCCCTCTCCTTTTC
TGGCATCCTGGCCTCTCGTGGTCCCTCAGCCCCCTCACCCCC
AGTACTGCAGATCTCACAGTTTGCCTTCCAGAAGCCAGCC
TATCTCTAGCCCATGGTTTTTGGAGTTCTCTCGGGTTATC
TCCCACGCCCTGACCTGGAACCAGCAAGCCCCCTTTCTCTGCC
TTCTTACCCCCCAACTCTAGGGGATGGGACTGTTACAATACT
TCAAGATCACTCTTTACACCTCTTCAAAGCAAAGTCATGA
CAATGCAGGGGCTCCTCATTTGCTCCCATCTGCCTCTGCTGC
ACACACAGGGCACCAGCAGGGGATGCCACAGGAGTGCCCCACA
GGGTGCAGGACTCCACTGATGAGAGATCCAGCCAAAGAGC
TGCCCCCAGGGGTATGAGGGGCACCAGCTGGGGTTCTCCAGG
GAGCAGGAGTTGGACCTCCATGGAGCCACTAGGCCCTGGCC
TCCTCTACACATCCCCAGGGGCTATCTGGTTAATTCCATCA
AGCTCAGAGTTAAAAGGCATATCAGCCTGGAGTATTTGGG
AGAGACTGGCTGCAGATCCCCGCGCAGCCAAAGATGCAAGCC
ACTCGGGACCTGATGTCGGGCAGCTGTGCCCTCTACTGCCCT
GAGGACTTACCAGAGGGAGGCCCTACTGGCCTTCCCCCACCC
ACAGCAGCCCTGCCTGTGAAGCTCTTGTTTCTGACATTTTC
ACAGGCAGAGAGGTGCCATCAGTTTCGCCCTCCATTCTTTGC
CACCATGACCAGCCTCTCCCTGAACCTCTCTCTTGCTCGGG
ACCTGCCCTGAGGGCTCCCTGCTGCGAGTTCCGCCGTACTTCC
ATCTGCTGGGTGCCTCCATCGTTGGTTGGGTGGGGATGGG
GCATTTTCTGAGCTAAGCTTTGTTCATTAGTTTGTGAAGCA
CCTGGTCAAGCAACCTGCCCCAGACCTGGAGGGTCTTTGTG

10

20

30

40

50

G A C T G A A G G T A G A C A C C A G C C A G C A T G G T G G C C C T G T T C T
G G G G G A G C A G G G T A A G G C A G G A G G A A G T G G G T G A G C T C C G
A G A T G A T G A G C A C A T G A A G C C T G T G G C C C C T T C G T A C C T G
C A A T A T G T C A G G A G C C T C A C G C T C A C C C A A G A T C C T G C A G
G G G C C A G G C T C C A T C T C A C T G G C T C T G A G G G C A G G A C A G G
G T A T C A C A C A T T T C T C A C C A G G C C T C C T T T C C T A T G G G C A
T T G G T G C C T C C C A G A G G T T T C T T G G G C T G C T G G C T G G T G A
G A G A G G A C C C T T A A A G A A G A T C A A G C C A A G C T G A C C T T G G
A C C C T G T C C A G C A C A G C T T C T G G C A C A G G A T G C T T G G T G A
A T G T A C C C T T T C T T T C C C T C C C T G C A G C T C T G A G G G A G C C
C C T G A C C T T G T A G T G G G T G G A G G A G G T A A G G G G C C T C C C T
C C C T A A A T C T G C C T C T T C T G C A A G C T A C T T G G A G A C T T G C
C T A G T T G T A C C C A C C C C T C C A G G T C C C T G G T G C T A G A G C T
T C T G A G A A G G G C C T T T C C C T T T C C T C T T T G C C T G C T A T A T
A A G G C A G G C T C C T G T G G C T C T G C T G G C T C A G T G T G G G C T G
C A G G A G G A C T G C A G A C T C A G C T G C A A T T C T G A G G G G G G T T
T G G G A G G C T T G T G C G A G G T C T C A G G C C T G T G T G G G G A G C T
G G T G C C T C T T C C T G C C C G T A T C T T T C T C T T C C A A G G G C A G
T G C T C C A A G G C A G G G A C T G G A G A A G C C A A G G G G A G A G T C T
A A A A G G G C T A G A G C A T T T T T A A A A A T A G A C A C A G G G T C T T
G G G A C T G G G G T T T C G G A T T G A G T T G C A A G C A G G G A G A A A A
C C T G A A G G T C G G T G C C C C T A T G G G G C T G A C C A G T A G A G A A
T T T C C T T T A C T G T A T T T T T G T G T C T G G T C T T C C C T T T C T G
G C T T C T A G G A C A T C C A T G C C A G G T G A G G T G C C T G G G T C C C
T G T T A C A A G T C A G G A G C C C T G T A G G G A G A C C C C T C C T T T T
G T A C A A G T A C C T G A A T G C T G C G A C A A G C A G A T T T T T G T A A
A A T T T T A T A T T A G T T T T T A A T G T C A G T G G C G A C T C G G T T C
C T G G G G C T G C A G C C A G C C T G G G A C T T T T G T A A G A A T T T T T
G G G T G A C T C A C T T A G A T G T C G T T T C C T T C T T G C C C C C T C T
T C C T C T C T G T A A T C T A A G T G C A T T A A A C A T C T T T G C A G

