

(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2010-512730  
(P2010-512730A)

(43) 公表日 平成22年4月30日(2010.4.30)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 12 N 15/09</b> (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
<b>C 12 Q 1/68</b> (2006.01)	C 12 Q 1/68	A 4 B O 2 4
<b>C 12 Q 1/48</b> (2006.01)	C 12 Q 1/48	Z 4 B O 6 3
<b>C 12 Q 1/02</b> (2006.01)	C 12 Q 1/02	4 C O 8 4
<b>C 07 K 14/71</b> (2006.01)	C 07 K 14/71	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 80 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2009-524832 (P2009-524832)	(71) 出願人 502240113
(86) (22) 出願日	平成19年12月12日 (2007.12.12)	オンコセラピー・サイエンス株式会社
(85) 翻訳文提出日	平成21年8月5日 (2009.8.5)	神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/074359	(74) 代理人 100102978
(87) 国際公開番号	W02008/072777	弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成20年6月19日 (2008.6.19)	(74) 代理人 100102118
(31) 優先権主張番号	60/874,791	弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成18年12月13日 (2006.12.13)	(74) 代理人 100160923
(33) 優先権主張国	米国(US)	弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人 100119507
		弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人 100142929
		弁理士 井上 隆一
		(74) 代理人 100148699
		弁理士 佐藤 利光
		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】肺癌の腫瘍マーカーおよび治療標的としてのTTK

## (57) 【要約】

本明細書に開示されるのは、EGFRに対するTTKキナーゼ活性測定方法およびこのキナーゼ活性のモジュレーターのスクリーニング方法である。また、開示されるのはこのモジュレーターを用いる、または含む、肺癌を予防および/または治療する方法ならびに薬学的組成物である。EGFRタンパク質に対するTTKキナーゼ活性を指標として使用する肺癌診断方法、ならびに、肺癌を評価および予後予測する方法もまた提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の工程を含む、肺癌の予後を評価する方法：

- 肺癌の予後を評価する対象から採取した試料におけるTTK発現レベルおよびEGFRリン酸化レベルのいずれかまたは両方を検出する工程、および
- TTK発現レベルおよびEGFRリン酸化レベルのいずれかまたは両方の上昇が、対照レベルと比較して検出された場合に予後不良を示す工程。

## 【請求項 2】

TTK発現レベルが以下から成る群より選択されるいずれか一つの方法によって検出される、請求項1記載の方法：

- SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列をコードするmRNAの存在を検出する方法、
- SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列を含むタンパク質の存在を検出する方法、および
- SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列を含むタンパク質の生物活性を検出する方法。

## 【請求項 3】

(c)の生物活性がEGFRに対するキナーゼ活性である、請求項2記載の方法。

## 【請求項 4】

EGFRのリン酸化レベルがSEQ ID NO:42の992アミノ酸残基のチロシンまたは967アミノ酸残基のセリンで検出される、請求項1記載の方法。

## 【請求項 5】

以下から成る群から選択されるいずれか一つの構成成分を含む、肺癌予後評価のためのキット：

- SEQ ID NO:2のアミノ酸配列をコードするmRNAを検出する試薬、
- SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含むタンパク質、あるいは、SEQ ID NO:42の992アミノ酸残基のチロシンまたは967アミノ酸残基のセリンを検出する試薬、ならびに
- SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含むタンパク質の生物活性を検出する試薬。

## 【請求項 6】

対象由来の生物試料におけるTTK発現レベルまたはEGFRリン酸化レベルを決定する工程を含む、肺癌または肺癌発症の素因を診断する方法であって、該遺伝子の正常対照レベルと比較した、該試料における該発現レベルまたはリン酸化レベルの上昇が、該対象が肺癌に罹患している、または肺癌発症のリスクを有していることを示す、方法。

## 【請求項 7】

前記試料の発現レベルが、正常対照レベルと比べ少なくとも10%高い、請求項6記載の方法。

## 【請求項 8】

TTK発現レベルが以下から成る群から選択される方法によって決定される、請求項6記載の方法：

- SEQ ID NO:2のアミノ酸配列をコードするmRNAを検出する方法、
- SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含むタンパク質を検出する方法、および
- SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含むタンパク質の生物活性を検出する方法。

## 【請求項 9】

生物活性がEGFRに対するキナーゼ活性である、請求項8記載の方法。

## 【請求項 10】

EGFRリン酸化レベルがSEQ ID NO:42の992アミノ酸残基のチロシンまたは967アミノ酸残基のセリンで検出される、請求項6記載の方法。

## 【請求項 11】

対象由来の生物試料が上皮細胞を含む、請求項6記載の方法。

## 【請求項 12】

生物試料が肺細胞を含む、請求項6記載の方法。

## 【請求項 13】

生物試料が肺組織由来の上皮細胞を含む、請求項6記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 14】

EGFRに対するTTKのキナーゼ活性を検出する試薬を含む、対象の肺癌または肺癌発症の素因を診断するキット。

## 【請求項 15】

EGFRに対するTTKのキナーゼ活性が、EGF非依存的なTTKによるEGFRのリン酸化である、請求項14記載のキット。

## 【請求項 16】

以下の工程を含む、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性を測定する方法：

a. TTKによるEGFRリン酸化に適した条件下でEGFRまたはその機能的等価物とTTKとをインキュベートする工程であって、TTKが以下から成る群から選択される、工程：

i. SEQ ID NO:2 (TTK) のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

ii. SEQ ID NO:2の一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失または挿入されたアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、結果として得られるポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する、ポリペプチド；

iii. SEQ ID NO:1の核酸配列から成るポリヌクレオチドにストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、結果として得られるポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する、ポリペプチド；

b. リン酸化EGFRレベルを検出する工程；および

c. 工程(b)で検出されたリン酸化EGFRレベルと相關させることにより、TTKキナーゼ活性を測定する工程。

## 【請求項 17】

EGFRの機能的等価物がSEQ ID NO:43のアミノ酸配列を含む断片である、請求項16記載の方法。

## 【請求項 18】

リン酸化EGFRレベルがSEQ ID NO:42の992アミノ酸残基のチロシンまたは967アミノ酸残基のセリンで検出される、請求項16記載の方法。

## 【請求項 19】

以下の工程を含む、EGFRに対するTTKキナーゼ活性を変更する薬剤を同定する方法：

a. TTKによるEGFRのリン酸化に適した条件の下、試験化合物の存在下でEGFRまたはその機能的等価物とTTKとをインキュベートする工程であって、TTKが以下から成る群から選択されるポリペプチドである、工程：

i. SEQ ID NO:2 (TTK) のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

ii. SEQ ID NO:2の一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失または挿入されたアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、結果として得られるポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する、ポリペプチド；

iii. SEQ ID NO:1の核酸配列から成るポリヌクレオチドにストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、結果として得られるポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する、ポリペプチド；

b. リン酸化EGFRレベルを検出する工程；および

c. 対照レベルとリン酸化EGFRレベルとを比較する工程であって、正常対照レベルと比較したリン酸化EGFRレベルにおける増減が、該試験化合物がEGFRに対するTTKキナーゼ活性を変更することを示す、工程。

## 【請求項 20】

EGFRの機能的同等物がSEQ ID NO:43のアミノ酸配列を含む断片である、請求項19記載の方法。

## 【請求項 21】

リン酸化EGFRレベルがSEQ ID NO:42の992アミノ酸残基のチロシンまたは967アミノ酸残基のセリンで検出される、請求項19記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 2 2】

以下の工程を含む、肺癌を治療および/または予防する化合物のスクリーニング方法：  
a. TTKによるEGFRのリン酸化に適した条件の下、試験化合物の存在下でEGFRまたはその機能的等価物とTTKとをインキュベートする工程であって、TTKが以下から成る群から選択されるポリペプチドである、工程：

- i. SEQ ID NO:2 (TTK) のアミノ酸配列を含むポリペプチド；
  - ii. SEQ ID NO:2の一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失または挿入されたアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、該ポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する、ポリペプチド；
  - iii. SEQ ID NO:1の核酸配列から成るポリヌクレオチドにストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、該ポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する、ポリペプチド；
- b. リン酸化EGFRレベルを検出する工程；および
- c. 対照レベルと比較したリン酸化EGFRレベルを減少させる化合物を選択する工程。

## 【請求項 2 3】

EGFRの機能的等価物がSEQ ID NO:43のアミノ酸配列を含む断片である、請求項 2 2 記載の方法。

## 【請求項 2 4】

リン酸化EGFRレベルがSEQ ID NO:42の992アミノ酸残基のチロシンまたは967アミノ酸残基のセリンで検出される、請求項 2 2 記載の方法。

## 【請求項 2 5】

以下の構成成分を含むキットであって、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性を改変する試験化合物の能力を検出するキット：

A) 以下から成る群から選択されるポリペプチド：

- i. SEQ ID NO:2 (TTK) のアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- ii. SEQ ID NO:2の一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失または挿入されたアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、結果として得られるポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する、ポリペプチド；
- iii. SEQ ID NO:1の核酸配列から成るポリヌクレオチドにストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、結果として得られるポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する、ポリペプチド；

B) SEQ ID NO:43のアミノ酸配列を含むEGFRまたはEGFR断片；および

C) リン酸化EGFRを検出する試薬。

## 【請求項 2 6】

以下の構成成分を含むキットであって、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性を改変する試験化合物の能力を検出するキット：

A) SEQ ID NO:43のアミノ酸配列を含むEGFRまたはEGFR断片、および以下から成る群から選択されるポリペプチドを発現する細胞：

- i. SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含むポリペプチド (TTK)；
  - ii. SEQ ID NO:2の一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失または挿入されたアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、結果として得られるポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する、ポリペプチド；
  - iii. SEQ ID NO:1の核酸配列から成るポリヌクレオチドにストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドであって、結果として得られるポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する、ポリペプチド；
- B) リン酸化EGFRを検出する試薬。

## 【請求項 2 7】

10

20

30

40

50

以下の工程を含む、肺癌の転移を予測する方法：

- キナーゼドメインにおけるTTKの1つまたは複数の変異を検出する工程、
- 変異を検出した場合、肺癌の転移の高い危険度を示す工程。

【請求項 28】

キナーゼドメインにおけるTTKの1つまたは複数の変異が、SEQ ID NO:2のコドン610におけるバリンからフェニルアラニン(V610F)、コドン753におけるグルタミンからヒスチジン(Q753H)、およびコドン574におけるチロシンからシステイン(Y574C)から成る群から選択される、請求項27記載の方法。

【請求項 29】

以下の工程を含む、TTKの1つまたは複数の変異を検出する方法であって、変異が、SEQ ID NO:2のコドン610におけるバリンからフェニルアラニン(V610F)、コドン753におけるグルタミンからヒスチジン(Q753H)、およびコドン574におけるチロシンからシステイン(Y574C)から成る群から選択される少なくとも1つの変異である、方法：

- 対象ポリペプチドまたはそれをコードするcDNAと、ポリペプチドまたはそれをコードするcDNAの変異のいずれか1つを認識する結合薬剤とを接触させる工程、
- ポリペプチドまたはそれをコードするcDNAと結合薬剤とを検出する工程、および
- 工程b)の薬剤の結合が検出された場合、TTKの変異が示される工程。

