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

特許第4532273号
(P4532273)

(45)発行日　平成22年8月25日(2010.8.25)　(24)登録日　平成22年6月18日(2010.6.18)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/574	(2006.01)	G01N	33/574	A
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	Z
A61K 49/00	(2006.01)	A61K	49/00	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	

請求項の数 8　(全 37 頁)

(21)出願番号	特願2004-530330 (P2004-530330)
(86)(22)出願日	平成15年8月6日(2003.8.6)
(65)公表番号	特表2006-507243 (P2006-507243A)
(43)公表日	平成18年3月2日(2006.3.2)
(86)国際出願番号	PCT/GB2003/003421
(87)国際公開番号	WO2004/017992
(87)国際公開日	平成16年3月4日(2004.3.4)
審査請求日	平成18年5月26日(2006.5.26)
(31)優先権主張番号	0219776.2
(32)優先日	平成14年8月24日(2002.8.24)
(33)優先権主張国	英国(GB)

前置審査

(73)特許権者　507073918
ユセベ　ファルマ　ソシエテ　アノニム
ベルギー国、ベー　－　１０７０　ブリュッセル、アレー　ド　ラ　ルシェルシュ　６０
(74)代理人　100066692
弁理士　浅村　皓
(74)代理人　100072040
弁理士　浅村　肇
(74)代理人　100088926
弁理士　長沼　暉夫
(74)代理人　100102897
弁理士　池田　幸弘

最終頁に続く

(54)【発明の名称】癌に関係するタンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

被験者における癌のスクリーニングおよび／または診断または予後を予測する、および／または癌療法の有効性をモニタリングする方法であって、前記癌が乳癌、すい臓癌、肺癌、膀胱癌又は腎臓癌から選ばれ、

該被験者から得られた生物試料において、ＰＴＫ７ポリペプチドを検出する、および／または定量するステップを含む、

上記方法。

【請求項２】

該ポリペプチドのレベルがあらかじめ定められた参照範囲または対照と比較される請求項１の方法。

【請求項３】

検出のステップが、

（ａ）試料をＰＴＫ７ポリペプチドに特異的である捕捉試薬と接触させ、ここで該捕捉試薬は抗体又はその機能的に活性な断片であり、そして

（ｂ）結合が捕捉試薬と試料中の該ポリペプチドの間に生じたか否かを検出することを含む、

請求項１または２に記載の方法。

【請求項４】

ステップ（ｂ）が、直接または間接的に標識化した検出試薬を用いて、捕捉したポリペ

プチドを検出することを含む、請求項３記載の方法。
【請求項５】
捕捉試薬が固相上に固定化されている、請求項３または４記載の方法。
【請求項６】
ポリペプチドが、ＰＴＫ７ポリペプチドに特異的に結合する抗体を使用して検出される、および／または定量される、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
抗体が、検出し得る標識、または第二抗体もしくはその断片に共役している請求項６の方法。
【請求項８】
ＰＴＫ７ポリペプチドに特異的な抗体又はその機能的に活性な断片、試薬および使用指示書を含む、乳癌、すい臓癌、肺癌、膀胱癌又は腎臓癌の診断のための診断キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ポリペプチドＰＴＫ７と相互作用するかまたはその発現または活性を調節するポリペプチドＰＴＫ７の薬剤を標的とすることを含む癌の治療および／または予防のための方法、そのような薬剤の同定のための方法、および癌の診断におけるＰＴＫ７の使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
腫瘍特異タンパク質は、ｃＤＮＡのディファレンシャルスクリーニング（Ｈｕｂｅｒｔ、Ｒ．Ｓ．ら、１９９９、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９６：１４５２３－１４５２８）および腫瘍特異抗体によって認識される細胞表面タンパク質の精製（Ｃａｔｉｍｅｌ、Ｂ．ら、１９９６、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１：２５６６４－２５６７０）のような技術を用いて多くの癌の型について同定されてきた。より最近には、１０，０００の発現配列素子（ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｅｌｅｍｅｎｔｓ）までを含有するＤＮＡチップが腫瘍細胞遺伝子発現を特徴づけるのに使用された（Ｄｈａｎａｓｅｋａｒａｎ、Ｓ．Ｍ．ら、２００１、Ｎａｔｕｒｅ、４１２：８２２－８２６）。しかしながら、なぜ以前に行われた多くの広範な癌のトランスクリプトーム解析が全ての、またはほとんどの腫瘍関連タンパク質を明らかにしなかったのかにはいくつかの理由がある。それらには以下のものがあげられる：（ｉ）転写と疾病関連タンパク質レベル、特に、しばしば長い半減期を有し、それゆえに高いｍＲＮＡ回転を有さない膜タンパク質間の相関関係の欠如。それゆえ、正常細胞と癌性細胞の間のタンパク質レベルにおける相異が矛盾しなくなるまで、癌状態での膜タンパク質のｍＲＮＡにおける変化に関連づけるのはしばしば困難である。（ｉｉ）転写された遺伝情報の単なる差のレベルというよりむしろ病態におけるタンパク質の転位、例えばｅｒｂＢ２／ＨＥＲ２－ｎｅｕが、正常な乳腺細胞よりも癌細胞においてより大きな原形質膜局在を示し、そして、転写因子エストロゲン受容体およびＳＴＡＴ３は腫瘍形成効果を示すために核に転位している。（ｉｉｉ）新規で、まだ特性化されていない遺伝子は、チップ当たりの発現配列素子の数およびＤＮＡクローンの知識および有効性について制限があるようなｃＤＮＡアレーの「閉鎖系」内においては高度に表示されない。タンパク質発現は、いくつかのレベルで厳密な翻訳調節を受けるので、タンパク質発現とｍＲＮＡレベルの間にはあてにならない関係があることは、よく確立されていることである（例えば、Ｇｙｇｉ　ＳＰら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１９９９、１９：１７２０－３０）。細胞の翻訳装置の全活性の制御は、本質的に全てのｍＲＮＡの翻訳に影響することが期待される（Ｍａｔｔｈｅｗｓ、Ｍ．ら、「翻訳調節」Ｈｅｒｓｈｅｙ、Ｊ．ら編、ｐｐ１１－１２、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｕｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、１９９６）。実際、特異的ｍＲＮＡの断片は完全に抑制されている。さらに、個々のｍＲＮＡは、翻訳の効率が大きく異なっており、「弱く」あるいは「強く」なり得、それで遺伝子発現の調節に寄与している。

それゆえ、ｃＤＮＡの概念的翻訳が存在するということは、特定の細胞型に特定のタンパク質が存在するという決定的な証拠が提供できないことになる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００３】

乳癌は婦人において最も頻繁に診断される癌である。乳癌の初期検出のスクリーニングプログラムの実行、および外科的切除を補う化学療法、放射線療法および抗エストロゲン療法のような、抗癌治療の出現は、乳癌患者の生存を改善した。しかしながら、癌細胞は化学療法薬に抵抗性を取得し、あるいはホルモン感受性を失うので、ある種の乳腺腫瘍はそのような治療に治療抵抗性となり、再発し、あるいは、しばしば不治である転移性の疾患となる。最近、腫瘍細胞に対する宿主免疫反応を開始する、あるいは、標的とする手段として、癌ワクチンおよびモノクローナル抗体（ｍＡＢｓ）のような免疫療法に注意が向けられている（Ｇｒｅｅｎ、ＭＣ．ら、２０００、Ｃａｎｃｅｒ Ｔｒｅａｔ Ｒｅｖ．２６：２６９－２８６；Ｄａｖｉｓ、ＩＤ．、２０００、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．７８：１７９－１９５；Ｋｎｕｔｈ、Ａ．ら、２０００、Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４６：Ｓ４６－５１；Ｓｈｉｋｕ、Ｈ．ら、２０００、Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４６：Ｓ７７－８２；Ｓａｆｆｉｎ、ＤＣ．ら、１９９９、Ｃａｎｃｅｒ Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ Ｒｅｖ．１８：４３７－４４９）。ｅｒｂＢ２／ＨＥＲ－ｎｅｕ受容体タンパク質を認識するｍＡｂであるハーセプチンは、転位乳癌の治療に使用されている。化学療法との組合せで、ハーセプチンは、化学療法のみを受けた患者と比較して、疾病の進行時間を引延ばすことが示された（Ｂａｓｅｌｇａ、Ｊ．ら、１９９８、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５８：２８２５－２８３１）。しかし、ハーセプチンは、ｅｒｂＢ２タンパク質を過剰発現した腫瘍を有する患者の１０－２０％の治療においてのみ効果がある。

【０００４】

膵癌の治療には、治療的モノクローナル抗体が含まれる。例えば、併用治療が、上皮増殖因子（ＥＧＦ）受容体（ＥＧＦ受容体が膵癌患者において過剰発現される）に対するモノクローナル抗体、ＩＭＣ－Ｃ２２５と５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）の組合せで、臨床治験中である。ＨＥＲ－２／ｎｅｕ癌遺伝子が膵腺癌の患者１５４名の２１％において過剰発現していることが報告されている（Ｓａｆｒａｎ、Ｈ．ら、２００１、Ａｍｅｒ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ ２４：４９６－４９９）。これによりそのような患者に組換えヒト化抗ＨＥＲ２抗体（ハーセプチン）の治療評価が正当化されることが示唆された。膵癌の診断は、初期症状が慢性膵炎、肝炎、胆石および糖尿病を含む他の疾患のそれに類似しているので、目下のところ困難である。時によっては、しばしば正しい診断が行われたときには、癌がリンパ節および肝臓に広がってしまっている。

【０００５】

膀胱癌は、女性よりも男性においてよりしばしば生じる疾病であり、しばしば進行した段階で診断されている。治療は、一般的に現在のところ得られる僅かな生物学的／免疫学的治療と、手術、放射線療法および化学療法に限定されている。特に、ＢＣＧ（カルメット－ゲラン菌）が、膀胱癌の患者の免疫系を促進するのに使われている。

【０００６】

ときに腎細胞癌とも呼ばれる腎臓癌は、腎臓に起こる最も普通の腫瘍である。現在のところ、主要な手術を受けるには余りにも悪化している患者に対する手術の代わりに、ときに使われる放射線療法とともに、手術が腎臓癌の主な治療であるが、しかしながら、腎細胞癌は、放射線療法に特に感受性があるともいえない。腎臓癌の二つの最も普通の生物学的治療は、患者の免疫系を促進する試みとして使用されるサイトカイン、インターロイキン２およびインターフェロンα、の使用である。

【０００７】

肺癌は、二つの主要な型、非小細胞肺癌および小細胞肺癌と共に、男性および女性における死亡の主要な癌である。治療は、手術に限定され、可能ならば、化学療法および放射

線療法がある。

【０００８】

卵巣癌は、最初に末期の疾病を示す、より普通の上皮卵巣癌にかかっている約７０％が致命的な婦人科の癌である。その生存率は、癌が既に上腹部に広がっているので、初期の疾病を示すものと比較して、著しく少ない。卵巣癌は、一般的にシスプラチンを基本とした化学療法で治療され、しばしば獲得性シスプラチン抵抗性のゆえに再発する（Ｙａｈａｔａ、Ｈ．ら、２００２、Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１２８：６２１－６）、それゆえに新薬と新しい治療標的に対する需要がある。また、現時点でのマーカーは、大きな集団に応用し得る適切な感受性および特異性に欠けているので、卵巣癌の新しいマーカーに対する需要がある（Ｒａｉ、Ａ．ら、２００２、Ａｒｃｈ　Ｐａｔｈｏｌ．Ｌａｂ．Ｍｅｄ．１２６：１５１８－２６）。

【０００９】

骨肉腫は、骨病変によって特徴づけられる主として小児期の疾病である。患者の２０％以上が、生検によって最もしばしば確定診断される末期骨肉腫として診断される。治療は、一般的に手術と組合せた化学療法である。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

それゆえに、癌の治療用の新規な治療薬について重要な需要が存在している。さらに、生物体における癌の診断用の高感度で特異的なバイオマーカーとして使用するための新しい癌関連タンパク質を同定する明確な需要がある。

【００１１】

ｃＤＮＡをコードするＰＴＫ－７（ＣＣＫ－４としても知られている）は、最初Ｌｅｅら（１９９３、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ８：３４０３－３４１０）によって、その後Ｍｏｓｓｉｅら（ＷＯ　９６／３７６１０およびＯｎｃｏｇｅｎｅ　１９９５、１１：２１７９－２１８４）によって単離された。我々の発見と対照的に、後者の著者らは、ＰＴＫ７　ｍＲＮＡ発現は正常な大腸組織には存在しないことを見出した。ＰＴＫ７は、受容体チロシンキナーゼファミリーの新しいメンバーである。

【００１２】

本発明は、ＰＴＫ７が、癌の治療および／または予防のための新規な治療標的を示していることを見出したことに基づいている。

【００１３】

従って、本発明は、ＰＴＫ７ポリペプチドと相互関係を有し、その発現または活性を調節する薬剤の治療有効量を投与することを含む癌の治療および／または予防の方法を提供するものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１４】

ＰＴＫ７ポリペプチドは、

（ａ）配列番号１のアミノ酸配列を含む、または、よりなる、あるいは

（ｂ）ＰＴＫ７ポリペプチドの活性を保持する配列番号１のアミノ酸配列に関して、１つまたはそれ以上のアミノ酸置換、修飾、欠失または挿入を有する誘導体であるようなポリペプチドを包含する。

【００１５】

用語「ポリペプチド」は、ペプチドおよびタンパク質を包含する。それらは、とくに特定しない限り互換的に使用される。

【００１６】

本発明における用語「癌」は、上皮に由来する皮膚または、より一般的には身体の器官、例えば、乳房、肺、腎、膵、卵巣、前立腺、膀胱、胃または腸管の内張りに見出される悪性新生物を包含する。骨肉腫もまた包含される。癌は、隣接する組織に浸潤し、および、別の器官、例えば骨、肝、肺または脳に拡散（転移）する傾向がある。本発明の方法において、癌は、好ましくは卵巣癌または骨肉腫であり、より好ましくは、肺癌、腎癌、膵

癌または膀胱癌であり、最も好ましくは、乳癌および、特に転移乳癌である。

【００１７】

本発明の方法において使用される薬剤は、限定されることなく、ＰＴＫ７ポリペプチドまたはＰＴＫ７ポリペプチドをコードする核酸分子と相互作用する（例えば、結合する、または、認識する）ことができる、あるいは、ＰＴＫ７ポリペプチドの相互作用、発現または活性、もしくはＰＴＫ７ポリペプチドをコードする核酸分子の発現を、調節できる薬剤を包含する。当業者は、それゆえに、本発明の方法が、ＰＴＫ７ポリペプチドを直接標的とする、および相当する核酸を標的とすることによってポリペプチドの発現に間接的に影響することを包含することを理解するであろう。好ましくは、ＰＴＫ７ポリペプチドは直接標的とされる。そのような薬剤は、限定されることなく、抗体、核酸（例えばＤＮＡおよびＲＮＡ）、炭水化物、脂質、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ペプチド様物質、小分子その他の薬品を包含する。

【００１８】

それゆえに、本発明は、癌の治療および／または予防用の医薬品の製造におけるＰＴＫ７ポリペプチドと相互作用するあるいはその発現または活性を調節する薬剤の使用を提供する。

【００１９】

最も好ましくは、癌の予防および／または治療における使用のための薬剤は、ＰＴＫ７ポリペプチドに相互作用する（すなわち、結合する、または認識する）あるいはその活性を調節する抗体である。さらに好ましいものは、ＰＴＫ７ポリペプチドを特異的に認識する抗体である。特に、「特異的に認識する」または「特異的に結合する」とは、抗体が、他のポリペプチドに対するよりもＰＴＫ７ポリペプチドに対してより大きな親和性を有していることを意味する。

【００２０】

従って、癌の治療および／または予防において使用するための医薬品の製造において使用されるＰＴＫ７ポリペプチドを特異的に認識する抗体の使用が提供される。また、提供されるのは、ＰＴＫ７を特異的に認識する抗体の治療有効量を被験者に投与することを含む、被験者における癌の治療および／または予防の方法である。特に、ＰＴＫ７ポリペプチドと特異的に相互作用する抗体が、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を仲介するために使用される。そのような場合、抗体は、好ましくは全長そのままの抗体（ｎａｋｅｄ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）である。本発明の別の態様によると、ＰＴＫ７ポリペプチドに特異的に結合する抗体は、該ポリペプチドの活性を阻害するために使用され得る。

【００２１】

所望により治療部分（ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ｍｏｉｅｔｙ）に結合する抗体は、単独または細胞傷害因子および／またはサイトカインと組合せて、治療的に使用できる。特に、ＰＴＫ７抗体は、与えられた生物反応を調節する細胞傷害性薬剤、放射性核種または薬品部分（ｄｒｕｇ　ｍｏｉｅｔｙ）のような、治療薬と結合できる。治療薬は、古典的な化学治療薬に限定するように解釈されるべきでない。例えば、治療薬は、所望の生物活性を有するタンパク質またはポリペプチドである薬品部分であり得る。そのような部分は、例えばそして限定なしに、アブリン、リシンＡ、シュードモナス外毒素、またはジフテリアトキシンのような毒素、腫瘍壊死因子、αインターフェロン、βインターフェロン、神経成長因子、血小板由来増殖因子または組織プラスミノーゲンアクチベーター、血栓症薬または抗血管形成剤、例えばアンジオスタチンまたはエンドスタチンのようなタンパク質、もしくは、リンホカインインターロイキン１（ＩＬ－１）、インターロイキン２（ＩＬ－２）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、神経成長因子（ＮＧＦ）またはその他の成長因子のような生物応答調節剤を包含する。

【００２２】

治療薬は、また、細胞に対し有害（例えば殺細胞）であるいかなる薬剤をも包含する細

胞毒素あるいは細胞傷害剤も包含している。例としては、タキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラセンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシン、およびこれらの類似体または同族体を包含する。治療薬は、また、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキセート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、５－フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブチル、メルファラン、カルムスチン（ＢＣＮＵ）およびロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、およびシスジクロロジアミン白金（ＩＩ）（ＤＤＰ）シスプラチン）、アンスラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前はダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前はアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、アンスラマイシン（ＡＭＣ）、カリケアマイシンまたはデュオカルマイシン）、および細胞分裂阻止剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）を包含するが、これらに限定されるものではない。