10

20

30

【図 1 E】

図 1 E

配列番号 5 (野生型 SMO)

```

atggccgctg ccgcgcgcgc gggggggcgg gagctccccc tccctgggct 50
gctgctgctg ctgctgctgg gggaccocggg cggggggggg gctctgagcg 100
ggaaacacac cgggcgcggg cctcggagcg cggggggggg cggcaggagg 150
agcgcgcggg tgacgtggcc tccgcccggg ctgagccaat gggggcgggg 200
tgcocccctg gagcgcgtgc ctacacacgt gtgcctgggg tgggtgctgc 250
ctacacgggg caccctccac ctgctggggg gagactggga ctccaggag 300
gaagcgcacg gcaagctcgt gctctgggtg ggcctccgga atgcoccccg 350
ctgctgggga gtgahccagc cctctgtgtg tgcctatcac atgcocccag 400
gtgagcaatg acgggtggag ctgcccagcc gtaacctctg ccaggccacc 450
cgaggccctt gtcacatcgt ggagagggag cggggcgggg ctgacitcct 500
ggcctgacct cctgacctct tccctgaagg ctgacacaaat gaggcgagga 550
acatcaagtt caacacattc ggcacgtgcy aagtgcctct ggttcggaca 600
gcaaacccca agagctggla cgaagcggcg gggggcggg gcahccagtg 650
ccagaaaccc ctcttcacag aggtcgagca ccaggacatg cacagctaca 700
tcgcgccttt cgggcgcggc aggggcctct gcaagctctt caacctggcc 750
acattctggg ctgactgggg gaactcgaaat cgtacacctg ctgtttattct 800
ctctacagtg aatgcgtgct tctttgtggg cagcattggc tggctggccc 850
agttcacgga tgggtccccc cgagagatcg tctgcctgct agatggcacc 900
atgaggtctg gggagcccac ctccaatgag actctgtcct ggcctacatc 950
cttttgtcat gtgtactacg cccatgaggg tttgttgtgg tgggttgtgg 1000
tctccaccca tgcctggcac acttccctca aagccctggg caccacatc 1050
cagctctctc cgggcaagac ctctacttcc caccctgcca cctggtaact 1100
ccccctttgc ctcaactggg caatcctttg tttggcgag tggatggggg 1150
acctctggag tggcatttgt tttgtggggc acaagaacta ccgataacct 1200
gggggcttgc tgcctggccc aatcggcctg gtgctcatcg tgggaggcta 1250
cttctctcat cgaggaghaa tgactctgtt cctccataag agcaaacccc 1300
ccgggctgct gagtgagaag gctgcacgca agatcaacga gaccatgctg 1350
cgctcgqgga tttttgaccl cccggcccll gqclllgtgc tcaattacct 1400
cagctggcac tctcagact tctccaacca ggcctgagtg gagcgagct 1450
tcgggacta tctgctatgt cgggcgaatg tgacactcag cctgcacccc 1500
aagcagccca tccctgactg tgagatacag aatcgcccga gctctctgct 1550
ggagagatc aacctgtttg ccatgtttgg aactgcatc gccatgagca 1600
cctgggtctg gaccaaagcc acgctgctca tctggagggc tctcgggtgc 1650
aggttgactg ggcagagtha cgtatgacca aagcggatca agaagagcaa 1700
gagatgtgcc aagcctctct ctaagcgcca cgagctcttg cagaacccag 1750
gcacggagct gtcctccagc atgcaacatg tctccacgca cgggcgcctg 1800
ggcgccttgc ccttgcaccl caatggagccc tcaagtgagc tctcctctgc 1850
ctgggcgcag caitgcacca agatgtggcg tgggagagga gcaatctctg 1900
cccgagatc tctgtcacc cctgtgcgaa ctccagtgc cccagaggaa 1950
ccagcaaac tctgtgtgtg tgaggcagag atctcccgag agctcgagaa 2000
ggcctgggc cgggaagaga agaggagaaa gaggagaaag gagggtgccc 2050
cgctggcgcc gcccccagag cttaaccccc ctgcccctgc ccccgatccc 2100
atctccagac tgcctcagct gcccccagag aaatgcctgg tggctcgagg 2150
tgccctggga gctggggact ctggcgacca gggagcctgg accctggct 2200
ccacccatt ctgcccagag cccagctccc ctcaggatcc attctgccc 2250
agtgccacgg ccccccgtgg atgggctcat ggcgcgcgac agggcctggg 2300
ccctllcac tccgcacca cccclagaa cccagaaatc atgagtgag 2350
actcgacct ctga 2364

```

【図 1 F】

図 1 F

配列番号 6 (SMOのアミノ酸 408 位での変異)