【請求項 30】

結合薬剤が、SEQ ID NO:2のコドン610におけるバリンからフェニルアラニン(V610F)、コドン753におけるグルタミンからヒスチジン(Q753H)、およびコドン574におけるチロシンからシステイン(Y574C)から成る群から選択される少なくとも1つの変異を含むポリペプチドに結合する抗体であり、かつ、結合薬剤がSEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドには実質的に結合しない、請求項29記載の方法。

【請求項 31】

試薬がポリペプチドまたはそれをコードするcDNAの変異のいずれか1つを認識する結合薬剤を含み、変異がSEQ ID NO:2のコドン610におけるバリンからフェニルアラニン(V610F)、コドン753におけるグルタミンからヒスチジン(Q753H)、およびコドン574におけるチロシンからシステイン(Y574C)から成る群から選択される少なくとも1つの変異である、TTKの1つまたは複数の変異を検出する試薬。

【請求項 32】

結合薬剤が、SEQ ID NO:2のコドン610におけるバリンからフェニルアラニン(V610F)、コドン753におけるグルタミンからヒスチジン(Q753H)、およびコドン574におけるチロシンからシステイン(Y574C)から成る群から選択される少なくとも1つの変異を含むポリペプチドと結合する抗体であり、かつ、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドには実質的に結合しない、請求項31記載の試薬。

【請求項 33】

A1870G(V610Fに対する)、G1977T(Q753Hに対する)およびG2408C(Y574Cに対する)から成る群から選択される1つまたは複数の変異を含む、SEQ ID NO:1の変異核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチド、または該1つまたは複数の変異を含むその断片。

【請求項 34】

V610F、Q753HおよびY574Cから成る群から選択される1つまたは複数の変異を含む、SEQ ID NO:2の変異アミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド、または該1つまたは複数の変異を含むその断片。

【請求項 35】

(a) ISSILEKGERLPQPPPICTI (SEQ ID NO:44)、DVYMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO:45)またはFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO:46)を含むポリペプチド、および

(b) ISSILEKGERLPQPPPICTI (SEQ ID NO:44)、DVYMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO:45)およびFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO:46)から成る群から選択されるポリペプチドと機能的に等価なポリペプチドであって、

SEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドの生物機能を欠く、ポリペプチド

10

20

30

40

50

から成る群から選択される少なくともいずれか1つのポリペプチド、または、

(a) および(b)のポリペプチドから選択されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

を投与する工程を含む、肺癌の治療または予防方法。

【請求項 3 6】

(a) ISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO:44)、DVYMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO:45) またはFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO:46) を含むポリペプチド、および

(b) ISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO:44)、DVYMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO:45) およびFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO:46) から成る群から選択されるポリペプチドと機能的に等価なポリペプチドであって、

SEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドの生物機能を欠く、ポリペプチドから成る群から選択される少なくともいずれか1つのポリペプチド、または、

(a) および(b)のポリペプチドから選択されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

の薬学的な有効量、ならびに薬学的に許容される担体を含む、肺癌の治療または予防のための組成物。

【請求項 3 7】

以下から成る群から選択されるポリペプチド；

(a) ISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO:44)、DVYMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO:45) またはFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO:46) を含むポリペプチド、および

(b) ISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO:44)、DVYMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO:45) およびFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO:46) から成る群から選択されるポリペプチドと機能的に等価なポリペプチドのアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、

SEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドの生物機能を欠く、ポリペプチド。

【請求項 3 8】

請求項 3 7 記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 3 9】

生物機能が細胞増殖活性である、請求項 3 7 記載のポリペプチド。

【請求項 4 0】

19から57残基から成る、請求項 3 7 記載のポリペプチド。

【請求項 4 1】

細胞膜透過性物質で修飾された、請求項 3 7 記載のポリペプチド。

【請求項 4 2】

一般式：

[R]-[D]

を有し、式中、[R]が細胞膜透過性物質を表し；かつ[D]が、ISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO:44) またはDVYMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO:45) またはFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO:46) を含む断片配列のアミノ酸配列；あるいは該断片配列を含むポリペプチドと機能的に等価なポリペプチドのアミノ酸配列を表し、

該ポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドの生物機能を欠いており、

[R]および[D]が、GGGから成るアミノ酸配列を含むリンカーで直接または間接的に連結されている。

請求項 4 1 記載のポリペプチド。

【請求項 4 3】

細胞膜透過性物質が以下から成る群から選択されるいずれか1つである、請求項 4 2 記載のポリペプチド：

ポリアルギニン；

Tat / RKKRRQRRR/SEQ ID NO:47；

ペネトラチン / RQIKIWFQNRRMKWKK/SEQ ID NO:48；

10

20

30

40

50

プフォリンII / TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK/SEQ ID NO:49;  
 トランスポータン / GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL/SEQ ID NO:50;  
 MAP (モデル両親媒性ペプチド) / KLALKLALKALKALKALA/SEQ ID NO:51;  
 K-FGF / AAVALLPAVLLALLAP/SEQ ID NO:52;  
 Ku70 / VPMLK/SEQ ID NO:53  
 Ku70 / PMLKE/SEQ ID NO:61;  
 プリオン / MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP/SEQ ID NO:54;  
 pVEC / LLIIILRRRIRKQAHHSK/SEQ ID NO:55;  
 Pep-1 / KETWWETWWTEWSQPKKKRKV/SEQ ID NO:56;  
 SynB1 / RGGRRLSYSRRRFSTSTGR/SEQ ID NO:57;  
 Pep-7 / SDLWEMMMVSLACQY/SEQ ID NO:58; および  
 HN-1 / TSPLNIHNGQKL/SEQ ID NO:59。

10

## 【請求項 4 4】

ポリアルギニンがArg 11 (RRRRRRRRRR/SEQ ID NO:60)である、請求項 4 3 記載のポリペプチド。

## 【請求項 4 5】

TTK (SEQ ID NO:1) またはEGFR (SEQ ID NO:3) の遺伝子発現を減少させる二本鎖分子を含む組成物を対象に投与することを含む、肺癌の治療または予防方法であって、該二本鎖分子がセンス核酸およびアンチセンス核酸を含み、該センス核酸が標的配列としてSEQ ID NO:62または63の配列に対応するリボヌクレオチド配列を含む、方法。

20

## 【請求項 4 6】

組成物がトランスフェクション促進剤を含む、請求項 4 5 記載の方法。

## 【請求項 4 7】

TTK (SEQ ID NO:1) またはEGFR (SEQ ID NO:3) の遺伝子発現を減少させる二本鎖分子の薬学的有効量、および薬学的に許容される担体を含む肺癌の治療または予防のための組成物であって、該二本鎖分子がセンス核酸およびアンチセンス核酸を含み、該センス核酸が標的配列としてSEQ ID NO:62または63の配列に対応するリボヌクレオチド配列を含む、組成物。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

30

## 【0 0 0 1】

本出願は、2006年12月13日付で出願した米国仮特許出願60/874,791号の恩典を主張するものであり、その開示全体は全目的に關して参照により本明細書に組み入れられる。

## 【0 0 0 2】

本発明は、肺癌、より詳しくはその診断および治療に関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 3】

肺癌は、世界的に見て癌による死亡の最も一般的な原因の1つであり、非小細胞肺癌(NSCLC)はそのような症例のほぼ80%を占める(Greenlee, R. T., et al., (2001) CA Cancer J Clin, 51: 15-36. (非特許文献1))。小細胞肺癌(SCLC)は全肺癌の15-20%を占める(Chute JP et al., (1999) J Clin Oncol.; 17:1794-801 (非特許文献2), Simon GR et al., (2003) Chest.; 123(1 Suppl):259S-271S (非特許文献3))。肺癌の発症および進行に関連した多くの遺伝子的变化が報告されているが、正確な分子機序は依然として不明である(Sozzi, G. Eur J Cancer, (2001) 37 Suppl 7: S63-73. (非特許文献4))。この10年の間に、パクリタキセル、ドセタキセル、ゲムシタビンおよびビノレルビンを含む、新たに開発された細胞毒性薬が出現し、進行性NSCLC患者に複数の治療選択肢が提供されるようになった。しかし、新しい治療法は、シスプラチニンに基づく従来の治療と比較して、わずかな延命効果を提供できるに過ぎない(Schiller, J. H. et al. (2002) N Engl J Med, 346: 92-8. (非特許文献5); Kelly, K., et al. (2001) J Clin Oncol, 19: 3210-8 (非特許文献6))。したがって、例えば分子標的作用物質、抗体、および癌ワクチンなどの新

40

50

しい治療戦略の開発が切望されている。

【0004】

cDNAマイクロアレイ技術を用いて数千の遺伝子の発現レベルを系統的に解析することは、発癌経路に関する未知の分子を同定するための有効なアプローチであり、かつ新規な治療法および診断法を開発するための候補標的として調べることができる。レーザーキャプチャーマイクロダイセクションにより肺癌組織101例から腫瘍細胞を濃縮した後に、27,648の遺伝子を含むcDNAマイクロアレイ上でNSCLC細胞のゲノムワイドな発現プロファイルを解析することによって、NSCLCの診断、治療および予防のための新規な分子標的を単離しようという試みがなされている(Kikuchi T, et al. *Oncogene*. 2003 Apr10;22(14):2192-205. (非特許文献7) ; Kikuchi T, et al. *Int J Oncol.* 2006 Apr; 28(4):799-805. (非特許文献8) ; Kakiuchi S, et al., *Mol Cancer Res.* 2003 May;1(7):485-99. (非特許文献9) ; *Hum Mol Genet.* 2004 Dec15;13(24):3029-43. Epub 2004 Oct 20. (非特許文献10) ; Taniwaki M, et al., *Int J Oncol.* 2006 Sep;29(3):567-75. (非特許文献11) )。ゲノムワイドcDNAマイクロアレイ解析の経過で、642の上方制御された遺伝子および806の下方制御された遺伝子が、NSCLCの診断マーカーおよび治療標的として同定された(WO 2004/31413 (特許文献1) (その内容は参照により本明細書に組み入れられる))。

【0005】

上皮成長因子受容体(EGFR)は、例えばEGFRの自己リン酸化を導き、EGFR情報伝達経路を活性化するEGFのようなリガンドの刺激によって、様々な組織においてヒト癌の成長および生存に重要な役割を果たす。cDNAおよび組織マイクロアレイ解析によって、肺癌の大多数でTTKは過剰発現するものとして同定され、さらに予後不良と関連することが示された。さらに、siRNA処理による内因性TTK発現の抑制は、非小細胞肺癌細胞の有意な増殖阻害を生じることが示された。癌細胞情報伝達に関連するリン酸化タンパク質に対する抗体のパネルを用いたTTKキナーゼの候補基質のスクリーニングは、TTKの細胞内標的としてEGFRを同定する結果となった。さらに、TTKによるEGFRのチロシン-992およびセリン-967のリン酸化がEGF刺激と独立して発生し、PLC の活性化およびMAPKのリン酸化につながることが発見された。また、原発性肺腺癌由来の転移性脳腫瘍を有する2人の患者および肺癌細胞株RERF-LC-A1において、TTK遺伝子のチロシンキナーゼドメインに点変異が同定された。インビトロでは、TTK変異体は哺乳動物細胞の浸潤能力を増大した。同時に、これらのデータは癌遺伝子およびその活性化としてのTTKの機能が癌細胞においてEGFR-MAPK情報伝達の細胞内刺激において重要な役割を果たすこと、TTKキナーゼと、EGFの存在から独立したEGFR間の新規細胞内情報伝達経路が肺癌形成において重要な役割を果たすことを示している。したがって、本発明はTTK酵素活性を標的とすることが肺癌患者の治療に対する有望な治療戦略であることを示唆している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】WO 2004/31413

