

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-523687

(P2005-523687A)

(43) 公表日 平成17年8月11日(2005.8.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 B 10/00	A 6 1 B 10/00 T	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/39	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 C	4 C O 7 6
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 39/395 L	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-557507 (P2003-557507)	(71) 出願人	504247945
(86) (22) 出願日	平成14年12月23日 (2002.12.23)		エージーワイ セラピューティクス イン
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月24日 (2004.8.24)		コーポレイティッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/041419		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
(87) 国際公開番号	W02003/057148		ス サン フランシスコ イースト グラ
(87) 国際公開日	平成15年7月17日 (2003.7.17)		ンド アベニュー 270
(31) 優先権主張番号	60/343,422	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成13年12月27日 (2001.12.27)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
		(72) 発明者	ゴンザレス-ズルエタ ミレラ
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パシ
			フィカ モンテレー ロード 510エイ
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍の処置及び可視化における生体分子標的の使用法

(57) 【要約】

本発明は、正常脳組織と比較して原発脳腫瘍組織において差次的に発現しているタンパク質の、腫瘍処置療法のための生体分子標的としての使用に関する。そのタンパク質は、腺癌細胞、非黒色腫瘍細胞、及び腎臓癌細胞からの組織にも発現している。同定された脳腫瘍標的タンパク質と特異的に結合する免疫療法剤及びイムノイメージング剤が提供される。本発明は、本発明の方法における投与のための化合物及び薬学的に許容される組成物も提供する。

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項1】
脳腫瘍の診断又は病期決定のための方法であって、TM7XN1の発現の上方制御又は下方制御を決定することを含む、方法。
- 【請求項2】
脳腫瘍が星状細胞腫である、請求項1記載の方法。
- 【請求項3】
星状細胞腫が神経膠芽腫である、請求項2記載の方法。
- 【請求項4】
決定が、脳腫瘍細胞内のmRNA又はポリペプチドの量の増加又は減少を検出することを含む、請求項1記載の方法。 10
- 【請求項5】
脳腫瘍の画像化の方法であって、
イメージング部分と結合している、TM7XN1タンパク質と特異的に結合する化合物を、有効量、患者へ投与すること；及び
前記複合体のイメージング部分を可視化することを含む、方法。
- 【請求項6】
複合体がクモ膜下腔内投与によって投与される、請求項5記載の方法。
- 【請求項7】
化合物が血管内投与によって投与される、請求項5記載の方法。 20
- 【請求項8】
腫瘍が星状細胞腫である、請求項5記載の方法。
- 【請求項9】
星状細胞腫が神経膠芽腫である、請求項8記載の方法。
- 【請求項10】
化合物が抗体又は抗体断片である、請求項5記載の方法。
- 【請求項11】
イメージング部分が、X線撮影用部分、陽電子放射部分、光学的に可視の色素、光学的に可視の粒子、及び磁気スピンコントラスト部分からなる群より選択される、請求項5記載の方法。 30
- 【請求項12】
脳腫瘍を処置する方法であって、1個または複数の細胞毒性部分と結合している、TM7XN1タンパク質と特異的に結合する化合物を、治療的な量、投与することを含む、方法。
- 【請求項13】
化合物がクモ膜下腔内投与によって投与される、請求項12記載の方法。
- 【請求項14】
化合物が血管内投与によって投与される、請求項12記載の方法。
- 【請求項15】
腫瘍が星状細胞腫である、請求項12記載の方法。
- 【請求項16】
星状細胞腫が神経膠芽腫である、請求項15記載の方法。 40
- 【請求項17】
化合物が抗体又は抗体断片である、請求項12記載の方法。
- 【請求項18】
抗体がヒト抗体である、請求項17記載の方法。
- 【請求項19】
抗体がTM7XN1の細胞外ドメインと特異的に結合するものである、請求項17記載の方法。
- 【請求項20】
細胞毒性部分が、放射性部分、化学毒性部分、及び毒素タンパク質部分からなる群より選択される、請求項12記載の方法。 50

【請求項 2 1】

脳腫瘍に対する免疫応答を増強するための方法であって、
TM7XN1ポリペプチドの抗原を含む免疫原性組成物を宿主へ投与することを含む、方法。

【請求項 2 2】

投与工程が、単離された樹状細胞を抗原と共にインキュベートすることをさらに含む、
請求項21記載の方法。

【請求項 2 3】

抗原がサイトカインと融合している、請求項21記載の方法。

【請求項 2 4】

脳腫瘍標的遺伝子又は遺伝子産物の活性を調整する生物学的活性薬剤を開発するための 10
方法であって、

候補の生物学的活性薬剤を、

(a) TM7XN1ポリペプチド；

(b) TM7XN1ポリペプチドをコードし発現する核酸を含む細胞；又は

(c) (i) TM7XN1に対応する遺伝子のノックアウト；(ii) TM7XN1をコードする外因性の
安定的に伝達された哺乳動物遺伝子配列のうちの一つを含む、腫瘍遺伝子機能のための非
ヒトトランスジェニック動物モデルのうちの一つと組み合わせること；並びに
腫瘍により誘導された分子及び細胞の変化に対する前記薬剤の効果を決定することを含む
、方法。

【請求項 2 5】

生物学的活性薬剤が、発現を下方制御又は上方制御するものである、請求項24記載の方 20
法。

【請求項 2 6】

生物学的活性薬剤が、ポリペプチドの活性を阻害するか又は増加させるものである、請 20
求項24記載の方法。

【請求項 2 7】

腺癌の診断又は病期決定のための方法であって、TM7XN1の発現の上方制御又は下方制 20
御を決定することを含む、方法。

【請求項 2 8】

決定が、腺癌細胞内のmRNA又はポリペプチドの量の増加又は減少を検出することを含む 30
、請求項27記載の方法。

【請求項 2 9】

腺癌の画像化の方法であって、
イメージング部分と結合している、TM7XN1タンパク質と特異的に結合する化合物を、有効 20
量、患者へ投与すること；及び
複合体のイメージング部分を可視化することを含む、方法。

【請求項 3 0】

化合物が血管内投与によって投与される、請求項29記載の方法。

【請求項 3 1】

化合物が抗体又は抗体断片である、請求項29記載の方法。 40

【請求項 3 2】

イメージング部分が、X線撮影用部分、陽電子放射部分、光学的に可視の色素、光学的 20
に可視の粒子、及び磁気スピンコントラスト部分からなる群より選択される、請求項29記
載の方法。

【請求項 3 3】

腺癌を処置する方法であって、1個または複数の細胞毒性部分と結合している、TM7XN1 20
タンパク質と特異的に結合する化合物を、治療的な量、投与することを含む、方法。

【請求項 3 4】

化合物が血管内投与によって投与される、請求項33記載の方法。

【請求項 3 5】

化合物が抗体又は抗体断片である、請求項33記載の方法。

【請求項36】

抗体がヒト抗体である、請求項33記載の方法。

【請求項37】

抗体がTM7XN1の細胞外ドメインと特異的に結合する、請求項35記載の方法。

【請求項38】

細胞毒性部分が、放射性部分、化学毒性部分、及び毒素タンパク質部分からなる群より選択される、請求項33記載の方法。

【請求項39】

腺癌に対する免疫応答を増強するための方法であって、
TM7XN1ポリペプチドの抗原を含む免疫原性組成物を宿主へ投与することを含む、方法。

10

【請求項40】

投与工程が、単離された樹状細胞を抗原と共にインキュベートすることをさらに含む、請求項39記載の方法。

【請求項41】

抗原がサイトカインと融合している、請求項39記載の方法。

【請求項42】

腺癌標的遺伝子又は遺伝子産物の活性を調整する生物学的活性薬剤を開発するための方法であって、

候補の生物学的活性薬剤を、

20

(a) TM7XN1ポリペプチド；

(b) TM7XN1ポリペプチドをコードし発現する核酸を含む細胞；又は

(c) (i) TM7XN1に対応する遺伝子のノックアウト；(ii) TM7XN1をコードする外因性の安定的に伝達された哺乳動物遺伝子配列のうちの一つを含む、腫瘍遺伝子機能のための非ヒトトランスジェニック動物モデルのうちの一つと組み合わせること；並びに腫瘍により誘導された分子及び細胞の変化に対する前記薬剤の効果を決定することを含む、方法。

【請求項43】

生物学的活性薬剤が、発現を下方制御又は上方制御するものである、請求項42記載の方法。

30

【請求項44】

生物学的活性薬剤が、ポリペプチドの活性を阻害するか又は増加させるものである、請求項42記載の方法。

【請求項45】

非黒色腫瘍の診断又は病期決定のための方法であって、TM7XN1の発現の上方制御又は下方制御を決定することを含む、方法。

【請求項46】

決定が、腫瘍細胞内のmRNA又はポリペプチドの量の増加又は減少を検出することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項47】

非黒色腫瘍の画像化の方法であって、

イメージング部分と結合している、TM7XN1タンパク質と特異的に結合する化合物を、有効量、患者へ投与すること；及び

複合体のイメージング部分を可視化することを含む、方法。

40

【請求項48】

化合物が血管内投与によって投与される、請求項47記載の方法。

【請求項49】

化合物が抗体又は抗体断片である、請求項48記載の方法。

【請求項50】

イメージング部分が、X線撮影用部分、陽電子放射部分、光学的に可視の色素、光学的

50

に可視の粒子、及び磁気スピンコントラスト部分からなる群より選択される、請求項47記載の方法。

【請求項51】

非黒色腫瘍を処置する方法であって、1個または複数の細胞毒性部分と結合している、TM7XN1タンパク質と特異的に結合する化合物を、治療的な量、投与することを含む、方法。

【請求項52】

化合物が血管内投与によって投与される、請求項51記載の方法。

【請求項53】

化合物が抗体又は抗体断片である、請求項51記載の方法。

10

【請求項54】

抗体がヒト抗体である、請求項53記載の方法。

【請求項55】

抗体がTM7XN1の細胞外ドメインと特異的に結合するものである、請求項53記載の方法。

【請求項56】

細胞毒性部分が、放射性部分、化学毒性部分、及び毒素タンパク質部分からなる群より選択される、請求項51記載の方法。

【請求項57】

非黒色腫瘍に対する免疫応答を増強するための方法であって、TM7XN1ポリペプチドの抗原を含む免疫原性組成物を宿主へ投与することを含む、方法。

20

【請求項58】

投与工程が、単離された樹状細胞を抗原と共にインキュベートすることをさらに含む、請求項57記載の方法。

【請求項59】

抗原がサイトカインと融合している、請求項57記載の方法。

【請求項60】

非黒色腫瘍的遺伝子又は遺伝子産物の活性を調整する生物学的活性薬剤を開発するための方法であって、

候補の生物学的活性薬剤を、

(a) TM7XN1ポリペプチド；

30

(b) TM7XN1ポリペプチドをコードし発現する核酸を含む細胞；又は

(c) (i) TM7XN1に対応する遺伝子のノックアウト；(ii) TM7XN1をコードする外因性の安定的に伝達された哺乳動物遺伝子配列のうちの一つを含む、腫瘍遺伝子機能のための非ヒトトランスジェニック動物モデルのうちいずれか一つと組み合わせること；並びに腫瘍により誘導された分子及び細胞の変化に対する前記薬剤の効果を決定することを含む、方法。

【請求項61】

生物学的活性薬剤が、発現を下方制御又は上方制御するものである、請求項60記載の方法。

【請求項62】

生物学的活性薬剤が、ポリペプチドの活性を阻害するか又は増加させるものである、請求項60記載の方法。

40

【請求項63】

腎臓癌の診断又は病期決定のための方法であって、TM7XN1の発現の上方制御又は下方制御を決定することを含む、方法。

【請求項64】

決定が、脳腫瘍細胞内のmRNA又はポリペプチドの量の増加又は減少を検出することを含む、請求項63記載の方法。

【請求項65】

腎臓癌の画像化の方法であって、

50

イメージング部分と結合している、TM7XN1タンパク質と特異的に結合する化合物を、有効量、患者へ投与すること；及び複合体のイメージング部分を可視化することを含む、方法。

【請求項66】

化合物が血管内投与によって投与される、請求項65記載の方法。

【請求項67】

化合物が抗体又は抗体断片である、請求項65記載の方法。

【請求項68】

イメージング部分が、X線撮影用部分、陽電子放射部分、光学的に可視の色素、光学的に可視の粒子、及び磁気スピンコントラスト部分からなる群より選択される、請求項65記載の方法。 10

【請求項69】

腎臓癌を処置する方法であって、1個または複数の細胞毒性部分と結合している、TM7XN1タンパク質と特異的に結合する化合物を、治療的な量、投与することを含む、方法。

【請求項70】

化合物が血管内投与によって投与される、請求項69記載の方法。

【請求項71】

化合物が抗体又は抗体断片である、請求項69記載の方法。

【請求項72】

抗体がヒト抗体である、請求項71記載の方法。 20

【請求項73】

抗体がTM7XN1の細胞外ドメインと特異的に結合するものである、請求項71記載の方法。

【請求項74】

細胞毒性部分が、放射性部分、化学毒性部分、及び毒素タンパク質部分からなる群より選択される、請求項69記載の方法。

【請求項75】

腎臓癌に対する免疫応答を増強するための方法であって、TM7XN1ポリペプチドの抗原を含む免疫原性組成物を宿主へ投与することを含む、方法。

【請求項76】

投与工程が、単離された樹状細胞を抗原と共にインキュベートすることをさらに含む、請求項75の方法。 30

【請求項77】

抗原がサイトカインと融合している、請求項75記載の方法。

【請求項78】

腎臓癌標的遺伝子又は遺伝子産物の活性を調整する生物学的活性薬剤を開発するための方法であって、候補の生物学的活性薬剤を、
(a) TM7XN1ポリペプチド；
(b) TM7XN1ポリペプチドをコードし発現する核酸を含む細胞；又は
(c) (i) TM7XN1に対応する遺伝子のノックアウト；(ii) TM7XN1をコードする外因性の安定的に伝達された哺乳動物遺伝子配列のうちの一つを含む、腫瘍遺伝子機能のための非ヒトトランスジェニック動物モデルのうちいずれか一つと組み合わせること；並びに腫瘍により誘導された分子及び細胞の変化に対する前記薬剤の効果を決定することを含む、方法。 40

【請求項79】

生物学的活性薬剤が、発現を下方制御又は上方制御するものである、請求項78記載の方法。

【請求項80】

生物学的活性薬剤が、ポリペプチドの活性を阻害するか又は増加させるものである、請求項78記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

腫瘍の中でも、脳の腫瘍は、長期生存にとって最も都合の悪い予後の1つを有すると考えられており：中枢神経系（CNS）腫瘍を有すると診断された個体の平均余命は、わずか8～12ヶ月である。脳及びその特定の型の新生物細胞の両方に、いくつかの特有の特徴があるため、脳腫瘍の完璧な処置及び管理は困難となっている。これらの中には、頭蓋内空間の物理的特徴；身体の残部からの脳の相対的な生物学的隔離；器官塊の比較的不可欠の交換不可能な性質；及び脳腫瘍細胞の特有の性質が含まれる。

10

【0002】

脳の頭蓋内空間及び物理的レイアウトは、処置及び回復に対する大きな障害を作出している。脳は、脳塊の大半を構成し神経細胞のための足場及び支持体として機能している星状細胞、神経系の実際の電気的衝撃を伝導する神経細胞、並びにミエリンを作製する絶縁性の乏突起膠細胞のような、その他の少数派の細胞集団から主として構成されている。これらの細胞型は、星状細胞腫、神経芽腫、神経膠芽腫、乏突起膠腫等を含む原発性脳腫瘍を生じさせる。

【0003】

脳は、強固な頭蓋の殻に格納されており、脳脊髄液のクッションにより保護されている。頭蓋腔の比較的小さな体積のため、脳内の組織の体積の微小な変化は、頭蓋内圧力を劇的に増加させ、器官全体の傷害を引き起こし得る。従って、小さな腫瘍ですら、脳の機能に対し、顕著な有害な影響を及ぼす場合がある。頭蓋の窮屈な物理的位置のため、脳の手術及び処置も、困難で微妙な手技である。しかしながら、腫瘍による増加した頭蓋内圧力の危険のため、脳腫瘍の処置においては、手術が最初の攻撃戦略となる場合が多い。

20

【0004】

物理的な隔離に加え、脳は、「血液脳関門」（又はBBB）によって、身体の残部から化学的にも生物学的にも隔離されている。この生理学的現象は、脳内の血管の裏打ちにおける上皮細胞間結合の「密着性」による。細胞裏打ちを通り能動輸送される栄養素は、脳に到達することができるが、血流由来のその他の分子は排除される。これは、毒素、ウイルス、及びその他の潜在的に危険な分子が脳腔に進入するのを防止する。しかしながら、それは、他の型の腫瘍において有用な多くの化学療法剤を含む治療用分子が、脳内へ通過することも防止する。従って、脳へと指向化される多くの療法剤は、例えばオマヤレザバー（Ommaya reservoir）により、脳腔へと直接送達されるか、又はBBBを通した有効量の拡散を保証するために上昇させた投薬量で投与されなければならない。

30

【0005】

化学療法薬を脳へと投与することは困難であることから、放射線療法アプローチも試行されている。しかしながら、潜在的な腫瘍生成細胞を完全に破壊するのに必要な量の放射線は、許容されない健康な脳組織の損失をも生ずる。腫瘍塊を排除しつつ患者の認知機能を保持することは、脳腫瘍治療におけるもう一つの難題である。新生物脳細胞は、しばしば、蔓延しやすく、脳塊全体に移動する。従って、例えば肺癌又は膀胱癌とは異なり、真の「腫瘍の縁」を画定することは不可能である。生殖器（卵巣、子宮、精巣、前立腺等）の癌、乳癌、腎臓癌、又は肺癌とは異なり、新たな腫瘍の成長を防止するために、器官全体を除去することはできないし、又は相当部分を除去することすらできない。さらに、脳腫瘍は、極めて不均一であり、腫瘍を構成している様々な細胞集団間で、細胞倍加時間、治療抵抗性、及びその他の生化学的特異体質が異なっている。この広範性及び可変性は、正常脳組織の健康及び機能を温存しつつ脳腫瘍を処置することの困難さを大きく増加させる。

40

【0006】

現在の外科的方法は、かなり良好な術後生活を患者に提供するようになったが、現在の組み合わせ療法（手術、低線量放射線、及び化学療法）は、30年前の方法と比較して、1

50

ヶ月、患者の平均余命を改善したにすぎない。主要な腫瘍塊の外部に存在する脳腫瘍細胞の成長を防止するための有効な薬剤が存在しないため、これらの患者の予後は大きくは改善され得ない。いくつかのイムノアフィニティ剤が提唱され、脳腫瘍の処置のために試験されているが（例えば、米国特許第5,624,659号に記載されたテネイシンターゲティング剤を参照されたい）、これらの薬剤は、脳腫瘍の処置にとって十分であることが立証されていない。従って、脳腫瘍の処置のため、新たな分子標的へと指向化された、脳腫瘍細胞を特異的にターゲティングし死滅させることができる治療剤が、緊急に必要とされている。

【0007】

関連文献

膠芽腫における差次的な遺伝子発現の分析は、特に、例えばMarianiら（2001）J Neuro oncol 53（2）：161-76；Markertら（2001）Physiol Genomics 5（1）：21-33；Yanoら（2000）Neurol Res 22（7）：650-6；Kroesら（2000）Cancer Lett 156（2）：191-8；及びReisら（2000）Am J Pathol 156（2）：425-32に見い出され得る。

【発明の開示】

【0008】

発明の概要

本発明は、脳腫瘍において過剰発現されていることが同定されており、従って、この標的に対する特異的親和性を有する治療用又は可視化用の組成物による細胞機能の選択的な阻害又は可視化のための選択的なマーキングを可能にするTM7XN1タンパク質をターゲティングすることにより、治療及びイメージングの両方の目的のため、脳腫瘍新生物細胞を特異的にターゲティングするための方法及び試薬を提供する。このタンパク質は、腺癌細胞、非黒色腫瘍細胞、及び腎臓癌細胞からの組織にも発現している。本発明は、そのような腫瘍に関連しているTM7XN1遺伝子の発現又はTM7XN1遺伝子産物の活性を調整する薬剤、例えば小さな有機化合物、抗体等の同定のための方法、及びそのような腫瘍に罹患している個体へそのような薬剤を投与することによる疾患の処置のための方法も、提供する。

【0009】

態様の詳細な説明

腫瘍標的タンパク質TM7XN1及び対応する遺伝子配列は、脳腫瘍組織と正常脳組織との間で差次的に発現されている。そのタンパク質は、腺癌細胞、非黒色腫瘍細胞、及び腎臓癌細胞からの組織にも発現している。癌性脳と正常脳との間のディファレンシャルクロニングによって、DNA配列分析により、この脳腫瘍タンパク質標的遺伝子が同定された。神経膠芽腫において上方制御される遺伝子及びそれらのタンパク質産物は、新生物細胞に関する特異的マーカーを提供し、脳腫瘍の開始及び進行を媒介すると予測されるため、重要である。遺伝子及び/又はタンパク質の活性の阻害は、脳腫瘍、例えば多形性神経膠芽腫；上衣腫；膠腫；星状細胞腫；髄芽腫；神経膠腫；乏突起膠腫；髄膜腫等の処置において有利であり得る。

【0010】

過剰発現された脳腫瘍タンパク質標的は、直接的に腫瘍細胞死を促進するため細胞毒性剤を送達するか、又は腫瘍細胞の正常な生理学を阻害するため脳腫瘍タンパク質標的の機能を改変する免疫療法剤のための優れた標的を提供する。本発明の一つの態様において、高い親和性でTM7XN1の細胞外領域と特異的に結合するヒト抗体又はヒト化抗体が提供される。その抗体の細胞外領域との結合によって、受容体の下方制御もしくは生物学的活性の減少、並びに細胞の増殖、浸潤の減少、及び/又は腫瘍サイズの減少が起こり得る。好ましい態様において、抗TM7XN1抗体は、配列番号：2の1～401アミノ酸を含むTM7XN1の細胞外ドメイン、又はその断片と結合する。