Met Ala Ala Ala Arg Pro Ala Arg Gly Pro Glu Leu Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu
 Leu Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ser Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly
 Pro Arg Ser Ala Gly Gly Ser Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Leu
 Ser His Cys Gly Arg Ala Ala Pro Cys Glu Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly Ser
 Val Leu Pro Tyr Gly Ala Thr Ser Thr Leu Leu Ala Gly Asp Ser Asp Ser Gln Glu Glu Ala
 His Gly Lys Leu Val Leu Trp Ser Gly Leu Arg Asn Ala Pro Cys Trp Ala Val Ile Gln
 Pro Leu Leu Cys Ala Val Tyr Met Pro Lys Cys Glu Asn Asp Arg Val Glu Leu Pro Ser
 Arg Thr Leu Cys Gln Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala Ile Val Glu Arg Glu Arg Gly Trp Pro
 Asp Phe Leu Arg Cys Thr Pro Asp Arg Phe Pro Glu Gly Cys Thr Asn Glu Val Gln Asn
 Ile Lys Phe Asn Ser Ser Gly Gln Cys Glu Val Pro Leu Val Arg Thr Asp Asn Pro Lys Ser
 Trp Tyr Glu Asp Val Gln Gly Cys Gly Ile Glu Cys Gln Asn Pro Leu Phe Thr Gln Ala
 Glu His Gln Asp Met His Ser Tyr Ile Ala Ala Phe Gly Ala Val Thr Gly Leu Cys Thr Leu
 Phe Thr Ala Thr Phe Val Ala Asp Trp Arg Asn Ser Asn Arg Tyr Pro Ala Val Ile Leu
 Phe Tyr Val Asn Ala Cys Phe Phe Val Gly Ser Ile Gly Trp Leu Ala Gln Phe Met Asp Gly
 Ala Arg Arg Glu Ile Val Cys Arg Ala Asp Gly Thr Met Arg Leu Gly Glu Pro Thr Ser
 Asn Glu Thr Leu Ser Cys Val Ile Ile Phe Val Ile Val Tyr Tyr Ala Leu Met Ala Gly Val
 Val Trp Phe Val Val Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
 Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr Phe His Leu Leu Thr Trp Ser Leu Pro Phe Val Leu
 Thr Val Ala Ile Leu Ala Val Ala Gln Val Asp Gly Asp Ser Val Ser Gly Ile Cys Phe Val
 Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr Arg Ala Gly Phe Val Leu Ala Pro Xaa Gly Leu Val Leu
 Ile Val Gly Gly Tyr Phe Leu Ile Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His
 Pro Gly Leu Leu Ser Glu Lys Ala Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Ser Arg Leu Gly Ile
 Phe Gly Phe Leu Ala Phe Gly Phe Val Leu Ile Thr Phe Ser Cys His Phe Tyr Asp Phe Phe
 Asn Gln Ala Glu Trp Glu Arg Ser Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Ala Asn Val Thr
 Ile Gly Leu Pro Thr Lys Gln Pro Ile Pro Asp Cys Glu Ile Lys Asn Arg Pro Ser Leu Leu
 Val Lys Lys Ile Asn Leu Phe Ala Met Phe Gly Thr Gly Ile Ala Met Ser Thr Trp Val Trp
 Thr Lys Ala Thr Leu Leu Ile Trp Arg Arg Thr Trp Cys Arg Leu Thr Gly Gln Ser Asp
 Asp Glu Pro Lys Arg Ile Lys Lys Ser Lys Met Ile Ala Lys Ala Phe Ser Lys Arg His Glu
 Leu Leu Gln Asn Pro Gly Gln Glu Leu Ser Phe Ser Met His Thr Val Ser His Asp Gly Pro
 Val Ala Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn Glu Pro Ser Ala Asp Val Ser Ser Ala Trp Ala Gln
 His Val Thr Lys Met Val Ala Arg Arg Gly Ala Ile Leu Pro Gln Asp Ile Ser Val Thr Pro
 Val Ala Thr Pro Val Pro Pro Glu Glu Gln Ala Asn Leu Trp Leu Val Glu Ala Glu Ile Ser
 Pro Glu Leu Gln Lys Arg Leu Gly Arg Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Lys Glu Val Cys
 Cys Pro Leu Ala Pro Pro Pro Glu Leu His Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ser Thr Ile Pro Arg
 Leu Pro Arg Gln Lys Cys Leu Val Ala Ala Gly Ala Trp Gly Ala Gly Asp Ser Cys
 Ser Cys Arg Gln Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn Pro Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro
 Gln Asp Pro Phe Leu Pro Ser Ala Pro Ala Pro Val Ala Trp Ala His Gly Arg Arg Gln Gly
 Leu Gly Pro Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp Ser
 Asp Phe

【図 1 G】

図 1 G

配列番号 7 (SMOのアミノ酸 533 位での変異)