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Greenlee, R. T., et al., (2001) *CA Cancer J Clin.*, 51: 15-36

【非特許文献2】Chute JP et al., (1999) *J Clin Oncol.*; 17:1794-801

【非特許文献3】Simon GR et al., (2003) *Chest.*; 123(1 Suppl):259S-271S

【非特許文献4】Sozzi, G. *Eur J Cancer*, (2001) 37 Suppl 7: S63-73

【非特許文献5】Schiller, J. H. et al. (2002) *N Engl J Med*, 346: 92-8

【非特許文献6】Kelly, K., et al. (2001) *J Clin Oncol*, 19: 3210-8

【非特許文献7】Kikuchi T, et al. *Oncogene*. 2003 Apr10;22(14):2192-205

【非特許文献8】Kikuchi T, et al. *Int J Oncol.* 2006 Apr; 28(4):799-805

【非特許文献9】Kakiuchi S, et al., *Mol Cancer Res.* 2003 May;1(7):485-99

【非特許文献10】*Hum Mol Genet.* 2004 Dec15;13(24):3029-43. Epub 2004 Oct 20

10

20

30

40

50

【非特許文献 11】Taniwaki M, et al, Int J Oncol. 2006 Sep;29(3):567-75

【発明の概要】

【0008】

ヒト癌の診断、治療および予防の新規分子標的のスクリーニングの過程で、レーザーマイクロダイセクションと組み合わせた27,648の遺伝子を含むcDNAマイクロアレイ上で、101例の肺癌のゲノム全域発現プロファイル分析が行われた(Kikuchi T, et al. Oncogene. 2003 Apr 10;22(14):2192-205.; Kikuchi T, et al. Int J Oncol. 2006 Apr;28(4):799-805.; Kakiuchi S, et al., Mol Cancer Res. 2003 May;1(7):485-99.; Kakiuchi S, et al., Hum Mol Genet. 2004 Dec 15;13(24):3029-43. Epub 2004 Oct 20.; Taniwaki M, et al, Int J Oncol. 2006 Sep;29(3):567-75.)。その結果は、TTKプロテインキナーゼ(別名、hMps1)をコードしている遺伝子が、しばしば原発性肺癌の大多数で過剰発現することを示している。10

【0009】

上皮成長因子受容体(EGFR)は、成長情報伝達経路の重要な仲介物質として認識されている(Carpenter G. Annu Rev Biochem. 1987;56:881-914.; Wells C. Int J Biochem Cell Biol. 1999 Jun;31(6):637-43.)。異常なEGFR活性は、遺伝的および後成的変化から生じ、細胞増殖を促進して、多くの腫瘍において腫瘍発達を生じることが示された(Salomon DS, et al., Crit Rev Oncol Hematol. 1995 Jul;19(3):183-232.; Mendelson J. Clin Cancer Res. 2000 Mar;6(3):747-53.)。そのため、選択的にEGFR情報伝達を阻害する作用物質が開発中であり、これを受けて抗EGFRモノクローナル抗体、セツキシマブ(Erbitux)、およびゲフィニチブ(Iressa)、エルロチニブ(Tarceva)といったEGFRチロシンキナーゼ低分子阻害剤が診療において用いられてきた(Dowell J, et al., Nat Rev Drug Discov. 2005 Jan;4(1):13-4.; Herbst RS, et al., Nat Rev Cancer. 2004 Dec;4(12):956-65.). 例えはEGFのようなそのリガンドの刺激は、EGFRに構造変化および、MAPK(mitogen activated protein kinase)カスケードおよびc-Src(cellular Src)カスケードを含むEGFR情報伝達経路を活性化する自己リン酸化を起こす(Yarden Y. Eur J Cancer. 2001 Sep;37 Suppl 4:S3-8.; Pal SK & Pogram M. Anticancer Drugs. 2005 Jun;16(5):483-94.; Tice DA, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Feb 16;96(4):1415-20.). c-Srcは、EGFの存在下でEGFRの細胞質テールをリン酸化し、EGFRシグナルを活性化する(Yarden Y. Eur J Cancer. 2001 Sep;37 Suppl 4:S3-8.; Pal SK & Pogram M. Anticancer Drugs. 2005 Jun;16(5):483-94.; Tice DA, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Feb 16;96(4):1415-20.). しかしながら、EGFRをリン酸化し、その結果EGFから独立した動態でEGFR経路を活性化するキナーゼは未だ報告されていなかった。20

【0010】

本明細書において開示される証拠は、EGFR Tyr-992およびSer-967の、EGFから独立したリン酸化および、それに続く、腫瘍成長/生存のために不可欠であると考えられる下流のMAPKシグナルの活性化による肺癌形成において、TTKが重要な役割を果たすことを証明する。これらのデータは、TTKと、EGFの存在から独立したEGFRの間の新規情報伝達が、肺癌の新規治療薬開発のための有望な標的であることを示唆している。30

【0011】

また、様々なアミノ酸置換、例えはコドン72におけるロイシンからプロリン(L72P)、コドン76におけるセリンからスレオニン(S76T)、コドン574におけるチロシンからシスティン(Y574C)、コドン789におけるプロリンからグルタミン(P789Q)およびコドン856におけるロイシンからイソロイシン(K856I)の置換(表4)、から成る変異体TTKタンパク質が本明細書において開示される。RERF-LC-A1細胞株で見られるTTKキナーゼドメイン上のコドン574におけるミスセンス変異(Y574C)は、SNPデータベースには存在しなかった(JSNP: [http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index\\_ja.html](http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html); DBSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)。さらに、原発性肺腺癌由来の2つの転移性脳腫瘍の臨床検体のTTKキナーゼドメインにおいて、2つのミスセンス変異が同定された。変異は結果的に2つのアミノ酸置換、すなわちコドン610におけるバリンからフェニルアラニン(V610F)、コド40

50

ン753におけるグルタミンからヒスチジン (Q753H)への置換、であった。適合した正常な脳組織はこれら2人の患者のために利用可能で、野生型DNA配列のみ示し、腫瘍形成または進行する間にその変異が身体的に生じたことを示唆した。

【 0 0 1 2 】

変異TTK(Y574C)形質転換細胞は、非形質転換細胞と比較して高い自己リン酸化レベルを示し、変異がTTKキナーゼ活性を促進し得ることを示した。さらに、変異TTK(Y574C)形質転換細胞の浸潤能力が、変異TTK構築物を用いたマトリゲル浸潤アッセイによって、著しく促進されることが確認された。これらの結果は、疑いなくRERF-LC-A1細胞由来のTTK変異が、肺癌形成に関与する活性化した変異であり得ることを示す。

【 0 0 1 3 】

(表4) 肺癌細胞株におけるTTK変異リスト

## 塩基位置(\*) (アミノ酸)

組織	細胞株	T288C (L72P)	G302C (S76T)	T581C (A169A)	T1655A (!)	A1796G (IS27I)	C2441A (Y574C)	A2641T (P789Q)	A2671G (K856I)	T2823C (!)
ADC	<b>A427</b>			ヘテロ		ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ホモ
	<b>A549</b>				ホモ		ホモ		ホモ	ホモ
	<b>LC174</b>					ホモ				
	<b>LC176</b>					ホモ				
	<b>LC319</b>			ホモ		ホモ		ヘテロ	ホモ	ホモ
	<b>PC-3</b>			ホモ		ホモ			ホモ	ホモ
	<b>PC-9</b>			ホモ		ホモ		ヘテロ	ホモ	ホモ
	<b>PC14</b>	ヘテロ	ヘテロ		ホモ		ホモ		ホモ	ホモ
	<b>PC14-</b>				ホモ		ホモ			
	<b>PE6</b>					ホモ				
	<b>SK-LU-1</b>						ホモ			
	<b>NCI-H23</b>				ホモ		ホモ			
	<b>NCI-H522</b>									
	<b>NCI-H1373</b>			ホモ		ホモ			ホモ	ホモ
	<b>NCI-H1435</b>									
	<b>NCI-H1793</b>			ホモ		ホモ				
BAC	<b>SW1573</b>					ホモ				
	<b>NCI-H358</b>									
	<b>NCI-H1650</b>					ホモ				
	<b>NCI-H1666</b>			ホモ		ホモ		ヘテロ	ホモ	ホモ
	<b>NCI-H1781</b>			ホモ		ホモ		ヘテロ	ホモ	ホモ
SCC	<b>RERF-LC-AI</b>		ホモ	ホモ	ホモ		ヘテロ	ホモ	ホモ	ホモ
	<b>SK-MES-1</b>		ホモ		ホモ			ホモ	ホモ	ホモ
	<b>EBC-1</b>		ホモ		ホモ		ヘテロ	ホモ	ホモ	ホモ
	<b>LU61</b>		ホモ		ホモ		ヘテロ	ホモ	ホモ	ホモ
	<b>SW900</b>				ホモ					
	<b>NCI-H520</b>		ホモ		ホモ			ホモ	ホモ	ホモ
	<b>NCI-H1703</b>		ホモ		ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ホモ	ホモ
	<b>NCI-H2170</b>		ホモ		ヘテロ			ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
ASC	<b>NCI-H226</b>		ヘテロ		ヘテロ			ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
	<b>NCI-H596</b>			ホモ						
	<b>NCI-H647</b>		ホモ		ホモ			ホモ	ホモ	ホモ
LCC	<b>LX1</b>	ヘテロ	ホモ		ホモ		ヘテロ	ホモ	ホモ	ホモ
SCLC	<b>DMS114</b>		ホモ		ホモ		ヘテロ	ホモ	ホモ	ホモ
	<b>DMS273</b>		ホモ		ホモ		ヘテロ	ホモ	ホモ	ホモ
	<b>SBC-3</b>		ホモ		ホモ		ヘテロ	ホモ	ホモ	ホモ
	<b>SBC-5</b>		ホモ		ホモ		ヘテロ	ホモ	ホモ	ホモ

(\*) : 転写開始点からの位置

10

20

30

40

50

(\*\*) : 非コード領域

# : キナーゼドメインにおける位置

(!) : 以前に報告された

**【0014】**

したがって、本発明は、一部、TTKによるEGFRのTyr-992およびSer-967のEGFから独立したリン酸化と、腫瘍成長および/または生存のために不可欠だと考えられている、その後に続く下流のMAPKシグナルの活性化の発見に基づく。

**【0015】**

また、本発明は、対象由来の生体試料において、TTK発現レベルおよびEGFRに対するTTKキナーゼ活性レベルを測定する工程を含む、肺癌または肺癌が発達する素因を診断する方法を提供する。正常対照レベルと比較した前記レベルの増加は、対象が肺癌に罹患しているか、もしくは肺癌の発症リスクを示す。特に、EGFRに対するTTKキナーゼ活性はEGFから独立しており、EGFRのリン酸化部位の1つはTyr-992またはSer-967である。