【0011】

脳腫瘍タンパク質標的へとターゲティングされたイムノイメージング剤は、例えばイムノイメージング剤内の光学的に可視の色素部分の使用等により、診断法、例えば磁気共鳴画像法（MRI）、ラジオグラフィ等において、かつ/又は手術において、腫瘍塊を可視

10

20

30

40

50

化するために利用され得る。

【0012】

脳腫瘍に罹患した、又はそのリスクが高い個体のための治療的及び予防的な処置法には、TM7XN1タンパク質もしくは遺伝子の活性を調整するか、又はTM7XN1タンパク質と特異的に結合する薬剤を、治療的又は予防的な量、投与することが含まれる。例えば、化学療法剤が、TM7XN1特異的結合部分とカップリングさせられ得る。

【0013】

スクリーニング法には、TM7XN1遺伝子もしくはタンパク質の発現もしくは活性を調整する薬剤を同定するための様々な型のアッセイ法の実施が含まれる場合、又はTM7XN1遺伝子もしくはタンパク質との特異的結合活性に関するスクリーニングが含まれる場合がある。これらのスクリーニングにおいて同定されたリード化合物及び/又は結合部分は、より高活性の類似体の合成のための基礎として活用され得る。リード化合物及び/又はそれらから生成した活性類似体は、脳腫瘍の処置において有効な薬学的組成物へと製剤化され得る。

10

【0014】

Gタンパク質共役受容体(GPCR)は、(様々な自己分泌、傍分泌、及び内分泌の過程を含む)広範囲の機能を包含する広大なタンパク質ファミリーを構成している。それらの配列は、配列レベルでは大きな多様性を示し、その多様性が、タンパク質の別個のグループへの分類の基礎を提供する。GPCRの主要なファミリーには、ロドプシン様GPCR、セクレチン様GPCR、cAMP受容体、及び代謝共役型グルタミン酸受容体ファミリーが含まれる。

20

【0015】

3Dフレームワークは他のGPCRと類似しているにも関わらず、セクレチン様受容体は、独特の「7TM」サインを有している。GPCR TM7XN1は、セクレチン様受容体ファミリーのメンバーであり、その配列は、Fredrikssonら(2002)FEBS Lett.531(3):407-14;Liuら(1999)Genomics 55(3):296-305;及びZendmanら(1999)FEBS Lett.446(2-3):292-8により記載されている。TM7XN1は、極端に大きなN末端細胞外領域(381アミノ酸)を有しており、第1膜貫通ドメインの直前に位置する4個のシステイン残基からなる新規のシステインボックスを含有しているという点で、他のセクレチン様ファミリーのメンバーと相違している。アミノ末端ドメインの残りは、ムチン様タンパク質と類似している多数の可能なN結合型及びO結合型のグリコシル化部位を含有している。これらの特色は、それが細胞-細胞相互作用において役割を果たしている可能性があることを示唆している。短いC末端は、いくつかのリン酸化部位及び推定AMP結合ドメイン(aa675~686)を含有しており、このことは、TM4とTM5との間の可能性のあるチロシンキナーゼリン酸化部位(aa546)と共に、シグナル伝達コンポーネントとの相互作用を暗示している可能性がある。

30

【0016】

疾患状態

本発明の方法は、脳腫瘍、特に神経膠芽腫に適用可能である。一般に、脳腫瘍処置の目標は、例えば手術により、できる限り多くの腫瘍細胞を除去し、放射線療法及び/又は化学療法により、術後に残った細胞を可能な限り多く死滅させ、放射線療法及び化学療法により、可能な限り長く、残存腫瘍細胞を非分裂性の休止状態に置くことである。腫瘍の再成長は、現在の処置の変更、又は観察期の患者については処置の再開を必要とするため、注意深い画像監視は、医療の重要な部分である。

40

【0017】

脳腫瘍は、腫瘍が起因したと考えられる細胞の種類によって分類される。びまん性線維性星状細胞腫は、成人における原発性脳腫瘍のうち最も一般的な型である。これらの腫瘍は、組織病理学的に、世界保健機関(WHO)グレードII星状細胞腫、WHOグレードIII退形成性星状細胞腫、及びWHOグレードIV多形性神経膠芽腫(GBM)という三つの悪性度グレードへと類別される。WHOグレードII星状細胞腫は、びまん性の星状細胞腫スペクトルの中で最も不活性のものである。星状細胞腫は、周囲の脳への顕著な浸潤傾向を示し、従って治療的な局所調節の試みは困難である。これらの侵襲能は、高グレード腫瘍のみならず低

50

グレード腫瘍においても認められることが多い。

【0018】

多形性神経膠芽腫は、最も悪性度が高い星状細胞腫の病期であり、生存期間は、大部分の患者で2年未満である。組織学的には、これらの腫瘍は、高密度細胞性、高い増殖指数、内皮増殖、及び局部的壊死により特徴づけられる。これらの病変の高度の増殖性は、複数の分裂促進効果に起因する可能性が高い。GBMの特徴のうちの一つは、内皮増殖である。GBMにおいては、多数の血管形成性増殖因子及びそれらの受容体が見い出される。

【0019】

星状細胞腫には生物学的なサブセットが存在しており、それは、これらの腫瘍において観察される臨床的不均一性を反映している可能性がある。これらのサブセットには、悪性の経過をたどる場合が多い、小児びまん性線維性星状細胞腫の一形態である脳幹膠腫が含まれる。脳幹GBMは、比較的低年齢の患者が発症する成人GBMと共通の遺伝学的特質を有している。多形性黄色星状膠細胞腫（PXA）は、低年齢の成人が主に発症する表層性の低グレードの星状細胞腫瘍である。これらの腫瘍は、奇妙な組織学的様相を有するが、典型的には、外科的に治癒されやすい成長の遅い腫瘍である。しかしながら、PXAは、GBMとして再発する場合もある。毛様細胞性星状細胞腫は、小児の最も一般的な星状細胞腫瘍であり、成人で発症するびまん性線維性星状細胞腫とは臨床的にも組織病理学的にも異なっている。毛様細胞性星状細胞腫は、びまん性線維性星状細胞腫と同じゲノム改変は有していない。上衣下巨細胞星状細胞腫（SEGA）は、通常、結節性硬化症（TS）と関連しており、TS患者の脳室を裏打ちしているいわゆる「キャンドルガタリングス（candle-gutterings）」と組織学的には同一の、脳室周囲の低グレードの星状細胞腫瘍である。TSにおける他の腫瘍性病変と同様に、これらは、成長が遅く、真の新生物よりも過誤腫と類似している。乳児線維形成性大脳星状細胞腫（DCAI）及び線維形成性乳児神経節膠腫（DIGG）は、生後1年又は2年の子供が発症する、大きい、表層性の、通常は嚢胞性の、良性星状細胞腫である。

10

20

【0020】

乏突起膠腫及び乏突起星状細胞腫（混合膠腫）は、臨床的にも生物学的にもびまん性線維性星状細胞腫と最も密接に関係している、びまん性の、通常は大脳の腫瘍である。しかしながら、これらの腫瘍は星状細胞腫ほど一般的ではなく、一般に、びまん性星状細胞腫より良好な予後を有する。乏突起膠腫及び乏突起星状細胞腫は、WHOグレードIII退形成性乏突起膠腫もしくは退形成性乏突起星状細胞腫、又はWHOグレードIV GBMへと進行する場合がある。従って、乏突起膠細胞の腫瘍へと至る遺伝学的変化は、さらにもう一つのGBMへの経路を構成している。

30

【0021】

上衣腫は、小児の攻撃的な脳室内腫瘍から、成人における良性脊髄腫瘍までである、臨床的に多様な膠腫の群である。上衣腫のGBMへの推移は、稀である。脈絡叢腫瘍も、小児の攻撃的なテント上脳室内腫瘍から、成人の良性小脳橋角腫瘍までである、脳室系に優先的に発生する多様な腫瘍の群である。脈絡叢腫瘍は、リー・フラウメニ（Li-Fraumeni）症候群及びフォン・ヒッペル・リンドウ（von Hippel-Lindau）（VHL）病を有する患者において時々報告されている。

40

【0022】

髄芽腫は、主として小児において、後窩で発生する高度に悪性の未分化な腫瘍である。髄膜腫は、髄膜で発生し基底脳を圧迫する一般的な頭蓋内腫瘍である。髄膜腫は、通常、良性であるが、局所的に再発する「非定形」髄膜腫も存在するし、明らかに悪性であり脳に侵入又は転移する髄膜腫も存在する。非定形髄膜腫及び悪性髄膜腫は、良性髄膜腫ほどは一般的でない。神経鞘腫は、末梢神経上で発生する良性腫瘍である。神経鞘腫は、脳神経、特にそれらが小脳橋角塊として存在する第8脳神経の前庭部分（前庭シュワン腫、聴神経腫）に発生する。血管芽腫は、内皮細胞、周皮細胞、及びいわゆる間質細胞から構成される、起源が不明の腫瘍である。これらの良性腫瘍は、低年齢の成人の小脳及び脊髄に最も頻発する。多発性血管芽腫は、フォン・ヒッペル・リンドウ（VHL）病の特徴である

50

。血管周囲細胞腫（HPC）は、局所的に攻撃的な挙動を示し、転移することもある硬膜の腫瘍である。硬膜に基づく血管周囲細胞腫（HPC）の組織発生は、長年議論されており、別個の実体として分類している著者もいるし、髄膜腫のサブタイプとして分類している著者もいる。

【0023】

原発性脳腫瘍の症状も、転移性脳腫瘍の症状も、脳内の位置及び腫瘍のサイズに主に依存する。脳の各区域が特定の機能を担っているため、症状は大きく変動すると考えられる。脳の前頭葉における腫瘍は、衰弱及び麻痺、精神病、思考の障害、錯乱及び見当識障害、並びに広い気分変動を引き起こし得る。頭頂葉腫瘍は、発作、無感覚又は麻痺、筆記の障害、単純な数学問題に回答する能力の喪失、ある種の動作の障害、及び触感の消失を引き起こし得る。後頭葉の腫瘍は、各視野の半分の視覚の欠損、幻視、及び発作を引き起こし得る。側頭葉腫瘍は、発作、知覚及び空間の障害、及び受容失語症を引き起こし得る。腫瘍が小脳に発生した場合には、運動失調、協調の欠損、頭痛、及び嘔吐が起こり得る。視床下部の腫瘍は、情動の変化、並びに熱さ及び冷たさの知覚の変化を引き起こし得る。さらに、視床下部腫瘍は、小児の成長及び栄養に影響することがある。小脳を例外として、脳の片側の腫瘍は、身体の反対側において症状及び障害を引き起こす。

10

【0024】

本発明の組成物により処置又は画像化され得るその他の神経系の疾患には、虚血性発作、脳癌、てんかん、精神分裂病、抑うつ、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞蹈病、頭部外傷、痴呆、昏睡、昏迷、頭痛（及びその他の神経学的疼痛）、めまい、衰弱、重症筋無力症（及びその他の神経筋結合部の障害）、運動失調、及び小脳障害、（ベル麻痺のような）脳神経障害、脳血管障害、細菌感染、真菌感染、ウイルス感染、及び寄生虫感染を含む感染性障害、多発性硬化症、並びに妊娠、内科的疾患、アルコール乱用及び物質乱用、毒素、及び代謝欠損と関連したその他の合併症が含まれるが、これらに限定はされない。

20

【0025】

肺癌には、小細胞癌及び非小細胞癌という二つの主要な型が存在し、非小細胞肺癌には異なるサブタイプが存在する。各々の型は、異なる方式で成長し蔓延し、異なる処置を受ける。非小細胞は、肺癌の最も一般的な型であり、顕微鏡下での外観のため燕麦細胞癌としても知られる小細胞型より、ゆっくりと成長し蔓延する。小細胞肺癌は、体内の他の器官に蔓延する可能性がより高い。肺癌の約40パーセントは腺癌である。その他の腺癌には、結腸癌、卵巣癌、及び子宮内膜癌が含まれる。

30

【0026】

腎細胞癌は、成人の悪性疾患のおよそ3%、そして腎臓から発生する新生物の90~95%を占める。それは、副腎腫又は明細胞癌としても知られている。腎細胞癌は、腎臓から発生する最も一般的な腫瘍であり、米国においては毎年約30,000例が診断されている。

【0027】

非黒色腫細胞癌は、二番目に一般的な皮膚癌である。それには、基底細胞癌及び扁平上皮癌が含まれる。米国における非黒色腫癌の年間症例数は、およそ100万である。扁平上皮癌は、粘膜を含む身体のあらゆる区域に起こり得るが、日光に曝された区域に最も好発する。皮膚が、ある種の損傷：熱傷、斑痕、長期的な潰瘍、以前にX線を被曝した部位等を有している場合にも、扁平上皮癌が起こり得る。さらに、慢性的な皮膚の炎症、又は長期にわたり免疫系を抑制する医学的状態は、扁平上皮癌の発達を助長する可能性がある。口腔、唇、及び口蓋の癌は、このカテゴリに属する。

40

【0028】

脳腫瘍標的としてのTM7XN1の同定

TM7XN1をコードする配列の全部又は一部を含む遺伝子配列を、正常又は非疾患の状態と比べて差次的に脳腫瘍細胞、特に膠芽腫細胞において発現させ、「T_{B,T}タンパク質」をコードする「T_{B,T}遺伝子」として呼ばれる場合もある。T_{B,T}遺伝子は、サブトラクションを受け標準化されたcDNAライブラリーを膠芽腫組織から作出することにより同定された。対照

50

状態及び疾患状態に由来するcDNAが、速度論的再アニーリングハイブリダイゼーションに供され、その間、転写物の存在量の標準化及び存在量の低い転写物の濃縮が行われた。2000年7月28日出願の同時係属中の米国特許出願第09/627,362号に記載のように、腫瘍において差次的に上方制御又は下方制御される転写物は、第二ドライバーcDNAを使用することにより、その後の「順方向」又は「逆方向」のサブトラクション工程により濃縮され得る。有意な転写の誘導及び/又は抑制を示すクローンのみが、配列決定され、多様な時間的、空間的、及び疾患関連プローブセットを使用した発現プロファイリングへと進められた。有意な転写の誘導及び/又は抑制を示す選択されたクローンが、配列決定され、所有データベース構造において機能アノテーションが行われた(国際公開公報第01/13105号参照)。大きな配列断片が配列決定工程において使用されたため、生じたデータは、SAGEのような他のアプローチよりはるかに高い信頼性及び特異性を有している。得られた配列情報は、DNA配列比較のためのBLAST(blastn)アルゴリズム及びタンパク質配列比較のための反復スミス・ウォーターマン分析を使用して、公共データベースと比較された。ヒトTM7XN1の配列は、本明細書により配列番号:1(ヌクレオチド)および配列番号:2(アミノ酸)の配列として提供される。

10

AGY 番号	説明	ヌクレオチド・アクセッション	配列番号	タンパク質アクセッション	配列番号	付加的なアクセッション
AL00003_CP1_J03	ホモ・サピエンスGタンパク質共役受容体56 (GPR56)	NM_005682	1	NP_005673	2	AJ011001, XM_007954

20

【0029】

以前はTM7XN1/GPR56配列と呼ばれたGenbank登録アクセッション番号XM_007954は、NCBIから除去され、新たなアクセッションXM_005682と交換された。「付加的なアクセッション」の列は、更新された説明及び同一の相同性を有する付加的なヌクレオチド配列を表す。

【0030】

「差次的な発現」とは、本明細書において使用されるように、遺伝子の時間的及び/又は組織的な発現パターンの量的及び質的な差をさす。従って、差次的に発現されたTM7XN1遺伝子は、疾患状態に比して正常状態において、又は実験状態に比して対照状態において、活性化又は不活化される発現を有し得る。そのような質的に制御された遺伝子は、対照試料又は腫瘍試料のいずれかで検出可能であり、両方では検出可能でない、特定の組織又は細胞型における発現パターンを示すと考えられる。検出可能とは、本明細書において使用されるように、当業者に周知のディファレンシャルディスプレイ、(逆転写)PCR、及び/又はノーザン分析の標準的な技術を介して検出可能なRNA発現パターンをさす。一般に、差次的な発現とは、例えば、非神経組織に関して、疾患組織における発現と対照組織における発現との間に、少なくとも20%の変化、他の例においては、少なくとも2倍、3倍、5倍、又は10倍の差が存在することを意味する。差は、通常、統計的に有意、即ち偶然に起こる差の確率(P値)が、予め決定されたレベル(例えば、5%)より低いものである。通常、信頼区間(P値)は、<0.05、より典型的には<0.01、他の例においては<0.001

30

40

【0031】

又は、差次的に発現されたTM7XN1遺伝子は、疾患状態に比して正常状態において、又は実験状態に比して対照状態において、調整される、即ち量的に増加又は減少する発現を有し得る。発現の差は、前記のような標準的な検出技術を介して可視化され得る程度に十分に大きいことのみを必要とする。一般に、mRNA又はタンパク質産物のいずれかの存在によって測定された発現レベルの差は、少なくとも約2倍、通常少なくとも約5倍、基底レベル(即ち、正常組織)と異なると考えられるが、10倍又は100倍又はそれ以上であってもよい。

【0032】

50

差次的に発現されることが同定された配列は、腫瘍の開始、進行、又は維持において遺伝子が役割を果たしているか否かを決定するため、機能確認プロセスに供され得る。「機能確認」という用語は、本明細書において使用されるように、候補遺伝子の発現又は機能の調整が、組織又は生物全体のような細胞集団であり得る参照細胞に関する細胞の活性又は細胞の状態の検出可能な変化を引き起こすか否かを決定するためのプロセスをさす。検出される検出可能な変化又は改変は、参照細胞により示される任意の活性であり得る。改変が検出され得る活性又は状態の具体例には、表現型の変化（例えば、細胞形態学、細胞増殖、細胞生存、及び細胞死）；過去の感受性に対する抵抗性、又は以前には存在しなかった感受性の細胞による獲得；タンパク質/タンパク質相互作用；細胞移動；細胞内又は細胞間のシグナル伝達；細胞/細胞相互作用；細胞活性化（例えば、T細胞活性化、B細胞活性化、肥満細胞脱顆粒）；細胞構成成分（例えば、ホルモン、ケモカイン等）の放出；並びに代謝反応又は異化反応（これらに制限はされない）が含まれる。

10

【0033】

候補遺伝子の機能バリデーションを行うには、多様なオプションが利用可能である。例えば、候補遺伝子発現の妨害を検出するための（即ち、候補遺伝子サイレンシングを検出するための）多数のオプションが利用可能である。一般に、発現の阻害は、候補遺伝子によってコードされたタンパク質のレベルの減少を検出することにより、遺伝子から転写されたmRNAのレベルを決定することにより、かつ/又は候補遺伝子発現に関連した表現型の変化を検出することにより検出される。

【0034】

RNAi技術のような方法が、使用され得る。アンチセンス技術も、候補遺伝子の機能確認に使用され得る。このアプローチでは、候補遺伝子のコーディング配列のセグメントと特異的にハイブリダイズするアンチセンスポリヌクレオチドが、それが導入される細胞における候補遺伝子の発現を阻害するために投与される。候補遺伝子が細胞内で果たしている機能的な役割は、候補遺伝子を一方又は両方の対立遺伝子において欠失させるか、修飾するか、又は阻害する遺伝子「ロックアウト」アプローチを使用して査定されてもよい。細胞又は動物は、場合により、さらなる分析の一部として野生型候補遺伝子を用いて再構成され得る。

20

【0035】

本発明の一つの態様において、RNAi技術が、機能確認において使用される。本明細書において使用されるように、RNAi技術とは、候補遺伝子の発現を阻害するため、即ちその発現の「サイレンシング」のため、候補遺伝子を発現している細胞へ二本鎖RNAが導入されるプロセスをさす。dsRNAは、候補遺伝子との実質的な同一性を有するよう選択される。一般に、そのような方法は、まず、候補遺伝子の全部又は一部を含有している核酸を、一本鎖又は二本鎖のRNAへと転写することを含む。センスRNA鎖とアンチセンスRNA鎖とが、dsRNAが形成されるよう適切な条件の下でアニーリングさせられる。得られたdsRNAが、様々な方法を介して参照細胞へと導入され、候補遺伝子の発現の減弱の程度が、様々な技術を使用して測定される。通常、阻害が細胞の状態又は細胞の活性を改変するか否かが検出される。

30

【0036】**核酸**

TM7XN1核酸配列は、診断及び治療の方法、並びにコードされたポリペプチドの組換え作製等において有益である。本発明の核酸には、配列番号：1との高度の配列類似性又は配列同一性を有する核酸が含まれる。配列同一性は、ストリンジентな条件、例えば50またはそれ以上及び0.1×SSC（9mM NaCl/0.9mMクエン酸Na）の下でのハイブリダイゼーションにより決定され得る。ハイブリダイゼーションの方法及び条件は、当技術分野において周知であり、例えば、米国特許第5,707,829号を参照されたい。提供された核酸配列と実質的に同一の核酸、例えば対立形質バリエーション、遺伝学的に改変された遺伝子のバージョン、スプライスバリエーション等は、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件の下で、表1に提供された配列のうちの1個と結合する。核酸の調製に関するさらなる具体的な

40

50

指針は、Fleuryら (1997) *Nature Genetics* 15: 269-272; Tartagliaら、国際公開公報第 96/05861号; 及びChenら、国際公開公報第00/06087号(各々、完全に本明細書に組み込まれる)により提供される。

【0037】

TM7XN1配列は、適切なcDNA又はゲノムDNAライブラリーの中の遺伝子を検出するための適切なプローブの使用、共有された構造的性質を有するクローニングされたDNA断片を検出するための発現ライブラリーの抗体スクリーニング、直接的な化学合成、及び増幅プロトコル(これらに制限はされない)を含む、当業者に周知の様々な方法を使用して入手され得る。ライブラリーは、好ましくは、正常脳又は脳腫瘍の細胞又は組織より調製される。クローニング法は、Berger及びKimmel、*Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, 152 (Academic Press, Inc. San Diego, CA); Sambrookら (1989) *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (第2版) 第1~3巻 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY); 並びにCurrent Protocols (1994) (Greene Publishing Associates, Inc.とJohn Wiley and Sons, Incとの共同出版)に記載されている。