Met Ala Ala Ala Arg Pro Ala Arg Gly Pro Glu Leu Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu
 Leu Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ser Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly
 Pro Arg Ser Ala Gly Gly Ser Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Leu
 Ser His Cys Gly Arg Ala Ala Pro Cys Glu Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly Ser
 Val Leu Pro Tyr Gly Ala Thr Ser Thr Leu Leu Ala Gly Asp Ser Asp Ser Gln Glu Glu Ala
 His Gly Lys Leu Val Leu Trp Ser Gly Leu Arg Asn Ala Pro Arg Cys Trp Ala Val Ile Gln
 Pro Leu Leu Cys Ala Val Tyr Met Pro Lys Cys Glu Asn Asp Arg Val Glu Leu Pro Ser
 Arg Thr Leu Cys Gln Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala Ile Val Glu Arg Glu Arg Gly Trp Pro
 Asp Phe Leu Arg Cys Thr Pro Asp Arg Phe Pro Glu Gly Cys Thr Asn Glu Val Gln Asn
 Ile Lys Phe Asn Ser Ser Gly Gln Cys Glu Val Pro Leu Val Arg Thr Asp Asn Pro Lys Ser
 Trp Tyr Glu Asp Val Glu Gly Cys Gly Ile Gln Cys Gln Asn Pro Leu Phe Thr Glu Ala
 Glu His Gln Asp Met His Ser Tyr Ile Ala Ala Phe Gly Ala Val Thr Gly Leu Cys Thr Leu
 Phe Thr Leu Ala Thr Phe Val Ala Asp Trp Arg Asn Ser Asn Arg Tyr Pro Ala Val Ile Leu
 Phe Tyr Val Asn Ala Cys Phe Phe Val Gly Ser Ile Gly Trp Leu Ala Gln Phe Met Asp Gly
 Ala Arg Arg Glu Ile Val Cys Arg Ala Asp Gly Thr Met Arg Leu Gly Glu Pro Thr Ser
 Asn Glu Thr Leu Ser Cys Val Ile Ile Phe Val Ile Val Tyr Tyr Ala Leu Met Ala Gly Val
 Val Trp Phe Val Val Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
 Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr Phe His Leu Leu Thr Trp Ser Leu Pro Phe Val Leu
 Thr Val Ala Ile Leu Ala Val Ala Gln Val Asp Gly Asp Ser Val Ser Gly Ile Cys Phe Val
 Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr Arg Ala Gly Phe Val Leu Ala Pro Ile Gly Leu Val Leu Ile
 Val Gly Gly Tyr Phe Leu Ile Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro
 Gly Leu Leu Ser Glu Lys Ala Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg Leu Gly Ile Phe
 Gly Phe Leu Ala Phe Gly Phe Val Leu Ile Thr Phe Ser Cys His Phe Tyr Asp Phe Phe Asn
 Gln Ala Glu Trp Glu Arg Ser Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Gln Ala Asn Val Thr Ile Gly
 Leu Pro Thr Lys Gln Pro Ile Pro Asp Cys Glu Ile Lys Asn Arg Pro Ser Leu Leu Val Glu
 Lys Ile Asn Leu Phe Ala Met Phe Gly Thr Gly Ile Ala Met Xaa Thr Trp Val Trp Thr Lys
 Ala Thr Leu Leu Ile Trp Arg Arg Thr Trp Cys Arg Leu Thr Gly Gln Ser Asp Asp Glu
 Pro Lys Arg Ile Lys Lys Ser Lys Met Ile Ala Lys Ala Phe Ser Lys Arg His Glu Leu Leu
 Gln Asn Pro Gly Gln Glu Leu Ser Phe Ser Met His Thr Val Ser His Asp Gly Pro Val Ala
 Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn Glu Pro Ser Ala Asp Val Ser Ser Ala Trp Ala Gln His Val
 Thr Lys Met Val Ala Arg Arg Gly Ala Ile Leu Pro Gln Asp Ile Ser Val Thr Pro Val Ala
 Thr Pro Val Pro Pro Glu Glu Gln Ala Asn Leu Trp Leu Val Glu Ala Glu Ile Ser Pro Glu
 Leu Gln Lys Arg Leu Gly Arg Lys Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Lys Glu Val Cys Pro
 Leu Ala Pro Pro Pro Glu Leu His Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ser Thr Ile Pro Arg Leu Pro
 Gln Leu Pro Arg Gln Lys Cys Leu Val Ala Ala Gly Ala Trp Gly Ala Gly Asp Ser Cys
 Arg Gln Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn Pro Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro Pro Gln Asp
 Pro Phe Leu Pro Ser Ala Pro Ala Pro Val Ala Trp Ala His Gly Arg Arg Gln Gly Leu Gly
 Pro Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp Ser Asp Phe

【図 2】

GLI1発現

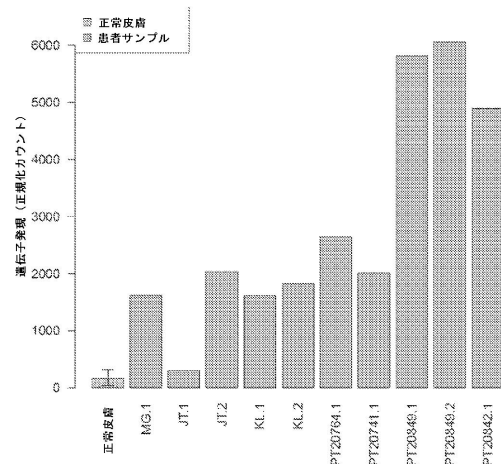
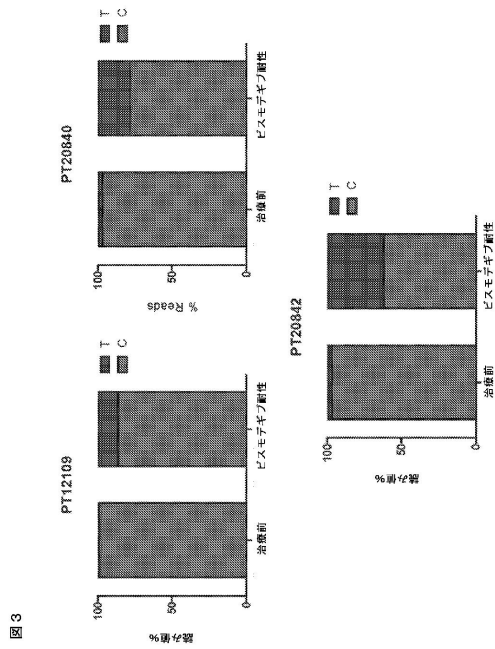
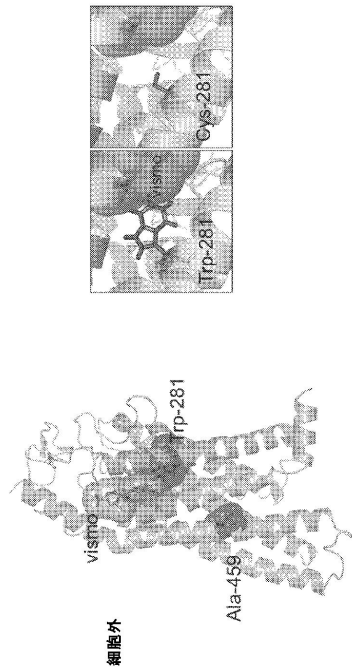