10

**【0016】**

本発明はまた、肺癌の予後を評価または判定するための方法を提供する。いくつかの態様において、その方法は次の工程を含む：

- a. 肺癌の予後が評価または判定される対象由来の試料において、TTK発現レベルおよび/またはリン酸化EGFRレベルを検出する；ならびに、
- b. TTK発現および/またはリン酸化EGFRレベルの高いレベルが検出される場合に、予後不良を示す。

20

**【0017】**

特に、EGFRに対するTTKキナーゼ活性はEGFから独立しており、EGFRのリン酸化部位はTyr-992またはSer-967である。

**【0018】**

さらなる態様において、本発明はTTKキナーゼ活性を測定する方法を特徴とし、その方法はTTKによるEGFRリン酸化に適した条件下でのポリペプチドのインキュベーションを含む。好適なポリペプチドには、TTKポリペプチドまたはその機能的等価物、およびEGFRポリペプチドまたはその機能的等価物が含まれる。

**【0019】**

例えば、TTKポリペプチドはSEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有することができる。あるいは、結果として生じるポリペプチドがSEQ ID NO:2の生物活性を保持する限りTTKポリペプチドはSEQ ID NO: 2の一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失あるいは挿入によって改変されたアミノ酸配列を有することができる。SEQ ID NO:2のポリペプチドの生物活性は、例えば、細胞増殖の促進およびEGFRに対するTTKキナーゼ活性を含む。さらに、結果として生じるポリヌクレオチドが、SEQ ID NO:2のポリペプチドの生物活性、例えばSEQ ID NO:2のAsp-647を含む領域を保持するタンパク質をコードする限り、そのポリペプチドはSEQ ID NO:1のオープンリーディングフレームによって、または低いもしくは高いといったストリンジェントな条件下で、SEQ ID NO:1のヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされる857-アミノ酸タンパク質という形態をとることができる。

30

**【0020】**

EGFRポリペプチドは、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列を有することができる(GenBank Accession No. NP\_005219)。細胞において、EGFRはN末端ドメインで開裂し、1186残基のタンパク質を形成する (SEQ ID NO:42)。結果として生じるポリペプチドがSEQ ID NO:4におけるTTKキナーゼの標的領域、例えばEGFRの開裂型でTyr-992およびSer-967を含む領域、を保持する限り、EGFRポリペプチドは、SEQ ID NO:4の一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失または挿入によって改変されたアミノ酸配列を有することができる。さらに、結果として生じるポリヌクレオチドが、SEQ ID NO:4のTTKキナーゼの標的部位を保持する限り、EGFRポリペプチドはSEQ ID NO:3(GenBank Accession No. NM\_005228)のオープンリーディングフレーム、または低いまたは高いといったストリンジェントな条件下で、SEQ ID N

40

50

0:3のヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされる1210アミノ酸タンパク質の形態をとることができる。

【0021】

本発明の文脈において、EGFRに対するTTKキナーゼ活性はリン酸化EGFR、特にTyr-992におけるリン酸化の検出によって定義され得る(図4e)。EGFRに対するTTKキナーゼ活性は、例えばリン酸化EGFR用抗体を用いたウエスタンプロット解析のような従来法により、検出することができる。リン酸化はインビトロまたはインビボのどちらかで生じ得る。インビトロリン酸化において、精製された組換え型TTKポリペプチドは、リン酸供与体としてATPを用いた細胞株、または組換え型EGFRポリペプチドから調製される全抽出物とインキュベートすることができる。インビボリン酸化において、内因的または外因的に共発現しているTTKおよびEGFRを用いることができる。適切な合成条件は、例えばTris-HClのような公知の基本的な緩衝液条件を含む。

10

【0022】

本発明は、さらに、TTKポリペプチドまたはその機能的等価物およびEGFRポリペプチドまたはその機能的等価物を、リン酸供与体としてのATP存在下でインキュベートし、リン酸化EGFRレベルを測定することによって検出されるEGFRに対するTTKキナーゼ活性を調節(例えば増大または減少)する作用物質を同定する方法を提供する。正常な対照レベルと比較したリン酸化EGFRレベルにおける減少は、被験薬剤がTTKキナーゼの阻害剤であることを示す。EGFRに対するTTKキナーゼ活性を阻害する(例えば減少する)化合物は、肺癌の症状を治療、予防または軽減することに有用である。例えば、そのような化合物は肺癌細胞の増殖を阻害することができる。あるいは、正常対照レベルと比較したレベルまたは活性の増大は、試験作用物質がEGFRに対するTTKキナーゼ活性のエンハンサーであることを示す。本明細書において、正常対照レベルという表現は、試験化合物の非存在下で検出されるEGFRに対するTTKキナーゼ活性レベルをいう。例えば、TTKによるEGFRのリン酸化はEGFから独立しており、EGFRのリン酸化部位の例はTyr-992およびSer-967、その他である。

20

【0023】

本発明はまた、上記のように同定される化合物と肺癌細胞を接触させることによって、肺癌を治療または予防する組成物および方法を含む。さらなる態様において、上記のように同定される化合物の使用、および肺癌を治療または予防するのに適した薬学的組成物の製造を提供する。例えば、肺癌を治療する方法は、上記に記載のように同定される化合物の薬学上有効量および薬学的担体を含んだ組成物を、例えば当該疾患状態を有すると診断されていたヒト患者のような哺乳類に投与する工程を含むことができる。

30

【0024】

本発明はまた、EGFRに対するTTKキナーゼ活性を検出するためのキットを提供する。試薬は、好ましくはキットの形でともに包装される。試薬は別々の容器で包装することができ、例えばTTKポリペプチド、EGFRポリペプチド、リン酸化EGFR(Tyr992)またはリン酸化EGFR(Ser967)などのリン酸化EGFR検出試薬、対照試薬(陽性および/または陰性)、および/または検出可能な標識を含み得る。アッセイを実施するための使用説明書(例えば書面、テープ、VCR、CD-ROM、その他)は、好ましくはキットに含まれる。キットのアッセイ形式は当技術分野において公知の任意のキナーゼアッセイを含むことができる。

40

【0025】

本発明はキナーゼドメインでTTKの様々なアミノ酸置換、特に結果としてアミノ酸が置換された変異；それぞれ2名の患者のために利用可能な、コドン610でのバリンからフェニルアラニン(V610F)、コドン753でのグルタミンからヒスチジン(Q753H)、およびSNPデータベースには存在しなかった、RERF-LC-AI細胞株で見出されたTTKキナーゼドメイン上のコドン574でのチロシンからシスティンへのミスセンス変異(Y574C)、の発見に一部基づいている。TTKの変異(Y574CまたはQ753H)はTTKのキナーゼ活性および浸潤能力を促進するため、RERF-LC-AI細胞由来のTTKの変異(Y574CまたはQ753H)は肺癌形成に関与する活性化した変異でありうる。したがって、本発明は肺癌の転移、特にTTKのキナーゼドメ

50

インの変異、例えばY574CまたはQ753Hを指標として用いた肺癌の脳転移を予測する方法を提供する。

【0026】

他の態様において、本発明はまた、TTK (SEQ ID NO:1) またはEGFR (SEQ ID NO:3) 遺伝子発現を減少する二本鎖分子を含む組成物を対象に投与することを含む肺癌治療または予防方法を提供する。該二本鎖分子はセンス核酸およびアンチセンス核酸を含んでおり、該センス核酸は標的配列としてのSEQ ID NO:62または63の配列に一致するリボヌクレオチド配列を含む。

【0027】

あるいは、本発明はまた、TTK (SEQ ID NO:1) またはEGFR (SEQ ID NO:3) 遺伝子発現を減少する二本鎖分子の薬学上有効量および薬学上許容される担体を含む肺癌治療および予防のための組成物を提供する。

【0028】

さらに、本発明は、ISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO:44)、DVYMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO:45) およびFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO:46)の群から選択される阻害性のポリペプチドを提供する。本発明は肺癌の治療および/または治療のためにこれらの阻害性のポリペプチドを使用するための医薬または方法をさらに提供する。

【0029】

本発明はまた、ISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO:44)、DVYMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO:45) およびFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO:46)の群から選択される阻害性のポリペプチドまたはそれらをコードするポリヌクレオチドを投与する工程を含む肺癌の治療方法および/または予防方法に関する。

【0030】

本発明のこれらおよびその他の目的および特徴は、添付の図および実施例と併せて以下の詳細な説明を読むことでより完全に明らかとなるであろう。しかしながら、上記の発明の概要および以下の詳細な説明のどちらも好ましい態様であり、本発明や本発明の他の代替的態様を制限するものではないことは理解されるべきである。特に、発明が多くの特定の態様に関して本明細書に記載されるとともに、明細書は発明の説明となり、発明を制限するものとして作成されるものではないことはいうまでもない。添付された特許請求の範囲に記載されているように、本発明の精神と範囲から逸脱しない範囲で、当業者は様々な変更や応用を思いつく場合がある。同様に、本発明の他の目的、特徴、恩典および効果は以下に記載されているこの概要および特定の態様から明らか、および当業者には直ちに明らかである。そのような目的、特徴、利点および効果は添付の実施例、データ、図およびそこから引き出される全ての妥当な推論と連動して、単独で、または明細書中で引用された参考文献を考慮して、上記から明らかである。

【0031】

上記で列挙される特異的な目的および対象に関して、一つまたは複数の本発明の態様が特定の目的に対処できることは当業者によく理解されている。その一方で、一つまたは複数の他の態様は特定の他の目的に対処できる。本発明のあらゆる態様に対して、あらゆる観点において、それぞれの目的は同等には適用することができない。よって、本明細書における対象は、本発明のいかなる一態様に関しても代替的に考えることが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0032】

本発明の様々な局面および出願は、図面の簡単な説明ならびに以下の本発明およびその好ましい態様の詳細な説明を検討することにより、当業者にとって明らかになるであろう。

【0033】

【図1】図1は原発性肺癌および細胞株におけるTTK発現検証を示す。パートaは半定量的RT-PCRによって検討された、NSCLC(T)および対応する正常肺組織(N)の臨床試料におけるTTK発現を示す。パートbは半定量的RT-PCRによって検討された、肺癌細胞株におけるTTK

10

20

30

40

50

発現を示す。パートcはウエスタンプロット解析によって検出された7つの肺癌細胞株、正常気道上皮細胞 (SAEC) および2つの正常肺線維芽細胞 (CCD19LuおよびMRC-5) におけるTTKタンパク質の発現を示す。パートdは肺腺癌 (ADC) 、扁平上皮癌 (SCC) および小細胞肺癌 (SCLC) 細胞におけるTTKタンパク質の免疫組織化学的解析の代表的なイメージを提供する。倍率×200。パートeは免疫組織化学的解析によるA549細胞 (左パネル) およびLC319細胞 (右パネル) におけるTTKの発現を示す。細胞は抗TTK抗体および二次抗体としてAlexa Fluor 488結合ヤギ抗マウスIgGを用いて固定および着色された。TTKは緑、細胞核は青 (DAPI) で可視化した。パートfは抗TTK抗体を用いたウエスタンプロット解析の結果を示し、TTKがA549細胞 (左パネル) およびLC319細胞 (右パネル) の細胞質および核画分に局在することを確認した。