【0038】

部分コーディング配列又は非コーディング配列を含有しているクローンから得られた配列は、RACE方法 (Chenchikら (1995) *CLONTECHniques (X)* 1: 5-8) を使用することにより、完全コーディング領域を得るために使用され得る。オリゴヌクレオチドが、部分クローンの分析された配列から設計され、その後、完全コーディング配列をコードする逆転写されたmRNAを増幅するために使用され得る。又は、プローブが、遺伝子が転写される適切な細胞又は細胞系から調製されたcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。標的核酸が同定された後、それは、周知の増幅技術を使用して単離されクローニングされ得る。そのような技術には、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、リガーゼ連鎖反応 (LCR)、Q⁻レプリカーゼ増幅、自律配列複製系 (self-sustained sequence replication system) (SSR)、及び転写に基づく増幅系 (TAS) が含まれる。そのような方法には、例えばMullisらの米国特許第4,683,202号; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innisら編) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990); Kwohら (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173; Guatelliら (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874; Lomellら (1989) *J. Clin. Chem.* 35: 1826; Landegrenら (1988) *Science* 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) *Biotechnology* 8: 291-294; Wu及びWallace (1989) *Gene* 4: 560; 並びにBarringerら (1990) *Gene* 89: 117に記載されたものが含まれる。

【0039】

核酸のクローニングの代わりに、適当な核酸を化学合成することもできる。直接化学合成法には、例えばNarangら (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 90-99のホスホトリエステル法; Brownら (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 109-151のホスホジエステル法; Beaucageら (1981) *Tetra. Lett.*, 22: 1859-1862のジエチルホスホロアミダイト法; 及び米国特許第4,458,066号の固相法が含まれる。化学合成により、一本鎖オリゴヌクレオチドが作製される。これは、相補的な配列とのハイブリダイゼーションによって、又は一本鎖を鋳型として使用したDNAポリメラーゼによる重合によって、二本鎖DNAへと変換され得る。DNAの化学合成は、約100塩基の配列に制限される場合が多く、より長い配列は、より短い配列のライゲーションにより入手され得る。又は、配列をクローニングし、適切な制限酵素を使用して適切な部分配列を切断してもよい。

【0040】

核酸は、cDNA又はゲノムDNA、並びにそれらの断片であり得る。「cDNA」という用語は、本明細書において使用されるように、天然型の成熟mRNA種に見い出される配列要素(エキソン並びに3'及び5'の非コーディング領域)の配置を共有している核酸を全て含むものとする。通常、mRNA種は、介在するイントロンが存在する場合にはそれが核RNAスプライシングによって除去された連続的なエキソンを有しており、本発明のポリペプチドをコードする連続的なオープンリーディングフレームを作出している。

【0041】

目的のゲノム配列は、天然型染色体に通常存在するイントロンを全て含む、挙げられた配列において定義されたような開始コドンと終止コドンとの間に存在する核酸を含む。それは、成熟mRNAに見い出される3'及び5'の非翻訳領域をさらに含んでいてもよい。それは、転写された領域の5'末又は3'末のいずれかに隣接している約1kb(それより大きくてもよい)ゲノムDNAを含む、プロモーター、エンハンサー等のような特定の転写及び翻訳の制御配列をさらに含んでいてもよい。コーディング領域の3'もしくは5'のいずれかに隣接するゲノムDNA、又はイントロンに時々見い出されるような内部制御配列は、適正な組織特異的、段階特異的、又は疾患状態特異的な発現に必要とされる配列を含有しており、腫瘍細胞における発現の上方制御を調査するのに有用である。

10

【0042】

本発明の核酸に特異的なプローブは、配列リストに開示された核酸配列を使用して生成させられ得る。プローブは、好ましくは、配列リストに提供された配列のうちの一つの対応する連続配列の少なくとも約18nt、25nt、又は50nt、又はそれ以上であり、通常、約2、1、又は0.5kb長未満である。好ましくは、プローブは、低い複雑度のマスキングのためのマスキングプログラムの適用の後、マスキングされずに残る連続配列に基づき設計される。二本鎖又は一本鎖の断片は、従来の方法によるオリゴヌクレオチドの化学合成、制限酵素消化、PCR増幅等によって、DNA配列から入手され得る。プローブは、例えば放射性タグ、ビオチン化タグ、又は蛍光性タグにより標識され得る。

20

【0043】

本発明の核酸は、一般的には完全な染色体以外として、実質的に純粋に単離され入手され得る。通常、核酸、DNA又はRNAのいずれかは、他の天然に存在する核酸配列を実質的に含まずに得られ、一般的には少なくとも約50%、通常は少なくとも約90%純粋であり、典型的には「組換え体」であり、例えば、天然に存在する染色体においては通常会合していない1個またはそれ以上のヌクレオチドと隣接している。

【0044】

本発明の核酸は、直鎖状分子として提供されてもよいし、又は環状分子内に提供されてもよく、自律複製性分子(ベクター)、又は複製配列を含まない分子の中に提供されてもよい。核酸の発現は、当技術分野において既知の自己又は他の制御配列によって制御され得る。本発明の核酸は、トランスフェリンポリカチオン媒介DNA移入、裸の核酸又は封入された核酸を用いたトランスフェクション、リポソーム媒介DNA移入、DNAでコーティングされたラテックスビーズの細胞内輸送、プロトプラスト融合、ウイルス感染、電気穿孔、遺伝子銃、リン酸カルシウム媒介移入等のような、当技術分野において使用可能な多様な技術を使用して、適当な宿主細胞へと導入され得る。

30

【0045】

PCRのような増幅反応において使用するため、1対のプライマーが使用されると考えられる。プライマー配列の正確な組成は、本発明にとって重大ではないが、大部分の適用の場合、プライマーは、当技術分野において知られているようなストリンジェントな条件の下で本発明の配列とハイブリダイズすると考えられる。少なくとも約50nt、好ましくは少なくとも約100ntの増幅産物を生成させると考えられる1対のプライマーを選択することが好ましい。プライマー配列の選択のためのアルゴリズムは、一般に既知であり、商業的なソフトウェアパッケージにおいて使用可能である。増幅プライマーは、DNAの相補鎖とハイブリダイズし、相互に向かって複製を開始させると考えられる。ハイブリダイゼーションプローブの場合、安定性及び結合親和性を改良するため、核酸類似体を使用することが望ましい場合がある。「核酸」という用語には、そのような類似体が包含されるものと理解されたい。

40

【0046】

ポリペプチド

TM7XN1ポリペプチドには、スクリーニング法のための用途、抗体を作製するための試薬としての用途、治療薬としての用途等がある。そのようなポリペプチドは、天然起源から

50

の単離、組換え法、及び化学合成により作製され得る。さらに、サイレント変化をもたらすアミノ酸残基の欠失、付加、又は置換を含有しており、従って機能的に等価な差次的に発現される、又は経路の遺伝子産物を産生する、機能的に等価なポリペプチドも、有益であり得る。アミノ酸置換は、含まれる残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性、及び/又は両親媒性に基つき作成され得る。「機能的に等価な」とは、本明細書において使用されるように、配列リストに提供されたような虚血関連遺伝子によりコードされたポリペプチドと実質的に類似のインビボ活性を示すことができるタンパク質をさす。

【0047】

ポリペプチドは、当技術分野において周知の技術を使用して、組換えDNA技術によって作製され得る。当業者に周知の方法が、コーディング配列及び適切な転写/翻訳調節シグナルを含有している発現ベクターを構築するために使用され得る。これらの方法には、例えば、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、及びインビボ組換え/遺伝学的組換えが含まれる。又は、目的のポリペプチドをコードすることができるRNAが、化学合成されてもよい。

10

【0048】

典型的には、コーディング配列は、比較的大量の遺伝子産物を作製するため、所望の宿主細胞において機能性のプロモーターの調節下に置かれる。極めて多様なプロモーターが周知であり、特定の適用に応じて、本発明の発現ベクターにおいて使用され得る。通常、選択されるプロモーターは、プロモーターが活性を有する細胞に依存する。リボソーム結合部位、転写終結部位等のようなその他の発現調節配列も、場合により含まれていてもよい。これらの調節配列を1個またはそれ以上含む構築物は、「発現カセット」と呼ばれる。発現は、プロモーター、及び特定の宿主細胞にとって適切なその他の制御剤を使用して、原核生物及び真核細胞において達成され得る。例示的な宿主細胞には、大腸菌、その他の細菌宿主、酵母、並びにCOS細胞系、CHO細胞系、及びHeLa細胞系、並びに骨髓腫細胞系のような様々な高等真核細胞（これらに制限はされない）が含まれる。

20

【0049】

哺乳動物宿主細胞においては、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等を含む多数のウイルスに基づく発現系が使用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合、目的のコーディング配列は、アデノウイルス転写/翻訳調節複合体、例えば後期プロモーター及び三成分リーダー配列とライゲートさせられる。次いで、このキメラ遺伝子が、インビトロ又はインビボの組換えによってアデノウイルスゲノムへと挿入され得る。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域E1又はE3）における挿入は、生存可能であり、感染宿主において差次的に発現される又は経路の遺伝子タンパク質を発現することができる組換えウイルスをもたらすと考えられる。

30

【0050】

特定の開始シグナルも、遺伝子の効率的な翻訳のために必要とされる場合がある。これらのシグナルには、ATG開始コドン及び隣接配列が含まれる。自己の開始コドン及び隣接配列を含む完全遺伝子が適切な発現ベクターに挿入される場合には、付加的な翻訳調節シグナルは必要とされない場合がある。しかしながら、遺伝子コーディング配列の一部のみが挿入される場合には、外因性の翻訳調節シグナルが提供されなければならない。これらの外因性翻訳調節シグナル及び開始コドンは、天然であってもよいし合成であってもよい様々な起源のものであり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサー要素、転写ターミネーター等の包含によって増強され得る。

40

【0051】

さらに、宿主細胞株としては、挿入された配列の発現を調整するか、又は所望の特定の様式で遺伝子産物の修飾及びプロセッシングを行うものが選択され得る。そのようなタンパク質産物の修飾（例えば、グリコシル化）及びプロセッシング（例えば、分解）は、タンパク質の機能にとって重要である場合がある。異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳後プロセッシング及び修飾のための特徴的な特定のメカニズムを有している。発現された外来タンパク質の正確な修飾及びプロセッシングを保証するため、適切な細胞系又は宿主系が選択さ

50

れ得る。この目標のため、一次転写物の適正なプロセッシング、遺伝子産物のグリコシル化及びリン酸化のための細胞機構を保有している真核宿主細胞が使用され得る。そのような哺乳動物宿主細胞には、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、WI38等が含まれるが、これらに制限はされない。

【0052】

組換えタンパク質の長期的な高収量の作製のためには、安定的な発現が好ましい。例えば、差次的に発現された又は経路の遺伝子タンパク質を安定的に発現する細胞系が工作され得る。ウイルスの複製開始点を含むしている発現ベクターを使用するのではなく、適切な発現調節要素によって調節されたDNA及び選択可能マーカーにより、宿主細胞が形質転換され得る。外来DNAの導入の後、工作された細胞は、濃縮培地中で1~2日間増殖させられ、次いで選択培地へと切り替えられ得る。組換えプラスミド中の選択可能マーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞が、染色体へプラスミドを安定的に組み込み、フォーカスを形成するよう増殖することを可能にする。そのフォーカスが、クローニングされ、細胞系へと繁殖させられ得る。この方法は、有利には、標的タンパク質を発現する細胞系を工作するために使用され得る。そのような工作された細胞系は、 T_{B_T} タンパク質の内因性の活性に影響する化合物のスクリーニング及び評価において特に有用であり得る。単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子、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遺伝子、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（これらに制限はされない）を含む多数の選択系が使用され得る。代謝拮抗薬耐性は、メトトレキサートに対する耐性を付与するdhfr、ミコフェノール酸に対する耐性を付与するgpt；アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与するneo；及びハイグロマイシンに対する耐性を付与するhygroのための選択の基礎として使用され得る。

10

20

【0053】

ポリペプチドは、直接的又は間接的に標識され得る。 ^{125}I のような放射性同位体；基質に露された場合に、検出可能な比色シグナル又は光を発生する酵素標識系；及び蛍光性標識（これらに制限はされない）を含む、多様で適当な標識系のうちの任意のものが使用され得る。間接標識には、目的のポリペプチドと特異的に結合する標識された抗体のようなタンパク質の使用が含まれる。そのような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片、及びFab発現ライブラリーにより産生された断片（これらに制限はされない）が含まれる。

30

【0054】

発現の後、組換えポリペプチドは、硫酸沈殿、アフィニティカラム、イオン交換及び/又はサイズ排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動等を含む、当技術分野の標準的な手法によって精製され得る（一般には、R.Scopes、Protein Purification、Springer--Verlag、N.Y.（1982）、Deutscher、Methods in Enzymology 第182巻：Guide to Protein Purification、Academic Press, Inc. N.Y.（1990）を参照されたい）。

【0055】

組換え法の別法として、ポリペプチド及びオリゴペプチドは化学合成されてもよい。そのような方法には、典型的には、固相アプローチが含まれるが、溶液に基づく化学及び組み合わせ又は固相アプローチと溶液アプローチとの組み合わせが使用されてもよい。タンパク質を合成するための固相方法論の例は、Merrifield（1964）J. Am. Chem. Soc. 85：2149；及びHoughton（1985）Proc. Natl. Acad. Sci.、82：5132に記載されている。 T_{B_T} タンパク質の断片を合成し、次いでつなぎ合わせてもよい。そのような反応を実施するための方法は、Grant（1992）Synthetic Peptides：A User Guide、W.H. Freeman and Co.、N.Y.；及び「Principles of Peptide Synthesis」（Bodansky及びTroost編）、Springer-Verlag, Inc. N.Y.、（1993）に記載されている。

40

【0056】

様々な目的のため、例えば免疫原として、 T_{B_T} ポリペプチド全体又はそれに由来する断片が使用されてもよい。好ましくは、例えば細胞外ドメインの1個またはそれ以上の8~30アミノ酸ペプチド部分が使用され得るが、10~20の範囲のペプチドが経済的にはより望ま

50

しい。この範囲のカスタム合成ペプチドは、多数の供給元から入手可能であり、KLH又はBSAに結合したものを注文することもできる。又は、30アミノ酸を超えるペプチドは、固相法によって合成されてもよいし、又は適当な組換えタンパク質産生系において組換え作製されてもよい。適正なタンパク質のグリコシル化及びプロセッシングを保証するため、動物細胞系（例えば、Sf9又はその他の昆虫細胞、CHO又はその他の哺乳動物細胞）が好ましい。T_BTポリペプチドを、下記のように癌ワクチンとして使用してもよい。

【0057】

特異的結合メンバー

「特異的結合メンバー」又は「結合メンバー」という用語は、本明細書において使用されるように、特異的結合対、即ち一方の分子（即ち、第1の特異的結合メンバー）が、化学的又は物理的手段により他方の分子（即ち、第2の特異的結合メンバー）と特異的に結合するような2個の分子、通常2個の異なる分子のメンバーをさす。特異的結合対の相補メンバーは、リガンドと受容体；又は受容体と対応受容体、と呼ばれる場合もある。本発明の目的のため、例えばアッセイ法が、既知の結合対の会合を妨害する化合物を検出するため行われる場合、2個の結合メンバーは、相互に会合することが既知のものであり得る。又は、目的の化合物の結合パートナーであると予測される候補化合物が使用されてもよい。

【0058】

目的の特異的結合対には、炭水化物とレクチン；相補的なヌクレオチド配列；ペプチドリガンドと受容体；エフェクター分子と受容体分子；ホルモンとホルモン結合タンパク質；酵素補因子と酵素；酵素阻害剤と酵素；脂質と脂質結合タンパク質等が含まれる。特異的結合対には、最初の特異的結合メンバーの類似体、誘導體、及び断片が含まれ得る。例えば、受容体とリガンドの対には、ペプチド断片、化学合成されたペプチド模倣体、標識されたタンパク質、誘導體化されたタンパク質等が含まれ得る。

【0059】

好ましい態様において、特異的結合メンバーは抗体である。「抗体」又は「抗体部分」という用語には、1個またはそれ以上の非共有結合性の結合相互作用が分子構造とエピトープとの間の複合体を安定化するような、エピトープに適合し、それを認識する特異的な形状を有する、任意のポリペプチド鎖含有分子構造が含まれるものとする。この用語には、モノクローナル抗体、多選択性抗体（1つ以上のドメイン特性を含む抗体）、ヒト抗体、ヒト化抗体、および所望の生物学的活性を持つ抗体断片が含まれる。脳腫瘍タンパク質標的のうちの一つと特異的に結合する抗体は、抗TM7XN1抗体、又は（TBT）と呼ばれる。特定の構造とその特異的エピトープとの特異的又は選択的な適合は、「鍵と鍵穴（lock and key）」適合と呼ばれることもある。原型抗体分子は免疫グロブリンであり、全ての起源、例えばヒト、げっ歯動物、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、その他の哺乳動物、ニワトリ、その他のトリ等に由来する全ての型の免疫グロブリン、IgG、例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgE、IgD等が、「抗体」と見なされる。本発明において使用される抗体は、ポリクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体は、細胞培養又は組換えによって作製すること、及び抗原性を減少させるために修飾することが可能であるため、モノクローナル抗体が好ましい。

【0060】

ポリクローナル抗体は、前記のように製剤化された抗原組成物を産生動物に注射することによる標準的なプロトコルにより作製され得る。例えば、HarlowとLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988を参照されたい。一つのそのような技術においては、まず、ポリペプチドの抗原性部分を含むTM7XN1抗原が、極めて多様な哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、又はヤギ）のうちの任意のものに注射される。完全タンパク質、又はタンパク質の比較的大きなセクションを使用する場合、抗体は、タンパク質及び適当なアジュバント（例えば、フロイントアジュバント、フロイント完全アジュバント、水中油乳剤等）で産生動物を免疫感作することにより作製され得る。比較的小さなペプチドが使用される場合には、免疫刺激性（immunostimulat

10

20

30

40

50

ory) 複合体を作成するため、ペプチドを比較的大きな分子と結合させることが有利である。そのような使用のための商業的に入手可能な一般的に使用されている結合タンパク質には、ウシ血清アルブミン (BSA) 及びスカシガイヘモシアニン (KLH) が含まれる。特定のエピトープに対する抗体を作製するためには、完全配列に由来するペプチドが使用され得る。又は、脳腫瘍タンパク質標的の比較的短いペプチド部分に対する抗体を生成させるためには、ポリペプチドが、オボアルブミン、BSA、又はKLHのような担体タンパク質につながれた場合、優れた免疫応答が誘発され得る。ペプチド複合体が、好ましくは1回またはそれ以上の追加免疫感作が組み込まれた予定されたスケジュールに従い、動物宿主へと注射され、動物から定期的に採血が行われる。次いで、ポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体が、例えば適当な固体支持体とカップリングしたポリペプチドを使用したアフィニティクロマトグラフィーによって、そのような抗血清から精製され得る。

【0061】

又は、モノクローナル抗体については、接種を受けた動物の脾臓に由来する細胞のような、刺激された免疫細胞を単離することにより、ハイブリドーマが形成され得る。次いで、これらの細胞を、細胞培養物中で無限に複製することができる、骨髄腫細胞又は形質転換細胞のような不死化細胞と融合させ、それにより免疫グロブリン分泌細胞系を生成させることができる。使用される不死細胞系としては、好ましくは、ある種の栄養素の使用に必要な酵素が欠損しているものが選択される。(骨髄腫のような)多くのそのような細胞系が、当業者に既知であり、例えば、チミジンキナーゼ (TK) 又はヒポキサンチン - グアニンホスフォリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) を含む。これらの欠損は、例えばヒポキサンチンアミノプテリンチミジン (HAT) 上で増殖する能力による、融合細胞の選択を可能にする。

【0062】

好ましくは、使用される不死融合パートナーは、免疫グロブリンを分泌しない系に由来する。得られた融合細胞、又はハイブリドーマは、融合細胞の生存を可能にし、非融合細胞の生存は可能にしない条件の下で培養され、得られたコロニーが、所望のモノクローナル抗体の産生に関してスクリーニングされる。そのような抗体を産生するコロニーは、クローニングされ、繁殖させられ、大量の抗体を産生するよう増殖させられる。例えば、Kohler及びMilstein、1975 Nature 256: 495 (この開示は参照として本明細書に組み込まれる) を参照されたい。

【0063】

次いで、分泌ハイブリドーマに由来する大量のモノクローナル抗体が、マウスの腹腔にクローンを注射し、そこから腹水を採取することにより作製され得る。好ましくはプリスタン、又はその他の何らかの腫瘍プロモーターでプライミングされ、化学的又は放射線的に免疫抑制されるマウスは、当業者に既知の様々な適当な系統のうちの任意のものであり得る。腹水がマウスから採取され、例えばCMセファロス (Sephacrose) カラム又はその他のクロマトグラフィー手段によって、それらからモノクローナル抗体が精製される。又は、ハイブリドーマを、インビトロで又は懸濁培養物として培養してもよい。回分培養、連続培養、又はその他の適当な培養法が使用され得る。次いで、モノクローナル抗体が、培地又は上清から回収される。

【0064】

さらに、抗体、又は抗原結合断片は、遺伝子工学によって作製され得る。この技術においては、標準的なハイブリドーマ手法と同様に、抗体産生細胞が、所望の抗原又は免疫原に対して感作される。免疫脾臓細胞又はハイブリドーマから単離されたメッセンジャーRNAが、PCR増幅を使用してcDNAを作成するための鋳型として使用される。各々、初期の抗原特異性を保持している1個の重鎖遺伝子及び1個の軽鎖遺伝子を含むしているベクターのライブラリーが、増幅された免疫グロブリンcDNAの適切なセクションの発現ベクターへの挿入によって作製される。コンビナトリアルライブラリーは、重鎖遺伝子ライブラリーを軽鎖遺伝子ライブラリーと組み合わせることにより構築される。これは、(抗体分子のFab断片又は抗原結合断片と類似している)重鎖及び軽鎖を共発現するクローンのライブラリー