【００２３】

その他の治療部分は、^{111}Ｉｎおよび^{90}Ｙ、Ｌｕ^{177}、ビスマス^{213}、カリホルニウム^{252}、イリジウム^{192}およびタングステン^{188}／レニウム^{188}のような放射性核種、あるいはアルキルホスホコリン、トロイソメラーゼＩ阻害剤、タキソイドおよびスラミンのような、しかしこれらには限定されない、薬品を包含し得る。

【００２４】

そのような治療薬を抗体に結合させる技術は、よく知られている（例えば、Ａｒｎｏｎら、「癌治療法における薬物の免疫標的用モノクローナル抗体」モノクローナル抗体および癌治療、Ｒｅｉｓｆｅｌｆら編、１９８５，ｐｐ．２４３－５６、ｅｄ．Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ社；Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍら、「薬物送達用抗体」、制御された薬物送達、第二版、Ｒｏｂｉｎｓｏｎら編、１９８７、ｐｐ．６２３－５３、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ社；Ｔｈｏｒｐｅ「総説：癌治療における細胞傷害性薬剤の抗体キャリヤー」モノクローナル抗体’８４、生物学的および臨床的応用；Ｐｉｎｃｈｅｒａら、１９８５、ｐｐ．４７５－５０６；「癌治療法における放射能標識抗体の治療的使用の分析、結果および将来への展望」癌検出および治療用モノクローナル抗体、Ｂａｌｄｗｉｎら編、１９８５、ｐｐ．３０３－１３、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；Ｔｈｏｒｐｅら、１９８２、「抗体・トキシン共役体の調製および細胞傷害性」、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．、６２：１１９－５８およびＤｕｂｏｗｃｈｉｋら、１９９９、Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ、８３、６７－１２３を参照のこと）。本発明において使用するための抗体は、限定されないが例えば、あらゆる種類の分子の共有結合によって修飾されている。好ましくは、該結合は、免疫特異的結合を妨害しない。一態様において、抗体は、抗体異種結合を形成するために第二抗体に結合できる（米国特許４，６７６，９８０）。

【００２５】

別の実施態様において、本発明は、抗体（またはそれらの機能的活性断片）の融合タンパク質、例えば限定することなしに、抗体またはそれらの断片が、所望ならばＮ末端またはＣ末端において、別のタンパク質のアミノ酸配列（またはその部分、好ましくは、少なくともタンパク質の１０、２０または５０アミノ酸部分）に共有結合（例えば、ペプチド結合）を経由して融合しているものの治療的使用を提供する。好ましくは抗体またはその断片は、抗体の一定のドメインのＮ末端で、別のタンパク質につながっている。別の態様において、抗体融合タンパク質は、ここに記載されたように、ポリペプチドの消耗または精製を容易にし、イン・ビボで半減期を増加し、および上皮の関門を横断して抗体の免疫系への運搬を増強している。

【００２６】
融合タンパク質がエフェクターまたはレポーター分子につながっている抗体断片であるところでは、このものは標準的な化学的または組換えＤＮＡ操作によって調製され得るが、そこでは抗体断片が直接またはカップリング剤を経由してエフェクターまたはレポーター分子に、活性ポリマーとの反応前または後のいずれかに適当に連結される。特定の化学操作は、例えば、ＷＯ　９３／６２３３１、ＷＯ　９２／２２５８３、ＷＯ　９０，１９５およびＷＯ　８９／１４７６に記載されているものを包含する。換言すれば、エフェクターまたはレポーター分子がタンパク質またはポリペプチドの場合、連結は、例えばＷＯ　８６／０１５３３およびＥＰ０３９２７４５に記載のような組換えＤＮＡ操作を用いて達成できる。

【００２７】
最も好ましくは、抗体は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）部分に連結されている。好ましくは、修飾Ｆａｂ断片は、ＰＥＧ化されている、すなわちＥＰ－Ａ－０９４８５４４に開示された方法に従って、共役的に結合したＰＥＧ（ポリエチレングリコール）を有している「ポリエチレングリコール、化学、生物工学的および生物医学的応用」、１９９２、Ｊ．Ｍｉｌｔｏｎ　Ｈａｒｒｉｓ（ｅｄ）、Ｐｌｅｎｕｍ　Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、「ポリエチレングリコール、化学および生物学的応用」、１９９７、Ｊ．Ｍｉｌｔｏｎ　ＨａｒｒｉｓおよびＳ．Ｚａｌｉｐｓｋｙ（ｅｄｓ）、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｓｏｃｉｅｔｙ、Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ　ＤＣおよび「生物医用科学のための生物共役タンパク質カップリング技術」、１９９８、Ｍ．ＡｓｌａｍおよびＡ．Ｄｅｎｔ、Ｇｒｏｖｅ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ；Ｃｈａｐｍａｎ、Ａ．２００２、Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　２００２、５４：５３１－５４５］。一実施態様において、ＰＥＧ修飾Ｆａｂ断片は、修飾されたヒンジ領域において単一チオール基に共役結合したマレイミド基を有している。リジン残基は、マレイミド基に共役結合していることがある。リジン残基のアミン基のそれぞれには、約２０，０００Ｄａの分子量を有するメトキシポリエチレングリコールポリマーが結合していることがある。完全なエフェクター分子の総分子量は、それゆえに、約４０，０００Ｄａであろう。

【００２８】
ＰＴＫ７ポリペプチドまたは該ポリペプチドを発現する細胞は、例えば該ＰＴＫ７ポリペプチドを特異的に認識する抗体を産生するために使用できる。ＰＴＫ７ポリペプチドに対して精製した抗体は、よく知られた所定のプロトコールを用いて、動物、好ましくは非ヒト動物にポリペプチドを投与することによって得ることができる。

【００２９】
抗ＰＴＫ７抗体は、機能的に活性な断片、誘導体または類縁体を包含し、限定的ではないが、ポリクロナール、モノクロナール、二特異的、ヒト化またはキメラ抗体、単鎖抗体、Ｆａｂ断片およびＦ（ａｂ’）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによってつくられた断片、抗イディオタイプ（抗ｉｄ）抗体、および上記のいずれかのエピトープ結合断片であり得る。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の一つまたはそれ以上の相補性決定領域（ＣＤＲｓ）およびヒト免疫グロブリン分子由来の枠組み構造領域を有する非ヒト種由来の抗体分子である（米国特許５，５８５，０８９参照）。抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫的に活性な部分、すなわち抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子を包含する。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子のいかなるクラス（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤおよびＩｇＡ）またはサブクラスでもあり得る。

【００３０】
モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術（Ｋｏｈｌｅｒ　＆　Ｍｉｌｓｔｅｉｎ、１９７５、Ｎａｔｕｒｅ、２５６：４９５－４９７）、トリオーマ技術、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Ｋｏｚｂｏｒら、１９８３、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　Ｔｏｄａｙ、４：７２）およびＥＢＶハイブリドーマ技術（Ｃｏｌｅら、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉ

ｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ、ｐｐ７７－９６、Ａｌａｎ Ｒ Ｌｉｓｓ社、１９８５）のような当業者に知られたいかなる方法によっても調製することができよう。

【００３１】

キメラ抗体は、軽鎖および重鎖遺伝子が異なった種に属する免疫グロブリン分子セグメントから構成されるように遺伝子工学処理されている免疫グロブリン遺伝子によってコードされた抗体である。これらキメラ抗体は、より少ない抗原性であるようである。二特異性抗体は、公知の方法によってつくることができる（Ｍｉｌｓｔｅｉｎら、１９８３、Ｎａｔｕｒｅ ３０５：５３７－５３９；ＷＯ ９３／０８８２９、Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒら、１９９１、ＥＭＢＯ Ｊ．１０：３６５５－３６５９）。

【００３２】

本発明において使用するための抗体は、Ｂａｂｃｏｏｋ、Ｊ．ら、１９９６、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３（１５）：７８４３－７８４８によって、およびＷＯ ９２／０２５５１において記載されているような特異的抗体の産生のために選択された単一リンパ球から生成した免疫グロブリン可変領域ｃＤＮＡｓの分子クローニングおよび発現に基づいた単一リンパ球抗体方法を用いて生成させ得る。

【００３３】

本発明において使用するための抗体は、公知技術である種々のディスプレー方法、およびＢｒｉｎｋｍａｎら、（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ、１９９５、１８２：４１－５０）、Ａｍｅｓら、（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ、１９９５、１８４：１７７－１８６）、Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈら、（Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９４、２４：９５２－９５８）、Ｐｅｒｓｉｃら、（Ｇｅｎｅ、１９９７、１８７：９－１８）、Ｂｕｒｔｏｎら、Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ ｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、１９９４、５７：１９１－２８０）およびＷＯ ９０／０２８０９；ＷＯ ９１／１０７３７；ＷＯ ９２／０１０４７；ＷＯ ９２／１８６１９；ＷＯ ９３／１１２３６；ＷＯ ９５／１５９８２；ＷＯ ９５／２０４０１；および米国特許５，６９８，４２６；５，２２３，４０９；５，４０３，４８４；５，５８０，７１７；５，４２７，９０８；５，７５０，７５３；５，８２１，０４７；５，５７１，６９８；５，４２７，９０８；５，５１６，６３７；５，７８０，２２５；５，６５８，７２７；５，７３３，７４３；および５，９６９，１０８によって開示されている方法を用いて生成させることもできる。米国特許４，９４６，７７８に記載されているような単一鎖抗体の製造技術が、ＰＴＫ７ポリペプチドに対する単一鎖抗体を製造するために適応できる。また、トランスジェニックマウス、または他の哺乳類を含むその他の生物が、ヒト化抗体を発現するために使用され得る。

【００３４】

ＰＴＫ７ポリペプチドを、本発明による治療および／または予防において使用するための薬剤の同定に使用できる。

【００３５】

本発明のさらなる態様は、

（ａ）ＰＴＫ７ポリペプチドを候補薬剤と接触させ、そして

（ｂ）候補薬剤が該ポリペプチドと相互作用するか否かを決定することを含むＰＴＫ７ポリペプチドと相互作用する抗癌剤をスクリーニングする方法を提供する。

【００３６】

好ましくは、候補薬剤とＰＴＫ７ポリペプチドの間の相互作用の決定は、候補薬剤と該ポリペプチドの結合を定量的に検出することを含む。

【００３７】

さらに提供されるのは、

（ｉ）候補薬剤の存在下でのＰＴＫ７ポリペプチドの発現または活性と候補薬剤の不存在下または対照薬剤の存在下でのＰＴＫ７ポリペプチドの発現または活性を比較し、そして

（ｉｉ）候補薬剤が該ポリペプチドの発現または活性を変化させる原因となるかどうかを決定する、

ことを含むＰＴＫ７ポリペプチドの発現または活性候補を調節する抗癌剤をスクリーニングする方法である。

【００３８】

好ましくは、ＰＴＫ７ポリペプチドの発現および／または活性は、あらかじめ決められた参照範囲または対照と比較される。

【００３９】

より好ましくは、本方法は、ＰＴＫ７ポリペプチドと相互作用する、あるいはＰＴＫ７ポリペプチドの相互作用、発現または活性を調節できる、薬剤を、癌の治療および／または予防における使用をさらに試験するために選択することをさらに含む。上記のスクリーニング方法はまた、ＰＴＫ７核酸分子と相互作用するかまたはＰＴＫ７核酸分子の発現または活性を調節する抗癌剤をスクリーニングするのに適当であることは、当業者に明らかであろう。

【００４０】

本発明は、また、癌の治療および／または予防用の薬剤の効能を同定または実証するための医薬の発見において使用するためのアッセイを提供する。これらの方法を使用して同定された薬剤は、医薬発見のためのリード薬剤として使用され、または治療的に使用されることができる。ＰＴＫ７ポリペプチドの発現は、例えば、イムノアッセイ、ゲル電気泳動、これに続く可視化、ｍＲＮＡまたはＰＴＫ７ポリペプチドの活性の検出、またはここに教示された、あるいは当業者に知られたその他の方法によってアッセイできる。そのようなアッセイは、候補薬剤のスクリーニング、クリニカルモニタリングにおいて、または医薬品開発において使用できる。

【００４１】

薬剤は広範な種々の候補薬剤から選択できる。候補薬剤の例としては、限定されないが、核酸（例えば、ＤＮＡおよびＲＮＡ）、炭水化物、脂質、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ペプチド様物質、小分子その他の薬品を包含する。薬剤は、公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数の方法のいずれを使用しても得ることができ、それらには、生物学的ライブラリー、空間的にアドレスで呼び出せるパラレル固相または液相ライブラリー、デコンヴォリューション（ｄｅｃｏｎｖｏｌｕｔｉｏｎ）が必要な合成ライブラリー法、「１ビーズ１化合物」ライブラリー法、およびアフィニティクロマトグラフィ選択を用いる合成ライブラリー法を包含する。生物学的ライブラリー方法は、ペプチドライブラリーに適しているが、他の４つの方法は、ペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の小分子ライブラリーに応用可能である（Ｌａｍ、１９９７、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ．１２：１４５；Ｕ．Ｓ．５，７３８，９９６；およびＵ．Ｓ．５，８０７，６８３）。

【００４２】

分子ライブラリーの合成のための本発明の記載に基づく適当な方法の例は、公知方法において見出すことができる、例えば、ＤｅＷｉｔｔら、１９９３、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：６９０９；Ｅｒｂら、１９９４、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：１１４２２；Ｚｕｃｋｅｒｍａｎｎら、１９９４，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７：２６７８；Ｃｈｏら、１９９３、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６１：１３０３；Ｃａｒｒｅｌｌら、１９９４、Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３３：２０５９；Ｃａｒｅｌｌら、１９９４、Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３３：２０６１；およびＧａｌｌｏｐら、１９９４、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７：１２３３。

【００４３】

化合物のライブラリーは、例えば、溶液（例えば、Ｈｏｕｇｈｔｅｎ、１９９２、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １３：４１２－４２１）、ビーズ（Ｌａｍ、１９９１、Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８２－８４）、チップ（Ｆｏｄｏｒ、１９９３、Ｎａｔｕｒｅ ３６４：５５５－５５６）、細菌（米国特許５，２２３，４０９）、胞子（米国特許５，５７１，６９８；５，４０３，４８４および５，２２３，４０９）、プラスミド（Ｃｕｌｌら

、１９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：１８６５－１８６９）またはファージ（ＳｃｏｔｔおよびＳｍｉｔｈ、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６－３９０；Ｄｅｖｌｉｎ、１９９０、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：４０４－４０６；Ｃｗｉｒｌａら、１９９０、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：６３７８－６３８２；およびＦｅｌｉｃｉ、１９９１、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：３０１－３１０）で提示され得る。

【００４４】

一実施態様において、ＰＴＫ７ポリペプチドとの相互作用（例えば結合）する薬剤は、ＰＴＫ７ポリペプチドを発現する細胞の集団が候補薬剤と接触し、ポリペプチドと相互作用する候補薬剤の能力が決定されるという、細胞に基づくアッセイによって同定される。好ましくは、ＰＴＫ７ポリペプチドと相互作用する候補薬剤の能力は、参照範囲または対照と比較される。別の実施態様において、ＰＴＫ７ポリペプチドを発現する第一および第二細胞集団が、候補薬剤または対照薬剤と接触され、そしてポリペプチドと相互作用する候補薬剤の能力が、候補薬剤と対照薬剤の間の相互作用の差異を比較することによって決定される。もし所望ならば、この型のアッセイが、ＰＴＫ７ポリペプチドを発現する複数の細胞集団を用いて複数（例えば、ライブラリー）の候補薬剤をスクリーニングするために使用できるであろう。所望ならば、このアッセイは、複数（例えば、ライブラリー）の候補薬剤をスクリーニングするために使用できるであろう。細胞は、例えば、原核細胞由来（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）または真核細胞由来（例えば、酵母または哺乳類）のものであり得る。さらに、細胞を、内在性にＰＴＫ７ポリペプチドを発現でき、あるいはポリペプチドを発現するよう遺伝子工学処理できる。ある種の実施態様において、ＰＴＫ７ポリペプチドまたは候補薬剤は、例えば放射能標識（例えば、^{32}Ｐ、^{35}Ｓまたは^{125}Ｉ）または蛍光標識（例えば、イソチアン酸フルオレセイン、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、ｏ－フタルアルデヒドまたはフルオレスカミン）によって、ポリペプチドと候補薬剤の間の相互作用の検出を可能にするよう標識化される。

【００４５】

別の実施態様において、ＰＴＫ７ポリペプチドと相互作用する（例えば結合する）薬剤は、ＰＴＫ７ポリペプチドを発現する試料が候補薬剤と接触し、ポリペプチドと相互作用する候補薬剤の能力が決定されるという、無細胞アッセイ系において同定される。好ましくは、ＰＴＫ７ポリペプチドと相互作用する候補薬剤の能力は、参照範囲または対照と比較される。好ましい実施態様において、天然のまたは組換えＰＴＫ７ポリペプチドを含む第一および第二の試料が、候補薬剤または対照薬剤と接触し、そしてポリペプチドと相互作用する候補薬剤の能力が、候補薬剤と対照薬剤の間の相互作用の差異を比較することによって決定される。もし所望ならば、このアッセイは、複数のＰＴＫ７ポリペプチド試料を用いて複数（例えば、ライブラリー）の候補薬剤をスクリーニングするために使用されるであろう。好ましくは、ポリペプチドは、例えば、ポリペプチドとそれを特異的に認識し結合する固定化抗体を接触させることによって、あるいは、ポリペプチドの精製した調製物とタンパク質に結合するように設計された表面を接触させることによって、最初固定化される。ポリペプチドは、部分的または完全に精製され（例えば、他のペプチドと部分的または完全に遊離している）または細胞溶解物の一部であってもよい。さらに、ポリペプチドは、ＰＴＫ７ポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分、およびグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼのようなドメインを含む融合タンパク質であり得る。換言すれば、ポリペプチドは、当業者に周知の技術を用いてビオチン化できる（例えば、ビオチン化キット、Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ；Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）。ポリペプチドと相互関係する候補薬剤の能力は、当業者に知られた方法によって複製できる。

【００４６】

一実施態様において、ＰＴＫ７ポリペプチドは、ＰＴＫ７ポリペプチドと結合する、または、相互関係する別の部分を同定する二ハイブリッドアッセイまたは三ハイブリッドアッセイにおける「おとりタンパク質」として使用される（例えば、米国特許５，２８３，