【図2】図2は原発性肺癌およびその予後評価におけるTTK発現を示す。パートaは組織マイクロアレイにおけるTTKタンパク質発現の免疫組織化学的評価の結果を示す。実施例は肺癌SCCにおけるTTK発現の強、弱、または発現なし、および正常肺には発現していないことを示す。倍率×100。パートbはTTK発現に基づいた非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者の腫瘍特異的生存のカプラン・マイヤー解析の結果を示す (ログランク検定によりP < 0.0001)。

【図3】図3はTTKの増殖促進効果およびTTKによる細胞浸潤活性の活性化を示す。パートaは半定量的RT-PCRによって解析された、LC319細胞におけるsi-TTK (si-TTK-1, -2) または対照siRNA(ルシフェラーゼ (LUC) またはスクランブル(SCR))に応答したTTKの発現を示す (左上パネル)。LC319細胞の生存率はsi-TTK、-LUC、または-SCRに応答したMTTアッセイによって評価された (左下パネル)。特異的siRNAまたは対照プラスミドをトランスフェクションしたLC319細胞のコロニー形成アッセイ (右下パネル)。パートbはウエスタンプロット解析におけるHEK293細胞のTTK定常的トランスフェクタントのTTKタンパク質発現を示す。パートcはTTKを低レベル (クローン1) 、高レベル (クローン2) に発現するトランスフェクタントまたはモックベクターを用いてトランスフェクションした対照細胞がそれぞれ三連で培養され、各時点でMTTアッセイにより細胞生存率を評価されたことを示す。パートdはヌードマウスの皮下に移植した (5×10<sup>6</sup>個TTK導入HEK293細胞/マウス) HEK293細胞のTTK定常的トランスフェクタントまたはモックHEK293細胞の増殖曲線を示す。パートeはTTK、触媒的に不活性なTTK-KD (kinase dead) 、またはモックベクターをトランスフェクションしたNIH-3T3細胞の増大した浸潤能を示す、マトリゲル浸潤アッセイの結果を示す。マトリゲルでコーティングしたフィルターを通過した浸潤細胞数が示された。

【図4】図4はTTKプロテインキナーゼによるTyr-992におけるEGFRの直接的リン酸化に関する。パートaは一過性にTTKを過剰発現させたCOS-7細胞におけるEGFRのTyr-992リン酸化の結果を示す。内因性TTKをほとんど発現していないCOS-7細胞にTTK発現ベクター、触媒不活性TTK-KD (D647A) 発現ベクター、またはモックベクターをトランスフェクションした。これらの細胞からの全細胞抽出物は、癌細胞情報伝達に関連する様々なリン酸化タンパク質に対して合計31個の抗体を用いたウエスタンプロット解析に用いられた (表2参照)。プロットは全EGFRまたはACTBの等量添加を確認するため、ストリップし、リプローブした。EGFRの全バンドは約175kDaである。パートbは肺癌細胞における、EGFRと内因性TTKの相互作用の結果を示す。免疫沈降はEGFの存在 (100nM) または非存在下で、抗TTK抗体およびA549細胞抽出物を用いて行われた。免疫沈降物は、内因性EGFRを検出するためのウエスタンプロット解析に供与した。IP: 免疫沈降 (immunoprecipitation) 、IB: immuno blot (イムノプロット) パートcはAG1478処理、またはTTKに対するsiRNA (oligo) またはEGFRに対するsiRNA (oligo) を導入したA549細胞の位相差像の結果を示す。非処理のA549細胞は対照として供与した。パートdは精製した組換えTTKタンパク質とCOS-7細胞から単離した全細胞抽出液をインキュベートすることによるインビトロキナーゼアッセイの結果を示す。インビトロキナーゼアッセイの後、試料は抗リン酸化EGFR抗体 (Tyr-845、Tyr-92、Tyr-1045、Tyr-1068、Tyr-1148およびTyr-1173) を用いたウエスタンプロット解析に供与した。プロットはストリップし、全EGFRまたはACTBの等量添加 (左パネル) を確認するためにリプローブした。24時間無血清培地で維持したCOS-7細胞は37℃で5または15分間EGF (100 nM) に暴露された。EGF処理への暴露を行わないCOS-7細胞は対照として供与

10

20

30

40

50

した。これらの細胞からの全細胞抽出物は、これらの抗リン酸化EGFR抗体を用いたウエスタンプロット解析（右パネル）に用いた。示される全てのバンドは約175kDaである。パートeはEGFR欠失変異（DEL）の略図である。細胞質領域の3つの部分的EGFR配列を有するGST融合タンパク質が構築された（欠失変異体）。個々の変異体は両端のアミノ酸残基番号を有するバーとして示される。細胞外ドメイン、膜貫通領域（TM）、チロシンキナーゼドメイン、Srcリン酸化部位（Tyr-845）、およびチロシン自己リン酸化部位（Tyr-992、Tyr-1045、Tyr-1068、Tyr-1148およびTyr-1173）の位置が示されている。全ての3つのEGFR欠失変異体（EGFR DEL）はキナーゼ欠失構築物である。パートfはSDS-PAGEに添加された3つの組換え型EGFR-DELがクーマシーブリリアントブルー染色によって可視化した結果を示す（上パネル）。基質としてEGFRの3つの欠失変異体と精製した組換え型TTKをインキュベートすることによるインビトロキナーゼアッセイ（下パネル）。キナーゼ反応後、試料は抗リン酸化EGFR抗体を用いたウエスタンプロット解析に供与した。プロットはストリップし、GSTの等量添加を確認するためリプローブした。パートgは組換え型TTK（キナーゼとして）および触媒活性組換え型GSTタグ付加EGFR（基質として活性rhEGFR、Upstate）をインキュベートすることによるインビトロキナーゼアッセイの結果を示す。キナーゼ反応後、試料は抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタンプロット解析に供与した。活性rhEGFRのキナーゼ活性は、ATP存在下で検出された（レーン2、#は活性rhEGFRの自己リン酸化を示す）。EGFRチロシンキナーゼ阻害剤（AG1378）で前処理した活性rhEGFRのリン酸化は組換え型TTK非存在下では検出されなかつたが（レーン3）、組換え型TTK存在下では検出された（レーン4）。組換え型TTKの自己リン酸化型（矢印）および組換え型TTKによる活性rhEGFRのリン酸化型が示された。パートhは、組織マイクロアレイ上で抗リン酸化EGFR（Tyr-992）抗体を用いて、正常肺と同様に、NSCLC（肺ADCおよびSCC）ならびにSCLCを含む代表的な外科的切除試料の免疫組織化学的染色の結果を示す（×200）。パートiはリン酸化EGFR（Tyr-992）発現に基づいたNSCLC患者の腫瘍特異的生存率のカプラン・マイヤー解析の結果を示す（ログランク検定によりP < 0.0001）。パートjはNSCLC患者の予後不良と、TTKおよびリン酸化EGFR（Tyr-992）の関連の結果を示す。366例のNSCLC症例は3グループに分けられた；TTKおよびリン酸化EGFR（Tyr-992）の両方を強く陽性染色するグループ1（63例）、両マーカーとも陰性染色であるグループ2（74例）、その他全ての症例であるグループ3（229例）。パートkおよびlはTTKを一過性に過剰発現したCOS-7細胞におけるリン酸化EGFR（Tyr-992）免疫蛍光検査解析の結果を示す。内因性TTKをほとんど発現しないCOS-7細胞はTTK発現ベクターまたは空ベクター（モック）でトランスフェクションして、12時間無血清培地で維持し、その後洗浄して固定した。TTK-Alexa488、リン酸化EGFR（Tyr-992）Alexa594または細胞核（DAPI）はそれぞれ緑、赤、または青で可視化された。リン酸化EGFR（Tyr-992）の内部移行はTTK発現プラスミドをトランスフェクションした細胞において観察された（k）。矢印はリン酸化EGFR（Tyr-992）の局在化を示す（l）。パートmはTTK（si-TTK）に対するRNAi（oligo）をトランスフェクションしたA549細胞における免疫蛍光検査解析で検出されたリン酸化EGFR（Tyr-992）レベルを示す。RNAiが介するTTKの抑制は、Tyr-992でのEGFRのリン酸化を減少した。

【図5】図5はリン酸化EGFR（Tyr-992）の誘導およびTTK依存的腫瘍形成系における下流シグナル活性化の結果を示す。パートaはTTKの発現レベルおよび24時間コルセミド処理（0、100、200 nM）（WAKO）で有糸分裂時に停止させたA549細胞におけるEGFR（Tyr-992）のリン酸化レベルを示す。それらは抗TTKおよびpEGFR（Tyr-992）抗体を用いたウエスタンプロット解析で検出した（上部および第3パネル）。TTKまたはEGFRバンドの移動度シフトをリン酸化で評価するため、細胞抽出液をホスファターゼバッファーまたはバッファーにおいて、ラムダプロテインホスファターゼ（-PPase；New England Biolab）処理または非処理を37℃で1時間行った。この処理はウエスタンプロッティングで検出したTTKおよびEGFRバンドの移動度シフトを無効にした（第2および第4パネル）。パートbはTTKに対するRNAi（oligo）をトランスフェクションしたA549細胞におけるウエスタンプロット解析で検出した、TTK、リン酸化EGFR（Tyr-992）、全EGFR、リン酸化PLC 1（Tyr-771）、全PLC 1、リン酸化p44/42MAPK（Thr202/Tyr204）および全p44/42MAPKの発現レベルを示す。TTKのRNAi

10

20

30

40

50

により仲介される抑制は、両方のEGFR(Tyr-992)、PLC 1 (Tyr-771) およびp44/42MAPK(Thr202/Tyr204)のリン酸化を減少した。パートcは一過性にTTKを過剰発現させているCOS-7細胞における、リン酸化p44/42MAPKの免疫蛍光検査解析の結果を示す。トランスフェクションした細胞は12時間無血清培地で維持され、その後洗浄し固定した。Flag-TTK-Alexa488、リン酸化p44/42MAPK(Thr202/Tyr204)-Alexa594または細胞核 (DAPI) はそれぞれ緑(上パネル)、赤(中パネル)または青で可視化した。p44/42MAPKのリン酸化はTTKトランスフェクション細胞でのみ観察されたが、TTK非トランスフェクション細胞では検出されなかった(下パネル)。パートdはTTK-ベクター、TTK-KD-ベクター、または空ベクター(モック)をトランスフェクションしたCOS-7細胞において、PLC 1とEGFRの共免疫沈降の結果を示す。EGFRは抗EGFR抗体を用いてこれらの細胞の全細胞抽出物から免疫沈降した。免疫沈降物はウエスタンブロッティングにより解析した。