図 2

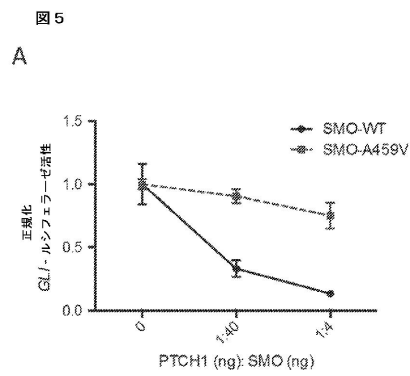
【図 3】



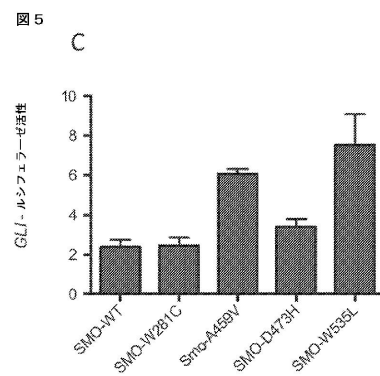
【図 4】



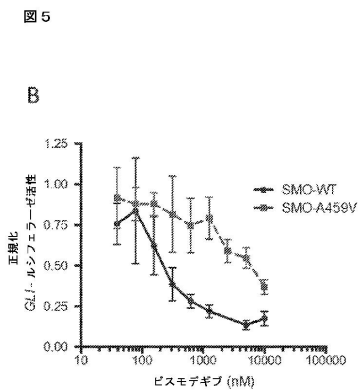
【図 5 A】



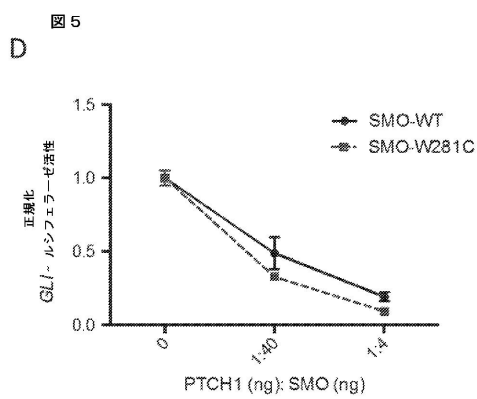
【図 5 C】



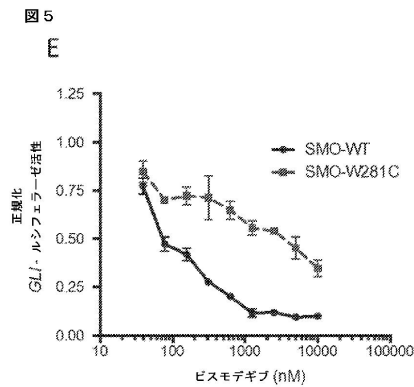
【図 5 B】



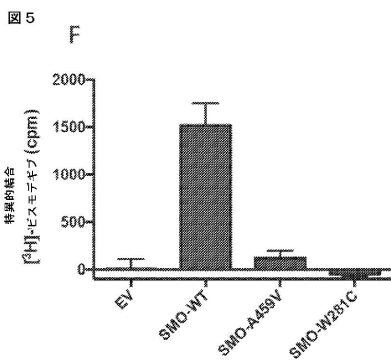
【図 5 D】



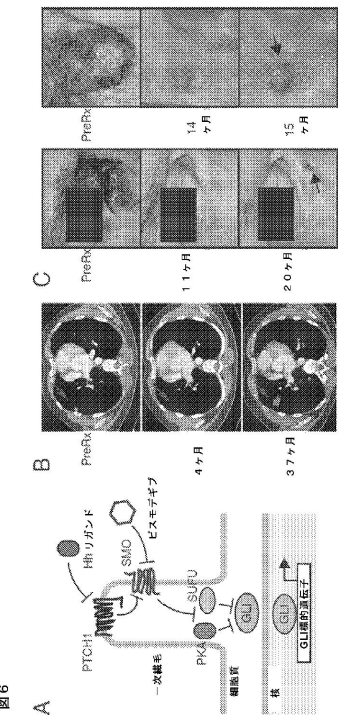
【図 5 E】



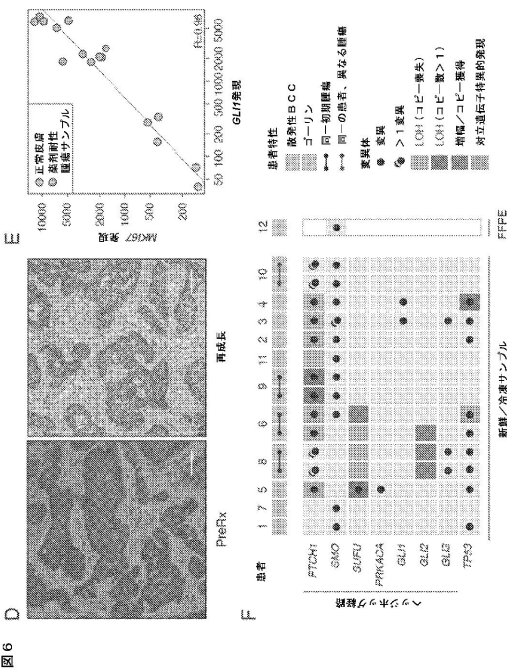
【図 5 F】



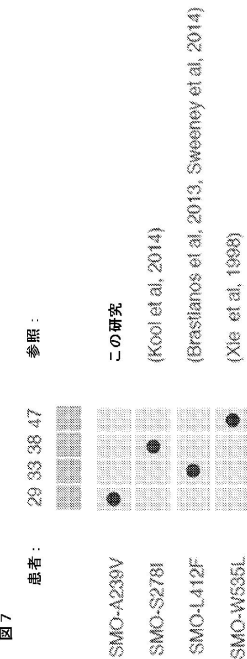