ーをもたらす。これらの遺伝子を保持しているベクターは、宿主（例えば、細菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞、又はその他の適当なタンパク質産生宿主細胞）へと共にトランスフェクトされる。トランスフェクトされた宿主において抗体遺伝子合成が誘導された場合、重鎖タンパク質及び軽鎖タンパク質が自己会合し、抗原又は免疫原を用いたスクリーニングにより検出され得る活性抗体が生成する。

【0065】

好ましくは、組換え抗体は、昆虫細胞又は哺乳動物細胞のような免疫グロブリン鎖のグリコシル化及びプロセッシングを正確に行う組換えタンパク質産生系において作製される。抗体の作製のため組換えバキュロウイルスを使用する、昆虫細胞の使用の利点は、バキュロウイルス系が、安定的にトランスフェクトされた哺乳動物細胞系よりはるかに迅速に、変異抗体の産生を可能にするという点である。さらに、昆虫細胞は、原核細胞が行わない真核生物タンパク質のプロセッシング及びグリコシル化を正確に行うことが示されている。最後に、外来タンパク質のバキュロウイルス発現は、ウイルス感染後期の全細胞タンパク質の50~75%もを構成することが示されており、従って、この系は、ミリグラム量の組換え抗体を作製する優れた手段である。

10

【0066】

（アナフィラキシーショックのような）ヒトにおける激烈又は有害な免疫応答を誘導する傾向が低く、抗体治療剤又はイメージング剤の反復投薬を防止すると考えられる免疫応答のプライミングの傾向も低い抗体は、本発明における使用にとって好ましい。脳は血液脳関門の背後に比較的隔離されているにも関わらず、やはり、増加した白血球浸潤及び炎症という形態で免疫応答が起こる場合がある。腫瘍に対する増加した免疫応答は望ましいが、同時に起こる治療剤又はイメージング剤の結合及び不活化は、一般に、この利益を上回る。従って、ヒトに投与された場合に、より少ない免疫応答を生じるヒト化抗体、単鎖、キメラ抗体、又はヒト抗体が、本発明における使用にとって好ましい。本発明には、多領域抗体及びTM7XN1を「模倣する」抗イディオタイプ抗体も含まれる。例えば、Tm7XN1ドメインと結合し、Tm7XN1とリガンドとの結合を競合的に阻害する抗体が、TM7XN1を「模倣」し、従って、Tm7XN1、TM7XN1リガンド、TM7XN1受容体、又はTM7XN1リガンドと結合するか、それらを活性化するか、又は中和する抗イディオタイプ抗体を生成させるために使用され得る。そのような抗イディオタイプ抗体又はそのような抗イディオタイプのFab断片は、TM7XN1により媒介される経路を含む治療計画において使用され得る（例えば、Greenspan及びBona（1993）FASEB J 7（5）：437-444；Nissinoff（1991）J. Immunol. 147（8）：2429-2438を参照のこと。

20

30

【0067】

キメラ抗体とは、異なる部分が異なる動物種に由来する分子、例えば、マウスmAbに由来する可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域とを有するものである。キメラ抗体の開発のための技術は、文献に記載されている。例えば、Morrisonら（1984）Proc. Natl. Acad. Sci. 81：6851-6855；Neubergerら（1984）Nature 312：604-608；Takedaら（1985）Nature 314：452-454を参照のこと。単鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してFv領域の重鎖断片と軽鎖断片とを連結させ、単鎖ポリペプチドとすることにより形成される。例えば、Hustonら、Science 242：423-426；Proc. Natl. Acad. Sci. 85：5879-5883；及びWardら Nature 341：544-546を参照のこと。

40

【0068】

特異的エピトープを認識する抗体断片は、当技術分野において周知の技術によって生成させられ得る。これらの断片には、抗体分子のペプシン消化により作製され得るF(ab')₂断片及びF(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することにより生成させられ得るFab断片が含まれるが、これらに限定はされない。

【0069】

本発明の一つの態様において、高い親和性でTM7XN1の細胞外領域と特異的に結合するヒト抗体又はヒト化抗体が提供される。抗体の細胞外領域との結合により、受容体の下方制御又は生物学的活性の減少、並びに細胞の増殖、浸潤の減少、及び/又は腫瘍サイズの減

50

少が起こり得る。低親和性結合剤も、いくつかの免疫療法のために有用であり得る。Lonbergら(1994) Nature 368: 856-859; 並びにLonberg及びHuszar(1995) Internal Review of Immunology 13: 65-93を参照のこと。本発明のもう一つの面において、高い親和性でTM7XN1の細胞外領域と特異的に結合し、かつヒト抗体との類似性を保持しているヒト化抗体が提供される。これらの抗体は、ヒト抗体と類似しており、従って最小限の負の副作用でヒト患者に投与され得る。

【0070】

ヒト化抗体は、ヒト型の非ヒト抗体である。それらは、非ヒト免疫グロブリンに由来する配列を最小限に有するキメラである。マウスモノクローナル抗体に固有の有害な特性を克服するため、やはり「ヒト化抗体」と呼ばれる、ヒト抗体の領域を取り込むよう工作された組換えマウス抗体が開発中である。この代替戦略は、細胞表面分子のようなヒト抗原に対するヒト抗体を生成させることが困難であるため、採用された。ヒト化抗体は、マウス抗体の相補性決定領域(CDR)領域及びその他の少数のアミノ酸を含有しており、抗体の残りはヒト起源である。

10

【0071】

好ましい態様において、抗TM7XN1抗体は、配列番号: 2の1~401アミノ酸を含むTM7XN1の細胞外ドメイン又はその断片、特に少なくとも約4アミノ酸、一般的には少なくとも約8アミノ酸であり、例えば、抗体が非連続残基を含む三次元ペプチド構造と結合する場合には、20アミノ酸またはそれ以上であってもよいエピトープ性断片と結合する。抗体は、結合、活性化、中和、阻害、又はタンパク質阻抗体として機能してもよい。それは、もう一つのリガンドとの相互作用を防止してもよい。

20

【0072】

興味深い抗体は、GPSドメインにおける切断を防止するものであり得る。このドメインは、ある種の受容体に保存されているLeu残基とThr残基との間のラトロフィン(Latrophilin)内の切断部位との配列類似性を有している。

【0073】

キメラ抗体は、主にヒトドメインを有する抗体を作製するために、マウス(又は、その他の動物に由来する)ハイブリドマクローンから得られたマウスの軽鎖及び重鎖の可変領域(VK及びVH)を、ヒトの軽鎖及び重鎖の定常領域と組み合わせることにより、組換え手段によって作成され得る。そのようなキメラ抗体の作成は、当技術分野において周知であり、(例えば、参照として完全に本明細書に組み込まれる米国特許第5,624,659号に記載されたような)標準的な手段によって達成され得る。ヒト化抗体は、はるかにヒト様の免疫グロブリンドメインを含有し、動物由来の抗体の相補性決定領域のみを取り込むよう、工作される。これは、モノクローナル抗体の可変領域の超可変ループの配列を注意深く検討し、それらをヒト抗体鎖の構造に適合させることにより達成される。一見複雑であるが、そのプロセスは実際は簡単である。例えば、参照として完全に本明細書に組み込まれる米国特許第6,187,287号を参照されたい。

30

【0074】

又は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリンを産生するよう遺伝学的に改変された動物から作製され得る。そのような動物を生成させ、それらから抗体を導出するための技術は、参照として完全に本明細書に組み込まれる米国特許第6,162,963号及び第6,150,584号に記載されている。

40

【0075】

又は、単鎖抗体(下記のようなFv)が、ヒト可変領域を含有しているファージライブラリーから作製され得る。米国特許第6,174,708号を参照されたい。単鎖免疫毒素LMB-7[Fv]-PE38のクモ膜下腔内投与は、ラットモデルにおいて癌性髄膜炎を治癒させることが示されている(全て参照として完全に本明細書に組み込まれるProc.Natl.Acad.Sci. U S A 92, 2765-9)。

【0076】

完全免疫グロブリン(又はそれらの組換え対応物)に加え、エピトープ結合部位を含む

50

免疫グロブリン断片（例えば、Fab'断片、F(ab')₂断片、又はその他の断片）が、本発明における抗体部分として有用である。そのような抗体断片は、フィシン、ペプシン、パパイイン、又はその他のプロテアーゼによる分解により、完全免疫グロブリンから生成し得る。「断片」又は最小免疫グロブリンは、組換え免疫グロブリン技術を使用して設計され得る。例えば、本発明において使用するための「Fv」免疫グロブリンは、ペプチドリンカー（例えば、ヘリックス又はシートモチーフを形成しないポリグリシン又はその他の配列）を介して、軽鎖可変領域を重鎖可変領域と連結することにより作製され得る。

【0077】

Fv断片は、重鎖可変ドメイン（V_H）と軽鎖可変ドメイン（V_L）とのヘテロダイマーである。完全IgGに存在する重鎖ドメインと軽鎖ドメインとのヘテロダイマーは、例えば、ジスルフィド結合によって接続されている。V_HとV_Lとがペプチドリンカーによって接続されている組換えFvは、典型的には安定である。例えば、Hustonら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85: 5879-5883 (1988) 及びBirdら、Science 242: 423-426 (1988)（いずれも完全に参照として本明細書に組み込まれる）を参照されたい。これらは、特異性及び親和性を保持していることが見出されており、腫瘍のイメージング及び腫瘍療法用の組換え免疫毒素の作成に有用であることが示されている単鎖Fvである。しかしながら、研究者らは、単鎖Fvの一部は減少した抗原に対する親和性を有していること、及びペプチドリンカーが結合を妨害する場合があることを見出した。完全に参照として本明細書に組み込まれる米国特許第6,147,203号に記載されるように、V_H領域とV_L領域との間の安定化ジスルフィド結合を含む、改良されたFvも、作成されている。これらの最小抗体のうちの任意のものが、本発明において使用され得るが、HAMA反応を回避するためにヒト化されたものが、本発明の態様における使用にとって好ましい。

【0078】

さらに、化学的リンカー、蛍光色素、酵素、基質、化学発光部分等のような検出可能部分、又はストレプトアビジン、アビジン、もしくはビオチン等のような特異的結合部分が追加された誘導体化された免疫グロブリンが、本発明の方法及び組成物において使用され得る。便宜上、「抗体」又は「抗体部分」という用語は、一般に、脳腫瘍タンパク質標的のエピトープと特異的に結合する分子をさすために使用されるが、この用語には、前記のような免疫グロブリン、誘導体、断片、組換え又は工作された免疫グロブリン、及び修飾された免疫グロブリンが全て包含されると考えられる。

【0079】

候補抗TM7XN1抗体は、任意の適当な標準的な手段、例えば、ELISA法などにより、試験され得る。一次スクリーニングとして、抗体は、免疫原、又は完全な脳腫瘍タンパク質標的細胞外ドメインもしくはタンパク質との結合に関して試験され得る。二次スクリーニングとして、抗TM7XN1候補は、適切な腫瘍細胞系、又は原発性腫瘍組織試料との結合に関して試験され得る。これらのスクリーニングのため、抗TM7XN1候補抗体は検出のために標識され得る。脳腫瘍タンパク質標的との選択的な結合が確立された後、候補抗体、又は下記のようにして作製された抗体複合体は、下記のように、適切な腫瘍細胞系のようなインビボモデル、又はマウスもしくはラットのヒト脳腫瘍モデルにおいて、適切な活性（即ち、腫瘍細胞成長を減少させ、かつ/又は腫瘍細胞の可視化を補助する能力）に関して試験され得る。好ましい態様において、抗TM7XN1タンパク質抗体化合物は、インビトロ及びインビボで多様な方法を使用してスクリーニングされ得る。これらの方法には、標的との結合親和性、動物又は細胞における化合物の生物学的分布、又は化合物により媒介される細胞毒性を測定する方法が含まれるが、これらに限定はされない。これら及び当技術分野において既知のその他のスクリーニング法は、化合物の効力の尺度となる、指定された標的と結合又は相互作用する化合物の能力に関する情報を提供する。

【0080】

TM7XN1タンパク質の生物学的活性を改変する抗体は、神経膠芽腫細胞培養物研究又はマウス/ラットCNS腫瘍モデル研究のような機能的なフォーマットにおいてアッセイされ得る。活性の神経膠芽腫細胞モデルにおいては、まず、タンパク質の発現が、使用される特

10

20

30

40

50

定の細胞株において確認される。必要であれば、細胞系は、原発性腫瘍に見い出されるものに匹敵するレベルでタンパク質を発現するよう、適切な構成性プロモーターの調節下にあるタンパク質のコーディング配列により安定的にトランスフェクトされ得る。次いで、候補機能改変抗タンパク質抗体の存在下での神経膠芽腫細胞の生存能力が決定される。細胞生存アッセイ法に加え、細胞遊走アッセイ法が、細胞の腫瘍様挙動に対する候補抗体療法剤の効果を決定するために使用され得る。又は、脳腫瘍タンパク質標的が血管形成に関与している場合には、候補抗体治療薬の、腫瘍生物学における重要な機能である血管新生を阻害する能力を決定するためのアッセイ法が使用され得る。

【0081】

TM7XN1抗体の結合親和性は、当技術分野において既知のような、ピアコア (Biacore) S PR技術を使用して決定され得る。この方法においては、第一の分子が、デキストランCM-5 センサーチップ (Pharmacia) にカップリングさせられ、結合した分子が、試験される抗体を捕獲するために使用される。次いで、抗原が特定の流速で適用され、そして解離が起こるよう同じ流速で緩衝液が適用される。会合速度及び解離速度、及び対応する速度定数は、BIAエバリュエーション (evaluation) ソフトウェアを使用することにより決定される。例えば、Malmqvist (1993) 「Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics.」第5巻：282-286；及びDavies (1994) Nanobiology 3：5-16を参照のこと。抗体の逐次導入によって、エピトープマッピングが可能となる。抗原が導入された後は、第二の抗体の抗原との結合能が試験され得る。多分子複合体の連続的な形成において、各反応体を個々にモニタリングすることができ、これによって、多部位結合実験を実施することが可能となる。

【0082】

いくつかのリガンドのそれらの受容体との結合によって、受容体により媒介される内部移行が起こる場合がある。この特性は、例えばイムノリポソームのような抗体治療薬の場合には望ましいかもしれず；又は、例えば非活性プロドラッグを活性細胞毒性分子へと変換するために酵素が細胞表面に存在する必要がある、抗体指向化酵素プロドラッグ療法 (antibody directed enzyme-prodrug therapy) (ADEPT) の場合には、有害であることがある。

【0083】

同様に、ヒト脳腫瘍のインビボモデル、特にヌードマウス / SCIDマウスモデル又はラットモデルが記載されており、例えばAntunesら (2000) J Histochem Cytochem 48、847-58；Priceら (1999) Clin Cancer Res 5、845-54；及びSennerら (2000) Acta Neuropathol (Berl) 99、603-8を参照されたい。腫瘍モデルにおいてタンパク質の正確な発現が確認された後は、これらのモデルにおける腫瘍塊に対する候補抗タンパク質抗体の効果が評価され、その際、腫瘍成長の減少又は腫瘍塊の縮小を、抗タンパク質抗体候補のタンパク質活性を改変する能力の指標とする。従って、タンパク質の発癌における特定の生物分子的役割に関する直接的な知識なしに、適切な抗腫瘍効果を示す抗体が選択され得る。

【0084】

アレイ

アレイは、試料中の多数のポリヌクレオチドをアッセイすることができるハイスループット技術を提供する。本発明の一つの局面において、その他の配列をさらに含んでもよい、TM7XN1の遺伝子配列、タンパク質、又は抗体を含み、目的のその他の配列、例えば、脳腫瘍関連配列、虚血、および神経障害などに関連する配列をさらに含むアレイが構築される。この技術は、差次的な発現に関して試験するための道具として使用され得る。結合したプローブを有する二次元マトリックス又はアレイにおいて、アレイは、ポリヌクレオチドプローブを基板 (例えば、ガラス、ニトロセルロース等) へとスポットすることにより作出され得る。プローブは、共有結合、又は疎水性相互作用のような非特異的な相互作用のいずれかにより、基板へと結合させられ得る。アレイを構築するための技術、及びこれらのアレイを使用する方法は、例えば、Schenら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93 (20) : 10614-9；Schenら (1995) Science 270 (5235) : 467-70；Shalonら (

1996) *Genome Res.* 6(7): 639-45、米国特許第5,807,522号、欧州特許第799 897号；国際公開公報第97/29212；国際公開公報第97/27317；欧州特許第785 280号；国際公開公報第97/02357号；米国特許第5,593,839号；米国特許第5,578,832号；欧州特許第728 520号；米国特許第5,599,695号；欧州特許第721 016号；米国特許第5,556,752号；国際公開公報第95/22058号；及び米国特許第5,631,734号に記載されている。

【0085】

アレイにおいて使用されるプローブは、様々な型のものであってよく、例えば、比較的短い長さ（例えば、20mer又は25mer）の合成プローブ、cDNA（全長又は遺伝子の断片）、増幅されたDNA、（例えば制限酵素により生成した）DNAの断片、及び逆転写されたDNAを含み得る。カスタムアレイ及び一般的アレイの両方が、差次的な発現レベルの検出において使用され得る。カスタムアレイは、mRNA遺伝子配列の特定の予め選択された内部配列、又はそれらから調製された増幅産物とハイブリダイズするプローブを使用して調製される。

10

【0086】

アレイは、例えば、遺伝子の差次的な発現を検討するため、および遺伝子機能を決定するために使用され得る。例えば、アレイは、試験細胞と対照細胞との間で比較されたTM7X N1の差次的な発現を検出するために使用され得る。アレイの例示的な使用は、例えばPappalaradoら（1998）*Sem.Radiation Oncol.* 8: 217；及びRamsay.（1998）*Nature Biotechnol.* 16: 40にさらに記載されている。さらに、アレイを使用した検出法に対する多くのバリエーションは、十分に、当技術分野の技術の範囲内、および本発明の範囲内にある。例えば、プローブを固体支持体へと固定化するのではなく、被験試料を固体支持体へと固定化し、次いでそれをプローブと接触させることが可能である。発現分析におけるマイクロアレイの使用に関するさらなる考察は、例えば、Dugganら、*Nature Genetics Supplement* 21: 10-14（1999）；Bowtell、*Nature Genetics Supplement* 21: 25-32（1999）；Brown及びBotstein、*Nature Genetics Supplement* 21: 33-37（1999）；Coleら、*Nature Genetics Supplement* 21: 38-41（1999）；Debouck及びGoodfellow、*Nature Genetics Supplement* 21: 48-50（1999）；Bassett, Jr.ら、*Nature Genetics Supplement* 21: 51-55（1999）；並びにChakravarti、*Nature Genetics Supplement* 21: 56-60（1999）に見い出され得る。

20

【0087】

発現レベルの検出のためには、通常、核酸が被験試料から得られ、直接標識されるか又は標識されたcDNAへと逆転写される。次いで、標識された核酸を含有している被験試料が、アレイと接触させられる。試料中に存在する任意の標識された核酸がプローブとハイブリダイズするのに十分な時間を経た後、典型的には、未結合の核酸を除去し、アレイの核酸プローブとの非特異的な結合を最小限に抑えるため、アレイは1回またはそれ以上の高ストリンジェンシー洗浄に供される。標識された配列の結合は、多様な商業的に入手可能なスキャナー及び添付のソフトウェアプログラムのうちの任意のものを使用して検出される。

30

【0088】

例えば、試料由来の核酸が蛍光標識で標識される場合、ハイブリダイゼーション強度は、例えば光子計数モードの走査型共焦点顕微鏡により決定され得る。適切な走査装置は、例えばTrulsonらの米国特許第5,578,832号及びSternらの米国特許第5,631,734号により記載されており、GeneChip（商標）標識としてAffymetrix, Inc.より入手可能である。いくつかの型の標識は、酵素法によって増幅され得るシグナルを提供する（例えば、Broudeら、*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91, 3072-3076（1994）を参照されたい）。例えば、放射性同位体、発色団、磁性粒子、及び高電子密度粒子を含む、その他の多様な標識も適当である。

40

【0089】

標識された核酸とハイブリダイズするプローブアレイ上の位置は、米国特許第5,143,854号、国際公開公報第90/15070号、及び米国特許第5,578,832号に記載されたような読み取

50

り装置を使用して検出される。カスタマイズされたアレイの場合には、次いで、国際公開公報第97/10365号に記載されるようにして分析される試料中の既知のmRNA種の存在及び/又は相対量もしくは絶対量を決定するため、ハイブリダイゼーションパターンが分析され得る。

【0090】

診断及び予後判定の方法

腫瘍におけるTM7XN1遺伝子及び/又はTM7XN1遺伝子産物の差次的な発現は、これらが、治療適用のみならず、診断適用、イメージング適用のためのマーカーとしても活用され得ることを示す。一般に、そのような診断法は、個体の細胞もしくは組織、又はそれらに由来する試料におけるTM7XN1遺伝子転写物又はTM7XN1遺伝子産物の上昇した発現レベルを検出することを含む。遺伝子転写物のレベルを検出する方法及びタンパク質のレベルを検出する方法の両方を含む、多様な異なるアッセイ法が、遺伝子発現の増加を検出するために使用され得る。より具体的には、本明細書に開示された診断及び予後判定の方法は、個体から試料を得ること、試料中のTM7XN1遺伝子産物発現のレベルを、少なくとも定性的に、好ましくは定量的に決定することを含む。通常、この決定された値又は試験値は、何らかの型の参照又は基線値と比較される。

10

【0091】

配列リストに提供された配列のうちの1個の配列に由来するポリペプチドに特異的な核酸、又は抗体のような結合メンバーが、対応するmRNA又はタンパク質の増加した発現、又は細胞中の増幅されたDNAの存在に関して患者の試料をスクリーニングするために使用される。試料は、多様な起源から入手され得る。試料は、典型的には、ヒト対象から得られる。しかしながら、方法は、霊長類、例えば類人猿及びチンパンジー、マウス、ネコ、ラット、及びその他の動物のような様々なその他の哺乳動物から得られた試料で使用されてもよい。そのような試料は、患者の試料と呼ばれる。