【図6】図6はTTKプロテインキナーゼによるSer-967におけるEGFRの直接的リン酸化の結果を示す。パートaは組換えEGFR-DEL-2(野生型)またはTyr-992残基がアラニンに置換された(Y992A)EGFR-DEL-2変異体を[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP存在下で組換え型TTKとインキュベートすることにより実施したインビトロキナーゼアッセイの結果を示す。その産物はSDS-PAGEで分離され、リン酸化はオートラジオグラフィーで可視化された。パートbは肺癌細胞株において、ウエスタンプロット解析により検出したTTK、リン酸化EGFR(Ser-967)および全EGFRタンパク質のレベルを示す。パートcは免疫蛍光検査解析によって検出された、一過性にTTKを過剰発現させたCOS-7細胞におけるリン酸化EGFR(Ser-967)の結果を示す。内因性TTKをほとんど発現していないCOS-7細胞はTTK発現ベクターをトランスフェクションした。TTK-Alexa594、リン酸化EGFR(Ser-967)-Alexa488または細胞核 (DAPI) はそれぞれ赤(右パネル)、緑(中パネル)、青(左パネル)で可視化した。TTK過剰発現はEGFR(Ser-967)のリン酸化を誘導した。パートdはTTKに対するRNAi(oligo)をトランスフェクションしたA549細胞の免疫蛍光検査解析により検出されるEGFR(Ser-967)のリン酸化レベルを示す。RNAiを介するTTKの抑制はEGFR(Ser-967)のリン酸化を減少させた。パートeは組織マイクロアレイにおけるリン酸化EGFR(Ser-967)発現の免疫組織化学的評価の結果を示す。実施例はリン酸化EGFR(Ser-967)発現の強、弱、発現なしを示す。倍率×100。パートfはリン酸化EGFR(Ser-967)発現に基づいたNSCLC患者における腫瘍特異的生存率のカプラン・マイヤー解析の結果を示す(ログランク検定によりP < 0.0001)。

【図7】図7はTTK-EGFR経路を標的とすることによる細胞増殖/浸潤の抑制の結果を示す。パートaは、TTKの定常的トランスフェクタントの増大された増殖促進効果を示す、MTTアッセイの結果を示す。HEK293細胞のTTKまたはモック定常的トランスフェクタントはそれぞれ三連で培養され、各時点において細胞生存率がMTTアッセイにより評価された。これらの定常的トランスフェクタントはEGFR(si-EGFR)に対するRNAi(oligo)でトランスフェクションした。パートbはHEK293のTTK-またはモック定常的トランスフェクタントの増大した浸潤能力を示す、マトリゲル浸潤アッセイの結果を示す。これらの定常的トランスフェクタントはsi-EGFRでトランスフェクションした。パートcはMTTアッセイにより検出される細胞透過性EGFRペプチド(11R-EGFR)による肺癌細胞の増殖抑制の結果を示す。TTKを過剰発現させたA549細胞にトランスフェクションしたペプチド。EGFRのTTK結合領域由来の11R-EGFR899-917、11R-EGFR918-936または11R-EGFR937-955の増殖抑制効果(左パネル)。ほとんどの有効な11R-EGFR937-955ペプチド由来のスクランブルペプチド処理はMTTアッセイで測定される細胞生存率における増殖抑制効果を示さなかった(右パネル)。カラム、三連アッセイの相対的吸光度;バー、SD。

【図8】図8はヒト肺癌におけるTTKの活性化された変異に関する。パートaは肺癌のTTK変異の配列解析の結果を示す。左パネル、肺癌細胞株RERF-LC-A1において発見されたTTKのチロシンキナーゼドメイン中でアミノ酸置換となった点変異(Y574C;矢印)。代表的な野生型の配列は参考文献として示される。中央および右パネル、原発性肺腺癌由来の2つの転移性脳腫瘍におけるTTKチロシンキナーゼドメインのアミノ酸置換(症例2例におけるV610F、症例8例におけるQ753H)となった点変異(矢印)。対となる正常脳組織由来の野生型DNA配列に対応する部分がまた示される。パートbはNIH-3T3細胞において外因的に発現した

10

20

30

40

50

変異TTK(Y574C)および(Q753H)を検出する、抗Flag抗体を用いたウエスタンプロット解析の結果を示す。リン酸化TTKは矢印により示された。パートcおよびdはwt-TTK-ベクター、TTK-KD-ベクター、変異TTK(Y574C)-ベクター、または変異TTK(Q753H)-ベクター、またはモックベクターを導入NIH-3T3細胞の増大された浸潤能力を証明するマトリゲル浸潤アッセイの結果を示す。ギムザ染色で評価したマトリゲル被覆フィルターを通過した浸潤細胞(×200)(c)、および計測した細胞数(d)。

【図9】図9は臨床試料におけるTTK発現を示す。初期原発性NSCLC(I-III期)、進行した原発性NSCLC(IIIB-IV期)、およびADC(T)由来転移性脳腫瘍および正常肺組織(N)の臨床検体におけるTTK発現、半定量的RT-PCRによって検討された(上パネル)。PCR産物の濃度測定強度は画像分析ソフトウェアによって定量化された(下パネル)。

10

【発明を実施するための形態】

【0034】

発明の詳細な説明

これらは日常的な試験および最適化に合わせて変更できるので、本明細書において記載されている特異的な方法論およびプロトコルに限られないことは理解されるべきである。本明細書において使用される用語は、特定のバージョンまたは実施例のみを記載するものであり、本発明の範囲を制限する意図はないことも理解されるべきである。本明細書においておよび添付の特許請求の範囲で用いられるように、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈が明らかに別のものを指す場合を除き、複数の参照を含むことに留意しなければならない。したがって、例えば「細胞」について言及することは、当業者等に公知の、一つまたは複数の細胞およびその等価物について言及することである。

20

【0035】

特に定義しない限り、本明細書において用いられる技術的および科学的用語は全て本発明の属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。しかしながら、矛盾する場合には本明細書が定義を含めて統御する。したがって、本発明の文脈において、以下の定義を適用する。

【0036】

本発明の文脈において、TTKポリペプチドはSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を有するポリペプチド、あるいは結果として提供されるポリペプチドがSEQ ID NO:2のポリペプチドと機能的に等価である、一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失または挿入によって改変されたSEQ ID NO:2を有するポリペプチドでもよい。さらに、TTKポリペプチドはSEQ ID NO: 1のオープンリーディングフレームによってコードされる857アミノ酸タンパク質、あるいは低いまたは高いといったストリンジエントな条件下で、結果として提供されるポリヌクレオチドがSEQ ID NO:2のポリペプチドと機能的に等価なタンパク質をコードする、SEQ ID NO:1のヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリペプチドという形態をとることもできる。

30

【0037】

本発明の文脈において、「機能的に等価な」という用語は、対象タンパク質が基のタンパク質の生物活性を保持することを意味する。SEQ ID NO:2の生物活性は、例えば細胞増殖の促進およびEGFRに対するTTKキナーゼ活性を含む。本発明の文脈において、TTKと機能的に等価なタンパク質は好ましくはEGFRに対するキナーゼ活性を有する。対象タンパク質が標的活性を有するか否かは、本発明によって判定することができる。例えば、EGFRに対するキナーゼ活性は、EGFRのリン酸化に適した条件下でポリペプチドをインキュベートし、リン酸化EGFRレベルを検出することによって測定することができる。例えば、TTKによるEGFRのリン酸化部位はTyr992またはSer967である。

40

【0038】

上記のハイブリダイゼーション技術または遺伝子増幅技術によって同定されたDNAによってコードされる、ヒトTTKタンパク質と機能的に等価なタンパク質は、通常、ヒトTTKタンパク質のアミノ酸配列と高い相同性を有する。本発明の文脈において、用語「高い相同

50

性」は40%以上の相同性を指し、好ましくは60%以上、より好ましくは80%以上、さらにより好ましくは95%以上を指す。タンパク質の相同性は「Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 726-30」においてアルゴリズムに従って決定することができる。

【0039】

本発明の文脈において、ハイブリダイゼーションの文脈中の用語「ストリンジエンサー」は利用されているハイブリダイゼーション標準の相対的な厳しさを指す。適切な低ストリンジエントな条件の例は、例えば42°C、2×SSC、0.1%SDS、または好ましくは50°C、2×SSC、0.1%SDSを含む。好ましくは、高ストリンジエントな条件が用いられる。適切な高ストリンジエントな条件の例は、例えば室温で2×SSC、0.01%SDSでの20分間の洗浄3回、次に37°Cで1×SSC、0.1%SDSでの20分間の洗浄3回、および50°Cで1×SSC、0.1%SDSでの20分間の洗浄2回を含む。しかしながら、温度および塩濃度などのいくつかの要素がハイブリダイゼーションのストリンジエンサーに影響を及ぼす場合があり、当業者であれば必要なストリンジエンサーを達成するための要素を適切に選択することができる。

10

【0040】

本発明の文脈において、「対照レベル」という用語は、対照試料中で検出されるmRNAまたはタンパク質発現レベルを指し、(a)正常対照レベルまたは(b)肺癌特異的対照レベルの両方を含む。対照レベルは、単一の参照集団に由来する単一の発現パターンであっても、または複数の発現パターンに由来する単一の発現パターンであってもよい。例えば、本発明の文脈において、対照レベルは以前に試験された細胞由来の発現パターンのデータベースであってよい。用語「正常対照レベル」とは、健常個体において、または癌、例えば肺癌に罹患していないことが分かっている個体集団において検出される遺伝子の発現レベルを指す。健常個体とは、癌、特に肺癌の臨床症状を有さない個体である。一方で、「肺癌対照レベル」とは、肺癌に罹患している集団において見出される遺伝子の発現レベルを指す。

20

【0041】

本発明の文脈において、対照レベルと比較して、少なくとも0.1倍、少なくとも0.2倍、少なくとも1倍、少なくとも2倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍、もしくはそれ以上、遺伝子発現または遺伝子産物の活性が増大している場合に、特定の遺伝子の発現レベルが「増大された」と見なされる。TTK遺伝子発現は患者由来の組織試料からTTKのmRNAを、例えばRT-PCRまたはノーザンプロット解析によって検出すること、あるいはTTKによってコードされるタンパク質を、例えば患者由来の組織試料の免疫組織化学的解析によって検出することによって決定することができる。

30

【0042】

本発明の文脈において、対象由来の試料は、試験対象、例えば、癌、より詳細には肺癌に罹患しているかまたはその疑いがある患者から得られる任意の体組織または体液試料でありうる。例えば、組織は上皮細胞を含むことができる。より詳細には、組織は肺癌細胞、例えば非小細胞肺癌または小細胞肺癌、の上皮細胞でありうる。あるいは、試料は血液、血清または血漿などの体液でもよい。

40

【0043】

本発明は癌の治療および予防に関する。本発明の文脈において、癌に対する治療または癌発症の予防は、癌細胞の増殖阻害、癌の退縮および癌の発生の抑制を含む、下記工程のいずれかを含む。そのような治療的および予防的效果は好ましくは統計的に有意である。例えば観察時には、5%またはそれ以下の有意性レベルで、細胞増殖性疾患に対する薬学的組成物の治療的または予防的效果は投与なしの対照と比較される。例えば、スチューデントのt検定、マン-ホイットニーのU検定またはANOVAは、統計解析に用いることができる。

【0044】

さらに、本発明の文脈において、用語「予防」は疾患の死亡率または罹患率の負荷を減少するいずれかの活性を含む。予防は第一次、第二次および第三次の予防レベルで生じることができる。第一次予防が疾患の発達を抑える一方で、機能を復元することによる、既

50

に確定した疾患の悪影響を減少することならびに疾患関連合併症を減少することと同様に、予防の第二次および第三次レベルは疾患の進行および症状の発生を予防するための活性を含む。