【図 6 A - C】



【図 6 D - F】

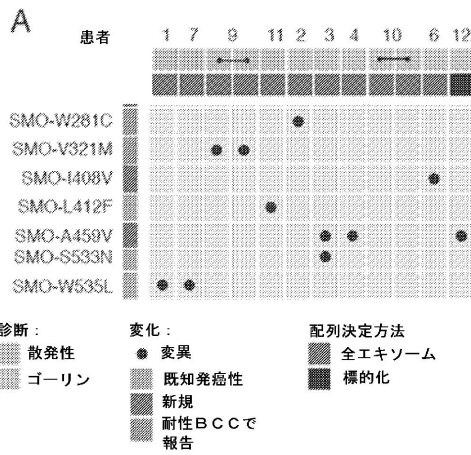


【図 7】



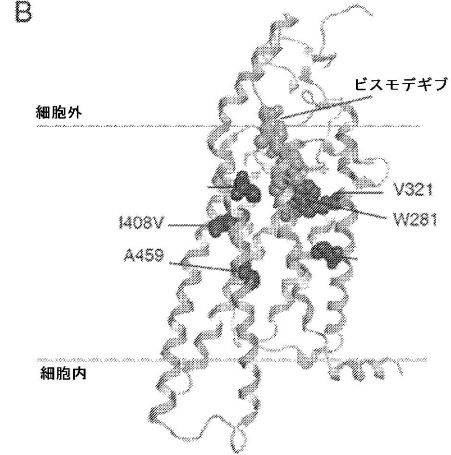
【図 8 A】

図 8



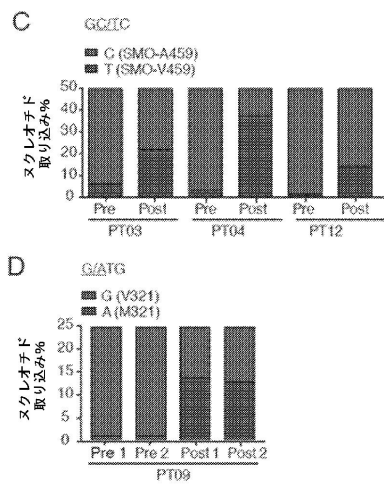
【図 8 B】

図 8



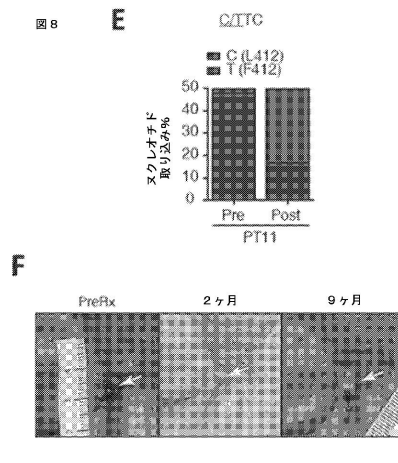
【図 8 C - D】

図 8



【図 8 E - F】

図 8



【図 9】

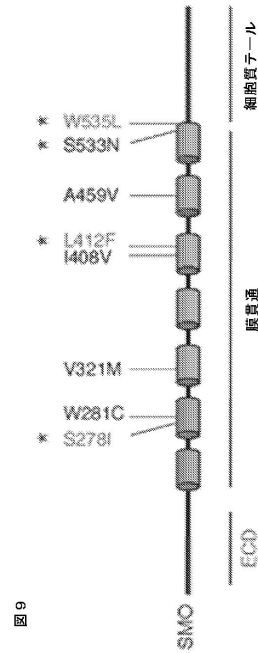


図 9

【図 10 A - C】

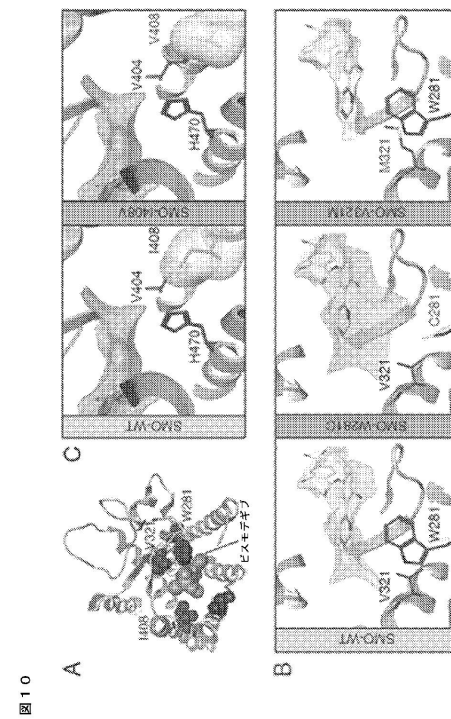
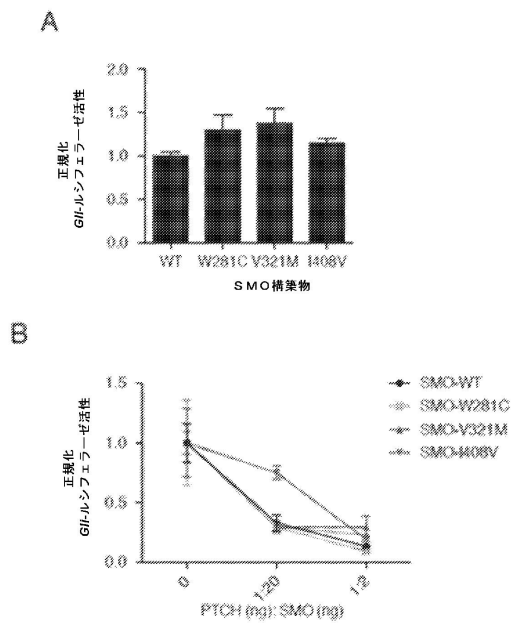