３１７；Ｚｅｒｖｏｓら、１９９３、Ｃｅｌｌ ７２：２２３－２３２；Ｍａｄｕｒａら、１９９３、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：１２０４６－１２０５４；Ｂａｒｔｅｌら、１９９３、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １４：９２０－９２４；Ｉｗａｂｕｃｈｉら、１９９３、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ ８：１６９３－１６９６；ＷＯ ９４／１０３００）。当業者が理解できるであろうように、そのような結合タンパク質は、また、ＰＴＫ７ポリペプチドによるシグナルの増殖にも関係しているようである。例えば、そのような結合タンパク質は、ＰＴＫ７ポリペプチドに関係するシグナル伝達経路の上流または下流要素であり得る。代わりに、ＰＴＫ７ポリペプチドと相互関係するポリペプチドは、ＰＴＫ７ポリペプチド（該ポリペプチドは一つないしそれ以上の他のポリペプチドと直接的または間接的に相互作用し得る）を含むタンパク質複合体を単離し、質量分析またはウエスタンブロッティングのような公知の方法を用いて関連タンパク質を同定することによって同定できる（例えば、Ｂｌａｃｋｓｔｏｃｋ、Ｗ．＆ Ｗｅｉｒ、Ｍ．１９９９、Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１７：１２１－１２７；Ｒｉｇａｕｔ、Ｇ．、１９９９、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１７：１０３０－１０３２；Ｈｕｓｉ、Ｈ．２０００、Ｎａｔｕｒｅ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．３：６６１－６６９；Ｈｏ、Ｙ．ら、２００２、Ｎａｔｕｒｅ、４１５：１８０－１８３；Ｇａｖｉｎ、Ａ．ら、２００２、Ｎａｔｕｒｅ、４１５：１４１－１４７）。

【００４７】

全ての場合において、ＰＴＫ７ポリペプチドと直接的または間接的に相互作用する候補薬剤の能力は、当業者に知られた方法によって決定できる。例えば、しかし限定なしに、候補薬剤とＰＴＫ７ポリペプチドの間の相互関係を、フローサイトメトリー、シンチレーションアッセイ、活性アッセイ、質量分析、顕微鏡、免疫沈降法、またはウエスタンブロット分析によって決定できる。

【００４８】

別のさらなる実施態様においては、ＰＴＫ７ポリペプチドと競合的に相互作用する（すなわち、競合的に結合する）薬剤は、競合結合アッセイにおいて同定され、そしてＰＴＫ７ポリペプチドと相互作用する候補薬剤の能力が決定される。好ましくは、ＰＴＫ７ポリペプチドと相互作用する候補薬剤の能力は、参照範囲または対照と比べられる。好ましい実施態様においては、ＰＴＫ７ポリペプチドおよびＰＴＫ７ポリペプチドと相互作用することが知られているタンパク質の両方を発現する細胞の第一および第二集団を、候補薬剤または対照薬剤と接触させる。次いで、ＰＴＫ７ポリペプチドと競合的に相互作用する候補薬剤の能力が、細胞の第一および第二集団における相互作用を比較することによって決定される。別の実施態様においては、細胞の代わりの第二集団またはさらなる集団を、ＰＴＫ７ポリペプチドと相互作用することが知られている薬剤と接触させる。代わりに、ＰＴＫ７ポリペプチドと競合的に相互作用する薬剤は、ＰＴＫ７ポリペプチドおよびＰＴＫ７ポリペプチドと競合的に相互作用することが知られているタンパク質を含む第一および第二の試料を候補薬剤または対照薬剤と接触させることによる無細胞アッセイ系において同定される。ＰＴＫ７ポリペプチドと競合的に相互作用する候補薬剤の能力は、第一および第二の試料における相互作用を比較することによって決定される。別の実施態様においては、代わりの第二試料またはＰＴＫ７ポリペプチドを含むさらなる試料を、ＰＴＫ７ポリペプチドと競合的に相互作用することが知られている薬剤と接触させる。何れの場合においても、ＰＴＫ７ポリペプチドおよび公知の相互作用するタンパク質は、自然に発現され、あるいは組換え的に発現されるであろうしそして、候補薬剤は外部から加えられ、または自然または組換え的に発現されるであろう。

【００４９】

別の実施態様においては、ＰＴＫ７ポリペプチドとその他の薬剤の間の相互関係を修飾する薬剤、例えば、しかし限定なしに、タンパク質は、公知の相互作用薬剤の存在下でＰＴＫ７ポリペプチドを発現する細胞と候補修飾薬剤を接触させ、そして相互関係を修飾する候補薬剤を選択することによる細胞に基づいたアッセイにおいて同定され得る。代わりに、ＰＴＫ７ポリペプチドと別の薬剤、例えば、しかし限定なしに、タンパク質の間の相

互作用を修飾する薬剤は、ポリペプチドと、候補薬剤の存在下でポリペプチドと相互作用することが知られている薬剤を接触させることによる無細胞系で同定され得る。修飾薬剤は、抗体、コファクター、阻害剤、活性化剤として作用し、あるいは、ＰＴＫ７ポリペプチドと公知の薬剤の間の相互作用に拮抗的または作動的効果を有できる。上述したように、ＰＴＫ７ポリペプチドと相互作用する公知の薬剤の能力は、公知の方法によって決定できる。これらのアッセイは、細胞に基づいていようが無細胞であろうが、複数の（例えば、ライブラリー）候補薬剤をスクリーニングするために使用できる。

【００５０】

別の実施態様においては、細胞に基づくアッセイ系が、ＰＴＫ７ポリペプチドの活性を修飾する（すなわち、促進または阻害）ことができる薬剤を同定するために使用される。従って、ＰＴＫ７ポリペプチドの活性は、候補薬剤の存在下で、ＰＴＫ７ポリペプチドを自然的または組換え的に発現する細胞の集団において測定される。好ましくは、ＰＴＫ７ポリペプチドの活性は、参照範囲または対照と比較される。好ましい実施態様において、ＰＴＫ７ポリペプチドの活性が、薬剤の存在下または候補薬剤の不存在下（例えば、対照薬剤の存在下）において、ＰＴＫ７ポリペプチドを自然的または組換え的に発現する細胞の第一および第二集団において測定され、そしてＰＴＫ７ポリペプチドの活性が比較される。候補薬剤は、この比較に基づいてＰＴＫ７ポリペプチドの活性の調節剤として同定できる。代わりに、ＰＴＫ７ポリペプチドの活性を、ＰＴＫ７ポリペプチドが天然または組換え体のいずれかである無細胞アッセイ系において測定できる。好ましくは、ＰＴＫ７ポリペプチドの活性は、参照範囲または対照と比較される。好ましい実施態様においては、ＰＴＫ７ポリペプチドの活性が、候補薬剤の存在または不存在下で第一および第二の試料において測定され、そしてＰＴＫ７ポリペプチドの活性が比較される。次いで、候補薬剤を、この比較に基づいてＰＴＫ７ポリペプチドの活性の調節剤として同定できる。

【００５１】

ＰＴＫ７ポリペプチドの活性は、当業者によって知られているように適当な下流のエフェクター、例えば、しかし限定なしに、第二メッセンジャー（例えば、ｃＡＭＰ、細胞内Ca^{2+}、ジアシルグリセロール、IP_3、等）のレベルまたは活性に対する効果を検出し、触媒的または酵素的活性を検出し、レポーター遺伝子（例えばルシフェラーゼ）の誘導を検出し、または、細胞反応、例えば、増殖、分化または形質転換を検出することによって評価できる（活性測定技術については、例えばＵＳ５，４０１，６３９を参照）。候補薬剤は、対照薬剤に対する候補薬剤の効果を比較することによってＰＴＫ７ポリペプチドの活性の調節剤として同定できる。適当な対照薬剤は、ＰＢＳまたは標準生理食塩水を包含する。

【００５２】

別の実施態様においては、ＰＴＫ７ポリペプチドの産生または分解に関与する、あるいはＰＴＫ７ポリペプチドの翻訳後修飾に関与する酵素またはその生物学的活性部分のような薬剤を同定できる。一次スクリーニングにおいては、本質的に純粋な、天然のまたは組換え的に発現されたＰＴＫ７ポリペプチド、核酸または細胞抽出物、または、天然または組換え的に発現されたＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸を含む別の試料を、そのような薬剤を同定するために、ＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸のプロセッシングに関与するであろう複数の候補薬剤（例えば、しかし限定なしに、ライブラリーとして提示される複数の薬剤）と接触させる。ＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸の産生、分解または翻訳後修飾を調節する候補薬剤の能力は、限定されることなく、フローサイトメトリー、放射性標識、キナーゼアッセイ、ホスファターゼアッセイ、免疫沈降およびウエスタンブロット法、またはノーザンブロット法を包含する当業者に公知の方法によって決定できる。

【００５３】

さらに別の実施態様においては、ＰＴＫ７ポリペプチドを発現する細胞を、複数の候補薬剤と接触させる。ＰＴＫ７ポリペプチドの産生、分解または翻訳後修飾を調節するそのような薬剤の能力を、上に記載したように、当業者に公知の方法によって決定できる。

【００５４】

一実施態様においては、ＰＴＫ７ポリペプチドの発現を調節する（例えば、ダウンレギュレーション）薬剤が、細胞を基本としたアッセイ系において同定される。従って、ＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸を発現する細胞の集団を、候補薬剤と接触させ、ＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸の発現を変える候補薬剤の能力が、参照範囲または対照との比較によって決定される。別の実施態様において、ＰＴＫ７ポリペプチドを発現する細胞の第一または第二の集団が、候補薬剤または対照薬剤と接触させ、ＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸の発現を変える候補薬剤の能力が、細胞の第一または第二の集団の間のＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸の発現のレベルの相異を比較することによって決定される。更なる実施態様においては、第一の集団におけるＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸の発現が、参照範囲または対照と更に比較される。必要により、このアッセイは、複数の候補薬剤（例えば、ライブラリー）をスクリーニングするために使用できるであろう。細胞は、例えば、原核細胞由来（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）または真核細胞由来（例えば、酵母または哺乳類）のものであり得る。さらに、細胞を、内在性にＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸を発現することができ、あるいはポリペプチドまたは核酸を発現するよう遺伝子工学処理できる。ＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸の発現を変える候補薬剤の能力を、当業者に公知の方法、例えば、限定されることなく、フローサイトメトリー、放射性標識、シンチレーションアッセイ、免疫沈降およびウエスタンブロット法、またはノーザンブロット法によって決定できる。

【００５５】

別の実施態様においては、ＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸の発現を調節する薬剤が、動物モデルにおいて同定される。適当な動物の例としては、限定なしに、マウス、ラット、ウサギ、サル、モルモット、イヌおよびネコが挙げられる。好ましくは、使用される動物は癌のモデルを表す。従って、哺乳類の第一または第二の群に、候補薬剤または対照薬剤が投与され、ＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸の発現を調節する候補薬剤の能力が、哺乳類の第一または第二の群の間の発現のレベルの相異を比較することによって決定される。所望ならば、哺乳類の第一または第二の群におけるＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸の発現レベルが、哺乳類の対照群におけるＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸のレベルと比較できる。候補薬剤または対照薬剤を、公知の手段によって投与できる（例えば、経口、経直腸、または腹腔内または静脈内のような非経口的）。ポリペプチドまたは核酸の発現の変化を、上記に概説したことによって評価できる。特別な実施態様においては、薬剤の治療有効量を、疾病症状の改良または改善、疾病の発症の遅延または遅くなった進行、例えば、しかし限定なしに、腫瘍サイズの減少をモニターすることによって決定できる。癌を熟知している医師に公知の技術を、候補薬剤が疾病に関連した一つないしそれ以上の症状を変えたかどうかを決定するために使用できる。

【００５６】

また、当業者は、ＰＴＫ７ポリペプチドが、該ポリペプチドの活性を調節する（例えば、促進するまたは阻害する）ように作用する薬剤、特に小分子の構造に基づいた設計の方法において、

１）該ポリペプチドの三次元構造を決定し、

２）薬剤の反応部位または結合部位のようなポリペプチド内の三次元構造を推論し、

３）推論された反応部位または結合部位と反応または結合すると予測される候補薬剤を合成し、そして

４）候補薬剤が該ポリペプチドの活性を調節できるかどうかを試験することを含む、

方法において使用できることも理解するであろう。

【００５７】

上記の方法は反復プロセスのようであることが理解されよう。

【００５８】

ここにおいて考察されたように、ＰＴＫ７ポリペプチドと相互作用する薬剤は、癌の治療および／または予防において使用され得る。そのような使用のために、薬剤が一般的に医薬品組成物の形で投与される。医薬品組成物は、また、ワクチンとしての使用も見られ

、ワクチン使用として許容される付加成分を含むことができ、当業者に知られた、一つないしそれ以上の適当な添加剤をさらに含むこともできる。

【００５９】

それゆえ、本発明によると、ＰＴＫ７ポリペプチドと相互作用する薬剤および医薬として許容される賦形剤、添加剤および／または担体を含む医薬組成物が提供される。

【００６０】

以下において、本発明において使用される薬剤、治療および／または予防において使用されるＰＴＫ７ポリペプチドおよびＰＴＫ７核酸は、「活性薬剤」と呼ばれる。用語「治療」は、治療的または予防的療法のいずれかを包含する。特に活性な薬剤または薬剤の組合せを用いて疾病または状態を治療するまたは予防する方法についてここで言及するとき、そのような言及は、疾病または状態を治療および／または予防のための医薬品製剤中のその活性薬剤または薬剤の組合せの使用を包含することを意図していると理解すべきである。

【００６１】

組成物は通常、医薬として許容される担体を普通包含しているであろう滅菌した医薬組成物の一部として供給される。この組成物は、どのような適当な形（患者にそれを投与する所望の方法に基づく）であってもよい。

【００６２】

本発明の活性薬剤は、薬の投与に通常使われるいかなる経路によっても、被験者に投与できる、例えば、それらは非経口、経口、局所（口腔剤、舌下または経皮を含む）または吸入によって投与され得る。いずれの与えられた場合においても、最も適した投与径路は、特定の活性薬剤、関与する癌、被験者、および疾病の性質および重症度および被験者の身体状態に依存する。

【００６３】

活性薬剤は、一つないしそれ以上の他の治療的に活性な、例えば抗腫瘍性の化合物との組合せで、例えば同時に、逐次、または分離して投与され得る。

【００６４】

医薬組成物は通常、一回投与当たりの本発明活性薬剤のあらかじめ決められた量を含有する単位投与形態で提供される。そのような単位は、例えば限定なしに、治療される条件、投与径路および被験者の年齢、体重および状態に依存して７５０ｍｇ／ｋｇから０．１ｍｇ／ｋｇを含有する。

【００６５】

本発明において使用する医薬として許容される担体は、例えば、投与径路に基づいて広範な種々の形態をとり得る。

【００６６】

経口投与用の組成は、液体または固体である。経口液剤は、例えば、水性または油性懸濁液、溶液、エマルジョン、シロップまたはエリキシル剤であり得、または、使用前に水または他の適当なベヒクルで再構成するドライプロダクトとして提供される。経口液剤は、公知の懸濁剤を含有してもよい。

【００６７】

粉末、カプセルおよび錠剤のような固形製剤の場合には、デンプン、砂糖、微結晶セルロース、賦形剤、顆粒化剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、その他のような担体を包含し得る。投与が容易であるので、錠剤およびカプセルが最も都合のよい経口投与単位形態を表しており、その場合固形医薬担体が一般的に採用される。上記に示した通常の投与形態に加えて、本発明の活性薬剤は、また、制御放出手段および／または送達装置によって投与もできる。錠剤およびカプセルは、結合剤、例えばシロップ、アラビアゴム、ゼラチン、ソルビトール、トラガカントまたはポリビニルピロリドン、賦形剤、例えば乳糖、砂糖、トウモロコシデンプン、リン酸カルシウム、ソルビトールまたはグリシン、錠剤滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコールまたはシリカ、崩壊剤、例えばバレイショデンプン、またはラウリル硫酸ナトリウムのような許容されるぬれ剤

を含み得る。錠剤は、通常の医薬品実務において公知の方法に従って、標準の水性または非水性の技術により被覆される。

【００６８】

経口投与に適した本発明の医薬組成物は、粉末または顆粒として、あるいは水性液体、非水性液体、水中油型乳剤または油中水型乳剤の溶液または懸濁液として、それぞれ活性薬剤のあらかじめ決められた量を含有するカプセル、カシェ剤または錠剤のような別々の単位として提示できる。そのような組成物は、薬剤学のいずれの方法によっても調製できるが、全ての方法は、活性薬剤を、一つないしそれ以上の必要な成分を構成する担体と会合させるステップを包含している。組成物は一般的に、活性薬剤を液体の担体または細かく分けた固体の担体もしくは両方と均一かつ密接に混合し、そして必要ならば、製品を所望の体裁に成形することによって調製される。例えば、錠剤は、所望ならば一つないしそれ以上の付随の成分とともに圧縮または成形によって調製し得る。

【００６９】

非経口投与に適した医薬組成物は、ヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤と適当に混合した本発明の活性薬剤の水溶液または水懸濁液として調製できる。分散製剤は、油中グリセリン、液状ポリエチレングリコールおよびそれらの混合物で調製できる。貯蔵と使用の通常の条件下で、それらの製剤は、微生物の増殖を防止するために保存料を含有する。

【００７０】

注射使用に適した医薬品の形態は、抗酸化剤、バッファ、静菌剤および所定の受容者の血液と組成物を等張にする溶質を含有する水性または非水性の滅菌注射液、および懸濁剤および粘稠化剤を包含する水性および非水性の滅菌懸濁液を包含する。即席注射溶液、分散液および懸濁液は、滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製される。

【００７１】

医薬組成物は、公知の医療装置で投与できる。例えば、好ましい実施態様において、本発明の医薬組成物は、米国特許５，３９９，１６３；５，３８３，８５１；５，３１２，３３５；５，０６４，４１３；４，９４１，８８０；４，７９０，８２４または４，５９６，５５６に開示された装置のような無針皮下注射装置で投与できる。本発明において有用な公知のインプラントおよびモジュールの例としては、制御された速度で薬物を投与するための埋込み型の微小注入ポンプを開示している米国特許４，４８７，６０３、皮膚を通して医薬を投与するための治療装置を開示する米国特許４，４８６，１９４、精密な注入速度で医薬を送達するための医薬注入ポンプを開示する米国特許４，４４７，２３３、連続医薬送達用の可変流量埋込み型注入装置を開示する米国特許４，４４７，２２４、マルチチェンバーコンパートメントを有する浸透性医薬送達システムを開示する米国特許４，４３９，１９６、および浸透性医薬送達システムを開示する米国特許４，４７５，１９６を包含する。多くのそのような埋込み型、送達システム、およびモジュールは、当業者に知られている。