#### 【0045】

本発明の文脈において、「有効な」治療とは、対象において、TTKレベルまたはEGFRリン酸化レベルの低下または、肺癌のサイズ、有病率、もしくは転移能の減少をもたらす治療である。治療が予防的に適用される場合、「有効な」とは、治療によって肺癌の発生が遅延もしくは妨害されるか、または肺癌の臨床症状が軽減されることを意味する。肺癌の評価は、標準的な臨床プロトコルを用いて行うことができる。さらに、治療の有効性は、肺癌の診断または治療のための公知の任意の方法に関連して判定することができる。例えば、肺癌は病理組織学的に、または症候性の異常を特定することにより、日常的に診断される。

10

#### 【0046】

付加的な定義は、次の文章中に散在しており、適用され得る。

#### 【0047】

概説：

癌治療のための分子標的薬剤の開発が発達してきたにもかかわらず、治療の効果と同様に、反応する腫瘍型の範囲は非常に制限されたままである(Ranson, M., et al. (2002) *J Clin Oncol*, 20: 2240-50.; Blackledge, G. and Averbuch, S. (2004) *Br J Cancer*, 90: 566-72.)。そのため、最小限のまたはまったく副作用のない、悪性細胞に高度に特異的な新規抗癌剤の開発が緊急に必要とされている。これらの目標に向けた強力な戦略は、細胞増殖におけるそれらの効果のハイスループットスクリーニングとともにcDNAマイクロアレイ上で得られた遺伝子情報に基づいて同定され、RNAiシステムによる機能喪失型フェノタイプの誘導による、癌細胞で上方制御された遺伝子のスクリーニングと、組織マイクロアレイ上で何百もの臨床試料を解析することにより薬剤標的の可能性のバリデーションを組み合わせる (Sauter, G., et al. (2003) *Nat Rev Drug Discov*, 2: 962-72.; Kononen, J., et al. (1998) *Nat Med*, 4: 844-7.)。そのような戦略に続き、本明細書においては、TTKが臨床NSCLC試料および細胞株においてしばしば共過剰発現しているだけではなく、高発現レベルの遺伝子産物がNSCLC細胞の増殖と同様に疾患の進行に不可欠であることを示している。

20

#### 【0048】

上皮成長因子受容体(EGFR)は様々な増殖シグナル経路の重要な仲介物質として認識された(Carpenter G. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:881-914.; Wells C. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Jun;31(6):637-43.)。遺伝子的および後成的変化から生じている異常なEGFR活性は、細胞増殖を増大し、多くの腫瘍において腫瘍の進行を駆動することが示された(Salomon DS, et al., *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995 Jul;19(3):183-232.; Mendelson J. *Clin Cancer Res*. 2000 Mar;6(3):747-53.)。したがって、EGFRシグナルを選択的に阻害する薬剤は開発中であり、臨床で用いられている例には、抗EGFRモノクローナル抗体、セツキシマブ(Erbitux)、およびゲフィチニブ(Iressa)およびエルロチニブ(Tarceva)といったEGFRチロシンキナーゼの低分子阻害剤を含まれる(Dowell J, et al., *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Jan;4(1):13-4.; Herbst RS, et al., *Nat Rev Cancer*. 2004 Dec;4(12):956-65.)。EGFのようなリガンドの刺激はMAPK(mitogen activated protein kinase)カスケードおよびc-Src (cellular Src)カスケードを含むEGFRシグナル経路を活性化する、立体構造変化ならびに自己リン酸化を起こす(Yarden Y. *Eur J Cancer*. 2001 Sep;37 Suppl 4:S3-8.; Pal SK & Pegram M. *Anticancer Drugs*. 2005 Jun;16(5):483-94.; Tice DA, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Feb 16;96(4):1415-20.)。c-SrcはEGF存在下でEGFRの細胞質テールをリン酸化し、EGFRシグナルを活性する(Yarden Y. *Eur J Cancer*. 2001 Sep;37 Suppl 4:S3-8.; Pal SK & Pegram M. *Anticancer Drugs*. 2005 Jun;16(5):483-94.; Tice DA, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Feb 16;96(4):1415-20.)。しかし、現在まで、EGFRをリン酸化して、その結果EGFから独立した動態でEGFR経路を

30

40

50

活性するキナーゼは報告されていなかった。

【0049】

しかしながら、TTKはEGFRのTyr-992またはSer-967のEGFから独立したリン酸化および、腫瘍成長/生存に不可欠であると考えられており、下流MAPKシグナルのそれに続く活性化による肺癌形成において、重要な役割を果たしている根拠が本明細書で提供される。したがって、データは、TTKとEGFの存在から独立しているEGFRが肺癌の新規治療薬開発の候補標的を意味することを示唆する。

【0050】

肺癌の予後評価：

上述したように、本発明は、一部、TTKキナーゼ、EGFRの新規細胞内標的分子の発見に基づく。本発明はまた、TTKの高発現レベルおよび/またはリン酸化EGFRの高レベルが肺癌患者の予後不良と関連している所見に基づいている。特に、肺癌は非小細胞肺癌（NSCLC）である。本明細書において提供される証拠を考慮すると、TTK発現および/またはEGFRに対するTTKキナーゼ活性あるいはEGFRリン酸化レベルが癌患者の予後不良と関連しており、したがって本発明は肺癌患者の予後を評価または測定する方法を提供する。例えば、EGFRのリン酸化部位はTyr-992またはSer-967である。そのような方法の例は、次の工程を含む：

a. 肺癌予後が評価または測定される対象から採取した試料において、TTK発現レベルまたはEGFRリン酸化レベルを検出する工程；および

b. TTK発現またはリン酸化EGFRの上昇したレベルが検出される場合に、予後不良が示される工程。

【0051】

本方法の文脈において、試料は対象から採取される。本発明の文脈において用いられる好ましい治療の例は、生検または外科切除によって肺癌患者から得られた肺組織である。本発明の文脈において、TTK発現レベルまたは試験試料で検出されるEGFRリン酸化レベルが対照レベルよりも高い場合、試験試料は上昇したレベルのTTK発現またはEGFRのリン酸化を有すると考えられる。本発明の文脈において、有効な対照レベルの例は、TTK発現の基準値または良い予後に関連する群から選択されるEGFRレベルのリン酸化を含む。基準値は従来技術において公知のいかなる方法によっても得られることができる。例えば、平均値  $\pm$  2 S.D.、または平均値  $\pm$  3 S.D.が基準値として使用することができる。あるいは、予後不良は、試料組織の免疫組織化学的解析によって強い染色が観察される場合に判定することができる。

【0052】

本発明の文脈において、TTKの発現レベルは以下からなる群から選択される方法のいずれか一つによって検出される：

(a) SEQ ID NO:2のアミノ酸配列をコードするmRNAの存在を検出する方法：

(b) SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するタンパク質の存在を検出する方法；および

(c) SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するタンパク質の生物活性を検出する方法。

【0053】

本発明の文脈において、mRNA、タンパク質またはタンパク質の生物活性はいかなる方法によっても検出され得る。所与のタンパク質、メッセンジャーRNAまたはその生物学的活性を検出する方法は当業者に周知である。例えば、mRNAは公知のPCRまたはハイブリダイゼーションベースの技術を用いて検出することができる。あるいは、いかなるイムノアッセイ形式もタンパク質検出に適用することができる。さらに、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性のような、TTKの生物活性は、本明細書に記載されているようないかなる適切なアッセイ方法を用いても検出することができる。例えば、EGFRのTTKキナーゼ活性はSEQ ID NO:42の992アミノ酸残基のチロシン、または967アミノ酸残基のセリンで検出することができる。

【0054】

本発明の文脈において、EGFRのリン酸化レベルはリン酸化EGFR、例えばTyr-992またはS

10

20

30

40

50

er-967リン酸化EGFRの量を測定することで検出することができる。リン酸化EGFRを検出する方法は、当業者に周知である。例えば、特異的抗体を用いたイムノアッセイは有用である。

【0055】

本発明の文脈において、予後不良の判定はさらなる治療、例えば生活の質を低下させるさらなる治療を止めること、過去に用いられたものとは異なる方法で癌を治療すること、またはより積極的に癌を治療すること、の判定に用いることができる。言い換えれば、TTKまたはEGFRのリン酸化による予後評価は、臨床医に、日常的な組織サンプリングの手順のみを用いて、従来の疾患の臨床進行度の情報すらない個々の肺癌患者に対する、最も適切な治療を事前に選択することを可能にする。

10

【0056】

さらに、本発明の方法は治療の経過の有効性を評価するために用いることができる。例えば、生体試料がTTK発現またはEGFRのリン酸化の上昇したレベルを含むことが発見されている癌を有する哺乳類において、抗癌治療の有効性はTTK発現レベルまたはEGFRのリン酸化レベルを長期にわたりモニタリングすることによって評価することができる。例えば、治療過程後の哺乳類から得た生物試料におけるTTK発現レベルまたはEGFRのリン酸化レベルの減少は、治療開始前または初期にその哺乳類から得た試料で観察されたレベルと比較して、有効な治療であることを示し得る。

20

【0057】

あるいはまた、本発明によれば、中間結果は対象の予後を評価または判定するための他の試験結果に加えて提供することができる。そのような中間結果は医師、看護士または他の開業医が対象の予後を評価、判定または推定するのに役立つ。本発明によって得られた中間結果を組み合わせて、予後を評価すると考えられる付加的な情報は、対象の臨床症状および物理的条件を含む。

20

【0058】

前述したように、本発明はまた、肺癌の進行を評価または判定するキットを提供する。キットは下記から成る群から選択されるいずれか一成分を含む；

- (a) SEQ ID NO:2のアミノ酸配列をコードするmRNAの存在を検出する試薬；
- (b) SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するタンパク質あるいはSEQ ID NO:42でチロシン92アミノ酸残基またはセリン976アミノ酸残基を有するアミノ酸配列を有するタンパク質を検出する試薬；および
- (c) SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するタンパク質の生物学的活性を検出する試薬。

30

【0059】

TTKはEGFRに対するキナーゼ活性を有し、ならびにその発現レベルとリン酸化EGFRレベル (Tyr-992またはSer-967) はより短い腫瘍特異的な生存期間を示した。さらに、TTKによるTyr-992またはSer-967におけるEGFRのリン酸化はEGF刺激から独立している。したがって、TTKが仲介するEGFRのリン酸化は肺癌、例えば非小細胞肺癌の診断パラメーターとして有効である。

30

【0060】

本発明はまた、対象における肺癌または肺癌発症の素因を評価あるいは判定するためのキットを提供し、該キットはEGFRに対するTTKキナーゼ活性を検出するための試薬を含む。キットは肺癌、例えば非小細胞肺癌の診断に有効である。さらに、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性、例えばEGFから独立したTTKによるEGFRリン酸化はあらゆる適切な試薬を用いて検出することもできる。

40

【0061】

EGFRに対するTTKのキナーゼ活性：

TTKによるEGFRの選択的なリン酸化は本明細書において明らかにされる。したがって、別の局面においては、本発明はEGFRに対するTTKのキナーゼ活性を測定する方法を提供する。そのような方法は次の工程を含み得る：