20

【0092】

試料は、細胞培養物又は組織ホモジネートのみならず、個体の組織又は体液からも入手され得る。例えば、試料は、脊髄液、又は腫瘍生検試料から入手され得る。この用語には、そのような細胞及び体液の誘導体及び画分も含まれる。試料は、増殖培地、組換え細胞、及び細胞構成成分を含むインビトロ細胞培養物に由来してもよい。診断用試料は、脳腫瘍を有しているか又は有していると推測される個体から収集される。特異的マーカーの存在は、腫瘍の同定及び病期決定において有用である。

30

【0093】

核酸スクリーニング法

TM7XN1遺伝子転写物の検出を含む診断及び予後判定の方法のうちのいくつかは、細胞の溶解、及びその後の他の細胞材料からの核酸、特にmRNA転写物の精製から出発する。mRNA転写物から派生した核酸とは、その合成のためにmRNA転写物又はその部分配列が鋳型として最終的に活用された核酸をさす。従って、mRNAから逆転写されたcDNA、そのcDNAから転写されたRNA、cDNAから増幅されたDNA、増幅されたDNAから転写されたRNAは、全て、mRNA転写物から派生したものであり、そのような派生産物の検出は、試料中の最初の転写物の存在及び/又は存在量の指標となる。

40

【0094】

多数の方法が、特定の配列の存在、例えば上方制御又は下方制御された発現に関して核酸を分析するために使用可能である。核酸は、分析にとって十分な量を提供するために、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のような従来技術によって増幅され得る。ポリメラーゼ連鎖反応の使用は、Saikiら(1985) *Science* 239: 487に記載されており、技術の概説は、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press 1989、14.2~14.3 3頁に見出され得る。

【0095】

増幅反応には検出可能標識が含まれていてもよい。適当な標識には、蛍光色素、例えばALEXA色素(Molecular Probes, Inc.より入手可能); フルオレセインイソチオシアネート

50

(FITC)、ローダミン、テキサスレッド、フィコエリトリン、アロフィコシアニン、6-カルボキシフルオレセイン(6-FAM)、2,7-ジメトキシ-4,5-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(JOE)、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、6-カルボキシ-2,4,7,4,7-ヘキサクロロフルオレセイン(HEX)、5-カルボキシフルオレセイン(5-FAM)、又はN,N,N,N-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)、放射性標識、例えば³²P、³⁵S、³H等が含まれる。標識は、増幅されたDNAが、アビジン、特異的抗体等の高親和性結合パートナーを有するビオチン、ハプテン等と結合され、結合パートナーが検出可能標識と結合されている、二段階系であってもよい。標識は、プライマーの一方又は両方と結合されてもよい。又は、標識が増幅産物に取り込まれるよう、増幅において使用されるヌクレオチドのプールが標識される。

10

【0096】

試料核酸、例えば増幅され、標識され、クローニングされた断片等は、当技術分野において既知の多数の方法のうちの一つによって分析される。プローブがノーザンブロットもしくはドットブロットへとハイブリダイズさせられてもよいし、又は液体ハイブリダイゼーション反応が実施されてもよい。核酸が、ジデオキシ法又はその他の方法によって配列決定され、塩基配列が野生型配列と比較されてもよい。一本鎖高次構造多型(SSCP)分析、変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)、及びゲルマトリックス中のヘテロ二重鎖分析が、DNA配列バリエーションによって作出された高次構造の変化を電気泳動移動度の改変として検出するために使用される。分画は、ゲル電気泳動又はキャピラリー電気泳動、特にアクリルアミドゲル又はアガロースゲルによって実施される。

20

【0097】

インサイチュ-ハイブリダイゼーション法は、ハイブリダイゼーションの前に細胞を溶解させないハイブリダイゼーション法である。この方法はインサイチュで実施されるため、細胞からRNAを調製する必要がないという利点を有する。この方法は、通常、まず支持体(例えば、顕微鏡用スライドの平面又はマイクロタイターウェルの壁)に被験細胞を固定し、次いで適切な透過性化溶液により細胞を透過性化することを含む。次いで、標識されたプローブを含有している溶液を、細胞と接触させ、プローブをハイブリダイズさせる。過剰のプローブを消化し、洗浄除去し、ハイブリダイズしたプローブの量を測定する。このアプローチは、Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach(Hamesら編、1987)に、より詳細に記載されている。

30

【0098】

多様ないわゆる「リアルタイム増幅」法又は「リアルタイム定量的PCR」法も、試料中に存在するmRNAの量を決定するために使用され得る。そのような方法は、増幅プロセスの間に形成された増幅産物の量を測定することを含む。蛍光発生ヌクレアーゼアッセイ法は、転写物を検出し定量するために使用され得るリアルタイム定量法の一つの具体例である。一般に、そのようなアッセイ法は、二重標識された蛍光発生性オリゴヌクレオチドプローブを使用して、PCR産物蓄積を連続的に測定する(文献では単に「タックマン(TaqMan)」法と呼ばれることが多いアプローチ)。増幅産物の濃度をリアルタイムに決定するための蛍光発生法の理論及び操作に関するさらなる詳細は、例えば、各々、参照として完全に組み込まれる、Gelfandの米国特許第5,210,015号、Livakらの米国特許第5,538,848号、及びHaalandの米国特許第5,863,736号に記載されている。

40

【0099】**ポリペプチドスクリーニング法**

本発明の配列の発現に関するスクリーニングは、タンパク質の機能的又は抗原的な特徴に基づき得る。TM7XN1タンパク質の多型を発見するために設計された様々なイムノアッセイ法が、スクリーニングにおいて使用され得る。検出は、TM7XN1と特異的に結合する抗体又はその他の特異的結合メンバーを使用して、従来の方式に従い実施される、細胞又は組織学的切片の染色を使用し得る。目的の抗体又はその他の特異的結合メンバーを細胞試料へと添加し、エピトープとの結合を可能にするために十分な時間、通常少なくとも約10分間、インキュベートする。抗体は、直接検出のための放射性同位体、酵素、蛍光団、化学

50

発光団、又はその他の標識で標識され得る。又は、二次の抗体又は試薬が、シグナルを増幅するために使用される。そのような試薬は、当技術分野において周知である。例えば、一次抗体をビオチンと結合させ、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合アビジンを二次試薬として添加することができる。最終検出は、ペルオキシダーゼの存在下で色が変化する基質を使用する。抗体結合の欠如又は存在は、解離させた細胞のフローサイトメトリー、顕微鏡検、ラジオグラフィー、シンチレーション計数等を含む様々な方法によって決定され得る。

【0100】

別の診断法は、溶解物中の、抗体と、TM7XN1の配列に対応するポリペプチドとの間の結合のインビトロの検出に依存する。試料又はその画分の中の標的タンパク質の濃度の測定は、多様な特異的アッセイ法によって達成され得る。従来のサンドイッチ型アッセイ法、例えばELISA法が使用されてもよい。例えば、サンドイッチアッセイ法は、まず、特異的抗体を不溶性の表面又は支持体に付着させる。本発明の試薬及び全体的な方法と適合性である限り、特定の結合様式は重大ではない。それらは、共有結合的又は非共有結合的、好ましくは非共有結合的にプレートに結合させられ得る。

10

【0101】

不溶性の支持体は、ポリペプチドが結合することができ、可溶性材料から容易に分離され、かつその他の点において全体的な方法と適合性である、任意の組成物であり得る。そのような支持体の表面は、固体又は多孔性であってよく、任意の便利な形状であり得る。受容体が結合させられる適当な不溶性支持体の例には、ビーズ、例えば磁性ビーズ、膜、及びマイクロタイプレートが含まれる。これらは、典型的には、ガラス、プラスチック（例えば、ポリスチレン）、多糖、ナイロン、又はニトロセルロースで作成されている。マイクロタイプレートは、少量の試薬及び試料を使用して、多数のアッセイ法を同時に実施することができるため、特に便利である。

20

【0102】

次いで、患者の試料の溶解物は、抗体を含有している別々にアッセイ可能な支持体（例えば、マイクロタイプレートの別々のウェル）に添加される。好ましくは、既知の濃度の被験タンパク質を含有している一連の標準が、対照として活用するため、試料又はその一部分と平行にアッセイされる。好ましくは、試料及び標準は、各々、各々の平均値が得られるよう、複数のウェルに添加されると考えられる。インキュベーション時間は、結合にとって十分なものであるべきである。インキュベーションの後には、一般に、不溶性支持体から未結合構成成分が洗浄される。洗浄後、二次抗体を含有している溶液が適用される。抗体は、存在するその他の構成成分と区別され得るよう十分な特異性で、目的のタンパク質のうちの一つと結合すると考えられる。二次抗体は、直接的又は間接的な結合の定量を容易にするため、標識され得る。好ましい態様において、抗体は、適当な基質の添加の後に検出可能な生成物シグナルを提供することができる共有結合した酵素で標識される。複合物物中に使用するのに適した酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ等が含まれる。商業的に入手可能でない場合、そのような抗体-酵素複合体は、当業者に既知の技術によって容易に作製される。インキュベーション時間は、標識されたリガンドが使用可能な分子と結合するのに十分なものであるべきである。

30

40

【0103】

第二結合工程の後には、非特異的に結合した材料が除去されるよう再び不溶性支持体を洗浄し、標的タンパク質と特異的結合メンバーとの間で形成された特異的複合体を残す。結合した複合体から生成したシグナルが、従来の手段によって検出される。酵素複合体が使用される場合には、検出可能産物が形成されるよう適切な酵素基質が提供される。

【0104】

その他のイムノアッセイ法は当技術分野において既知であり、診断薬として有益であり得る。オクタロニプレートは、抗体結合の単純な決定を提供する。ウェスタンブロットは、サンドイッチアッセイ法に関して記載されたような標識法を便利に使用して、標的と

50

されたポリペプチドに特異的な検出系を使用して、タンパク質ゲル又はフィルター上のタンパク質スポットに対して実施され得る。

【0105】

いくつかの場合には、競合アッセイ法が使用されると考えられる。患者の試料に加え、標的とされたタンパク質に対する競合剤が反応混合物に添加される。競合剤と標的とは、特異的結合パートナーとの結合に関して競合する。通常、以前に記載されたようにして、競合剤分子が標識され検出されると考えられる。その場合、競合剤結合の量が、存在する標的タンパク質の量に比例すると考えられる。競合剤分子の濃度は、検出の範囲を最も高感度で直線的なものにするため、最大予想タンパク質濃度の約10倍乃至ほぼ等しい濃度までであると考えられる。

10

【0106】

インビボイメージング

いくつかの態様において、方法は、例えば腫瘍細胞が存在する部位を位置決定又は同定するための、インビボのイメージングにおける使用に適合している。これらの態様においては、TM7XN1ポリペプチドに特異的な検出可能に標識された部分、例えば抗体が、(例えば、注射により)個体に投与され、標識された細胞が、磁気共鳴イメージング、コンピュータ連動断層撮影法等(これらに制限はされない)を含む、標準的なイメージング技術を使用して位置決定される。

【0107】

診断インビボイメージングの場合、使用可能な検出装置の型が、特定の放射性核種の選択における主な要因である。選択された放射性核種は、特定の型の装置によって検出可能な型の崩壊を有していなければならない。一般に、診断イメージングを可視化するための任意の従来の方法が、本発明に従い使用され得る。インビボ分析用の放射性核種の選択におけるもう一つの重要な要因は、その半減期が、標的組織による最大取り込みの時点でまだ検出可能である程度に長く、しかし宿主への有害な照射が最小限に抑えられる程度に短いということである。 ^{99m}Tc による標識のための現在使用されている方法は、キレート剤前駆体の存在下で過テクネチウム酸塩を還元して、不安定な ^{99m}Tc -前駆体複合体を形成させ、それを、次に、二官能修飾された走化性ペプチドの金属結合基と反応させ、 ^{99m}Tc -走化性ペプチド複合体を形成させるというものである。

20

【0108】

検出可能に標識されたTM7XN1特異的抗体は、標的の発現を分析するため、イメージング技術と共に使用される。一つの態様において、イメージング法は、放射性核種が合成的又は局所的に患者に投与されるイメージング技術であるPET又はSPECTのうちの一つである。その後の放射性トレーサーの取り込みが経時的に測定され、標的とされた組織に関する情報を得るために使用される。使用された特定の同位体の高エネルギー(線)放射、並びにそれらを検出するために使用された装置の感度及び精度のため、放射能の二次元分布が体外から推量される。

30

【0109】

PETにおいて最も一般的に使用されている陽子放射核種には、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、及び ^{18}F が含まれる。SPECTにおいては、電子捕捉及び/又は放射により崩壊する同位体で使用されており、それには ^{123}I 及び ^{99m}Tc が含まれる。

40

【0110】

治療的/予防的な処置法

TM7XN1遺伝子又はタンパク質の活性を調整する薬剤、特にポリペプチドの活性又は遺伝子の発現を阻害又は上方制御する薬剤は、治療的又は予防的な介入のポイントを提供する。本発明の一つの態様において、前記のような抗体が、神経膠芽腫を含む脳腫瘍の処置のため脳組織への局所投与によって投与される。この抗体は、中和抗体であってもよいし、機能的阻止抗体であってもよいし、GPSドメインに結合し、その切断を防止するものであってもよいし、又は多量体化を防止し、従ってシグナル増幅に影響を与えるものであってもよいし、又はリガンド結合を防止するものであってもよい。

50

【0111】

TM7XN1活性の調整において有用な薬剤には、発現を直接的に調整する薬剤、例えば発現ベクター、標的とされたポリペプチドに特異的なアンチセンス；及びタンパク質に作用する薬剤、例えば特異的抗体及びそれらの類似体、触媒活性を阻止する有機低分子等が含まれる。

【0112】

ある種の細胞に選択的に核酸を送達するための方法が、設計され得る。そのような細胞の例には、神経細胞、小膠細胞、星状細胞、内皮細胞、乏突起膠細胞等が含まれる。ある種の処置法は、神経細胞細胞へ発現ベクターを選択的に発現させるため、及び/又はCNS細胞（小膠細胞、星状細胞、内皮細胞、乏突起膠細胞）への送達のため核酸をターゲティングするために設計される。CNS由来細胞における選択的な発現を達成するための一つの技術は、コーディング配列を、主としてCNS由来細胞において活性化プロモーターと機能的に連結させることである。そのようなプロモーターの例には、プリオンタンパク質プロモーター、カルシウム-カルモジュリン依存性プロテインキナーゼプロモーターが含まれるが、これらに制限はされない。別法として、又はさらに、核酸は、核酸をCNS由来細胞へとターゲティングする薬剤と共に投与され得る。例えば、核酸は、CNS由来細胞上の細胞表面抗原と特異的に結合する抗体、又は神経細胞細胞上の受容体に対するリガンドと共に投与され得る。

10

【0113】

リボソームが使用される場合には、リボソームを神経細胞へとターゲティングし、取り込みを容易にするため、エンドシトシスと関連した細胞表面膜タンパク質と結合する基質が、リボソームに付加され得る。付加され得るタンパク質の例には、CNS由来細胞と結合するカプシドタンパク質又はそれらの断片、サイクリング中に内部移行するCNS由来細胞上の細胞表面タンパク質と特異的に結合する抗体、及びCNS由来細胞内の細胞内局在を標的とするタンパク質が含まれる（例えば、Wuら（1987）*J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432；及びWagnerら（1990）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3410-3414参照）。遺伝子マーキング及び遺伝子治療のプロトコルは、Andersonら（1992）*Science* 256: 808-813により概説されている。様々な他の送達オプションも使用され得る。例えば、目的の配列を含有している核酸を、脳脊髄液へと直接注射することができる。又は、そのような核酸を脳室内注射により投与してもよい。

20

30

【0114】

アンチセンス分子は、細胞における発現を下方制御するために使用され得る。アンチセンス試薬は、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ODN）、特に天然型核酸からの化学修飾を有する合成ODN、又はRNAのようなアンチセンス分子を発現する核酸構築物であり得る。アンチセンス配列は、標的とされた遺伝子のmRNAに相補的であり、標的とされた遺伝子産物の発現を阻害する。アンチセンス分子は、様々なメカニズムによって、例えばRNase Hの活性化又は立体障害により、翻訳に使用可能なmRNAの量を減少させることによって、遺伝子発現を阻害する。1個のアンチセンス分子が投与されてもよいし、又は複数の異なる配列を含んでいてもよいアンチセンス分子の組み合わせが投与されてもよい。

【0115】

アンチセンス鎖がRNA分子として産生されるよう転写開始が方向付けられている適切なベクターの中の標的遺伝子配列の全部又は一部の発現によって、アンチセンス分子は産生され得る。又は、アンチセンス分子は、合成オリゴヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、一般に、少なくとも7ヌクレオチド長、一般的には少なくとも12ヌクレオチド長、より一般的には少なくとも20ヌクレオチド長であり、500ヌクレオチド長、一般的には約50ヌクレオチド長、より一般的には約35ヌクレオチド長は超えず、長さは、阻害の効率、特異性（交差反応性の欠如を含む）等により支配される。7~8塩基長の短いオリゴヌクレオチドは、遺伝子発現の強力かつ選択的な阻害剤であり得ることが見出されている（Wagnerら（1996）*Nature Biotechnology* 14: 840-844参照）。

40

【0116】

50

内因性のセンス鎖 mRNA 配列の特定の1個またはそれ以上の領域が、アンチセンス配列と相補的であるよう選択される。オリゴヌクレオチドのための特定の配列の選択は、数個の候補配列が、インビトロ又は動物モデルにおける標的遺伝子の発現の阻害に関してアッセイされる、経験的方法を使用し得る。mRNA配列の数個の領域がアンチセンス相補のために選択される、配列の組み合わせが使用されてもよい。

【0117】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、当技術分野において既知の方法によって化学合成され得る (Wagnerら (1993) (前記) 及び Milliganら (前記) 参照)。好ましいオリゴヌクレオチドは、細胞内安定性及び結合親和性を増加させるため、天然型ホスホジエステル構造から化学修飾される。骨格、糖、又は複素環式塩基の化学を改変するそのような修飾は、多数、文献に記載されている。

10

【0118】

骨格化学の有用な変化としては、ホスホロチオエート；非架橋酸素が両方とも硫黄で置換されているホスホロジチオエート；ホスホロアミダイト；アルキルホスホトリエステル及びボラノホスフェートがある。アキラルなホスフェート誘導体には、3'-O'-5'-S-ホスホロチオエート、3'-S-5'-O-ホスホロチオエート、3'-CH₂-5'-O-ホスホネート、及び3'-NH-5'-O-ホスホロアミダイトが含まれる。ペプチド核酸は、完全なリボースホスホジエステル骨格をペプチド結合に交換したものである。糖修飾も、安定及び親和性を増強するために使用される。塩基が天然の アノマーと逆であるデオキシリボースの アノマーも使用され得る。リボース糖の2'-OHは、親和性を含まずに、分解に対する抵抗性を提供する2'-O-メチル糖又は2'-O-アリアル糖を形成するよう改変させられ得る。複素環式塩基の修飾は、適切な塩基対形成を維持しなければならない。いくつかの有用な置換には、デオキシウリジンとデオキシチミジン；5-メチル-2'-デオキシシチジン及び5-プロモ-2'-デオキシシチジンとデオキシシチジンが含まれる。5-プロピニル-2'-デオキシウリジン及び5-プロピニル-2'-デオキシシチジンは、それぞれデオキシチミジン及びデオキシシチジンに置換された場合、親和性及び生物学的活性を増加させることが示されている。

20

【0119】

化合物スクリーニング

化合物スクリーニングは、インビトロモデル、遺伝学的に改変された細胞もしくは動物、又は精製されたTM7XN1タンパク質を使用して実施され得る。コードされたポリペプチドと結合するか、その作用を調整又は模倣するリガンド又は基質が同定され得る。

30

【0120】

ポリペプチドには、TM7XN1遺伝子によってコードされたもののみならず、遺伝暗号の縮重のため、開示された核酸と配列が同一でない核酸、及びそれらのバリエーションによってコードされたものが含まれる。バリエーションポリペプチドは、アミノ酸 (aa) の置換、付加、又は欠失を含み得る。アミノ酸置換は、非必須アミノ酸を排除するための、例えばグリコシル化部位、リン酸化部位、もしくはアセチル化部位を改変するための、又は機能にとって必要でない1個またはそれ以上のシステイン残基の置換もしくは欠失による誤折り畳みを最小限に抑えるための、1個またはそれ以上の保存的アミノ酸置換であり得る。バリエーションは、タンパク質の特定の領域 (例えば、機能性ドメイン、及び/又は、ポリペプチドがタンパク質ファミリーのメンバーである場合には、コンセンサス配列に関連した領域) の生物学的活性を保持するか、又は増強されたそのような活性を有するよう設計され得る。バリエーションには、本明細書に開示されたポリペプチドの断片、特に生物学的活性断片及び/又は機能性ドメインに相当する断片が含まれる。目的の断片は、典型的には、少なくとも約10aa乃至少なくとも約15aa長、一般的には少なくとも約50aa長であり、300aa長又はそれ以上の長さであってもよいが、一般的には約500aa長を超えず、脳腫瘍関連遺伝子又はそのホモログによってコードされたポリペプチドと同一の連続アミノ酸ストレッチを有すると考えられる。

40

【0121】

トランスジェニック動物又はそれらに由来する細胞も、化合物スクリーニングにおいて

50

使用される。トランスジェニック動物は、TM7XN1に対応する正常な遺伝子座が改変される相対的組換えによって作成され得る。又は、核酸構築物がランダムにゲノムへ組み込まれる。安定的組み込みのためのベクターには、プラスミド、レトロウイルス及びその他の動物ウイルス、YAC等が含まれる。酵素活性、発癌、シグナル伝達等における異なるエキソンの役割を決定するために、一連の小さな欠失及び/又は置換が、コーディング配列に作成され得る。目的の特異的構築物には、標的とされた遺伝子の発現及びドミナントネガティブ変異の発現を阻止するアンチセンス配列が含まれる。lacZのような検出可能マーカが、目的の遺伝子座へ導入され得る。その場合、発現の上方制御により、容易に検出される表現型の変化をもたらされると考えられる。通常は発現されない細胞もしくは組織における、又は異常な発生時点における、標的遺伝子もしくはそのバリエーションの発現を提供することも可能である。通常は産生されない細胞における標的タンパク質の発現を提供することにより、細胞挙動の変化を誘導することが可能である。