【００７２】

ある種の実施態様において、本発明の医薬組成物は、イン・ビボでの適切な分布を確実にするために処方できる。例えば、血液脳関門は多くの親水性化合物を排除し、リポソーム中の医薬組成物を送達するために適している。それゆえ、本発明の医薬組成物の一実施態様において、本発明の活性薬剤はリポソーム中に処方され、より好ましい実施態様において、リポソームは標的部分を包含している。最も好ましい実施態様において、リポソーム中の治療化合物は、腫瘍に近接した部位にボーラス注射によって送達される。リポソームを製造する方法については、例えば、米国特許４，５２２，８１１、５，３７４，５４８および５，３９９，３３１を参照すること。リポソームは、特定の細胞または器官に選択的に送達される一つないしそれ以上の部分を含み得、それゆえ標的医薬送達を増強する（例えば、Ｒａｎａｄｅ、ＶＶ．１９８９、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２９：６８５）。例示の標的部分は、葉酸またはビオチン（例えばＵＳ　５，４１６，０１６）、マンノシド（Ｕｍｅｚａｗａら、１９８８、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ

．Ｃｏｍｍｕｎ．１５３：１０３８）、抗体（Ｂｌｏｅｍａｎ、ＰＧら、１９９５、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．３５７：１４０；Ｍ．Ｏｗａｉｓら、１９９５、Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．３９：１８０）、サーファクタントタンパク質Ａ受容体（Ｂｒｉｓｃｏｅら、Ａｍ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．１２３３：１３４）を包含し、その別の種は、本発明の処方および本発明の分子の成分を含む（Ｓｃｈｒｅｉｅｒら、１９９４、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：９０９０）やＫｅｉｎａｎｅｎ、Ｋ．＆ Ｌａｕｋｋａｎｅｎ、ＭＬ．１９９４、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．３４６：１２３；Ｋｉｌｌｉｏｎ、ＪＪ．＆ Ｆｉｄｌｅｒ、ＩＪ．１９９４、Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ ４：２７３も参照のこと。組成物は、単位投与または多回投与容器、例えば密封アンプルおよびバイアルそして安定性を増すために提供され、使用直前に滅菌液体担体、例えば注射用水の添加のみを必要とする凍結乾燥条件において貯蔵し得る。滅菌液体担体は、分離されたバイアルまたはアンプルで供給され、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセリン、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコール）、適当なそれらの混合物、および食用油を含有する溶媒または分散媒体であり得る。有利な点として、局所麻酔剤、保存料および緩衝剤のような薬剤が滅菌液体担体に包含され得る。

【００７３】

局所投与に適応した医薬組成物は、軟膏、クリーム、懸濁液、ローション、粉末、溶液、ペースト、ゲル、含浸した包帯、スプレー、アエロゾルまたはオイル、経皮装置、散布剤、その他として処方され得る。これらの組成物は、活性薬剤を含有する通常の方法を経て調製できる。それゆえ、それらは、保存料、医薬の浸透性を補助する溶媒、クリームおよび軟膏中の皮膚軟化薬およびローション用のエタノールまたはオレイルアルコールのような、互換性のある通常の担体および添加剤も含み得る。そのような担体は、組成物の約１％から約９８％までとして存在している。より通常には、それらは、組成物の約８０％まで形成し得る。例示としてのみであるが、クリームまたは軟膏が、所望の硬度を有するクリームまたは軟膏を製造するために充分な量で、化合物約５－１０重量％を含有して、充分な量の親水性材料および水と混合することによって調製される。

【００７４】

経皮投与に適合した医薬組成物は、より長い時間に受容者の表皮に密接に接触して残ることを意図した別々のパッチとして提示される。例えば、活性薬剤は、イオン導入法によってパッチから送達され得る。

【００７５】

外部組織、例えば口および皮膚に適用するために、組成物は、好ましくは局所軟膏またはクリームとして適用される。軟膏に処方されるとき、活性薬剤は、パラフィン性または水混和性の軟膏基剤のいずれかが採用される。代わりに、活性薬剤は、水中油型クリーム基剤または油中水型基剤と共にクリームに処方される。

【００７６】

口中での局所投与に適した医薬組成物は、トローチ剤、パステル剤および口内洗浄剤を包含して口中に局所投与するように適応される。

【００７７】

眼に対して局所投与するのに適した医薬組成物は、活性薬剤が適当な担体、特に水性溶媒に溶解または懸濁する点眼剤を包含する。それらは、また、上記の局所軟膏またはクリームを包含する。

【００７８】

担体が個体である直腸投与に適した医薬組成物は、最も好ましくは、単位投与坐剤として供される。適当な担体は、カカオバターまたはその他のグリセリドまたは技術的に普通に使用される材料を包含し、坐剤は、軟化した、または、溶融した担体の組合せの混合物により、次いで型を冷却し形作ることによって、都合よく形成できる。それらは、また、浣腸剤として投与される。

【００７９】

膣投与に適した医薬組成物は、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、発

泡剤またはスプレー組成物として供される。それらは、技術的に普通に使用される皮膚軟化薬または基剤として投与される。

【００８０】

活性薬剤の投与されるべき投薬量は、特定の活性薬剤、関与する癌、被験者、および疾病の性質および重症度および被験者の身体状態、および選択された投与径路に従って変化し、適当な投薬量は、当業者によって容易に決定できる。ヒトおよび動物における癌の治療および／または予防のために、抗体を含む医薬組成物を、抗体に基づいた臨床製品についての注射および技術的に公知の他の投与径路のような、いずれかの適切な投与径路を用いて治療的または予防的有効投薬量（例えば、腫瘍増殖阻害および／または腫瘍細胞遊走阻止をもたらす投薬量）で、患者（例えば、ヒト被験者）に投与できる。

【００８１】

組成物は、投与方法に依存して、０．１重量％から、好ましくは１０－６０重量％またはそれ以上からの本発明の活性薬剤を含有する。

【００８２】

本発明活性薬剤の個々の投薬至適量および間隔は、治療される状態の性質および程度、投与形態、径路および部位、および治療される特定の被験者の年齢および状態によって決定されるであろうし、医師は、使用されるべき適当な投薬量を究極的には決定するであろうことは、当業者によって認識されるであろう。この投薬は、適当なかぎり繰り返される。もし副作用が発生したら、投薬量および／または頻度を、通常の診療業務に従って変更または減らすことができる。

【００８３】

ＰＴＫ７ポリペプチドは、癌の治療および／または予防、例えばワクチンとして投与されたとき、有益であろう。それらが本発明の方法で使用するために提供されると、それらは、好ましくは、単離された形で提供される。より好ましくは、ＰＴＫ７ポリペプチドは、少なくとも、ある程度まで精製されている。ＰＴＫ７ポリペプチドは、また、組換え方法を用いて製造され、合成的に製造され、あるいはこれら方法の組合せによって製造できる。ＰＴＫ７ポリペプチドは、本質的に純粋な形において、すなわち他のタンパク質から実質的な程度まで遊離した形で提供される。

【００８４】

組換えＰＴＫ７ポリペプチドは、公知技術のプロセスによって、発現系を含む遺伝子工学的に処理された宿主細胞から調製できる。従って、本発明はまた、ＰＴＫ７ポリペプチドまたはＰＴＫ７核酸を含む発現系、そのような発現系で遺伝子工学的に処理された宿主細胞、および組換え技術によるＰＴＫ７ポリペプチドの製造に関する。無細胞翻訳系も、また、組換えポリペプチドを製造するために採用できる（例えば、ウサギ網状赤血球溶解物、コムギ麦芽溶解物、ＳＰ６／Ｔ７イン・ビトロＴ＆ＴおよびＲＴＳ１００ Ｅ．ｃｏｌｉ ＨＹ転写および翻訳キット、Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ社、Ｌｅｗｅｓ、英国およびＴＮＴ Ｑｕｉｃｋ ｃｏｕｐｌｅｄ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ／Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ、Ｐｒｏｍｅｇａ ＵＫ社、Ｓｏｕｔｈａｍｐｔｏｎ、英国）。

【００８５】

組換えＰＴＫ７ポリペプチド製造のために、宿主細胞はＰＴＫ７核酸用の発現系またはその部分を取り込むために遺伝子工学的に処理できる。そのような取込みは、リン酸カルシウムトランスフェクション、ＤＥＡＤ－デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション（ｔｒａｎｓｖｅｃｔｉｏｎ）、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション法、形質導入、スクレープローディング（ｓｃｒａｐｅ ｌｏａｄｉｎｇ）、弾丸導入（ｂａｌｌｉｓｔｉｃ ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ）または感染のような公知の方法を用いて実施できる（例えば、Ｄａｖｉｓら、Ｂａｓｉｃ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、１９８６およびＳａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、第二版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｕｒ Ｌａ

ｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｕｒ、ＮＹ、１９８９）。

【００８６】

宿主細胞の代表例としては、細菌細胞、例えばＥ．ｃｏｌｉ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｉ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｉ、ＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓおよびＢａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ細胞、真菌細胞、例えば酵母細胞およびＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ細胞、昆虫細胞、例えばＤｒｏｓｏｐｈｉｌａ Ｓ２およびＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ Ｓｆ９細胞、動物細胞、例えばＣＨＯ、ＣＯＳ、ＨｅＬａ、Ｃ１２７、３Ｔ３、ＨＥＫ２９３、ＢＨＫおよびＢｏｗｅｓメラノーマ細胞、および植物細胞が挙げられる。

【００８７】

広範な発現系を使用できる、例えば、限定なしに、染色体系、エピソーム系およびウイルス誘導系、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入配列由来、酵母染色体エレメント由来、バキュロウイルスのようなウイルス由来、ＳＶ４０、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、家禽ポックスウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスのようなパポーバウイルス由来、およびプラスミドおよびバクテリオファージ遺伝子エレメント（例えば、コスミドおよびファージミド）由来のようなベクターの組合せ由来のベクターが使用できる。発現系は、発現を制御および発生させる調節領域を含有し得る。一般的に、宿主中でポリペプチドを産生する核酸を保持し、増殖し、または発現できる系またはベクターを使用できる。適当な核酸配列は、上記のＳａｍｂｒｏｏｋらの著書に挙げられたような種々の公知で通常の技術によって発現系に挿入できる。適当な分泌シグナルが、翻訳タンパク質の小胞体の内腔、周辺腔または細胞外環境への分泌を可能とするためＰＴＫ７ポリペプチドに取込まれる。

【００８８】

もし、ＰＴＫ７ポリペプチドが、細胞に基づくスクリーニングアッセイにおいて使用するために発現するのなら、ポリペプチドは細胞表面に産生することが好ましい。この場合、細胞は、スクリーニングアッセイにおける使用の前に収穫するのがよい。もしＰＴＫ７ポリペプチドが培地中に分泌されるなら、培地は、該ポリペプチドを単離するために回収できる。もし細胞内に生産されるなら、細胞は、ＰＴＫ７ポリペプチドを回収する前に先ず溶解すべきである。

【００８９】

ＰＴＫ７ポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロースクロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ、分子ふるいクロマトグラフィ、遠心分離法、電気泳動法およびレクチンクロマトグラフィを包含する周知方法によって、組換え細胞培養から、または他の生物起源から回収および精製できる。一実施態様において、これらの方法の組合せが使用される。別の実施態様において、高速液体クロマトグラフィが使用される。さらなる実施態様において、ＰＴＫ７ポリペプチドに特異的に結合する抗体を、該ポリペプチドからＰＴＫ７ポリペプチドを含む試料を消耗するために、あるいは該ポリペプチドを精製するために使用できる。公知技術が、ポリペプチドが単離および／または精製中に失活してしまったときＰＴＫ７ポリペプチドの天然のまたは活性立体配座を再生するため復元するために使用できる。本発明の関連において、ＰＴＫ７ポリペプチドは、いかなる起源からでも、例えば制限なしに、乳腺、腎臓、膵臓、膀胱、卵巣または肺組織からの生物試料から得ることができる。

【００９０】

ＰＴＫ７ポリペプチドは、「成熟」タンパク質の形であり得、または融合タンパク質のような大きなタンパク質の部分でもあり得る。分泌またはリーダー配列、プレ、プロまたはプレプロタンパク質配列を含有する付加的アミノ酸配列、またはアフィニティタグ、例えばしかし限定なしに、多ヒスチジン残基、ＦＬＡＧタグ、ＨＡタグまたはｍｙｃタグのような精製において補助となる配列を包含することがしばしば有利である。組換え生産中

に安定性を提供するであろう付加的配列も、また、使用される。そのような配列は、付加的配列またはその部分として開裂し得る配列を取り込むことによって必要なときに任意に除去できる。それゆえ、ＰＴＫ７ポリペプチドは、他のポリペプチドを包含する他の部分に融合できる。そのような付加配列およびアフィニティタグは、技術的に公知である。

【００９１】

アミノ酸置換は、知られているように保存的または半保存的であり、好ましくは、ポリペプチドの所望の活性に著しく影響しない。置換は自然に起こり得るか、あるいは、例えば突然変異誘発を使って（例えば、Ｈｕｔｃｈｉｎｓｏｎら、１９７８、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５３：６５５１）導入できる。それゆえ、アミノ酸、グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンが、しばしば互に置換できる（脂肪族鎖を有するアミノ酸）。これらの可能性のある置換で、グリシンとアラニンが互に置換するために使用され（それらは比較的短い側鎖を有しているから）、そしてバリン、ロイシンおよびイソロイシンは、互に置換するために使用する（それらは疎水性のより大きな脂肪族側鎖を有しているから）のが好ましい。互にしばしば置換できる他のアミノ酸には、限定的でなく、以下が包含される：

・フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン（芳香族側鎖を有するアミノ酸）
・リジン、アルギニンおよびヒスチジン（塩基性側鎖を有するアミノ酸）
・アスパラギン酸およびグルタミン酸（酸性側鎖を有するアミノ酸）
・アスパラギンおよびグルタミン（アミド側鎖を有するアミノ酸）
・システインおよびメチオニン（含硫側鎖を有するアミノ酸）および
・アスパラギン酸およびグルタミン酸は、それぞれ、ホスホセリンおよびホスホスレオニンの代わりに置換できる（酸性側鎖のアミノ酸）。

【００９２】

さらなる一実施態様において、置換されたアミノ酸は、ＰＴＫ７ポリペプチドの活性に著しく影響し、そしてペプチドにおいてドミナントネガティブ活性にするよう特異的に選択できる。別の実施態様において、置換アミノ酸は、ポリペプチドを本質的に活性にするよう特異的に選択され得る。

【００９３】

修飾は、翻訳後修飾のような、しかしこれには限定されない、天然に存在する修飾、および突然変異誘発によって導入されるような天然には存在しない修飾を包含する。

【００９４】

好ましくは、ＰＴＫ７ポリペプチドの誘導体は、図１（配列番号１）に示されたアミノ酸配列に少なくとも７０％同一性を有し、より好ましくは、それは少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または少なくとも９８％の同一性を有する。パーセントの同一性は、公知の概念であり、例えば、しかし限定なしに、ＮＣＢＩから入手可能なＢＬＡＳＴ（商標）ソフトウエアを用いて計算できる（Ａｌｔｓｃｈｕｌ、Ｓ．Ｆ．ら、１９９０、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０；Ｇｉｓｈ、Ｗ．＆ Ｓｔａｔｅｓ、Ｄ．Ｊ．１９９３、Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．３：２６６－２７２；Ｍａｄｄｅｎ、Ｔ．Ｌ．ら、１９９６、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２６６：１３１－１４１；Ａｌｔｓｃｈｕｌ、Ｓ．Ｆ．ら、１９９７、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２）；Ｚｈａｎｇ、Ｊ．＆ Ｍａｄｄｅｎ、Ｔ．Ｌ．１９９７、Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．７：６４９－６５６）。

【００９５】

ＰＴＫ７ポリペプチドの断片は、本発明の方法における使用に有益であり、断片の長さにわたって少なくとも７０％の相同性領域が存在する、配列番号１のアミノ酸配列を有するポリペプチドの断片を包含する。該断片は好ましくは、長さで少なくとも１０のアミノ酸であり、好ましくは少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも５０あるいは少なくとも１００のアミノ酸である。断片は、図１（配列番号１）に示されたアミノ酸配列に対する長さにわたって少なくとも７０％の同一性を有し、更に好ましくは、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または

少なくとも９８％の同一性を有する。

【００９６】

ＰＴＫ７ポリペプチドは、癌の治療および／または予防において使用するための医薬組成物の活性薬剤であり、好ましくは組換えＰＴＫ７ポリペプチドが使用される。特別な実施態様においては、ＰＴＫ７ポリペプチドが、融合タンパク質が細胞内に入るのを促進するＨＩＶ／Ｔａｔタンパク質のタンパク質導入ドメインのような、別のポリペプチドと融合し（Ａｓｏｈ、Ｓ．ら、２００２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９９：１７１０７－１７１１２）、癌の治療および／または予防のための医薬の製造において使用するために提供される。

【００９７】

別の態様においては、担癌生物体においてＰＴＫ７ポリペプチドの検出が、本発明の医薬組成物の方法に従って、治療のための適当な患者集団を特に同定するために使用される。

【００９８】

従って、本発明は、被験者から得られた生物試料を検出および／または定量するステップを含む、被験者における癌のスクリーニングおよび／または診断または予後を予測する方法、および／または癌療法の有効性をモニタリングする方法を提供する。スクリーニングおよび／または診断の方法において使用するためのＰＴＫ７ポリペプチドは、好ましくは：