図 10

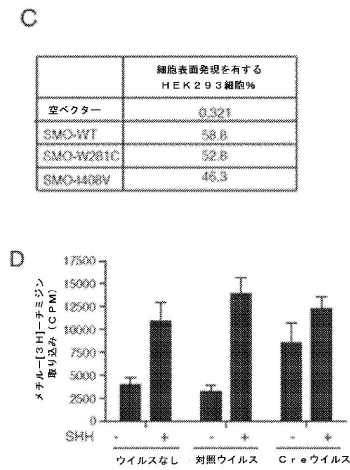
【図 11 A - B】

図 11

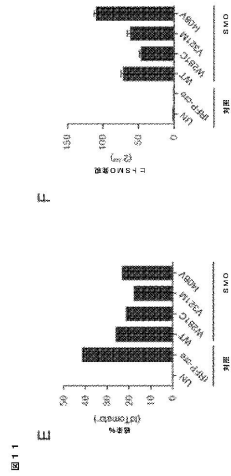


【図 11 C - D】

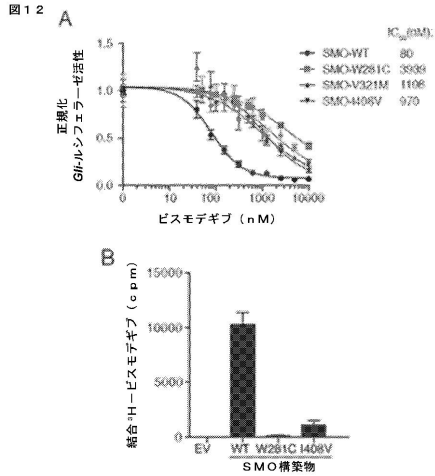
図 11



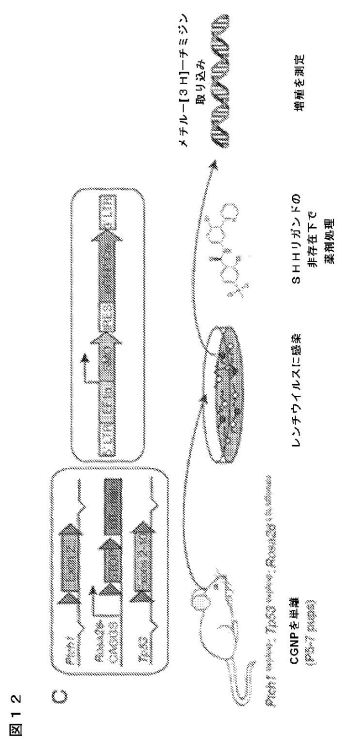
【図 1 1 E - F】



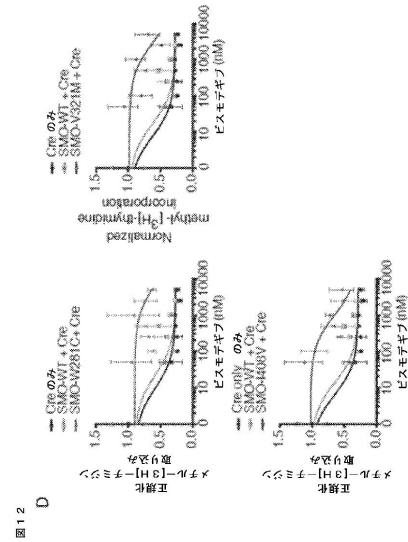
【図 1 2 A - B】



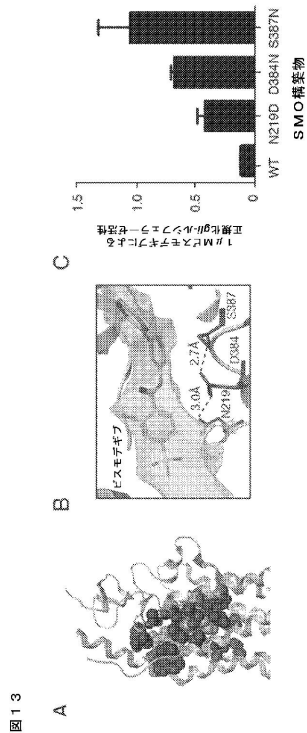
【図 1 2 C】



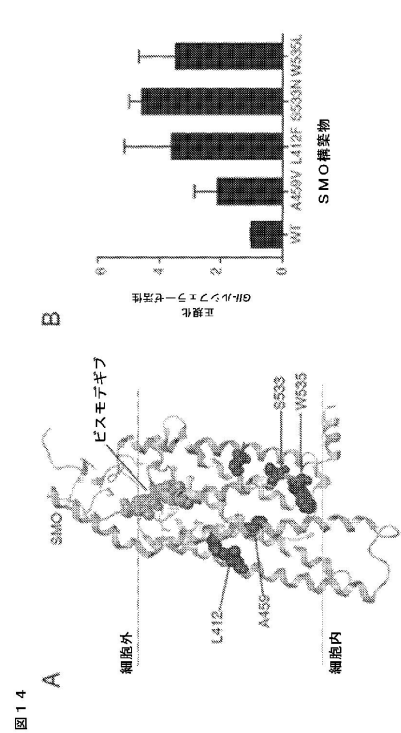
【図 1 2 D】



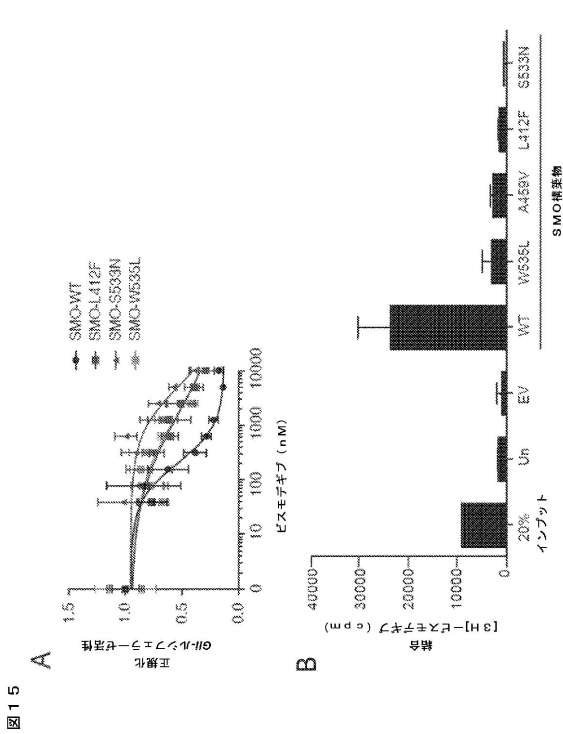
【図 1 3 A - C】



【図 1 4 A - B】



【図 1 5 A - B】



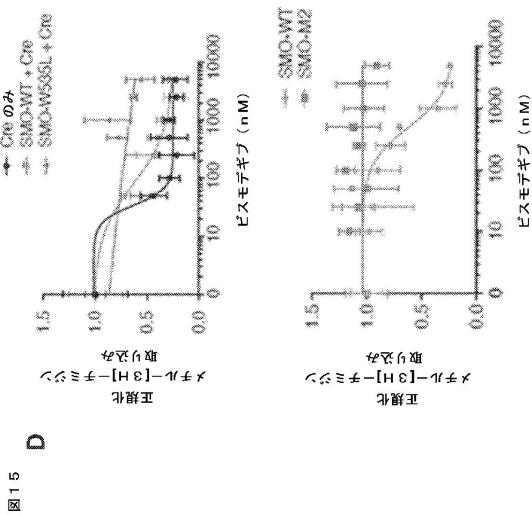
【図 1 5 C】

図 1 5

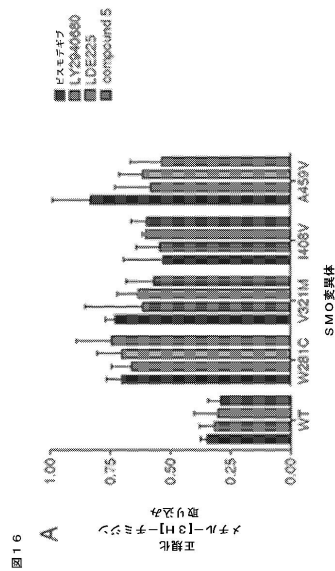
C

	細胞表面発現を有する HEK293細胞%
空ベクター	0.321
SMO-WT	58.8
SMO-A459V	60.8
SMO-S533N	61.7
SMO-W535L	54.1

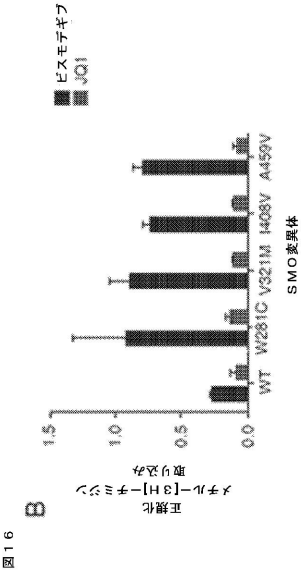
【図 1 5 D】



【図 1 6 A】



【図 1 6 B】



【配列表】

0006736467000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 0 7 K	16/30	(2006.01)	C 0 7 K 16/30
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 E