10

【0122】

化合物スクリーニングにより、TM7XN1ポリペプチドの機能を調整する薬剤が同定される。特に重要であるのは、ヒトの細胞に対する低い毒性を有している薬剤に関するスクリーニングアッセイ法である。標識されたインビトロタンパク質-タンパク質結合アッセイ法等を含む極めて多様なアッセイ法が、この目的のために使用され得る。精製された組換えタンパク質の結晶化から導出されたコードされたタンパク質の三次元構造に関する知識は、活性を特異的に阻害する小さな薬物の合理的設計に結びつく可能性がある。これらの薬物は、特定のドメインに指向化され得る。

20

【0123】

一般的に使用されているGPCR活性化の二つのマーカーは、細胞内カルシウム及びcAMPである。この方法は、Gタンパク質共役受容体(GPCR)に対する機能的なアゴニスト及びアンタゴニストの同定にも使用され得る。細胞内カルシウム動員をモニタリングするためには、FLIPR(Fluorometric Imaging Plate Reader Molecular Devices Corp)が使用される。オーファンGPCR活性をモニタリングするには、オーファンGPCR標的がキメラGタンパク質と共役させられる。これは、Gq経路又はGs経路のいずれかを刺激するオーファンGPCRの測定が単一ウェルにおいて探索されることを可能にする。第一に、カルシウム動員をもたらすGq-PLC経路の興奮が、FLIPR装置を利用して完全細胞において測定される。続いて、細胞を溶解させ、HTRF方法を使用してcAMPのレベルを測定することにより、Gs活性化がモニタリングされる。この型の二重読み取りは、リガンドフィッシングスクリーニングにおける試薬コスト及び化合物消費を減少させる。

30

【0124】

浸潤アッセイ法に対する薬剤の効果は、例えば、化学誘引物質、例えば5%ウシ胎仔血清等に応答してマトリゲル様マトリックスを通過する細胞の能力の測定を提供するためにモニタリングされ得る。浸潤率は、マトリゲルコーティングフルオロブロック(FluoroBlock)膜を通過して浸潤する細胞の数を、非コーティングフルオロブロック膜を通過して浸潤する細胞の数で割ったものにより決定される。多数のインビトロ及びインビボの生物検定法が、血管形成の複雑な過程を模倣するために開発されている。これらのうち、各々血管形成の一面；即ち内皮細胞の増殖及び遊走を模倣する二つのアッセイ法が、特に、血管形成制御因子に関する特異的なスクリーニングのために広く使用されている。増殖アッセイ法は、培養された毛細血管内皮細胞を使用し、S期の細胞を検出するため、増加した細胞数、又は放射標識もしくは修飾されたヌクレオシドの取り込みのいずれかを測定する。対照的に、走化性アッセイ法は、閉門を横切った内皮細胞の遊走が、試験溶液中に存在する化学誘引物質の指標となるよう、内皮細胞及び試験溶液を多孔性膜ディスク(ボイデンチャンバー(Boyden Chamber))により分離する。

40

【0125】

内部移行の速度は、例えばセロミクスアレイスキャン(Cellomics Array Scan)HCSリーダーを使用して、蛍光タグをタンパク質にカップリングさせることにより測定され得る。会合及び解離の速度も、同様にして測定され得る。受容体の内部移行は、リサイクリン

50

グコンパートメント (recycling compartment) 内の蓄積及びリサイクリングコンパートメント内の受容体の減少によって測定され得る。

【 0 1 2 6 】

アポトーシスに影響を与える薬剤の能力が決定されてもよい。アポトーシスとは、「遺伝子によって指図された細胞の自己破壊」と定義され得る。細胞死は、壊死又はアポトーシスによって起こり得る。アポトーシスを測定するための多くの方式が存在する。例えば、生体色素排除の失敗又はMTTの取り込みによって決定される細胞生存可能性の欠損；DNA断片化、インサイチュ-TUNEL標識、細胞及び核の形態学、サブG1ピークFACS分析、システインプロテアーゼ活性化、Bcl2の阻害等。

【 0 1 2 7 】

ゼラチン酵素電気泳動法は、マトリックス分解に関与している酵素を分析するための定性的な方法である。それは、酵素の濃度及び活性の時間的な変化を証明するために、蛍光発生基質アッセイ法と組み合わせられ得る。腫瘍の浸潤特性には、腫瘍が、その腫瘍が位置する特定の組織の境界を越えて拡大することを可能にするための、マトリックス材料及び基底膜材料を分解するコラゲナーゼのようなタンパク質分解酵素の同化が伴う場合がある。そのような酵素の同化は、腫瘍細胞内の内因性の合成による可能性がある、又は隣接細胞もしくは循環血中好中球により誘発される可能性があり、その場合、腫瘍による誘発は、腫瘍によって同化された化学的メッセンジャーに起因し、酵素の発現は、腫瘍部位又は腫瘍の近位で起こる。

【 0 1 2 8 】

シグナル伝達経路に対する薬剤の効果は、当技術分野において周知のレポーターアッセイ法を使用して決定され得る。リガンドの結合によって、腫瘍に関係していることが示されているp21^{ras}、MAPキナーゼ、NF- κ B、及びcdc42/racのような中心的な細胞シグナル伝達経路の活性化が誘起される。cisレポーターシステムは、興味深い遺伝子又はタンパク質が、特異的なエンハンサーエレメントに作用するか否かを決定するために使用され得、トランス活性化剤は、興味深い遺伝子又はタンパク質が、転写因子のリン酸化及び活性化に直接的又は間接的に関与しているか否かを示す。

【 0 1 2 9 】

「薬剤」という用語は、本明細書において使用されるように、TM7XN1ポリペプチドの生理学的機能を改変又は模倣する能力を有する任意の分子、例えばタンパク質又は医薬品を記載するものである。一般に、様々な濃度に対する差次的な応答を得るために、複数のアッセイ混合物が、異なる薬剤濃度で平行に実行される。典型的には、これらの濃度のうちの一つは、陰性対照として使用される（即ち、ゼロ濃度又は検出レベル未満）。

【 0 1 3 0 】

候補薬剤には多数の化学物質クラスが含まれるが、典型的には、それらは、有機分子、好ましくは50ダルトン超、約2,500ダルトン未満の分子量を有する小さな有機化合物である。候補薬剤は、タンパク質との構造的相互作用、特に水素結合に必要な官能基を含み、典型的には、少なくとも1個のアミン基、カルボニル基、ヒドロキシル基、又はカルボキシル基を含み、好ましくは、官能化学基のうちの少なくとも2個を含む。候補薬剤は、上記の官能基のうちの1個またはそれ以上で置換された環式炭素又は複素環式構造、及びノ又は芳香族もしくは多環芳香族構造を含む場合が多い。候補薬剤は、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、それらの誘導体、構造類似体、又は組み合わせを含む生体分子の中にも見い出され得る。

【 0 1 3 1 】

候補薬剤は、合成又は天然の化合物のライブラリーを含む極めて多様な起源より得られる。例えば、ランダム化されたオリゴヌクレオチド及びオリゴペプチドの発現を含む、極めて多様な有機化合物及び生体分子のランダム合成及び特異的合成のための多数の手段が使用可能である。又は、細菌、真菌、植物、及び動物の抽出物の形態の天然化合物のライブラリーが、使用可能であるか、又は容易に作製される。さらに、天然の又は合成的に作製されたライブラリー及び化合物は、従来の化学的、物理的、及び生化学的手段によっ

10

20

30

40

50

て容易に修飾され、コンビナトリアルライブラリーを作製するために使用され得る。既知の薬理学的薬剤は、構造類似体を作製するため、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化等のような、特異的又はランダムな化学修飾に供され得る。被験薬剤は、例えば天然生成物ライブラリー又はコンビナトリアルライブラリーのようなライブラリーから入手され得る。多数の異なる型のコンビナトリアルライブラリー及びそのようなライブラリーを調製するための方法が、例えば、各々、参照として本明細書に組み込まれる国際公開公報第93/06121号、国際公開公報第95/12608号、国際公開公報第95/35503号、国際公開公報第94/08051号、及び国際公開公報第95/30642号に記載されている。

【0132】

スクリーニングアッセイ法が結合アッセイ法である場合、分子のうちの1個またはそれ以上が、直接的又は間接的に検出可能シグナルを提供することができる標識と結合させられ得る。様々な標識には、放射性同位体、蛍光団、化学発光団、酵素、特異的結合分子、粒子、例えば磁性粒子等が含まれる。特異的結合分子には、ビオチンとストレプトアビジン、ジゴキシンとアンチジゴキシン等のような対が含まれる。特異的結合メンバーの場合には、相補メンバーが、通常、既知の手法に従い、検出を提供する分子で標識されると考えられる。

【0133】

その他の多様な試薬が、スクリーニングアッセイ法に含まれ得る。これらには、最適なタンパク質 - タンパク質結合を容易にし、かつ/又は非特異的相互作用もしくはバックグラウンド相互作用を減少させるために使用される塩、中性タンパク質、例えばアルブミン、界面活性剤等のような試薬が含まれる。プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗微生物剤等のようなアッセイ法の効率を改善する試薬が、使用されてもよい。構成成分の混合物は、必要な結合を提供する任意の順序で添加される。インキュベーションは、任意の適当な温度、典型的には4~40の温度で実施される。インキュベーション時間は、最適な活性のため選択されるが、迅速なハイスループットスクリーニングを容易にするために最適化されてもよい。典型的には、0.1~1時間で十分であると考えられる。

【0134】

TM7XN1ポリペプチドと結合することができる化合物に関するスクリーニングによる予備スクリーニングを実施してもよく、そのようにして同定された化合物のうちの少なくともいくつかは、修飾物質、例えば、阻害剤又は活性化剤である可能性が高い。結合アッセイ法は、通常、TM7XN1ポリペプチドを1個またはそれ以上の被験化合物と接触させること、及びタンパク質と被験化合物とが結合複合体を形成するために十分な時間を経過させることを含む。形成された任意の結合複合体は、多数の確立されている分析技術のうちの任意のものを使用して検出され得る。タンパク質結合アッセイ法には、共沈殿、非変性SDS-ポリアクリルアミドゲル上の共移動、及びウェスタンブロット上の共移動を測定する方法が含まれる(例えば、Neurotransmitter Receptor Binding (Yamamura, H. I.ら編) 61-89頁のBennet, J. P. 及び Yamamura, H. I. (1985) 「Neurotransmitter, Hormone or Drug Receptor Binding Methods」参照)。

【0135】

発現又は活性のレベルは、基線値と比較され得る。既に示されたように、基線値は、対照試料に関する値、又は対照集団に関する発現レベルを代表する統計値であり得る。発現レベルは、陰性対照としてのTM7XN1遺伝子を発現していない細胞に関して決定されてもよい。そのような細胞は、一般に、その他の点では実質的に遺伝学的に被験細胞と同じである。レポーター構築物を欠く細胞を用いた平行反応を実行すること、又はレポーター構築物を保有している細胞を試験化合物と接触させないことを含む、様々な対照が、観察された活性が真正のものであることを保証するために実施され得る。化合物は、下記のようにして、さらに確認され得る。

【0136】

前述のスクリーニング法のうちのいずれかにより最初に同定された化合物は、明白な活性を確認するためにさらに試験され得る。そのような方法の基本的なフォーマットは、ヒ

トのモデルとして活用される動物へ、一次スクリーニングにおいて同定されたリード化合物を投与すること、次いで、TM7XN1が実際に上方制御されるか否かを決定することを含む。確認研究において使用される動物モデルは、一般に、哺乳動物である。適当な動物の具体例には、霊長類、マウス、及びラットが含まれるが、これらに制限はされない。

【0137】

本明細書に記載されたスクリーニング法により同定された、TM7XN1活性及びノ又は腫瘍成長を阻害する活性被験薬剤は、類似体化合物の合成のためのリード化合物として活用され得る。典型的には、類似体化合物は、リード化合物と類似した電子配置及び分子高次構造を有するよう合成される。類似体化合物の同定は、自己無撞着場 (SCF) 分析、配置間相互作用 (CI) 分析、及び正規モード動態分析のような技術の使用により実施され得る。これらの技術を実行するためのコンピュータプログラムが使用可能である。例えば、Reinら (1989) Computer-Assisted Modeling of Receptor-Ligand Interactions (Alan Liss, New York) を参照されたい。

10

【0138】

抗体複合体

脳腫瘍タンパク質標的の天然型活性が腫瘍細胞において改変されている場合、本発明において使用するための抗TM7XN1抗体は、結合なしに、有用性を有し得る。前記のようにして選択され得るそのような抗体は、治療剤として結合なしに使用され得る。本発明のもう一つの態様において、標的ポリペプチドの活性を改変してもよいし、又は改変しなくてもよいTM7XN1特異的抗体が、抗体に機能性を追加する細胞毒性剤又はイメージング剤と結合させられる。

20

【0139】

抗TM7XN1抗体は、1個またはそれ以上の治療用細胞毒性部分又はイメージング部分とカップリング又は結合させられ得る。本明細書において使用されるように、「細胞毒性部分」とは、細胞と接近しているか又は細胞に吸収された場合に、細胞成長を阻害するか又は細胞死を促進する部分である。この点に関して適当な細胞毒性部分には、放射性同位体 (放射性核種)、分化誘導剤及び小さな化学毒性薬物のような化学毒性剤、毒素タンパク質、並びにそれらの誘導体が含まれる。「イメージング部分」(1)とは、可視化技術 (例えば、ラジオグラフィ、陽電子放射断層撮影、核磁気共鳴イメージング、直接的又は間接的な視覚的検査) における腫瘍と周囲の健康な組織との対比を増加させるために使用され得る部分である。従って、適当なイメージング部分には、ラジオグラフィ部分 (例えば、重金属及び放射線放射部分)、陽電子放射部分、磁気共鳴造影部分、及び光学的に可視の部分 (例えば、蛍光性又は可視スペクトル色素、可視粒子等) が含まれる。治療用部分とイメージング部分との間にいくらかのオーバーラップが存在することは、当業者には理解されると思われる。例えば、 ^{212}Pb 及び ^{212}Bi は、両方とも、治療用組成物のための有用な同位体であるが、高電子密度でもあり、従ってX線ラジオグラフィイメージング技術のための対比を提供し、シンチレーションイメージング技術においても使用され得る。

30

【0140】

一般に、治療剤又はイメージング剤は、薬物動態学的安定性及び減少した患者への全体毒性の必要を適切に考慮しつつ、任意の適当な技術によって抗TM7XN1部分と結合させられ得る。治療剤は、直接的又は間接的に (例えば、リンカー基を介して)、適当な抗体部分とカップリングさせられ得る。各々が相互に反応することができる官能基を保有している場合には、薬剤と抗体との間の直接反応が可能である。例えば、アミノ基又はスルフヒドリル基のような求核性の基は、無水物もしくは酸ハロゲン化物のようなカルボニル含有基、又は優れた脱離基 (例えば、ハライド) を含有しているアルキル基と反応することができる場合がある。又は、適当な化学的リンカー基が使用されてもよい。リンカー基は、結合能の妨害を回避するために、抗体を薬剤から隔離するためのスペーサーとして機能し得る。リンカー基は、部分又は抗体の上の置換基の化学的反応性を増加させ、従ってカップリング効率を増加させるためにも活用され得る。化学的反応性の増加は、そうでなければ不可能であると考えられる部分又は部分上の官能基の使用も容易にし得る。

40

50

【0141】

適当な結合化学には、(抗体部分上のスルフヒドリルと反応する)マレイミジルリンカー及びハロゲン化アルキルリンカー、並びに(抗体部分上の第一級アミンと反応する)スクシンイミジルリンカーが含まれる。数個の第一級アミン及びスルフヒドリル基が、免疫グロブリン上に存在しており、組換え免疫グロブリン分子へと付加的な基が設計されてもよい。(Pierce Chemical Co., Rockford, Illのカタログに記載されているもののような)多様な二官能性又は多官能性の試薬(同種官能性及び異種官能性の両方)が、リンカー基として使用され得ることは、当業者には明らかであると考えられる。カップリングは、例えばアミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、又は酸化型炭水化物残基によって達成され得る。多数の参照が、そのような方法論を記載している(例えば、米国特許第4,671,958号)。別のカップリング方法として、米国特許第5,057,313号及び第5,156,840号に記載されたように、細胞毒性部分又はイメージング部分は、グリコシル化部位において酸化型炭水化物基によって抗 T_H 抗体部分とカップリングさせられてもよい。抗体部分を細胞毒性部分又はイメージング部分とカップリングさせるためのさらにもう一つの別法は、ストレプトアビジン/ビオチン又はアビジン/ビオチンのような非共有結合性の結合対の使用によるものである。これらの態様においては、対の一方のメンバーが、抗体部分と共有結合的にカップリングさせられ、結合対の他方のメンバーが、細胞毒性部分又はイメージング部分と共有結合的にカップリングさせられる。

10

【0142】

本発明の免疫複合体の抗体部分がない場合に、細胞毒性部分がより強力である場合には、細胞への侵入の間もしくは後に分解可能であるか、又は細胞外環境において経時的に徐々に分解可能であるリンカー基を使用することが望ましいと思われる。多数の異なる分解可能リンカー基が、記載されている。これらのリンカー基からの細胞毒性部分剤の細胞内放出のメカニズムには、ジスルフィド結合の還元による分解(例えば、米国特許第4,489,710号)、光不安定結合の放射による分解(例えば、米国特許第4,625,014号)、誘導体化されたアミノ酸側鎖の加水分解による分解(例えば、米国特許第4,638,045号)、血清中の補体により媒介される加水分解による分解(例えば、米国特許第4,671,958号)、及び酸触媒加水分解による分解(例えば、米国特許第4,569,789号)が含まれる。

20

【0143】

同じであってもよいし又は異なってもよい2個またはそれ以上の細胞毒性部分及び/又はイメージング部分が、抗体と結合させられてもよい。抗TM7XN1抗体の多重誘導体化によって、いくつかの細胞毒性戦略が同時に実行され得る。抗体は、いくつかの可視化技術のための造影剤として有用になる場合がある;又は、治療用抗体は、可視化技術による追跡のため標識され得る。複数個の部分を有する免疫複合体は、多様な方式で調製され得る。例えば、複数個の部分が、抗体分子に直接カップリングさせられてもよいし、又は付加のための複数の部位を提供するリンカー(例えば、 dendrimer)が使用されてもよい。又は、複数個の細胞毒性部分又はイメージング部分を担持する能力を有する担体が使用され得る。

30

【0144】

担体は、直接的な又はリンカー基を介した共有結合、及び非共有結合性の会合を含む様々な方式で、細胞毒性部分又はイメージング部分を保持し得る。適当な共有結合担体には、各々、部分の付加のための部位を複数個有しているアルブミンのようなタンパク質(例えば、米国特許第4,507,234号)、ペプチド、及びアミノデキストランのような多糖(例えば、米国特許第4,699,784号)が含まれる。担体は、非共有結合のような非共有結合性の会合、又はリボソーム小胞(例えば、米国特許第4,429,008号及び第4,873,088号)への封入のような封入により、薬剤を保持していてもよい。封入担体は、検出のための十分な量のイメージング部分(色素、磁気共鳴造影試薬等)を、より容易に、抗体部分と会合させ得るため、本発明において使用するための抗TM7XN1抗体部分へのイメージング部分の結合に特に有用である。さらに、腫瘍細胞の近傍に集中させながら、治療用組成物が経時的に徐々に化学毒性部分を放出することを可能にし得るため、封入担体は、化学毒性治療態

40

50

様においても有用である。

【0145】

放射性核種薬剤（細胞毒性部分として使用するためのもの又は陽電子放射イメージング部分として使用するためのもの両方）に特異的な担体及びリンカーには、放射性ハロゲン化低分子及びキレート化合物が含まれる。例えば、米国特許第4,735,792号は、代表的な放射性ハロゲン化低分子及びそれらの合成を開示している。放射性核種キレートは、金属、又は金属酸化物、放射性核種との結合のためのドナー原子としての窒素原子及び硫黄原子を含有しているものを含むキレート化合物から形成され得る。例えば、Davisonらの米国特許第4,673,562号は、代表的なキレート化合物及びそれらの合成を開示している。そのようなキレーション担体は、磁気共鳴イメージング腫瘍可視化法において使用するための磁気スピンコントラストイオン、及びラジオグラフィ可視化法において使用するための重金属イオンのキレーションにも有用である。

10

【0146】

細胞毒性部分として使用するための好ましい放射性核種は、薬理的投与に適した放射性核種である。そのような放射性核種には、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{211}At 、 ^{67}Cu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{212}Pb 、及び ^{212}Bi が含まれる。ヨウ素及びアスタチンの使用に関しては大量の文献が蓄積されているため、ヨウ素及びアスタチンの同位体は、本発明の治療用組成物において使用するためのより好ましい放射性核種である。 ^{131}I は、数ミリメートルの有効域を有している他の線放射核種と同様に、特に好ましい。 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、又は ^{211}At は、ヨウ素、N-スクシンイミジル3- [^{211}At]アスタトベンゾエート、N-スクシンイミジル3- [^{131}I]ヨードベンゾエート（SIB）、及びN-スクシンイミジル5- [^{131}I]ヨード-3-ピリジンカルボキシレート（SIPC）を含むいくつかの既知の結合試薬のうちの任意のものを使用して、組成物及び方法において使用するための抗体部分と結合させられ得る。任意のヨウ素同位体が、列挙されたヨード試薬において使用され得る。放射性核種は、核医学分野の当業者に既知の適当なキレーション剤により、抗TM7XN1抗体部分として結合させられてもよい。

20

【0147】

好ましい化学毒性薬剤には、カルボプラチン、シスプラチン、ピンクリスチン、パクリタキセル及びドセタキセルのようなタキサン類、ヒドロキシ尿素、ゲムシタピン、ピノレルピン、イリノテカン、チラパザミン、マトリリシン、メトトレキサート、ピリミジン及びプリンの類似体、並びに当技術分野において既知のその他の適当な小さな毒素のような低分子薬物が含まれる。好ましい化学毒素分化誘導剤には、ホルボールエステル及び酪酸が含まれる。化学毒性部分は、化学的リンカーを介して直接的に抗TM7XN1抗体部分と結合させられてもよいし、又は担体へと封入され、それが抗TM7XN1抗体部分と結合させられてもよい。