（ａ）配列番号１のアミノ酸配列を含み、または、同配列から構成され；

（ｂ）ＰＴＫ７の活性を保持している配列番号１のアミノ酸配列に関して一つないしそれ以上のアミノ酸置換、修飾、欠失または挿入を有する誘導体であり；または

（ｃ）少なくとも１０のアミノ酸の長さであり、断片の長さにわたって少なくとも７０％の相同性を有する、配列番号１のアミノ酸配列を有するポリペプチドの断片である。

【００９９】

一態様において、発現は、あらかじめ決定された参照範囲と比較される。

【０１００】

好ましくは、検出のステップは、

（ａ）試料を上記（ａ）から（ｃ）において規定されたポリペプチドに特異的である捕捉試薬と接触させ；そして

（ｂ）結合が、捕捉試薬と試料中の該ポリペプチドの間で生じているかどうかを検出することを含む。

【０１０１】

別の態様においては、捕捉されたポリペプチドが、固相に固定化された、直接または間接に標識化された検出試薬を用いて検出される。

【０１０２】

本発明の関連において、生物試料は、いかなる起源、例えば限定なしに、組織生検からも得ることができる。

【０１０３】

ＰＴＫ７ポリペプチドを検出／定量する便利な手段としては、抗体の使用を含む。ＰＴＫ７ポリペプチドを、上に記載したように、公知の方法を用いて該ポリペプチドと相互作用する（結合または認識する）抗体を高める免疫原として使用できる。それゆえ、さらなる態様において、本発明は、被験者における癌のスクリーニングおよび／または診断のための、あるいは抗癌療法の有効性をモニタリングするための少なくとも一つのＰＴＫ７ポリペプチドに特異的に結合する抗体の使用を提供する。特別な実施態様においては、抗ＰＴＫ７ポリペプチド抗体を用いた診断の方法を、本発明の方法に従って治療するための適当な患者の集団を同定するために使用できる。

【０１０４】

ＰＴＫ７ポリペプチドを、ヒト組織の生物試料におけるおよび／またはそのサブフラクション、例えば、しかし限定なしに、膜、サイトゾルまたは核サブフラクションにおける

ＰＴＫ７ポリペプチドの発現を検出することによる癌の診断のためにも、なかんずく使用できる。

【０１０５】

さらなる態様において、生物試料中のＰＴＫ７ポリペプチドを検出する方法は、直接的または間接的に標識化された検出試薬を用いて該試料中のＰＴＫ７ポリペプチドの量を検出および／または定量することを含む。ＰＴＫ７ポリペプチドを、免疫沈降法とそれに続くドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動、二次元電気泳動、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着検定法）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル核酸沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイおよびタンパク質Ａイムノアッセイを包含するが、しかしこれらに限定されない、公知のいかなるイムノアッセイの手段によっても検出できる。

【０１０６】

抗体と抗原の相互作用の検出は、抗体と、それを検出し得る物質、例えば、しかしこれらには限定されない、酵素（例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ）、補欠分子族（例えば、ストレプトアビジン、アビジン、ビオチン）、蛍光物質（例えば、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、フィコエリスリン）、発光材料（例えば、ルミノール）、生物発光材料（例えば、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、エクオリン）、放射性核種（例えば、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{111}Ｉｎ、^{99}Ｔｃ）、陽電子照射金属または非放射性常磁性金属イオン（ＵＳ４，７４１，９００）をカップリングさせることによって容易にできる。

【０１０７】

本発明は、また、上に記載したようなＰＴＫ７ポリペプチドに対する捕捉試薬（例えば、抗体）を含む診断キットを提供する。さらに、そのようなキットは、以下の一つまたはそれ以上を所望ならば含む：

（１）スクリーニング、診断、予後の予測、治療モニタリングまたはこれらを応用した任意組合せのための捕捉試薬を使用するための指示書；

（２）捕捉試薬に対する標識結合パートナー；

（３）捕捉試薬が固定化されている固相（例えば、試薬片）；および

（４）スクリーニング、診断、予後予測または治療的使用またはこれらの組合せについての規制当局の認可を示すラベルまたは能書。

【０１０８】

もし、捕捉試薬に対する標識結合パートナーがないのなら、抗ＰＴＫ７ポリペプチド捕捉試薬自体を、検出し得るマーカー、例えば、ケミルミネセンス、酵素、蛍光、または放射性部分（上記参照）で標識化できる。

【０１０９】

ＰＴＫ７核酸の検出および／または定量が、被験者における癌のスクリーニングおよび／または診断または予後を予測する方法、および／または癌療法の有効性をモニタリングする方法において使用できることは当業者に明らかであろう。

【０１１０】

状況が変わらない限り、ＰＴＫ７核酸は、以下の特徴の一つないしそれ以上を有するであろう核酸分子を包含し、そしてそれゆえに：

ｄ）配列番号２のＤＮＡ配列またはそのＲＮＡ均等物を含み、または、それから構成され；

ｅ）ｄ）の配列に相補的である配列を有し；

ｆ）ＰＴＫ７ポリペプチドをコードする配列を有し；

ｇ）ｄ）、ｅ）およびｆ）の何れとも実質的に同一性を示す配列を有し；または

ｈ）長さにおいて少なくとも１０のヌクレオチドであるｄ）、ｅ）、ｆ）またはｇ）の断

片であり；
そして、以下の特徴の一つまたはそれ以上を有している：
１）それらはＤＮＡまたはＲＮＡであり得る；
２）それらは一本鎖または二本鎖であり得る；
３）それらは実質的に純粋な形であり得る。それゆえに、それらは不純タンパク質および／または他の核酸を実質的に含まない形で提供され得る；および
４）それらはイントロンを有し、または、イントロンを有さない（例えば、ｃＤＮＡ）。

【０１１１】
ＰＴＫ７核酸の断片は、好ましくは、長さにおいて、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも５０、少なくとも１００または少なくとも２５０のヌクレオチドである。

【０１１２】
本発明は、また、上記（ｄ）－（ｈ）に記載したＰＴＫ核酸に相補性でありそして、該ＰＴＫ核酸にハイブリダイズできる核酸の使用を提供する。そのような核酸分子は、「ハイブリダイズする核酸分子」と呼ばれる。例えば、しかし限定なしに、「ハイブリダイズする核酸分子」は、プローブまたはプライマーとして有用であり得る。「ハイブリダイズする核酸分子」は、上記（ｄ）－（ｈ）の範囲内で核酸分子と長さに沿って、高度に配列同等性を有する（例えば、少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または少なくとも９８％の配列同等性）。上記で考察した核酸分子のいずれともハイブリダイズできる、「ハイブリダイズする核酸分子」の使用、例えば、ハイブリダイジングアッセイにおける使用も本発明に包含されている。

【０１１３】
ハイブリッド形成アッセイは、被験者における癌のスクリーニング、予後予測、診断または療法のモニタリングに使用できる。従って、そのようなハイブリッド形成アッセイは、
ｉ）被験者から得られた、核酸を含有する生物試料を、ＰＴＫ核酸分子にハイブリダイズできる核酸プローブと、ハイブリッド形成が起こり得るような条件下で、接触させ、そして
ｉｉ）いずれかで得られたハイブリッド形成を検出または測定する、
ことを含む。

【０１１４】
好ましくは、そのようなハイブリダイズする分子は、長さで少なくとも１０ヌクレオチドであり、そして、好ましくは、長さにおいて少なくとも２５または少なくとも５０ヌクレオチドである。より好ましくは、ハイブリダイズする核酸分子は、上記（ｄ）から（ｆ）のいずれか一つの範囲内で核酸に特異的にハイブリダイズする。最も好ましくは、ハイブリッド形成は、ストリンジェントハイブリッド形成条件下で起こる。ストリンジェントハイブリッド形成条件の一例は、試みられたハイブリッド形成が、約０．９Ｍの塩溶液を使用して、約３５℃から約６５℃の温度で実行される。しかしながら、プローブの長さ、塩基組成、存在するイオンのタイプ等のような変更を考慮するために、そのような条件を当業者は適当に変化させ得るであろう。

【０１１５】
本発明は、また、ＰＴＫ７ポリペプチドをコードするＲＮＡをハイブリダイズできる核酸プローブ、適当な試薬および使用指示書を含む診断キットを提供する。

【０１１６】
さらなる実施態様においては、診断キットが、ポリメラーゼ連鎖反応（例えば、Ｉｎｎｉｓら、１９９０、ＰＣＲ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ社、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）、リガーゼ連鎖反応（ＥＰ　３２０，３０８）、Ｑβレプリカーゼの使用、サイクリックプローブ反応、またはその他の公知方法のような適当な反応条件下で、少なくともＰＴＫ７核酸分子の部分の増幅を開始できる一対のプライマーを、一つないしそれ以上の容器中に含んで提供される。典型的には、プライマーは、少なくとも

８ヌクレオチドの長さであり、そして好ましくは、少なくとも１０ないし２５ヌクレオチドの長さであり、より好ましくは、１５ないし２５のヌクレオチドの長さである。ある場合には、長さで、少なくとも３０または少なくとも３５のヌクレオチドが使用され得る。

【０１１７】

なお別の態様において、本発明は、癌の治療および／または予防における使用のための医薬品の製造における少なくとも一つのＰＴＫ核酸の使用を提供する。

【０１１８】

特定の実施態様においては、ハイブリダイズするＰＴＫ核酸分子が、相補的ＰＴ７核酸に結合することによってＰＴＫ７ポリペプチドの発現を変えるアンチセンス分子として使用され、癌の治療および／または予防において使用され得る。アンチセンス核酸は、ＰＴＫ７ポリペプチドをコードするＲＮＡ（好ましくはｍＲＮＡ）の部分に相補性であるいくつかの配列によってハイブリダイズできるＰＴＫ７核酸を包含する。アンチセンス核酸は、そのようなポリペプチドをコードするｍＲＮＡのコードおよび／または非コード領域に相補的であり得る。最も好ましくは、ＰＴＫ７ポリペプチドの発現は、アンチセンス核酸の使用によって阻害される。それゆえ、本発明は、ＰＴＫ７ポリペプチドをコードする遺伝子またはｃＤＮＡにアンチセンスである少なくとも８つのヌクレオチドを含む核酸の治療的または予防的使用を提供する。

【０１１９】

別の態様においては、癌の症状が、ポリペプチドの遺伝子発現を減少させる、周知の遺伝子「ノックアウト」、リボザイムまたはトリプルヘリックス法に関連して、ここに定義されたようなポリペプチドをコードする遺伝子配列を使用して、ＰＴＫ７ポリペプチドのレベルまたは活性を減少させることにより改善されるであろう。この方法においては、リボザイムまたはトリプルヘリックス分子が、遺伝子の活性、発現または合成を調節するために使用され、その結果、癌の症状が改善される。そのような分子は、変異または非変異標的遺伝子の発現を減少または阻害するように設計できる。そのような分子の製造および使用についての技術は、当業者に周知である。

【０１２０】

内因性ＰＴＫ７ポリペプチドの発現は、標的相同的組換えを用いてポリペプチドをコードする遺伝子、またはそのような遺伝子のプロモーターを不活化する、または「ノックアウト」することによっても減少させ得る（例えば、Ｓｍｉｔｈｉｅｓら、１９８５、Ｎａｔｕｒｅ ３１７：２３０－２３４；Ｔｈｏｍａｓ ＆ Ｃａｐｅｃｃｈｉ、１９８７、Ｃｅｌｌ ５１：５０３－５１２；Ｔｈｏｍｐｓｏｎら、１９８９、Ｃｅｌｌ ５：３１３－３２１；およびＺｉｊｌｓｔｒａら、１９８９、Ｎａｔｕｒｅ ３４２：４３５－４３８）。例えば、内因性ＰＴＫ７遺伝子（ポリペプチドをコードする遺伝子のコード領域または調節領域のいずれか）に相同性のＤＮＡによって隣接されている非機能的ポリペプチドをコードする変異遺伝子（または完全に無関係のＤＮＡ配列）を、選択マーカーおよび／またはネガティブ選択マーカーの存在または不存在で、イン・ビボで標的遺伝子を発現する細胞に遺伝子導入するために使用できる。標的相同的組換えを経たＤＮＡ構築の挿入によって、標的遺伝子の不活化がもたらされる。

【０１２１】

別の態様においては、核酸が遺伝子治療を経て投与される（例えば、Ｈｏｓｈｉｄａ、Ｔ．ら、２００２、Ｐａｎｃｒｅａｓ、２５：１１１－１２１；Ｉｋｕｎｏ、Ｙ．２００２、Ｉｎｖｅｓｔ．Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．Ｖｉｓ．Ｓｃｉ．２００２、４３：２４０６－２４１１；Ｂｏｌｌａｒｄ、Ｃ．、２００２、Ｂｌｏｏｄ ９：３１７９－３１８７；Ｌｅｅ Ｅ．、２００１、Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．７：７７３－７８２）。遺伝子治療とは、被験者に、発現したまたは発現し得るＰＴＫ７核酸を投与することである。公知の遺伝子治療のいかなる方法も、本発明に従って使用できる。

【０１２２】

治療的ＰＴＫ核酸の患者への送達は、直接イン・ビボ遺伝子治療（すなわち、患者は核酸または核酸含有ベクターに直接的に曝露される）または間接的エクス・ビボ遺伝子治療

（すなわち、細胞は、先ずイン・ビトロで核酸と形質転換され、次いで、患者に移植される）によって行われ得る。

【０１２３】

例えば、イン・ビボ遺伝子治療のためには、ＰＴＫ核酸を含有する発現ベクターを、欠損のある、または、弱毒化レトロウイルスまたは、例えば、米国特許４，９８０，２８６またはＲｏｂｂｉｎｓら、１９９８、Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．８０：３５－４７に記載されているような他のウイルスベクターを使用して感染させることによって、それを細胞内に取込むような方法で投与される。

【０１２４】

公知の種々のレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムのパッケージングおよびそれに続く宿主細胞ＤＮＡへの組込みを必要としないレトロウイルス配列を欠失するよう修飾されている、Ｍｉｌｌｅｒら、（１９９３、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２１７：５８１－５９９）に記載されているようなものである。また、非分裂細胞に感染する能力のゆえに都合のよいアデノウイルスベクターを使用することができ、そのような高能力アデノウイルスベクターはＫｏｃｈａｎｅｋ（１９９９、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ、１０：２４５１－２４５９）に記載されている。使用できるキメラウイルスベクターは、Ｒｅｙｎｏｌｄｓら、（１９９９、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ Ｔｏｄａｙ、１：２５－３１）に記載されているものである。ハイブリッドベクターもまた使用でき、Ｊａｃｏｂｙら、（１９９７、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ、４：１２８２－１２８３）によって記載されている。

【０１２５】

裸のＤＮＡの直接注入、または微粒子衝撃の使用（例えば、Ｇｅｎｅ Ｇｕｎ（登録商標）；Ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ、Ｄｕｐｏｎｔ）、または脂質で被覆する方法も遺伝子治療に使用できる。化合物を細胞表面受容体に移入する、または、リポゾーム、微小粒子またはマイクロカプセル内にカプセル化する、あるいは核に入ることが知られているペプチドに連結して核酸を投与する、または受容体依存性エンドサイトーシスで前もって処置したリガンドに連結して投与することによる（Ｗｕ ＆ Ｗｕ、１９８７、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６２：４４２９－４４３２）移入が、関係のある受容体を特異的に発現する標的細胞タイプに使用できる。

【０１２６】

別の実施態様においては、ＰＴＫ核酸を含む核酸リガンド化合物が、製造され得る。ここで、このリガンドは、エンドソームを破壊するように設計された紡錘型（ｆｕｓｏｇｅｎｉｃ）のウイルスペプチドを含み、そうすることでＰＴＫ７核酸が続いておこるリソソームの分解を避けることができる。ＰＴＫ７核酸は、細胞特異的エンドサイトーシスおよびＷＯ ９２／０６１８０、ＷＯ ９３／１４１８８およびＷＯ ９３／２０２２１に記載されているように特異的受容体を標的とすることによる発現をイン・ビボで標的とされ得る。代わりに、核酸は、細胞内に導入でき、相同的組換えによる発現のために宿主細胞ゲノム内に取込まれる（Ｚｉｊｌｓｔｒａら、１９８９、Ｎａｔｕｒｅ、３４２：４３５－４２８）。

【０１２７】

エクス・ビボ遺伝子治療においては、遺伝子が組織培養を使ってイン・ビトロで細胞に転移され、この細胞が、皮下注射、細胞を皮膚移植に応用する、および造血幹細胞または始原細胞のような組換え血液細胞の静脈内注射のような種々の方法によって患者に送達される。

【０１２８】

遺伝子治療の目的のためにＰＴＫ７核酸を導入できた細胞には、例えば、上皮細胞、内皮細胞、角化細胞、繊維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞および血液細胞を包含する。使用できる血液細胞は、例えば、Ｔリンパ球、Ｂリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球、造血細胞または始原細胞、その他が包含される。

【０１２９】

一態様において、医薬組成物はＰＴＫ７核酸を含み、該核酸は、適当な宿主内でＰＴＫ７ポリペプチドまたはそのキメラタンパク質を発現する発現ベクターの部分である。特に、そのような核酸は、ポリペプチドをコードする領域に作用できるように連結したプロモーターを有しており、該プロモーターは誘導可能であり、あるいは構成的である（および、所望ならば、組織特異性である）。別の特定の実施態様においては、コード配列およびその他のいずれかの所望の配列が、ゲノムの所望の部位において相同的組換えを促進する領域によって隣接されている場所で核酸分子が使用され、そうして核酸の染色体内発現のために提供される（Ｋｏｌｌｅｒ　＆　Ｓｍｉｔｈｉｅｓ、１９８９、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：８９３２－８９３５；Ｚｉｊｌｓｔｒａら、１９８９、Ｎａｔｕｒｅ、３４２：４３５－４３８）。

【０１３０】

ＰＴＫ７核酸は、ヒト細胞のｍＲＮＡから誘導したｃＤＮＡライブラリーから、発現配列タグ（ＥＳＴ）解析法を使い、標準的なクローニング及びスクリーニング技法によって得ることが出来る（Ａｄａｍｓ、Ｍ．ら、１９９１、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５２：１６５１－１６５６；Ａｄａｍｓ、Ｍ．ら、１９９２、Ｎａｔｕｒｅ　３５５：６３２－６３４；Ａｄａｍｓ、Ｍ．ら、１９９５、Ｎａｔｕｒｅ、３７７：Ｓｕｐｐｌ：３－１７４）。また、ＰＴＫ７核酸はゲノムＤＮＡライブラリーなどの天然素材から得ることが出来るし、或いは公知の市販技術を使って合成することも出来る。上記ＰＴＫ７ポリペプチドのコーディング配列から成るＰＴＫ７核酸は、該ペプチドの組換え体生産に使うことが出来る。ＰＴＫ７核酸は、それ自体が成熟ポリペプチドのコーディング配列として含まれているか、或いは読取り枠内に他のコーディング配列、例えばリーダーまたは分泌をコードした配列、プレー、プローまたはプレプロータンパク配列、切断可能配列または他の融合ペプチド部分、例えばアフィニティー・タグまたはポリペプチド生産中の安定化配列と共にリーディングフレーム（読み枠）中に成熟ペプチドのコーディング配列として含まれる。好ましいアフィニティー・タグとしては、多重ヒスチジン残基（例えば、Ｇｅｎｔｚら、１９８９、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：８２１－８２４を参照）、ＦＬＡＧタグ、ＨＡタグまたはｍｙｃタグが挙げられる。また、ＰＴＫ７核酸には非コーディング５’及び３’配列、例えば転写された、非翻訳配列、スプライシング及びポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位およびｍＲＮＡ安定化配列が含まれる。