C 1 2 Q	1/6827	(2018.01)	A 6 1 K 39/395 T
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/6827 Z
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02
			G 0 1 N 33/50 P

- (72)発明者 フレデリック・ジ・ド・サウヴァージ
アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サン・フランシスコ、ディーエヌエー・ウェイ 1
- (72)発明者 ロバート・エル・ヤウク
アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サン・フランシスコ、ディーエヌエー・ウェイ 1
- (72)発明者 ジェリ・ジ・ペ・ディジクラーフ
アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サン・フランシスコ、ディーエヌエー・ウェイ 1
- (72)発明者 ヘイリー・シャープ
アメリカ合衆国 9 4 1 1 4 カリフォルニア州サン・フランシスコ、アパートメント 2、クリッパー・ストリート 2 2 2

審査官 小田 浩代

- (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 0 3 9 8 9 3 (US, A 1)
米国特許第 0 6 1 3 6 9 5 8 (US, A)
Dijkgraaf, G. J. et al., Cancer Research, 2 0 1 0 年, Vol.71, No.2, pp.435-444
伊藤幸裕 ほか, ファルマシア, 2 0 1 4 年, Vol.50, No.11, pp.1107-1111

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / D W P I / B I O S I S / E M B A S E / M E D L I N E
(STN)
U n i P r o t / G e n e S e q