30

【0148】

化学療法は、高グレードの膠腫の調節において役に立つ。化学療法薬の一般的な組み合わせは、プロカルバジン、CCNU、及びピンクリスチンという3個の薬物をさす「PCV」である。テモゾロミド（Temozolomide）（テモダー（Temodar））は、退形成性星状細胞腫の処置のためFDAによって承認されており、この薬物は、現在、高グレードの膠腫のために広く使用されている。ノイボゲン（Neupogen）は、化学療法後に白血球数が極めて低いレベルにまで減少した患者へと投与され得る。

40

【0149】

細胞毒性部分として使用するための好ましい毒素タンパク質には、リシンA及びB、アブリン、ジフテリア毒素、ブリオジン（bryodin）1及び2、モモルジン（momordin）、トリコキリン（trichokirin）、コレラ毒素、ゲロニン（gelonin）、シュードモナス外毒素、シゲラ毒素、アメリカヤマゴボウ抗ウイルス性タンパク質、並びに医学生化学分野において既知のその他の毒素タンパク質が含まれる。非毒性リシンB鎖は、細胞と結合する部分であり、A鎖が、タンパク質合成を不活化する毒性部分である（ただし、ガラクトース末端膜タンパク質と結合するジスルフィド結合B鎖により細胞質へと送達された後にのみ）

50

。アブリン、ジフテリア毒素、及びシュードモナス外毒素は、全て、類似した二本鎖構成成分を有しており；一本は、細胞膜結合及び侵入を媒介する鎖であり、A鎖が毒性の酵素的な鎖である。コレラは、毒性A鎖とカップリングされたペントマーの結合サブユニットを有している。これらの毒素剤は、血管内に注射された場合には特に、患者において望ましくない免疫応答を誘発し得るため、抗TM7XN1抗体部分とのカップリングのためには担体へと封入されることが好ましい。

【0150】

本発明においてイメージング部分として使用するための好ましいラジオグラフィ部分には、金、イリジウム、テクネチウム、バリウム、タリウム、ヨウ素、及びそれらの同位体のような比較的大きな原子を含む化合物及びキレートが含まれる。本発明の組成物及び方法においては、ヨウ素又はヨウ素同位体のような低毒性のラジオグラフィイメージング部分が使用されることが好ましい。X線ラジオグラフィのため使用され得る組成物の例は、参照として完全に本明細書に組み込まれる米国特許第5,709,846号に記載されている。そのような部分は、許容される化学的リンカー又はキレーション担体によって抗TM7XN1抗体部分と結合させられ得る。さらに、頭蓋を透過することができる放射線を放射する放射性核種が、シンチレーションイメージング技術に有用であり得る。結合のための適当な放射性核種には、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、及び ^{67}Ga が含まれる。本発明において使用するための陽電子放射部分には、米国特許第6,187,284号に記載された方法に従い、抗TM7XN1抗体部分とのフッ素化反応によって容易に結合させられ得る ^{18}F が含まれる。

10

【0151】

好ましい磁気共鳴コントラスト部分には、クロミウム(III)イオン、マンガン(II)イオン、鉄(II)イオン、ニッケル(II)イオン、銅(II)イオン、プラセオジウム(III)イオン、ネオジウム(III)イオン、サマリウム(III)イオン、及びイッテルビウム(III)イオンのキレートが含まれる。ガドリニウム(III)イオン、テルビウム(III)イオン、ジスプロシウム(III)イオン、ホルミウム(III)イオン、エルビウム(III)イオン、及び鉄(III)イオンは、極めて強い磁気モーメントのため、特に好ましい。磁気共鳴スピンイメージングに適したそのようなキレートの例は、参照として完全に本明細書に組み込まれる米国特許第5,733,522号に記載されている。核スピンコントラストキレートは、適当な化学的リンカーによって抗TM7XN1抗体部分と結合させられ得る。

20

【0152】

イメージング部分として使用するための光学的に可視の部分には、蛍光色素、並びに可視スペクトル色素、可視の粒子、及びその他の可視の標識部分が含まれる。アレキサ(AL EXA)色素、フルオレセイン、クマリン、ローダミン、ボディピー(bodipy)テキサスレッド、及びシアニン色素のような蛍光色素が、視覚的に検査すべき部位に十分な励起エネルギーが提供された場合、有用である。内視鏡的可視化法は、そのような標識の使用と比較的適合性であり得る。脳腫瘍を切除する手術のような、イメージング剤が有用である多くの手法については、可視スペクトル色素が好ましい。許容される色素には、非毒性のFDAにより承認されている食用の色素及び着色料が含まれるが、内用として承認された薬学的に許容される色素が好ましい。好ましい態様において、そのような色素は、担体部分に封入され、それらが、抗TM7XN1抗体と結合させられる。又は、コロイド金粒子又はラテックス粒子のような可視の粒子が、適当な化学的リンカーを介して抗TM7XN1抗体部分とカップリングさせられ得る。

30

40

【0153】

薬学的製剤

血液脳関門(BBB)を通した薬物送達のための一つの戦略は、マンニトールもしくは口イコトリエンのような浸透圧手段によるか、又は生化学的に、ブラジキニンのような血管作用物質の使用による、BBBの破壊を要する。特定の薬剤を脳腫瘍へターゲットングするためにBBBオープニングを使用することも、選択可能である。BBB破壊剤は、組成物が血管内注射によって投与される場合、本発明の治療用組成物又はイメージング組成物と共投与され得る。BBBを貫通するためのその他の戦略は、グルコース担体及びアミノ酸担体のよ

50

うな担体により媒介されるトランスポーター、インスリン又はトランスフェリンのための受容体により媒介されるトランスサイトシス、並びにp糖タンパク質のような能動排出輸送体を含む内因性の輸送系の使用を要する。能動輸送部分も、血管の上皮壁を横切る輸送を容易にするため、本発明において使用するための治療用化合物又はイメージング化合物と結合させられ得る。又は、BBBの後ろへの薬物送達には、例えばオマヤレザバーによる、治療薬又はイメージング剤の頭蓋への直接的なクモ膜下腔内送達による。

【0154】

薬学的組成物には、望まれる製剤に依って、動物又はヒトへの投与のための薬学的組成物を製剤化するために一般的に使用されている媒体と定義される、薬学的に許容される非毒性の希釈剤の担体が含まれ得る。希釈剤は、組み合わせの生物学的活性に影響しないように選択される。そのような希釈剤の例は、蒸留水、緩衝水溶液、生理食塩水、PBS、リンゲル液、デキストロース溶液、及びハックス液である。さらに、薬学的組成物又は製剤には、その他の担体、佐剤、又は非毒性の非治療用の非免疫原性の安定化剤、賦形剤等が含まれ得る。組成物には、pH調整緩衝剤、毒性調整剤、湿潤剤、及び界面活性剤のような生理学的条件に接近するための付加的な物質が含まれ得る。

10

【0155】

組成物には、例えば抗酸化剤のような多様な安定剤のうちの任意のものが含まれ得る。薬学的組成物がポリペプチドを含んでいる場合、ポリペプチドは、ポリペプチドのインビボ安定性を増強するか、又は薬理学的特性を増強する（例えば、ポリペプチドの半減期を増加させる、毒性を減少させる、可溶性又は取り込みを増強する）、様々な周知の化合物と複合体化され得る。そのような修飾又は複合体化剤の例には、硫酸塩、グルコン酸塩、クエン酸塩、及びリン酸塩が含まれる。組成物のポリペプチドは、インビボ属性を増強する分子と複合体化されてもよい。そのような分子には、例えば、炭水化物、ポリアミン、アミノ酸、その他のペプチド、イオン（例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、マンガン）、及び脂質が含まれる。

20

【0156】

様々な型の投与に適した製剤に関するさらなる手引きは、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mace Publishing Company, Philadelphia, PA) 第17版 (1985) に見い出され得る。薬物送達のための方法の簡潔な概説については、Langer, Science 249: 1527-1533 (1990) を参照されたい。

30

【0157】

薬学的組成物は、予防的及び/又は治療的な処置のため投与され得る。活性成分の毒性及び治療効力は、例えばLD₅₀（集団の50%にとって致死的な用量）及びED₅₀（集団の50%において治療的に有効な用量）の決定を含む、細胞培養物及び/又は実験動物における標準的な薬学的手法に従い決定され得る。毒性効果と治療効果との用量比が、治療指数であり、比率LD₅₀/ED₅₀として表され得る。大きな治療指数を示す化合物が好ましい。

【0158】

細胞培養物及び/又は動物研究から得られたデータは、ヒトのための投薬量の範囲を規定するのに使用され得る。活性成分の投薬量は、典型的には、低い毒性と共にED₅₀を含む循環血中濃度の範囲内にある。投薬量は、使用される剤形及び使用される投与経路に依って、この範囲内で変動し得る。

40

【0159】

本明細書に記載された薬学的組成物は、多様な異なる方式で投与され得る。例には、経口、鼻腔内、直腸内、局所、腹腔内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、経皮、クモ膜下腔内、及び頭蓋内の方法を介した、薬学的に許容される担体を含有している組成物の投与が含まれる。

【0160】

経口投与の場合、活性成分は、カプセル、錠剤、及び粉末のような固体剤形、又はエリキシル、シロップ、及び懸濁液のような液体剤形で投与され得る。（1個またはそれ以上の）活性構成成分は、不活性成分、及びグルコース、乳糖、ショ糖、マンニトール、デン

50

ブン、セルロース又はセルロース誘導体、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、サッカリンナトリウム、タルク、炭酸マグネシウムのような粉末化担体と共にゼラチンカプセルに封入され得る。望ましい色、味、安定性、緩衝能、分散、又はその他の既知の望ましい特質を提供するために添加され得る付加的な不活性成分の例は、べんがら、シリカゲル、ラウリル硫酸ナトリウム、二酸化チタン、及び食用白色顔料である。類似の希釈剤が、圧縮錠を作成するために使用され得る。錠剤及びカプセルの両方は、数時間にわたり医薬品の連続的な放出を提供するため、徐放性製品として製造され得る。圧縮錠は、不快な味をマスキングし、環境から錠剤を保護するための糖コーティングもしくはフィルムコーティング、又は胃腸管における選択的な崩壊のための腸溶コーティングを施され得る。経口投与用の液体剤形は、患者による受け入れを増加させるため、着色料及び香料を含有し得る。

10

【0161】

活性成分は、単独で、又は他の適当な構成成分と組み合わせられて、吸入を介して投与されるエアロゾル製剤にされ得る（即ち、「噴霧」され得る）。エアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素のような加圧された許容される噴霧剤の中に置かれ得る。

【0162】

例えば、関節内経路（関節の中）、静脈内経路、筋肉内経路、皮内経路、腹腔内経路、及び皮下経路のような非経口投与に適した製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、及び製剤を意図された受容者の血液と等張にする溶質を含有し得る水性及び非水性の等張無菌注射溶液、並びに懸濁化剤、可溶化剤、濃化剤、安定剤、及び保存剤を含み得る水性及び非水性の無菌懸濁液が含まれる。

20

【0163】

薬学的組成物を製剤化するために使用される構成成分は、好ましくは高純度であり、潜在的に有害な汚染物質を実質的に含まない（例えば、少なくともナショナルフード（National Food）（NF）等級、一般には、少なくとも分析的等級、より典型的には少なくとも薬学的等級）。さらに、インビボ使用を目的とする組成物は、通常、無菌である。特定の化合物が使用前に合成されなければならない場合、得られる産物は、典型的には、合成又は精製の過程で存在する可能性のある潜在的に毒性の薬剤、特に内毒素を実質的に含まない。非経口投与用の組成物も、無菌であり、実質的に等張であり、GMP条件の下で作成される。

30

【0164】

本発明の組成物は、任意の医学的に適切な手法、例えば血管内（静脈内、動脈内、毛細血管内）投与、脳脊髄液への注射、腔内注射、又は腫瘍への直接注射を使用して投与され得る。クモ膜下腔内投与は、既知の技術に従い、オマヤレザバーの使用により実施され得る（F. Balisら、Am J. Pediatr. Hematol. Oncol. 11、74、76（1989））。本発明のイメージング組成物については、血管内注射を介した投与が、腫瘍の術前可視化にとって好ましい。術後の可視化又は手術と同時の可視化は、例えばオマヤレザバーによる、クモ膜下腔内もしくは腔内投与によってもよいし、又は血管内投与によってもよい。

【0165】

本発明の治療用組成物の投与のための一つの方法は、（必要であれば、注射シリンジの定位固定によって補助される）直接注射、又は投与のための腔もしくは嚢胞へのオマヤレザバーのチップの設置のような、任意の適当な技術による嚢胞性腫瘍の内腔への沈積によるものである。腫瘍が固形腫瘍である場合には、まず、腫瘍の位置に切除腔を作出することにより、抗体が投与され得る。この手法は、少数の微細な点でのみ通常の開頭及び腫瘍切除と異なっている。腫瘍切除は、一般的な処置法であり、圧力を緩和するために指示される場合が多いため、本発明の治療用組成物の投与は、腫瘍切除の後に実施され得る。標準的な神経外科的な全切除の後、全ての出血が焼灼によって止められるまで、腔は好ましくは生理食塩水で濯がれる。次に、表面で腫瘍腔を囲んでいる軟膜くも膜が、繊維芽細胞反応及び軟膜くも膜区域における斑痕の形成を増強するために焼灼される。その結果、脳

40

50

組織内の腫瘍が除去された位置に、閉鎖された体液で満たされた腔が形成される。嚢胞が形成された後、ポンプ装置に接続され、腔への抗体溶液の連続注入を可能にするオマヤレザバー又はマイクロカテーテルのチップが腔内に設置され得る。例えば、参照として完全に本明細書に組み込まれる米国特許第5,558,852号を参照されたい。

【0166】

又は、対流増強送達カテーテルが、腫瘍塊、天然もしくは外科的に作出された嚢胞、又は正常脳塊へと直接移植されてもよい。そのような対流増強薬学的組成物送達装置は、脳塊全体への組成物の拡散を大きく改善する。これらの送達装置の移植されたカテーテルは、脳及び/又は腫瘍塊へと治療用組成物又はイメージング組成物を送達するため、拡散流ではなく高流速微量注入(約0.5~15.0 μ l/分の範囲の流速)を使用する。そのような装置は、参照として完全に本明細書に組込まれる米国特許第5,720,720号に記載されている。

10

【0167】

特定の患者へと与えるべき治療組成物の有効量は、多様な要因に依存すると考えられるが、それらのいくつかは、患者によって異なっていると考えられる。有能な医師であれば、腫瘍細胞の成長を遅延させ、死滅を促進するため患者に投与すべき治療剤の有効量、又は腫瘍の可視化を容易にするため患者に投与すべきイメージング組成物の有効量を決定することができると考えられる。抗体複合体の投薬量は、腫瘍の処置、投与の経路、治療薬の性質、治療薬に対する腫瘍の感受性等に依存すると考えられる。結合した細胞毒性部分又はイメージング部分に関して入手可能なLD₅₀動物データ及びその他の情報を使用して、医師は、投与の経路に依って、個体のための最大安全用量を決定することができる。例えば、静脈内投与される用量は、治療用組成物が投与される体液がより多いため、クモ膜下腔内投与される用量よりも大きい。同様に、身体から迅速に排泄される組成物は、治療的濃度を維持するために、より高用量で、又は反復的に投与され得る。イメージング部分は、典型的には、細胞毒性部分より低毒性であり、いくつかの態様において、より高い用量で投与され得る。有能な医師であれば、通常の技術を使用して、日常の臨床試験の過程で、特定の治療用組成物又はイメージング組成物の投薬量を最適化することができよう。

20

【0168】

典型的には、投薬量は、対象の体重1キログラム当たり0.001~100ミリグラムの複合体であると考えられる。クモ膜下腔内投与される放射性核種治療用組成物の場合には、患者の体重1キログラム当たり0.01~1mgの範囲の用量が、使用され得る。比較的非毒性のイメージング部分を含むイメージング複合体の場合には、患者の体重1キログラム当たり0.1~10mgの範囲の比較的大きな用量が、使用され得る。使用される量は、イメージング法の感度及びイメージング部分の相対毒性に依存すると考えられる。例えば、治療用組成物が¹³¹I細胞毒性部分を含む治療の例においては、患者への投薬量は、典型的には、10mCiという比較的低い範囲から出発し、100mCi、300mCi、又はさらには500mCiにまで引き上げられると考えられる。換言すると、治療剤が¹³¹Iである場合、患者への投薬量は、典型的には、5,000ラド~100,000ラド(好ましくは、少なくとも13,000ラド、又はさらには少なくとも50,000ラド)と考えられる。その他の放射性核種の用量は、典型的には、殺腫瘍用量が上記の¹³¹Iの範囲と等価になるよう選択される。同様に、化学毒性タンパク質又は毒素タンパク質の用量は、相応じて計測され得る。

30

40

【0169】

組成物は、一連の複数回の投与で対象へと投与され得る。治療用組成物の場合には、規則的な周期的な投与(例えば、2~3日毎)が、毒性を減少させるため、必要とされるか、又は望ましい場合がある。治療用組成物が反復用量計画において使用される場合には、免疫応答を惹起しない抗体部分が好ましい。イメージング抗体複合体組成物は、可視化技術の前の適切な時点で投与され得る。例えば、直接視覚的検査の前1時間以内の投与が適切である場合がある、又はMRIスキャンの前12時間以内の投与が適切である場合がある。しかしながら、イメージング化合物は最終的には患者の系から排泄されるため、投与と可視化との間にあまりに多くの時間を経過させないよう、注意すべきである。

50

【0170】

単純な可視化のためのイメージング抗体複合体の使用に加え、これらの組成物は、比較的高毒性の細胞毒性抗体複合体のための「模擬試験」として使用され得る。治療用複合体と同じ抗体部分がイメージング複合体のために使用される場合、医師は、まず、細胞毒性複合体が集中すると考えられる脳内の位置を正確に決定するために、可視化技術を使用することができる。十分な程度の組織選択性が達成されない場合（例えば、腫瘍細胞が正常な組織にも過剰に分散している場合、又は選択された特定の脳腫瘍タンパク質標的が特定の患者の腫瘍細胞において十分に過剰発現されていない場合）、医師は、もう一つの脳腫瘍タンパク質標的を選択することができる。イメージング剤及び治療剤の両方と併せた、多数の脳腫瘍タンパク質標的の本発明による提供は、個々の患者にとって有効な治療計画の設計における高度の柔軟性を可能にする。

10

【0171】

組み合わせ療法

脳腫瘍は、不均一な特徴を有し、脳組織全体に蔓延する傾向がある。この組み合わせのため、それらの処置は困難である場合が多い。いくつかの場合には、殺腫瘍特徴を示す細胞全てをより完全にターゲティングするため、様々な治療剤又はイメージング剤の組み合わせを使用することが好ましい場合がある。そのような組み合わせ処置は、前記のようにして個々に調製された治療用又はイメージング用の抗体組成物を混和したものの投与、及び記載されたような患者への混和された治療剤の投与による。熟練した医師であれば、そのような組み合わせ薬剤を投与する場合に、組み合わせ毒性、及び個々の薬剤の効力のような要因を考慮に入れることができよう。さらに、当業者であれば、各薬剤の完全な効力を保証するため、可能性のある相互の交差反応に関してスクリーニングすることができると考えられる。

20

【0172】

又は、数個の個々の脳腫瘍タンパク質標的組成物が、組み合わせ療法のため、同時又は連続的に投与され得る。これは、数個の抗体複合体試薬から蓄積される毒性を回避するため、又は個々の抗体試薬に対する可能性のある有害反応をより緊密にモニタリングするため、望ましい場合がある。従って、第一の抗体治療剤を1日目に投与し、続いて第二を2日目に投与し、次いで投与を行わない期間の後、異なる連続日に抗体治療薬を再投与するというようなサイクルが、本発明に包含される。

30

【0173】

療法がTM7XN1に対して特異的に指向化されたものであっても、又は一般的な化学療法であっても、TM7XN1の診断的画像化は、療法の効力を決定するための「分子指標」を提供し得る。

【0174】

癌ワクチン

TM7XN1タンパク質は、自己、同種異系、又は異種の宿主における免疫反応の誘発に有益である。例えば、腫瘍細胞が、タンパク質を特異的に発現しているか、又は正常細胞と比してタンパク質を過剰発現している場合、腫瘍細胞が優先的に死滅するような、細胞溶解性免疫応答が誘導され得る。そのような目的のための抗原は、同一種に由来してもよいし、又は異なる種に由来してもよい。本明細書において使用されるように、抗原という用語は、体液性免疫応答、即ち抗原特異的抗体の産生を特徴とする応答であってもよいし、又は細胞障害性免疫応答、即ち抗原特異的細胞障害性Tリンパ球の産生を特徴とする応答であってもよい、哺乳動物宿主における免疫応答を誘発することができる分子をさすものとする。

40

【0175】

抗体又はT細胞受容体が結合する抗原の部分は、エピトープと呼ばれる。抗原、特にポリペプチドのような複雑な抗原は、通常、複数のエピトープを含む。抗原がタンパク質である場合、直鎖状エピトープは、約5~20アミノ酸長の範囲である。抗体及びT細胞受容体は、抗原上の非連続残基によって形成された高次構造的な決定基を認識する場合もあり、

50

従って、エピトープは、抗原のより大きな断片、例えばタンパク質ドメイン又はタンパク質配列の本質的に全部が結合のために存在することを必要とする可能性がある。従って、数百アミノ酸長であり得る治療用タンパク質は多数の別個のエピトープを含み得ることが認識されると思われる。

【0176】

抗原性の弱いタンパク質、即ち自己タンパク質等に対する免疫応答を誘導するために使用され得るいくつかの方法が存在する。応答を誘発するためには、通常、免疫原がインビボ送達されるが、それらを宿主動物へ導入する前にエクスピボで抗原提示細胞、例えば樹状細胞を初回刺激することが有利である場合がある。