【０１３１】

ＰＴＫ７ポリペプチド誘導体は、ＰＴＫ７核酸のヌクレオチド配列に１個以上のヌクレオチドの置換、付加または削除を導入し、コード化されたタンパクに１個以上のアミノ酸の置換、付加または削除を導入することによって創出することが出来る。変異の導入、例えば部位特異的突然変異及びＰＣＲ媒介突然変異を含む変異の導入には、当業者に公知の標準的な技術を使うことが出来る。好ましくは、保存性のアミノ酸置換は１個以上の予測した非必須アミノ酸残基において行われる。

【０１３２】

ＰＴＫ７ポリペプチドをコードするＰＴＫ７核酸は、ヒト以外の種の同族体及びオルソログを含めて、上記（ｄ）－（ｈ）記載のＰＴＫ７核酸配列を持つ標識プローブを使い、厳しいハイブリダイゼーション条件下における適切なライブラリーのスクリーニング、および完全長のｃＤＮＡおよび該核酸配列を含むゲノムクローンの分離のステップから成る工程によって得られる。このハイブリダイゼーション手法は公知の技術である。厳しいハイブリダイゼーション条件の一例は、ハイブリダイゼーションが０．９Ｍの塩溶液を使い約３５℃から約６５℃の温度で実施される場合である。しかし、当業者は、プローブの長さ、塩基の組成、存在するイオンのタイプなどの変化要素を勘案してその条件を適切に変えることが出来る。高い選択性を得るために、二重らせん形成には低塩濃度または高温条件のような比較的厳しい条件が用いられる。より厳しい条件として、６５℃で０．５Ｍ$NaHPO_4$、７％ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、１ｍＭのＥＤＴＡ存在下でのフィルター結合ＤＮＡへのハイブリダイゼーション、および６８℃での０．１ｘＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ中での洗浄が挙げられる（Ａｕｓｕｂｅｌ、Ｈ．Ｍ．ら，ｅｄｓ．、１９８

９、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｖｏｌ．１、Ｇｒｅｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ社、およびＪｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ社、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ｐ．２．１０．３）。いくつかの応用のために、二重螺旋形成用の厳密性の低い条件が求められている。中程度に厳しい条件としては、４２℃の０．２ｘＳＳＣ／０．１％のＳＤＳ内での洗浄が挙げられる（Ａｕｓｕｂｅｌら、１９８９、同上文献）。ハイブリダイゼーションの条件は、ホルムアミドの添加量を増加させさらに厳しくすることが出来て、ハイブリッド二重螺旋は不安定になる。このように、特定のハイブリダイゼーション条件は容易に操作でき、通常は適切な選択がなされる。一般に、５０％ホルムアミド存在下での都合の良いハイブリダイゼーション温度は、ここに記載のポリペプチドをコードする遺伝子の断片と９５－１００％の相同性を有するプローブに対しては４２℃、９０－９５％の相同性の場合は３７℃および７０－９０％の相同性の場合は３２℃である。

【０１３３】

多くの場合分離されたｃＤＮＡ配列が、ポリペプチドのコード領域がｃＤＮＡの５’末端のところで短く切断されて不完全な形になることを当業者は理解しているであろう。これは本質的に、プロセッシビティー（酵素が重合反応中の鋳型に付着した状態を保てる能力の尺度）が低い酵素である逆転写酵素による第１鎖ｃＤＮＡ合成段階で、ｍＲＮＡ鋳型のＤＮＡ複写が未完結であった結果である。

【０１３４】

完全長ｃＤＮＡの取得法または短いｃＤＮＡの伸長方法は公知の技術であり、例えばレース法がある（ｃＤＮＡ末端の迅速増幅法、Ｆｒｏｈｍａｎら、１９８８、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：８９９８－９００２）。最近の技術改良は、Ｍａｒａｔｈｏｎ（商標）（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社）の技術で例示されるように、長鎖ｃＤＮＡの探索を著しく簡略化した。この技術には、選択した組織から抽出したｍＲＮＡからｃＤＮＡを調製し、次にアダプター配列を各々の末端に連結したｃＤＮＡが使われる。続いて、欠損したｃＤＮＡの５’末端を増幅するために、遺伝子特異的オリゴヌクレオチド・プライマーとアダプター特異的オリゴヌクレオチド・プライマーの組合せを使ってＰＣＲを行う。次に、増幅産物に連結するように設計された入れ子プライマー類、特にアダプター配列の３’にさらに連結するアダプター特異的プライマーおよび既知の遺伝子配列の５’にさらに連結する遺伝子特異的プライマーを使ってＰＣＲ反応を繰り返す。この反応生産物をＤＮＡ配列決定により分析し、その生産物を直接既存のｃＤＮＡに接続して完全な配列にするか、或いは５’プライマー設計に対する新しい配列情報を使った全長のＰＣＲを別途実施するかの何れかによって完全長のｃＤＮＡが構築される。

【０１３５】

本発明のもう一つの態様は、癌の治療および／または予防に用いるワクチンに関する。上記のＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸は、癌の治療および／または予防に用いるワクチンの生産に使うことが出来る。そのような物質は抗原および／または免疫原となり得る。抗原としては、抗体を惹起するために使われる、或いは確かに対象者体内に抗体反応を誘導する能力のあるタンパク質または核酸が挙げられる。免疫原物質としては、対象者体内に免疫反応を誘導する能力のあるタンパク質または核酸が挙げられる。従って、後者の場合、タンパク質または核酸は、抗体反応を生み出すだけでなく、さらに抗体非関与の免疫反応つまり細胞性或いは体液性免疫反応を生み出す能力がある。抗原または免疫原のポリペプチドによって、抗原性または免疫原性を担う部位つまりエピトープまたはエピトープ類を同定することが可能であることは技術的に公知である。当業者に既知のアミノ酸および核酸の特性は、ＰＴＫ７ポリペプチドの抗原性指標（部位が抗原性である可能性の尺度）を予測するために使うことが出来る。例えば、限定するものではないが、“ペプチド構造”プログラム（ＪａｍｅｓｏｎおよびＷｏｌｆ、１９８８、ＣＡＢＩＯＳ、４（１）：１８１）および“スレディング法”（Ａｌｔｕｖｉａ Ｙ．ら、１９９５、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２４９：２４４）と呼ばれる手法が用いられる。従って、ＰＴＫ７ポリペプ

チドは１個以上のこのようなエピトープを含むか、または抗原性／免疫原性を保持するのに十分なほどそのような部位に類似している。

【０１３６】

ポリペプチドまたは核酸は胃で分解される可能性があるため、ワクチン組成物は好ましくは非経口的に（例えば、皮下、筋肉内、静脈内または皮内注射で）投与される。

【０１３７】

従って、さらなる実施態様において、本発明は以下のことを提供する：

ａ）患者体内に免疫反応を誘導するワクチンとしての使用；および

ｂ）患者の癌を治療および／または予防するための方法、または患者の癌に対する予防接種の方法で、好ましくはワクチンとして、有効量のＰＴＫ７ポリペプチドまたは核酸を段階的に患者に投与することから成る。

【０１３８】

本発明の各実施態様の好ましい形は、他の実施態様のそれぞれに必要な変更を加えて成るものである。本明細書に引用した限定的ではないが特許および特許申請を含むすべての出版物は、あたかも個々の出版物が特異的に且つ個別に参考資料によって全文が取入れられて明記されているかのごとく、参考として本明細書に載せてある。

【０１３９】

次に実施例に基づいて、本発明を説明するが、これらは単に例証であり、いずれの方法においても本発明の目的を限定するとは見なされない。

【実施例１】

【０１４０】

肺および肝細胞株からのＰＴＫ７タンパク質の単離

肺癌および肝癌細胞株の膜タンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、解析した。

【０１４１】

肺癌および肝癌細胞株の疎分画

１ａ－細胞培養

肺癌細胞株のＤＭＳ１４４およびＳＨＰ－７７は、１０％牛胎児血清、２ｍＭグルタミン、１％ペニシリンおよび１％ストレプトマイシンを補充したＥＭＥＭプラス１％ＮＥＡＡ（非必須アミノ酸）培地で培養した。肝癌細胞株のＨｅｐＧ２は、１０％牛胎児血清、２ｍＭグルタミン、１％ペニシリンおよび１％ストレプトマイシンを補充したＥＭＥＭプラス１％ＮＥＡＡ培地で培養した。細胞は、９５％空気および５％炭酸ガスの加湿環境下、３７℃で生育させた。

【０１４２】

１ｂ－細胞断片化およびプラズマ・膜調製

精製した膜標品を細胞株より分離した。付着性細胞（２ｘ１０^{8}）はＰＢＳ（リン酸緩衝生理食塩水）で３回洗浄し、プラスチックの細胞剥離器具を使って擦り剥がした。細胞を４℃、１０００ｘｇで５分間遠心し、細胞ペレットを均質化用緩衝液（２５０ｍＭの蔗糖、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、１ｍＭのＥＤＴＡ、１ｍＭのバナジウム酸塩および０．０２％のアザイド、プロテアーゼ阻害剤）に再懸濁した。細胞の断片化は、ボールベアリング・ホモジナイザー（８．００２ｍｍボール、ＨＧＭ　Ｌａｂ社製装置）を用い、約９５％の細胞が破砕されるまで行った。膜は、Ｐａｓｑｕａｌｉら（Ｐａｓｑｕａｌｉ，Ｃ．ら、１９９９、Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ、７２２：ｐｐ８９－１０２）によって報告された方法で行った。断片化した細胞を４℃、３０００ｘｇで１０分間遠心した後、核を除いた上清を６０％蔗糖クッション上に重層し１００００００ｘｇで４５分間遠心した。膜をパスツールピペットで採取し、予め作製した１５－６０％蔗糖勾配上に重層し１００００００ｘｇで１７時間遠心した。蔗糖勾配の各分画中のタンパク質は４－２０％ゲル（Ｎｏｖｅｘ）上で泳動しウェスタンブロットに供した。

【０１４３】

１ｃ－１Ｄ－ゲル解析用のプラズマ・膜の調製

トランスフェリン免疫反応性があり、オキシドリダクターゼＩＩまたはカルネキシン免

疫反応性を有しないプラズマ・膜画分を集め、プラズマ・膜の代表とした。これらの蔗糖画分を集め、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、１ｍＭのＥＤＴＡ、１ｍＭのバナジウム酸塩および０．０２％のアザイドを含む溶液で少なくとも４倍に希釈した。希釈した蔗糖画分をＳＷ４０またはＳＷ６０チューブに入れ、緩い加速と減速で１００００００ｘｇで、４５分間遠心した。膜ペレットから上清を除き、膜ペレットをＰＢＳ－ＣＭで３回洗浄した。膜ペレットは、２％ＳＤＳを含む６３ｍＭ　ＴｒｉｓＨＣｌ、ｐＨ７．４に溶解させた。メルカプトエタノール（最終で２％）、グリセリン（１０％）およびブロモフェノールブルー（最終で０．００２５％）を加えた後にタンパク質をアッセイした。１Ｄ－ゲルへの負荷には、最終タンパク質濃度１μｇ／μＬを用いた。

【０１４４】

１ｄ－１Ｄ－ゲル技術

タンパク質または膜ペレットを１Ｄ－サンプル緩衝液に溶解（約１ｍｇ／ｍＬ）し、混合液を９５℃で５分間加熱した。

【０１４５】

サンプルを、Ｂｉｏ－Ｒａｄ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｍｅｌ　Ｈｅｍｐｓｔｅａｄ、英国）から購入した既製の８－１６％の傾斜ゲル上での１Ｄ－ゲル電気泳動を用いて分離した。界面活性剤抽出物から得たタンパク質混合物３０－５０μｇを含むサンプルを、マイクロピペットを用いて濃縮ゲル溝内に注入した。分子量マーカー（１０、１５、２５、３７、５０、７５、１００および２５０ｋＤａ）を含む検量用の一つの溝を含めておき、現像後の分離ゲル挿入の目盛りとした。タンパク質の分離は、ゲルに３０ｍＡの電流を約５時間通電するか、またはブロモフェノールブルーのマーカー色素がゲルの底部に到達するまで通電して行った。

【０１４６】

電気泳動後、ゲル板をこじ開けてゲルを固定液（１０％酢酸、４０％エタノール、５０％水）のトレーに入れ、１夜振揺した。次にゲルをプライミング溶液（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水中７．５％酢酸、０．０５％ＳＤＳを含む）に入れ、３０分間振揺してプライミングし、続いて蛍光色素（７．５％酢酸に溶解した０．０６％ＯＧＳ色素）に入れて振揺しながら３時間培養した。好ましい蛍光色素は米国特許番号６，３３５，４４６に開示されている。Ｓｙｐｒｏ　Ｒｅｄ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ社、Ｅｕｇｅｎｅ、Ｏｒｅｇｏｎ）はこの目的の適切な代替色素である。

【０１４７】

染色ゲル数の映像は、Ｓｔｏｒｍ　Ｓｃａｎｎｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｙｎａｍｉｃｓ社、米国）上で青色蛍光モードでの走査によって得た。捕らえた映像は、ゲル内タンパク分解のために摘出するゲルの領域を決めるために用いた。

【０１４８】

１ｅ－選択したタンパク質の回収と分析

ゲル各々の縦の列を、ステンレススチール製の外科用メス刃、またはゲル列の長さに沿って連続して切るＰＥＥＫ製ゲルカッター（ＯＧＳ）のどちらかを用いて、特定のタンパク質バンドの採取を意図せずに切取った。

【０１４９】

タンパク質をトリプシン（Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　ｔｒｙｐｓｉｎ、Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ、米国）によるゲル内消化法で処理し、トリプシン消化ペプチドを作製した。回収したサンプルを２つに分割した。ＭＡＬＤＩ（レーザーイオン化法）分析の前に、サンプルから脱塩しＣ１８　Ｚｉｐ　Ｔｉｐｓ（商標）（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｅｄｆｏｒｄ、ＭＡ）を用いて濃縮した。タンデム質量分析のサンプルを、ナノＬＣシステム（ＬＣ　Ｐａｃｋｉｎｇｓ、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ、オランダ）にＣ１８　ＳＰＥ材を装填して精製した。回収したペプチドプールを、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－質量分析器（Ｖｏｙａｇｅｒ　ＳＴＲ、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社、Ｆｒａｍｉｎｇｈａｍ、ＭＡ）で３３７ｎｍ波長のレーザー光を使った脱離および反射モードで分析した。またペプチドプールを、Ｍｉｃｒｏｍａｓｓ　Ｑｕａｄｒｕｐｏｌｅ飛行時間（Ｑ－ＴＯＦ）質量

分析装置（Ｍｉｃｒｏｍａｓｓ、Ａｌｔｒｉｎｃｈａｍ、英国）を使ったナノ－ＬＣタンデム質量分析（ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ）で分析した。部分的なアミノ酸配列決定および膜タンパク質の同定のために、解釈されていないトリプシン・ペプチドのタンデム質量スペクトルの検索を、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｒｅ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）が保有する非重複データベースに登録されたタンパク質で構成されている公有のタンパク質データベースに対して実施した。ＮＣＢＩのデータベースへは、ｈｔｔｐ://ｗｗｗ.ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／で、ＳＥＱＵＥＳＴ検索プログラム（Ｅｎｇら、１９９４、Ｊ．Ａｍ．Ｓｏｃ．Ｍａｓｓ Ｓｐｅｃｔｒｏｍ．５：９７６－９８９）、バージョンｖ．Ｃ．１を使ってアクセスできる。データベースでの同定の基準には、トリプシンの切断特異性；データベースからのペプチドにａ、ｂおよびｙイオンの一組が確認されること、および全てのＣｙｓ残基のカルバミドメチル化を裏付ける質量増加が確認されることを挙げた。ＳＥＱＵＥＳＴプログラムを使ったスペクトル－スペクトル対比によるタンパク質同定に続いて、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦマススペクトルで検出されたそれぞれの質量を、同定されたタンパク質内のトリプシン消化ペプチドに割り当てた。ＳＥＱＵＥＳＴプログラムを用いたトリプシン消化ペプチドの解釈されていないＭＳ／ＭＳスペクトル検索でアミノ酸配列が同定されなかった場合、ペプチドのタンデムマススペクトルは公知の方法を用いて手作業で解析した。（ペプチドイオンの低エネルギー断片化マススペクトルを解釈する場合は、Ｇａｓｋｅｌｌら、１９９２、Ｒａｐｉｄ Ｃｏｍｍｕ．Ｍａｓｓ Ｓｐｅｃｔｒｏｍ．６：６５８－６６２を参照）。国際特許出願番号ＷＯ ０２／２１１３９に記載の方法もマススペクトルの解釈に使うことが出来る。

【０１５０】

４つのタンデムスペクトル（図１中、太字とアンダーラインで表示）と１６の質量一致（図１中、太字で表示）がＧｅｎＢａｎｋの受託番号ＡＡＣ５０４８４およびＪＣ４５９３に一致することが判った。

【実施例２】

【０１５１】

定量的ＲＴ－ＰＣＲ（Ｔａｑｍａｎ）を用いたＰＴＫ７の正常組織内分布および疾病組織内アップレギュレーションの解析

リアルタイムＲＴ－ＰＣＲを使用して様々な癌組織と対応コントロール内のＰＴＫ７発現量を定量的に測定した。正常および乳癌サンプルの倫理的な許諾は外科（英国，オックスフォード大学）で取得した。肺、膵臓および腎臓の癌サンプルはＣｌｉｎｏｍｉｃｓ社から入手し、卵巣および骨肉腫の癌サンプルはＡｒｄａｉｓ社（Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ、ＭＡ、米国）から入手した。ＰＣＲに使用したプライマーは以下の通りである：
センス、５’－ｃａｇｃｃａｇａａｃｔｔｃａｃｃｔｔｇａｇｃ－３’（配列番号３）
アンチセンス、５’－ｃａｔｇｇｇａｇｔｃｔｃａｔｃｃｔｃａａａｇ－３’（配列番号４）。

【０１５２】

ｃＤＮＡ５ｎｇ、ＳＹＢＲグリーン配列検出試薬（ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）およびセンスとアンチセンスプライマーを含む反応物を、ＡＢＩ７７００配列検出システム（ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）でアッセイした。ＰＣＲ条件は、５０℃で２分間を１サイクル、９５℃で１０分間を１サイクル、９５℃で１５秒間、６０℃で１分間を４０サイクルとした。ＰＣＲ産物の蓄積を、ＳＹＢＲグリーン蛍光の増加としてリアルタイムに測定し、データをＳｅｑｕｅｎｃｅ Ｄｅｔｅｃｔｏｒ プログラム ｖ１．６．３（ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使って解析した。初期鋳型複製数を蛍光強度および増幅サイクルに関係付ける標準曲線は、鋳型として増幅ＰＣＲ産物を使って作成し、各サンプル中のＰＴＫ７複製数を算定するために使用した。

【０１５３】

正常組織では比較的低いＰＴＫ７発現レベルが観測された（ｃＤＮＡ １ｎｇ当り２０００複製未満、図３）。

【０１５４】
対照的に、乳癌サンプルにおけるＰＴＫ７の発現レベルはコントロールと対比して大幅に増加しており、２３例中８例がｃＤＮＡ　１ｎｇ当り２５００複製を越す発現レベルであった（図４）。さらに、リンパ節転移を伴う患者サンプル２０例中９例では、正常組織およびリンパ節転移のない患者組織と比較して、ＰＴＫ７発現量が大きく増加（ｃＤＮＡ　１ｎｇ当り＞５０，０００複製）していることが認められた（図５）。
【０１５５】
ＰＴＫ７発現を７例の肺癌サンプルで調べ、コントロールの罹患していない肺サンプルと対比して、サンプル全部の７例に発現量の増加が認められた（図６）。ＰＴＫ７ｍＲＮＡ発現は同様に、コントロールの腎臓組織または対応するコントロールサンプルと対比した腎癌サンプルの９例中８例で（図７）、正常組織と対比した膵臓癌サンプルの６例中６例で（図８）、卵巣癌サンプルの１１例中６例で、骨肉腫の３例中３例、および３種の卵巣癌細胞株と骨肉腫細胞のＭＧ６３で（図９）上昇していた。
【実施例３】
【０１５６】
ＰＴＫ７を過剰発現する安定な細胞ＨＥＫ２９３およびＣＨＯ－Ｋ１の生成
ＨＥＫ２９３細胞（初代ヒト胚腎細胞、ＡＴＣＣ　Ｎｏ．：ＣＲＬ－１５３７）およびＣＨＯ－Ｋ１細胞（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．：ＣＣＬ　６１）は、１０％の牛胎児血清、２ｍＭのグルタミン添加したＤｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　ｍｅｄｉｕｍ　ＮＵＴ　ｍｉｘ　Ｆ１２培地で生育させた。ＰＴＫ７（寄託番号：Ｕ４０２７１）をｐｃＤＮＡ３．１ネオマイシンベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にクローニングし、このベクターをｐｃＤＮＡ３．１細胞に移入した（ＧｅｎｅＪｕｉｃｅ、Ｎｏｖａｇｅｎ）。
【０１５７】
完全長のＰＴＫ７を発現するＨＥＫ２９３細胞集団は、抗生物質含有培地（０．２ｍｇ／ｍＬ　Ｇ４１８、Ｓｉｇｍａ）で増殖させて選択した。完全長のＰＴＫ７を発現するＣＨＯ－Ｋ１細胞は、希釈クローニングし抗生物質含有培地（０．２ｍｇ／ｍＬ　Ｇ４１８）で増殖させて選択した。ＣＨＯ－Ｋ１の２つのクローン細胞、Ａ３およびＡ６を次の評価のために選択した。
【実施例４】
【０１５８】
癌細胞株中のＰＴＫ７の検出
ＰＴＫ７に対するポリクローナル抗体を作製した（ＣｏｖａｌＡＢ、Ｌｙｏｎ、フランス）。この抗体は、疎水性、抗原性、表面存在の可能性、および他の既知の同族タンパク質と相同性が低い領域を基に配列を選定し、合成した２つの特定のペプチドでウサギを免疫して生育した。ペプチドはＦｍｏｃ法で末端に１個のシステイン残基を入れて合成し、感作する前に特定のチオール基がキーホールリンペットヘモシアニンとカップリング出来るようにした。使用したＰＴＫ７ペプチドは；ＫＧＫＤＲＩＬＤＰＴＫＬＧＰ（配列番号５、ペプチド０１０－ＩＩ、細胞外エピトープ）およびＩＳＫＳＫＤＥＫＬＫＳＱＰＬ（配列番号６、ペプチド０１１－ＩＩ、細胞内エピトープ）である。
【０１５９】
抗血清（ペプチド０１０－ＩＩ）を使ったウェスタンブロットで、おおよそ１６０ｋＤａにＰＴＫ７過剰発現のバンドがＨＥＫ２９３およびＣＨＯ－Ｋ１細胞溶解物に認められたが、親細胞のＨＥＫ２９３細胞には認められなかった。この組換え体タンパク質には、特異的なモノクローナル抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）によって認識されるＶ５タグも発現していた。抗Ｖ５タグ抗体によるウェスタンブロットでも、約１６０ｋＤａの一本バンドがＨＥＫ２９３細胞溶解物に確認された。
【０１６０】
この抗血清によって、同じ分子量のタンパク質が癌細胞株、ＢＴ７４７（乳癌細胞株、ＡＴＣＣ　Ｎｏ．：ＨＴＢ　２０）、ＢＴ２０（乳癌細胞株、ＡＴＣＣ　Ｎｏ．：ＨＴＢ１９）、ＰＡＮＣ－１（膵臓癌細胞株、ＡＴＣＣ　Ｎｏ．：ＣＲＬ－１４６９）、Ｔ４

７Ｄ（乳癌細胞株、ＡＴＣＣ　Ｎｏ．：ＨＴＢ　１３３）およびＳＫ　ＭＥＬ５（悪性黒色腫細胞株、ＡＴＣＣ　Ｎｏ．：ＨＴＢ－７０）およびＳａＯＳ－２（骨原性肉腫細胞株、ＡＴＣＣ　Ｎｏ．：ＨＴＢ　８５）細胞株内で発現していることが認められた。

【実施例５】

【０１６１】

癌細胞株におけるＰＴＫ７の細胞内局在性

蛍光免疫細胞化学を用い、組換え体または内在性ＰＴＫ７の細胞株における細胞内局在性を評価した。

【０１６２】

癌細胞株、核酸移入および非移入のＨＥＫ２９３細胞およびＣＨＯ－Ｋ１細胞を８－ウェル・チャンバースライド（Ｎａｌｇｅ、Ｎｕｎｃ）に１ウェル当り６×１０^{4}の細胞密度で接種した。３７℃、５％CO_2下で２４時間、培養した後、培地をスライドから除き、チャンバーのプラスチックハウジングも取除いた。スライドを一度コプリン・ジャー（Ｃｏｐｌｉｎ　ｊａｒ）中にてＰＢＳで５分間、洗浄した。スライド上の余分なＰＢＳを除き、１０％のホルマリン溶液に１５分間、浸漬した。続いて、スライドの余分な液を除き、スライドを加湿槽内に平らに並べ、１％（ｗ／ｖ）ＢＳＡ含有ＰＢＳで適切に希釈した５００μＬの１次抗体（１μｇ／ｍＬの抗ＰＴＫ７ウサギ抗血清０１０－ＩＩまたは１μｇ／ｍＬのウサギ・ガンマグロブリン（Ｓｉｇｍａ））と１時間、培養した。次に、スライドをＰＢＳで５分間ずつ３回洗浄した。スライドを加湿チャンバー内、１％（ｗ／ｖ）ＢＳＡ含有ＰＢＳで２００倍に希釈した５００μＬのビオチン－ＳＰ－結合ＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ　ロバの抗ウサギ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）と１時間、培養した。培養に続いて、スライドをＰＢＳで５分間ずつ３回洗浄した後、加湿槽内、１％（ｗ／ｖ）ＢＳＡ含有ＰＢＳで７００倍に希釈した５００μＬのＣｙ３－結合Ｅｘｔｒａｖｉｄｉｎ（Ｓｉｇｍａ）と１時間、培養した。培養の後、スライドをＰＢＳで５分間ずつ４回洗浄した。次に、スライドを２μｇ／ｍＬのビスベンザミド（Ｓｉｇｍａ）と３０秒間、培養し、その後ＰＢＳ内で２分間、洗浄した。スライドに蛍光造影剤（Ｄａｋｏ　Ｌｔｄ．）中でカバースライドを載せ、ＤＭＩＲＥ２蛍光顕微鏡（Ｌｅｉｃａ　Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ社、英国）に装着したデジタルカメラＤＣ３００Ｆで映像を撮った。

【０１６３】

得られた映像は、ＰＴＫ７がＰＴＫ７移入ＨＥＫ２９３およびＣＨＯ細胞のプラズマ・膜上に高度に発現していることを示した。この染色法はＰＴＫ７移入細胞に対する特異性が高い。それは、非移入ＨＥＫ２９３およびＣＨＯ－Ｋ１細胞を抗ＰＴＫ７ポリクローナル抗体で染色すると非常に低いレベルの蛍光強度しか得られないことで示される。コントロールのウサギＩｇＧを使ったＰＴＫ７移入細胞の染色では、非常に低いレベルのバックグラウンド蛍光発色しか認められない。

【０１６４】

また、Ｐａｎｃ１、ＳａＯＳ－２、ＭＤＡ－ＭＢ－４５３およびＭＤＡ－ＭＢ－３６１の細胞株は全て、明らかに膜局在の内生的なＰＴＫ７を示した。

【実施例６】

【０１６５】

ＰＴＫ７の免疫組織化学

ＨＤＣＳ（ヒト二倍体細胞株）を含む２５０切片の各種正常および癌組織（Ｃｌｉｎｏｍｉｃｓ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社、１６５　Ｔｏｒ　Ｃｏｕｒｔ、Ｐｉｔｔｓｆｉｅｌｄ、ＭＡ０１２０１）に加え、５５症例の乳癌組織、５０症例の前立腺癌組織、５０症例の肺癌組織のホルマリン固定パラフィン包埋組織の１ｍｍ切片マイクロアレイについて免疫組織化学的な解析を行った。

【０１６６】

スライドをキシレンで５分間ずつ２回洗浄して脱パラフィンし、連続的な濃度傾斜のエタノール溶液で再水和した後、ＰＢＳで５分間、洗浄した。スライドを０．０１Ｍのクエ

ン酸緩衝液（ｐＨ６）に浸漬し、全出力（９５０Ｗ）で１０分間、電磁波処理して抗原を回復させた。また、抗体を用いる検出は、組織をＡｕｔｏｚｙｍｅ（ＡｂＣａｍ）による室温で１０分間のプロテアーゼ処理を行うことにより改善された。組織は、１．５μｇ／ｍＬ（ＰＢＳで希釈した２．５％ロバ血清）の抗血清０１０－ＩＩを添加する前に、ＰＢＳで希釈した１０％のロバ血清でブロックした。ＰＢＳで３回洗浄した後、組織切片を２００倍に希釈（２．５μｇ／ｍＬ、ＰＢＳで希釈した２．５％ロバ血清溶液）したビオチン－コンジュゲート第二抗体（Ｂｉｏｔｉｎ－ＳＰ－結合ＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ ロバの抗モルモット抗体、Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）と1時間、培養した。スライドをＰＢＳで３回洗浄し、組織を１００倍に希釈（５μｇ／ｍＬ、ＰＢＳで希釈した２．５％ロバ血清溶液）したストレプトアビジン－ＨＲＰ（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）と培養した後、ＰＢＳ中で５分間ずつ３回洗浄した。抗体シグナルの検出は、ＤＡＢ基質溶液（Ａａｋｏ Ｌｔｄ．）を用い、製造元の解説に従って行った。隣接組織アレイをヘマトキシリンとエオジン（Ｄａｋｏ社）で対比染色し、画像を光学顕微鏡に装着したデジタルカメラで撮った。

【０１６７】

乳癌のミクロアレイについてＰＴＫ７の免疫組織化学的解析を行った結果、試験した乳癌組織切片の３５～４０％にＰＴＫ７の存在が認められた。癌細胞のみがＰＴＫ７染色陽性で、間質および隣接の正常組織は染色されなかった。切片中のすべての癌細胞はＰＴＫ７免疫反応が陽性であった。

【０１６８】

原発乳癌組織とリンパ節転移の切片が一致する患者では、転移リンパ節の５例中５例で、対応する原発乳癌組織の４例中４例でＰＴＫ７免疫染色が陽性であった。ＰＴＫ７の発現は一般に癌組織の腫瘍性上皮細胞に限定されており、膜への局在を検出することが出来た。

【０１６９】

また、がん細胞特異的なＰＴＫ７のポジティブ染色は、大腸癌（５５サンプル中３８例）、膵臓癌（７サンプル中１例）、腎臓癌（７サンプル中１例、染色は主に細胞質）および膀胱癌（７サンプル中１例）でも見られた。

【０１７０】

ＰＴＫ７の免疫反応性染色は、前立腺癌（１６例）、肝臓癌（７例）、胃癌（７例）、子宮内膜癌（７例）、甲状腺癌（１０例）、悪性黒色腫（５例）リンパ腫（１４例）では確認されなかった。

【０１７１】

次の正常組織でＰＴＫ７免疫反応染色がほとんど認められないか全く認められなかった：前立腺、肝臓、腎臓、甲状腺、脾臓、肺、大腸、リンパ節、膵臓、心臓、脳、副腎、睾丸、卵巣。ＰＴＫ７免疫反応性染色は、コントロール抗体のウサギＩｇＧを使った染色と区別できなかった。

【実施例７】

【０１７２】

ＰＴＫ７によるコロニー形成の誘導

細胞内に組換え体ＰＴＫ７を発現するＨＥＫ２９３細胞、または空のｐｃＤＮＡ３．１ベクターを移入したＨＥＫ２９３細胞（ベクターコントロール細胞）についてコロニー形成能を評価した。

【０１７３】

６－ウェルの組織培養プレートに０．６％寒天の基層を敷き、１０分間、室温に静置して固化させた。細胞を最終濃度が５０００細胞／ｍＬ（ＨＥＫ２９３ｐｃＤＮＡ３．１ベクターコントロール細胞、ＨＥＫ２９３親細胞およびＰＴＫ７発現ＨＥＫ２９３細胞）になるように上層の寒天溶液（０．４％）に接種し、その２ｍＬを各ウェルに加え最終細胞数を１０，０００細胞／ウェルにした（３重試験で）。プレートは、３７℃、５％CO_2下で１０～１４日間、培養した。２個以上の細胞から成るコロニー数をそれぞれの条件に

ついて評価した。ＰＴＫ７移入ＨＥＫ２９３細胞は多数の大きなコロニーを形成したが、コントロール移入細胞および親細胞のＨＥＫ２９３細胞は軟寒天内で自立できずコロニー形成は無かった。

【０１７４】

このデータは、ＰＴＫ７が、乳癌、肺癌、腎臓癌および膵臓癌を含む選定された癌で、タンパク質およびｍＲＮＡレベルで増加することを示唆している。また、正常組織およびリンパ節転移のない乳癌患者からのサンプルに対比して、リンパ節転移を伴う乳癌患者からのサンプルの４５％でＰＴＫ７発現の大幅な増加が認められ、このことはＰＴＫ７が癌の標的として、特に乳癌の標的として有用性があることを示している。ＰＴＫ７は劇的なコロニー形成活性をＨＥＫ２９３細胞に誘導するように見うけられ、従って、ＰＴＫ７は形質転換細胞に共通する形質の付着非依存性の強力な因子であることを示唆する。

【図面の簡単な説明】

【０１７５】

【図１】ＰＴＫ７（ＡＡＣ５０４８４／ＪＣ４５９３）、配列番号１のタンパク質配列を示す。タンデムマススペクトルのペプチドは太字にアンダーライン、ＭＡＬＤＩマススペクトルのペプチドは太字で示した。

【図２】ＰＴＫ７（Ｕ４０２７１）、配列番号２の核酸配列を示す。

【図３】正常組織内のＰＴＫ７　ｍＲＮＡの分布を示す。ｍＲＮＡ量はリアルタイムＲＴ－ＰＣＲにより定量化し、ｃＤＮＡ　１ｎｇ当りの複製数として表示した。

【図４】患者乳房の隣接して対応する正常組織（中空線）と癌組織（黒線）におけるＰＴＫ７　ｍＲＮＡの分布を示す。ｍＲＮＡ量はリアルタイムＲＴ－ＰＣＲにより定量化し、ｃＤＮＡ　１ｎｇ当りの複製数として表示した。

【図５】乳癌組織内のＰＴＫ７　ｍＲＮＡの分布を示す。リンパ節転移の無い患者（Ａ）とある患者（Ｂ）から４０例の乳癌組織サンプルを得た。ｍＲＮＡ量はリアルタイムＲＴ－ＰＣＲにより定量化し、ｃＤＮＡ　１ｎｇ当りの複製数として表示した。

【図６】対応する正常肺組織と肺癌組織におけるＰＴＫ７　ｍＲＮＡの分布を示す。ｍＲＮＡ量はリアルタイムＲＴ－ＰＣＲにより定量化し、ｃＤＮＡ　１ｎｇ当りの複製数として表示した。

【図７】対応する正常腎臓組織（中空線）と腎臓癌組織（黒線）におけるＰＴＫ７　ｍＲＮＡの分布を示す。ｍＲＮＡ量はリアルタイムＲＴ－ＰＣＲにより定量化し、ｃＤＮＡ　１ｎｇ当りの複製数として表示した。

【図８】対応する正常膵臓組織（中空線）と膵臓癌組織（黒線）におけるＰＴＫ７　ｍＲＮＡの分布を示す。ｍＲＮＡ量はリアルタイムＲＴ－ＰＣＲにより定量化し、ｃＤＮＡ　１ｎｇ当りの複製数として表示した。

【図９】卵巣癌と骨肉腫組織サンプルにおけるＰＴＫ７　ｍＲＮＡの分布を示す。ｍＲＮＡ量はリアルタイムＲＴ－ＰＣＲにより定量化し、ｃＤＮＡ　１ｎｇ当りの複製数として表示した。