【0177】

抗原の調製においては、当技術分野において既知のようにして、TM7XN1タンパク質又はその断片が発現され精製される。又は、TM7XN1の断片は化学合成されてもよい。免疫応答を生ずるために、タンパク質は、融合タンパク質として作成されるか又はもう一つのポリペプチドと結合させられてもよく、化学的に修飾されるか又はアジュバントと混合されてもよい。

【0178】

分子をつなぎ合わせるためにペプチド結合又はその他の結合を利用し得る複合体の例には、例えば、KLH、preS HbsAg、又は例えばインターフェロン誘導性タンパク質 (interferon inducible protein) 10 (IP-10)、単球走化性タンパク質 (monocyte chemotactic protein) 3 (MCP-3)、インターロイキン-1、インターロイキン-2、及び-インターロイキン8、顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子等 (GM-CSF) 等のようなサイトカインもしくはケモカインが含まれ、又は化学的に修飾されてもよい。抗原調製及び免疫感作に適している融合ケモカイン及び方法の例は、Biragynら (Immunol Rev (1990) 170: 115-126) ; Biragynら (Nature Biotechnology (1999) 17: 253-258、及びTaoら (1993) Nature 362: 755-695) に提供されている。

【0179】

ポリペプチド抗原は、抗原に対する特異的な免疫応答を強化されると思われるアジュバントと混合され得る。多くの異なる型のアジュバントが当技術分野において既知であり、例えば、ミョウバン、ステアリル・チロシン、サポニン、モノホスホリル・リピドA (MPL-A)、ムラミル・トリペプチド・ホスファチジルエタノールアミン (MTP-PE) 等を含む。アジュバントは、インターロイキン1 (IL1)、インターロイキン2 (IL2) その他のインターロイキン、TNF、及び-インターフェロン、顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子、腫瘍壊死因子等のようなサイトカインを含有していてもよい。アジュバントは、コレラ毒素Bサブユニット、全細胞不活化ミコバクテリウム、百日咳菌 (Bordetella pertussis) コンポーネント、ジフテリア毒素等のようなその他の部分を含有していてもよい。ワクチン抗原は、マイクロスフェア、リポソームを使用して提示されてもよいし、当技術分野において既知のような、免疫刺激複合体 (immunostimulating complex) (ISCOM) を使用して作製されてもよい。

【0180】

エクスピボ抗原負荷工程が含まれる場合には、樹状細胞が既知の方法を使用して個体から単離され、好ましくはGM-CSFのようなサイトカインと融合している、ペプチド抗原と共にインキュベートされる。次いで、樹状細胞調製物は、分画され、確立されている手法による静脈注射又は中枢注射 (例えば、30~60分にわたる注入) によって宿主へ投与され得る。この処置に対する対象の応答性は、当技術分野において周知の方法により、細胞溶解性T細胞応答、ヘルパーT細胞応答、及び末梢血単核球における抗原に対する抗体応答の誘導をモニタリングすることにより測定され得る。特許第5,851,756号、第6,080,409号、第5,994,126号、及び第号5,972,334の開示は、参照として完全に本明細書に組み込まれる。

【0181】

実験

以下の実施例は、本発明をいかにして作成及び使用するかの完全な開示及び記載を当業

10

20

30

40

50

者に提供するために示されるものであり、本発明者らが本発明と見なすものの範囲を制限するためのものではないし、実施された実験が下記の実験のみであることを表すためのものでもない。使用された数（例えば、量、温度等）に関しては正確さを保証すべく努力がなされたが、いくつかの実験の誤差及び偏差は斟酌されるべきである。特記しない限り、部分は重量部分であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、圧力は大気圧又は大気圧付近である。

【0182】

この明細書中に引用された全ての出版物及び特許出願は、個々の出版物又は特許出願が各々特別に個別に参照として組み込まれると示されたかのごとく、参照として本明細書に組み込まれる。

10

【0183】

本発明は、本発明の実施のための好ましい様式を含むことが本発明者らによって見出された又は提唱された特定の態様に関して記載された。本開示を考慮することにより、本発明の意図された範囲を逸脱することなく、例証された特定の態様に多数の修飾及び変化を施し得ることが、当業者には理解されると思われる。例えば、コドンの縮重により、タンパク質配列に影響を与えることなく、基となるDNA配列を変化させることが可能である。さらに、生物学的機能的等価性の考察により、生物学的作用の種類又は量に影響を与えることなく、タンパク質構造を変化させることが可能である。そのような修飾は全て、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれるものとする。

【0184】

20

実施例1

差次的に発現された配列の同定

脳腫瘍：

未詳の患者に由来する、神経病理学によって神経膠芽腫グレードIVと確認された腫瘍組織が、手術室において急速凍結させられ、実験試料として活用された。ヒト全脳組織（Ciontech Laboratories、Palo Alto、USA）を、対照試料として活用した。2000年7月28日出願の同時係属中の米国特許出願第09/927,362号に記載のように、細胞から調製されたポリA⁺ RNAを、二本鎖cDNA（dscDNA）へと変換し、標準化した。腫瘍に由来するdscDNAを、非癌性脳の同じ領域から調製された過剰のdscDNAと共に使用して、サブトラクティブハイブリダイゼーションを実施した。差次的に発現された遺伝子断片を、プラスミドベクターへとクローニングし、得られたライブラリーを大腸菌細胞へと形質転換した。組換えクローニングの挿入断片を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅した。PCR産物（200～2000bpのサイズの断片）を、一般的なベクター配列に相補的なオリゴヌクレオチドを使用して配列決定した。得られた配列情報を、BLAST（blastn）及びスミス・ウォーターマンアルゴリズムを使用して、公共データベースと比較した。このようにして同定された差次的に発現された配列を、配列番号：1として提供される。

30

【0185】

TM7XN1発現プロファイル

AGYイマジネディスカバープラットフォーム（AGY imAGYne discovery platform）を使用して、TM7XN1をコードする遺伝子が、14個のGBM腫瘍試料のパネルにおいて1.905倍上方制御されていることが決定された。アノテーションのためのp値は、1.6E-83であった。mRNA発現レベルの増加は、正常脳試料及び脳腫瘍試料のパネルに対する定量PCR及びインサイチュハイブリダイゼーションを使用して確認された。mRNA測定及びcDNAアレイは必ずしも正確にタンパク質発現の大きさを反映しないため、この標的を付加的な手段によって研究した。

40

【0186】

ウサギポリクローナル抗体を、TM7XN1の細胞外N末端にマッピングされたペプチド配列に対して生成させた。これらの抗体は、TM7XN1タンパク質の分析に有用であることが判明した。TM7XN1タンパク質発現を、ヒト神経膠芽腫に由来する細胞系、肺、肝臓、脳、及びGBM組織のコレクションのウェスタンブロットによって調査した（図1に示される）。この

50

分析は、TM7XN1が、GBM腫瘍組織において上方制御されており、膠腫細胞系において差次的に発現されていることを証明している。

【0187】

TM7XN1タンパク質の局在を、原発腫瘍のパラフィン切片に対する免疫組織化学によって分析した（図2a及び2bに示される）。この研究においては、GBM腫瘍19個中15個（79%）が、TM7XN1染色陽性であった。正常脳切片には、極めて低いレベルの発現が同定された。さらに、正常ヒト組織のパネルのIHC分析によって、心臓、副腎、及び腎臓に由来する試料が、低～中程度のレベルの発現を有していることが示された。その他の組織（リンパ節、結腸、肝臓、精巣、脾臓、及び甲状腺）は、検出可能なレベルのTM7XN1陽性染色を有していなかった。本発明者らのウェスタンブロット分析と一致して、これらの結果は、GBMにおけるTM7XN1タンパク質の上方制御を明白に証明している。従って、TM7XN1は、GBMのための優れたマーカーである。

10

【0188】

データは、より低いレベルではあるが、TM7XN1がその他の組織にも発現されており、脳における役割に類似している役割を果たしている可能性があることを証明している。表1に示されるように、その配列は、腺癌、腎臓細胞癌、及び非黒色腫瘍において発現されている。

【0189】

（表1）ヒト癌におけるTM7XN1の発現

癌の型	腫瘍組織の例	TM7XN1陽性腫瘍(%)
腺癌	結腸	50%
腎臓細胞癌	腎臓	37%
非黒色腫瘍	口/口蓋/唇/粘膜	43%

20

【0190】

TM7XN1タンパク質に対する抗体を用いた免疫組織化学を使用した、ランドマーク（Land mark）（商標）高密度癌調査組織マイクロアレイ（High Density cancer survey Tissue Microarray）（Ambion）におけるヒト癌組織の調査において、いくつかの腫瘍が、陽性染色/発現を示した。TM7XN1発現と最も高頻度に関連していた癌の型を、表に列挙する（腺癌、腎臓細胞癌、並びに基底細胞癌及び扁平上皮癌を含む非黒色腫瘍）。腫瘍組織型の例（結腸、腎臓、及び口/口蓋）、及びグループ内のTM7XN1陽性腫瘍の割合（%）が与えられる。TM7XN1タンパク質発現は、多数のヒト癌において見出され、腫瘍生物学に関連している可能性がある。

30

【0191】

TM7XN1の機能バリデーション

全長TM7XN1を、ヒト成人脳cDNAライブラリーからRT-PCRを使用してクローニングした。このcDNAに由来する構築物は、FLAGエピトプタグ化タンパク質又は非タグ化タンパク質のいずれかとして発現される。TM7XN1の機能を決定するため、ヒトHEK-293細胞を、ガラクトシダーゼトランスフェクション対照と共に、TM7XN1及びルシフェラーゼレポーター構築物のパネルにより一過的に同時トランスフェクトしたヒトであった。これらの実験によって、TM7XN1が機能性であるか否か、及びそれが既知のシグナル伝達経路を活性化し得るか否かの決定が可能となる。これらの測定によって、既知のリガンドの非存在下ですら、TM7XN1機能を間接的に研究することができる。データは、TM7XN1が、CREB応答エレメント（Response Element）（CRE-ルシフェラーゼ）及び血清応答エレメント（Serum Response Element）（SRE-ルシフェラーゼ）を活性化することを示している（図3に示される）。NF- κ Bレポーターは、TM7XN1によって活性化されなかった。従って、TM7XN1の一過性の過剰発現によって、シグナル伝達カスケードの活性化が起こり、遺伝子転写を調整し得る核へのCREB及びSREの転移が最高潮に達する。これらの経路は、腫瘍の成長を含む多

40

50

数の細胞機能に関係していることが示されている。

【0192】

ヒト神経膠芽腫に由来する細胞を、対照siRNAでトランスフェクトした。3日後に測細胞増殖を定した。TM7XN1 siRNAでトランスフェクトされた細胞は、対照細胞よりおよそ26%ゆっくりと増殖し、このことから、腫瘍細胞成長におけるTM7XN1の役割が示された。

【0193】

以上は、本発明の態様を例示するためのものであり、決して、本発明を制限するためのものではない。特定の修飾に関して本発明を記載したが、それらの詳細は制限として解釈されるべきではなく、本発明の本旨及び範囲を逸脱することなく、様々な等価物、変化、及び修飾が可能であることが明らかであると思われ、そのような等価な態様は、本発明に含まれることが理解される。全ての出版物及び特許出願が、個々の出版物又は特許出願が各々特別に個別に参照として組み込まれると示されたかのごとく、参照として本明細書に組み込まれる。

10

【図面の簡単な説明】

【0194】

【図1】ヒトGBM由来細胞系及び組織のウェスタンブロット分析。TM7XN1は、いくつかの膠腫細胞系及びGBMにおいて上方制御されている。

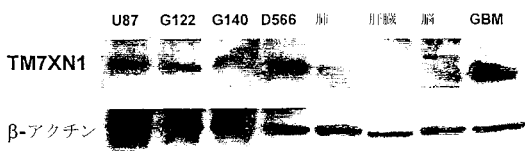
【図2】神経膠芽腫組織のインサイチュウ切片におけるTM7XN1タンパク質の発現を示す。

【図3】TM7XN1の一過性過剰発現による下流転写因子の活性化。HEK-293を、ベクター対照、又はTM7XN1とレポーター構築物とで一過的にトランスフェクトした。ルシフェラーゼ活性の増加倍率を、 β -ガラクトシダーゼ活性に対して規準化した。

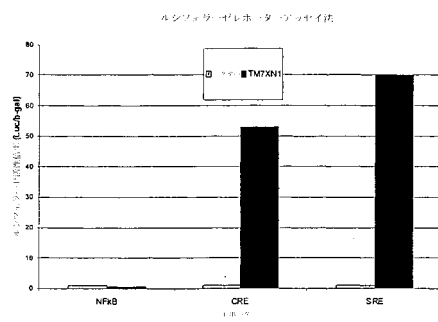
20

【図4】TM7XN1 siRNAに応答して起こる細胞増殖。ヒト神経膠芽腫由来細胞を、対照siRNAでトランスフェクトした。3日後に細胞増殖を測定した。TM7XN1 siRNAでトランスフェクトされた細胞は、対照細胞よりおよそ26%ゆっくりと増殖し、このことから、腫瘍細胞成長におけるTM7XN1の役割が示された。

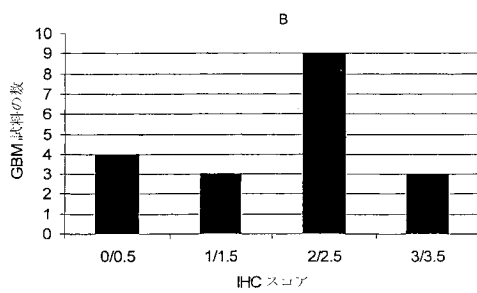
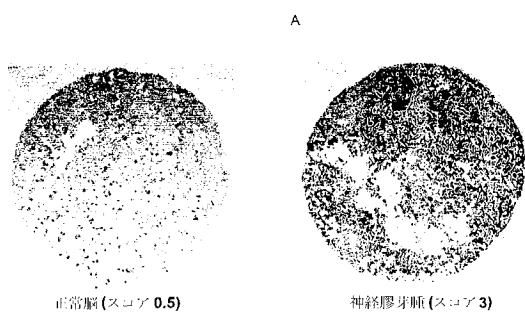
【図1】



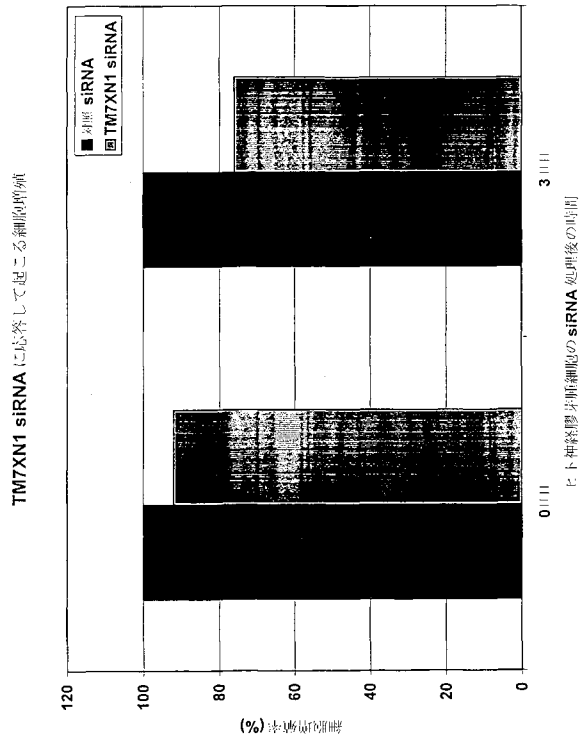
【図3】



【図2】



【 図 4 】



【 配列表 】

[2005523687000001.app](#)

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成16年10月19日 (2004.10.19)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

脳腫瘍、腺癌、非黒色腫瘍、及び腎臓癌からなる群より選択される腫瘍の診断又は病期決定のための方法であって、TM7XN1の発現の上方制御又は下方制御を決定することを含む、方法。

【 請求項 2 】

脳腫瘍が星状細胞腫である、請求項1記載の方法。

【 請求項 3 】

星状細胞腫が神経膠芽腫である、請求項2記載の方法。

【 請求項 4 】

決定が、脳腫瘍細胞内のmRNA又はポリペプチドの量の増加又は減少を検出することを含む、請求項1記載の方法。

【 請求項 5 】

脳腫瘍、腺癌、非黒色腫瘍、及び腎臓癌からなる群より選択される腫瘍の画像化の方法であって、
イメージング部分と結合している、TM7XN1タンパク質と特異的に結合する化合物を、有効

量、患者へ投与すること；及び

前記複合体のイメージング部分を可視化することを含む、方法。

【請求項6】

複合体がクモ膜下腔内投与によって投与される、請求項5の方法。

【請求項7】

化合物が血管内投与によって投与される、請求項5の方法。

【請求項8】

腫瘍が星状細胞腫である、請求項5の方法。

【請求項9】

星状細胞腫が神経膠芽腫である、請求項8の方法。

【請求項10】

化合物が抗体又は抗体断片である、請求項5の方法。

【請求項11】

イメージング部分が、X線撮影用部分、陽電子放射部分、光学的に可視の色素、光学的に可視の粒子、及び磁気スピンコントラスト部分からなる群より選択される、請求項5の方法。

【請求項12】

脳腫瘍、腺癌、非黒色腫瘍、及び腎臓癌からなる群より選択される腫瘍を処置する方法であって、1個または複数の細胞毒性部分と結合している、TM7XN1タンパク質と特異的に結合する化合物を、治療的な量、投与することを含む、方法。

【請求項13】

化合物がクモ膜下腔内投与によって投与される、請求項12の方法。

【請求項14】

化合物が血管内投与によって投与される、請求項12の方法。

【請求項15】

腫瘍が星状細胞腫である、請求項12の方法。

【請求項16】

星状細胞腫が神経膠芽腫である、請求項15の方法。

【請求項17】

化合物が抗体又は抗体断片である、請求項12の方法。

【請求項18】

抗体がヒト抗体である、請求項17記載の方法。

【請求項19】

抗体がTM7XN1の細胞外ドメインと特異的に結合するものである、請求項17記載の方法。

【請求項20】

細胞毒性部分が、放射性部分、化学毒性部分、及び毒素タンパク質部分からなる群より選択される、請求項12の方法。

【請求項21】

脳腫瘍、腺癌、非黒色腫瘍、及び腎臓癌からなる群より選択される腫瘍に対する免疫応答を増強するための方法であって、TM7XN1ポリペプチドの抗原を含む免疫原性組成物を宿主へ投与することを含む、方法。

【請求項22】

宿主が脳腫瘍に罹患している、請求項21記載の方法。

【請求項23】

投与工程が、単離された樹状細胞を抗原と共にインキュベートすることをさらに含む、請求項21の方法。

【請求項24】

抗原がサイトカインと融合している、請求項21の方法。

【請求項25】

腫瘍タンパク質標的遺伝子又は遺伝子産物の活性を調整する生物学的活性薬剤を開発す

るための方法であって、
候補の生物学的活性薬剤を、

(a) TM7XN1ポリペプチド；

(b) TM7XN1ポリペプチドをコードし発現する核酸を含む細胞；又は

(c) (i) TM7XN1に対応する遺伝子のノックアウト；(ii) TM7XN1をコードする外因性の安定的に伝達された哺乳動物遺伝子配列のうちの一つを含む、腫瘍遺伝子機能のための非ヒトトランスジェニック動物モデルのうちいずれか一つと組み合わせること；並びに腫瘍により誘導された分子及び細胞の変化に対する前記薬剤の効果を決定することを含む、方法。

【請求項 26】

生物学的活性薬剤が、発現を下方制御又は上方制御するものである、請求項25記載の方法。

【請求項 27】

生物学的活性薬剤が、ポリペプチドの活性を阻害するか又は増加させるものである、請求項25記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/41419
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C12N 15/12, 5/10, 1/21; C07K 14/705, 14/72, 16/28; A61K 38/17; C12Q 1/68 US CL : 530/300, 350, 387.1, 388.1, 388.15; 436/64, 164; 435/4; 424/130.1, 9.1, 1.11; 536/1.11, 22.1, 23.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/300, 350, 387.1, 388.1, 388.15; 436/64, 164; 435/4; 424/130.1, 9.1, 1.11; 536/1.11, 22.1, 23.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) GenCore sequence database		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/20590 A2 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 13 April 2000 (13.04.00), see abstract; page 23, lines 12-22, page 24, line 8; page 25, lines 8-14; page 30, lines 19-27; page 31, lines 15-26; bridging paragraph of pages 33 and 34, page 34, lines 26-34 and entire document.	1-4, 12-19, 33-37 and 51-55
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 April 2003 (02.04.2003)		Date of mailing of the international search report 28 JUL 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Alanna M. Harris, Ph.D. Telephone No. (703)308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 5
A 6 1 K 49/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 49/04	A 6 1 K 49/00	A
A 6 1 K 51/00	A 6 1 K 49/00	C
A 6 1 P 1/14	A 6 1 K 49/04	A
A 6 1 P 3/00	A 6 1 P 1/14	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 9/14	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 9/14	
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/30	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/32	A 6 1 P 25/30	
A 6 1 P 27/00	A 6 1 P 25/32	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 27/00	
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 41/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 41/00	
C 1 2 Q 1/02	A 6 1 P 43/00	1 0 5
G 0 1 N 33/15	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z
// C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/50	Z
	A 6 1 K 49/02	A
	C 1 2 N 15/00	A

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

(72) 発明者 ムエラー サビン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン フランシスコ クリッパー ストリート 3 4 3

(72) 発明者 フォアー エリック

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ミル バレー ミラー アベニュー # 5 9 6

(72) 発明者 チン ダニエル

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 フォスター シティ セレスシャル レーン 6 5 3

F ターム(参考) 2G045 AA29 CB01 FB03
4B024 AA11 CA09 HA12
4B063 QA19 QQ53 QQ79 QR55 QR77 QS32
4C076 CC27 CC42 EE57 EE59 FF67 FF68
4C084 AA02 AA13 CA27 NA14 ZA011 ZA021 ZA061 ZA081 ZA121 ZA151
ZA161 ZA181 ZA211 ZA221 ZA321 ZA361 ZA441 ZA811 ZA941 ZB211
ZB261 ZB321 ZB331 ZB351 ZB371 ZC391 ZC411
4C085 AA06 AA14 AA21 AA26 DD21 DD62 EE01 HH03 HH05 HH07
HH13 KA04 LL18