【図１】

Figure 1

```
1    MGAARGSPAR PRRLPLLSVL LLPLLGGTQT AIVFIKQPSS QDALQGRRAL LRCEVEAPGP
61   VHVYWLLDGA PVQDTERRFA QGSSLSFAAV DRLQDSGTFQ CVARDDVTGE EARSANASFN
121  IKWIEAGPVV LKHPASEAEI QPQTQVTLRC HIDGHPRPTY QWFRDGTPLS DGQSNHTVSS
181  KERNLTLRPA GPEHSGLYSC CAHSAFGQAC SSQNFTLSIA DESFARVVLA PQDVYVARYE
241  EAMFHCQFSA QPPPSLQWLF EDETPITNRS RPPHLRRATV FANGSLLLTQ VRPRNAGIYR
301  CIGQGQQRGPP IILEATLHLA EIEDMPLFEP RVFTAGSEER VTCLPPKGLP EPSVWWEHAG
361  VRLPTHGRVY QKGHELVLAN IAESDAGVYT CHAANLAGQR RQDVNITVAT VPSWLKKPQD
421  SQLEEGKPGY LDCLTQATPK PTVVWYRNQM LISEDSRFEV FKNGTLRINS VEVYDGTWYR
481  CMSSTPAGSI EAQARVQVLE KLKFTPPPQP QQCMEFDKEA TVPCSATGRE KPTIKWERAD
541  GSSLPEWVTD NAGTLHFARV TRDDAGNYTC IASNGPQGQI RAHVQLTVAV FITFKVEPER
601  TTVYQGHTAL LQCEAQGDPK PLIQWKGKDR ILDPTKLGPR MHIFQNGSLV IHDVAPEDSG
661  RYTCIAGNSC NIKHTEAPLY VVDKPVPEES EGPGSPPPYK MIQTIGLSVG AAVAYIIAVL
721  GLMFYCKKRC KAKRLQKQPE GEEPEMECLN GGPLQNGQPS AEIQEEVALT SLGSGPAATN
781  KRHSTSDKMH FPRSSLQPIT TLGKSEPGEV PLAKAQGLEE GVAETLVLVK SLQTKDEQQQ
841  LDFRRELEMP GKLNHANVVR LLGLCREAEP HYMVLEYVDL GDLKQFLRIS KSKDEKLKSQ
901  PLSTKQKVAL CTQVALGMEH LSNNRFVHKD LAARNCLVSA QRQVKVSALG LSKDVYNSEY
961  YHFRQAWVPL RWMSPEAILE GDFSTKSDVW AFGVLMWEVF THGEMPHGGQ ADDEVLADLQ
1021 AGKARLPQPE GCPSKLYRLM QRCWALSPKD RPSFSEIASA LGDSTVDSKP
```

【図２】

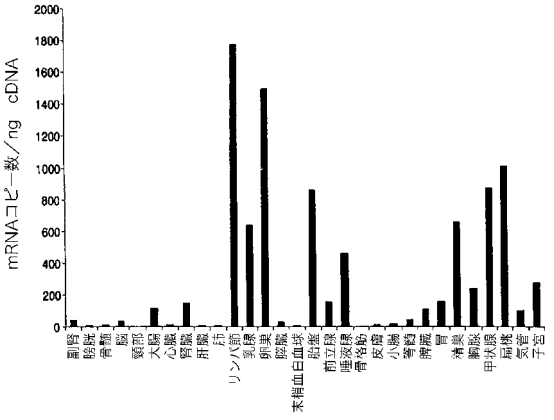
Figure 2

```
1    cgcctcggga cgcctcgggg tcgggctccg gctgcggctg ctgctgcggc gcccgcgctc
61   cggtgcgctc cgcctcctgt gcccgccgcg gagcgcagtc tgcgcgcccg ccgtgcgccc
121  tcagctcctt ttcctgagcc cgccgcgatg ggagctgcgc ggggatcccc ggccagaccc
181  cgccggttgc ctctgctcag cgtcctgctg ctgccgctgc tgggcggtac ccagacagcc
241  attgtcttca tcaagcagcc gtcctcccag gatgcactgc aggggcgccg ggcgctgctt
301  cgctgtgagg ttgaggctcc gggcccggta catgtgtact ggctgctcga tggggccccc
361  gtccaggaca cggagcggcg tttcgcccag ggcagcagcc tgagctttgc agctgtggac
421  cggctgcagg actctggcac cttccagtgt gtggctcggg atgatgtcac tggagaagaa
481  gcccgcagtg ccaacgcctc cttcaacatc aaatggattg aggcaggtcc tgtggtcctg
541  aagcatccag cctcggaagc tgagatccag ccacagaccc aggtcacact tcgttgccac
601  attgatgggc accctcggcc cacctaccaa tggttccgag atgggacccc ccttttctgat
661  ggtcagagca accacacagt cagcagcaag gagcggaacc tgacgctccg gccagctggt
721  cctgagcata gtgggctgta ttcctgctgc gcccacagtg cttttggcca ggcttgcagc
781  agccagaact tcaccttgag cattgctgat gaaagctttg ccagggtggt gctggcaccc
841  caggacgtgg tagtagcgag gtatgaggag gccatgttcc attgccagtt ctcagcccag
901  ccacccccga gcctgcagtg gctctttgag gatgagactc ccatcactaa ccgcagtcgc
961  cccccacacc tccgcagagc cacagtgttt gccaacgggt ctctgctgct gacccaggtc
1021 cggccacgca atgcagggat ctaccgctgc atttggccagg ggcagagggg cccacccatc
1081 atcctggaag ccacacttca cctagcagag attgaagaca tgccgctatt tgagccacgg
1141 gtgtttacag ctggcagcga ggagcgtgtg acctgccttc cccccaaggg tctgccagag
1201 cccagcgtgt ggtgggagca cgcgggagtc cggctgccca cccatggcag ggtctaccag
1261 aagggccacg agctggtgtt ggccaatatt gctgaaagtg atgctggtgt ctacacctgc
1321 cacgcggcca acctggctgg tcagcggaga caggatgtca acatcactgt ggccactgtg
1381 cctcctggc tgaagaagcc ccaagacagc cagctggagg agggcaaccc cggctacttg
1441 gattgcctga cccaggccac accaaaacct acagttgtct ggtacagaaa ccagatgctc
1501 atctcagagg actcacggtt cgaggtcttc aagaatggga ccttgcgcat caacagcgtg
1561 gaggtgtatg atgggacatg gtaccgttgt atgagcagca ccccagccgg cagcatcgag
1621 gcgcaagccc gtgtccaagt gctggaaaag ctcaagttca caccaccacc ccagccacag
1681 cagtgcatgg agtttgacaa ggaggccacg gtgccctgtt cagccacagg ccgagagaag
1741 cccactatta agtgggaacg ggcagatggg agcagcctcc cagagtgggt gacagacaac
1801 gctgggaccc tgcatttttgc ccgggtgact cgagatgacg ctggcaacta cacttgcatt
1861 gcctccaacg ggccgcaggg ccagattcgt gcccatgtcc agctcactgt ggcagttttt
1921 atcaccttca aagtggaacc agagcgtacg actgtgtacc agggccacac agccctactg
1981 cagtgcgagg cccaggggga ccccaagccg ctgattcagt ggaaaggcaa ggaccgcatc
2041 ctggacccca ccaagctggg acccaggatg cacatcttcc agaatggctc cctggtgatc
2101 catgacgtgg cccctgagga ctcaggccgc tacacctgca ttgcaggcaa cagctgcaac
2161 atcaagcaca cggaggcccc cctctatgtc gtggacaagc ctgtgccgga ggagtcggag
2221 ggccctggca gccctcccc ctacaagatg atccagacca ttgggttgtc ggtgggtgcc
2281 gctgtggcct acatcattgc cgtgctgggc ctcatgttct actgcaagaa gcgctgcaaa
2341 gccaagcggc tgcagaagca gcccgagggc gaggagccag agatggaatg cctcaacggt
2401 gggcctttgc agaacgggca gccctcagca gagatccaag aagaagtggc cttgaccagc
```

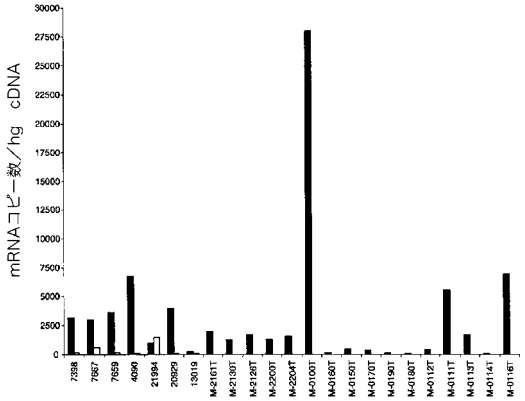
Contd...

```
2461 ttgggctccg gccccgcggc caccaacaaa cgccacagca caagtgataa gatgcacttc
2521 ccacggtcta gcctgcagcc catcaccacg ctgggggaaga gtgagtttgg ggaggtgttc
2581 ctggcaaagg ctcagggctt ggaggagggga gtggcagaga ccctggtact tgtgaagagc
2641 ctgcagagca aggatgagca gcagcagctg gacttccgga gggagttgga gatgtttggg
2701 aagctgaacc acgccaacgt ggtgcggctc ctggggctgt gccgggaggc tgagccccac
2761 tacatggtgc tggaatatgt ggatctggga gacctcaagc agttcctgag gatttccaag
2821 agcaaggatg aaaaattgaa gtcacagccc ctcagcacca agcagaaggt ggccctatgc
2881 acccaggtag ccctgggcat ggagcacctg tccaacaacc gctttgtgca taaggacttg
2941 gctgcgcgta actgcctggt cagtgcccag agacaagtga aggtgtctgc cctgggcctc
3001 agcaaggatg tgtacaacag tgagtactac cacttccgcc aggcctgggt gccgctgcgc
3061 tggatgtccc ccgaggccat cctggagggt gacttctcta ccaagtctga tgtctgggcc
3121 ttcggtgtgc tgatgtggga agtgtttaca catggagaga tgccccatgg tgggcaggca
3181 gatgatgaag tactggcaga tttgcaggct gggaaggcta gacttcctca gcccgagggc
3241 tgcccttcca aacttctatg gctgatgcag cgctgctggg ccctcagccc caaggaccgg
3301 ccctccttca gtgagattgc cagcgccctg ggagacagca ccgtggacag caagccgtga
3361 ggagggagcc cgctcaggat ggcctgggca ggggaggaca tctctagagg gaagctcaca
3421 gcatgatggg caagatccct gtcctcctgg gccctgaggc ccctgcccta gtgcaacagg
3481 cattgctgag gtctgagcag ggcctggcct ttcctcctct tcctcaccct catccttttgg
3541 gaggctgact tggacccaaa ctgggcgact agggctttga gctgggcagt ttcccctgcc
3601 acctcttcct ctatcaggga cagtgtgggt gccacaggta accccaattt ctggccttca
3661 acttctcccc ttgaccgggt ccaactctgc cactcatctg ccaactttgc ctggggaggg
3721 ctaggcttgg gatgagctgg gtttgtgggg agttccttaa tattctcaag ttctgggcac
3781 acagggttaa tgagtctctt cgcccactgg tcccacttgg gggtctagac caggattata
3841 gaggacacag caagtgagtc ctccccactc tgggcttgtg cacactgacc cagacccacg
3901 tcttccccac ccttctctcc tttcctcatc ctaagtgcct ggcagatgaa ggagtttttca
3961 ggagcttttg acactatata aaccgccctt tttgtatgca ccacgggcgg cttttatatg
4021 taattgcagc gtggggtggg tgggcatggg aggtaggggt gggccctgga gatgaggagg
4081 gtgggccatc cttacccccac acttttattg ttgtcgtttt ttgtttgttt tgttttttg
4141 tttttgtttt tgtttttaca ctcgctgctc tcaataaata agccttttttt a
```

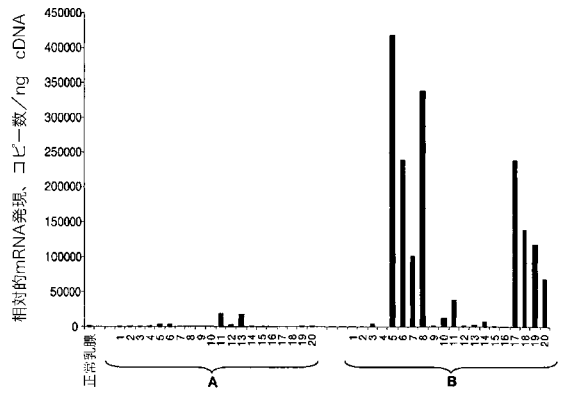
【図３】



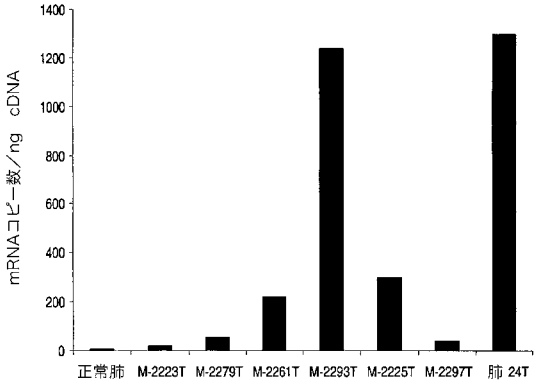
【図４】



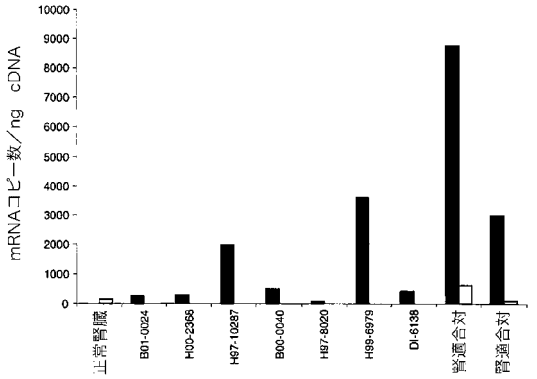
【図５】


相対的mRNA発現、コピー数／ng cDNA
正常乳腺
A
B

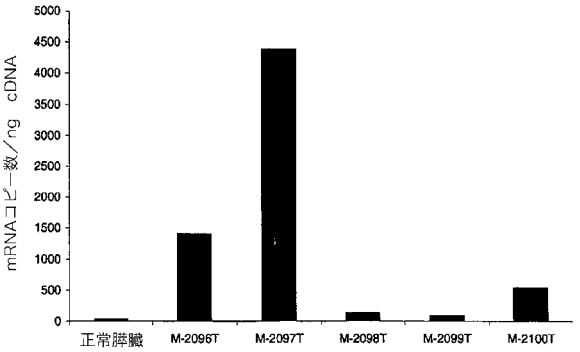
【図６】


mRNAコピー数／ng cDNA
正常肺
M-2223T
M-2279T
M-2261T
M-2293T
M-2225T
M-2297T
肺 24T

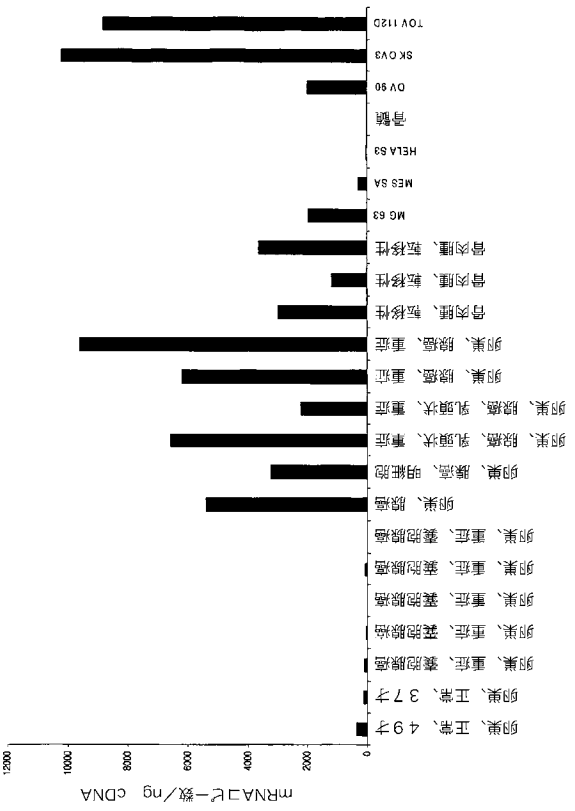
【図７】


mRNAコピー数／ng cDNA
正常腎臓
B01-0024
H00-2366
H97-10287
B00-0040
H97-8020
H99-6979
DI-6138
腎適合対
胃適合対

【図８】


mRNAコピー数／ng cDNA
正常膵臓
M-2096T
M-2097T
M-2098T
M-2099T
M-2100T

【図９】


mRNAコピー数／ng cDNA
卵巣、正常、４９才
卵巣、正常、３７才
卵巣、重症、漿液腺癌
卵巣、重症、粘液腺癌
卵巣、重症、漿液腺癌
卵巣、重症、漿液腺癌
卵巣、重症、漿液腺癌
卵巣、腺癌
卵巣、悪性、明細胞
卵巣、腺癌、乳頭状、軽症
卵巣、腺癌、乳頭状、重症
卵巣、腺癌、重症
卵巣、腺癌、重症
骨肉腫、転移性
骨肉腫、転移性
骨肉腫、転移性
MG 63
MES SA
HELA S3
子宮
OV 90
SK OV3
TOV 112D

【配列表】
0004532273000001.xml

フロントページの続き

(72)発明者 テレット、ジョナサン、アレクサンダー
イギリス国、バークシャー、スラウ、バス ロード ２０８、 セルテック アール アンド ディ リミテッド

審査官 長部 喜幸

(56)参考文献 国際公開第０１／０６６５９４（WO，Ａ１）
国際公開第９６／０３７６１０（WO，Ａ１）
国際公開第０２／０９９０６２（WO，Ａ１）
Kevin Mossie, Colon carcinoma kinase-4 defines a new subclass of the receptor tyrosine kinase family, Oncogene, １９９５年, Vol.11, Pages 2179-2184
Forus Anne, Microarray-based analysis of gene activity patterns in osteosarcoma, Proceedings of the american association for cancer research annual, ２００１年, Vol.42, Page 428

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K 45/00
A61K 49/00
G01N 33/574
BIOSIS(STN)
CAplus(STN)
EMBASE(STN)
MEDLINE(STN)