50

- a. EGFRまたはその機能的等価物およびTTKをTTKによるEGFRリン酸化に適した条件下で

インキュベートする工程。TTKは下記群から選択される：

- i. SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するポリペプチド (TTK)
- ii. SEQ ID NO:2の一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失あるいは挿入によって改変されたポリペプチドであって、結果として生じるポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するポリペプチドと等価な生物活性を有するポリペプチド；
- iii. SEQ ID NO:1のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドに対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドで、結果として生じるポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するポリペプチドと等価な生物活性を有するポリペプチド；

b. リン酸化EGFRレベルを検出する工程；および

c. 工程(b)で検出されたリン酸化EGFRレベルとの相関によってTTKのキナーゼ活性を測定する工程。

【0062】

本発明の文脈において、EGFRリン酸化に適した条件は、リン酸供与体の存在下でのEGFRとTTKのインキュベーションとともに提供され得る。本発明において、好ましいリン酸供与体はATPである。TTKによるEGFRリン酸化に適した条件はまた、ポリペプチドを発現している培養細胞も含む。例えば、細胞は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを内部に持つ形質転換細胞でもよい。別の態様において、EGFRに対するリン酸化反応はキナーゼアッセイバッファー(例えば 50 mM Tris, pH7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dithiothreitol, 1 mM NaF, 0.2 mM ATP)中で60分間30 でEGFRとTTKをインキュベーションすることによって行われる。本発明の文脈において、EGFRの機能的な等価物は、TTKが仲介するEGFRのリン酸化部位、Tyr992またはSer967を含み得るEGFR断片である。例えば、EGFRの断片はSEQ ID NO:43のアミノ酸配列に含まれ得る。

【0063】

インキュベーション後、リン酸化EGFRレベルはリン酸化EGFRを認識する抗体で検出され得る。リン酸化EGFR検出の前に、EGFRは他の要素、またはEGFR発現細胞の細胞溶解物から分離できる。例えば、ゲル電気泳動はEGFRの分離に使用できる。あるいは、EGFRは抗EGFR抗体を有する担体とEGFRを接触させることによって捕捉することができる。標識化リン酸供与体が用いられる場合、リン酸化EGFRレベルは標識の追跡によって検出することができる。例えば、放射性標識されたATP(例えば<sup>32</sup>P-ATP)は、単離されたEGFRの放射活性がリン酸化EGFRレベルと相關するリン酸供与体として用いられた。

【0064】

本発明の文脈において、生体試料におけるTTKのキナーゼ活性を評価することができる。例えば、本発明の生体試料は患者由来の癌組織または癌細胞株を含み得る。当該生体試料においてTTKキナーゼ活性は、肺癌を示す、あるいは予後を評価または判定する信頼性のあるマーカーとして有効である。本発明はさらに、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性を測定する試薬を提供する。そのような試薬の例としてはEGFRおよびリン酸供与体が挙げられる。本発明において、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性を測定するキットもまた提供される。該キットは本発明の試薬およびリン酸化EGFRレベルを検出する検出試薬を含み得る。好ましい検出試薬は、非リン酸化EGFRから特異的にリン酸化EGFRを認識する抗体である。例えば、本発明において、好ましい抗体はTyr992またはSer967でリン酸化EGFRを認識する。

【0065】

診断方法：

本発明はまた、対象における肺癌の診断または肺癌の素因の予測方法を提供し、該方法は対象由来の生体試料におけるTTK発現またはEGFRリン酸化レベルを決定する段階を含み、正常対照レベルと比較した該レベルの増加は、対象が肺癌に罹患している、あるいは発症するリスクを示す。本発明において、診断される対象由来のいかなる試料も使用することができる。本発明の文脈において用いられる好ましい例は、生検または外科切除によって得られた肺組織である。例えば、TTKによるEGFRのリン酸化部位はTyr992 またはSer967

10

20

30

40

50

である。

【0066】

あるいは、本発明によれば、対象の状態を調べるための中間結果を提供することができる。そのような中間結果をさらなる情報と組み合わせて、対象は疾患に罹患していることを、医師、看護師、またはその他の医療従事者が、診断することを補助することができる。さらに、本発明はさらなる肺癌の診断が必要とされる人をスクリーニングする方法に関する。スクリーニング後、陽性の結果を示した人は本当に肺癌に罹患しているか確認するため、さらなるスクリーニング試験、または医学的治療を受けることを勧告される。

【0067】

あるいは、本発明を用いて対象由来の組織中の癌細胞を検出し、対象が肺癌に罹患していると診断するのに有用な情報を医師に提供することもできる。したがって、本発明は対象由来試料におけるEGFRに対するTTKのキナーゼ活性レベルを決定（例えば測定する）ことを必要とする。本発明において、肺癌診断方法はまた、肺癌を試験または検出する方法を含む。あるいは、本発明において、肺癌を診断することは、対象における肺癌の疑い、リスク、あるいは可能性も指す。

10

【0068】

本発明の診断方法は、TTK発現を決定（例えば測定）する工程を含む。TTK遺伝子配列の使用は、当業者に周知の従来技術を用いて検出および測定することができる。例えば、ノザンプロットハイブリダイゼーション解析がTTK遺伝子の発現を決定するために用いられる。ハイブリダイゼーションプローブは典型的には、TTK配列の少なくとも10個、少なくとも20個、少なくとも50個、少なくとも100個、または少なくとも200個の連続したヌクレオチドを含む。別の例としては、配列は、例えば増幅ベースの検出方法、例えば逆転写ベースのポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）において、TTK核酸の特異的に複製するプライマーを構築するために用いられる。別の例としては、TTKに対する抗体、例えば抗TTKポリクローナル抗体または抗TTKモノクローナル抗体は、イムノアッセイ、例えば免疫組織化学的解析、ウエスタンプロット解析またはELISA等に用いることができる。

20

【0069】

あるいは、TTKの発現は生物活性により検出することができる。例えば、生物活性は細胞増殖活性ならびに浸潤活性ならびにEGFR Tyr997またはSer967に対するキナーゼ活性である。キナーゼ活性検出方法は上述されている。

30

【0070】

また、本発明の診断方法はEGFRのリン酸化レベルを決定する工程を含む。例えば、EGFRのリン酸化部位はTyr992またはSer967である。非リン酸化型を除くリン酸化を特に認識する抗体がイムノアッセイ、例えば免疫組織化学的解析、ウエスタンプロットまたはELISA等に用いることができる。

40

【0071】

対象由来の組織試料のような試験細胞集団において検出される、TTK発現レベルまたはEGFRリン酸化レベルは、参照細胞集団におけるそれらと比較することができる。参照細胞集団は比較パラメーターが公知の、一つまたは複数の細胞、例えば肺癌細胞または正常肺上皮細胞（非肺癌細胞）を含み得る。

【0072】

肺癌の存在または素因を示すかどうかを問わず、参照細胞集団に対する試験細胞集団におけるTTK発現レベルまたはEGFRのリン酸化レベルは、参照細胞集団の構成に依存する。例えば、参照細胞集団が非肺癌細胞からなる場合、試験細胞集団および参照細胞集団間レベルの類似性は、試験細胞集団が非肺癌であることを示す。逆にいえば、参照細胞集団が肺癌細胞から成る場合、試験細胞集団および参照細胞集団間の遺伝子発現における類似性は試験細胞集団が肺癌細胞を含むことを示す。

【0073】

参照細胞集団におけるレベルから、1.1倍以上、1.5倍以上、2.0倍以上、5.0倍以上、10.0倍以上またはそれ以上変化する場合、試験細胞集団におけるTTK発現レベルまたはEGFR

50

のリン酸化レベルは、「変化した」と見なされるか、または「異なる」と見なされる。

【0074】

試験細胞集団と参照細胞集団間の差次的な遺伝子発現は、対照遺伝子、例えばハウスキーピング遺伝子に標準化することができる。例えば、対照遺伝子は細胞の癌または非癌状態に応じて異なることが公知のものである。対照遺伝子の発現レベルは、したがって、試験および参照細胞集団におけるシグナルレベルを標準化するために用いられる。代表的な対照遺伝子は、例えば - アクチン、グリセルアルデヒド3-リン酸塩デヒドロゲナーゼおよびリボソームタンパク質P1を含むが、これに限定されるものではない。

【0075】

試験細胞集団は、複数の参照細胞集団と比較され得る。複数の参照細胞集団の各々は、公知のパラメーターにおいて、異なってよい。したがって、試験細胞集団は、例えば非肺癌細胞（正常細胞）を含むことが公知である第2の参照細胞集団と同じく、例えば肺癌細胞を含むことが公知である第1の参照細胞集団と比較され得る。試験細胞集団は、肺癌細胞を含む、または含む疑いのあることが公知の対照からの組織あるいは細胞試料に含まれ得る。

10

【0076】

試験細胞集団は体組織または体液、例えば生体液（例えば血液、痰、唾液）から得ることができる。例えば、試験細胞集団は肺組織から精製することができる。好ましくは、試験細胞集団は上皮細胞を含む。上皮細胞は肺癌であるまたはその疑いがあることが公知の組織からが好ましい。

20

【0077】

参照細胞集団における細胞は、試験細胞集団の細胞と類似の組織型が好ましい。状況に応じて、参照細胞集団は細胞株、例えば肺癌細胞株（すなわち陽性対照）、または正常非肺癌細胞株（すなわち陰性対照）である。あるいは、対照細胞集団は検定されたパラメーターまたは状態が公知である細胞から得られた分子情報のデータベースでもありうる。

【0078】

対象は好ましくは哺乳類である。典型的な哺乳類は、例えばヒト、非ヒト靈長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマまたはウシを含むが、これに限定されるものではない。

【0079】

本発明はまた、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性を検出するキットを提供する。当該キットの範囲内で含まれる構成成分の例は、EGFR、リン酸化EGFRに結合する抗体、例えば抗リン酸化EGFR (Tyr992) 抗体または抗リン酸化EGFR(Ser967)抗体、および抗体を検出する検出標識を含む。EGFRのリン酸化Tyr992またはSer967を認識する抗体は市販されている。あるいは、当該抗体あるいはTyr992またはSer967残基を含む断片がTyr992またはSer967でリン酸化EGFRとの免疫によって得られることは公知である。

30

【0080】

TTK cDNAは、SEQ ID NO:1 (GenBank Accession No. NM\_003318)に規定される2,571ヌクレオチドのオープソリーディングフレームを含む2,984のヌクレオチドから成る。オープソリーディングフレームはSEQ ID NO:2 (GenBank Accession No. NP\_003309)に規定されるアミノ酸配列を有する857アミノ酸タンパク質をコードする。Mps1 (TTKはそのヒトホモログである)は出願酵母において中心体複製に必要とされる因子として最初に発見され、その後紡錘体チェックポイントに必須機能を有することが示された。

40

【0081】

スクリーニング方法：

本発明はまた、TTKがEGFRに対するキナーゼ活性を有するという知見に関連する。例えば、TTKによるEGFRのリン酸化部位はTyr992またはSer967であり、そのリン酸化はEGFとは独立している。そのため、発明の一態様はEGFRのTTKが仲介するリン酸化を制御する試験化合物を同定することを含む。したがって、本発明はEGFRに対するTTKのキナーゼ活性を調節する化合物を同定する新規方法を提供する。例えば、本発明はEGFRに対するTTKのキナーゼ活性を調節する作用物質を同定する方法を提供し、その方法は以下の工程を含む：

50

a. TTKが以下から成る群から選択される、EGFRまたはその機能的等価物とTTKを試験化合物の存在下、TTKによるEGFRのリン酸化に適した条件下でインキュベートさせる工程：

i. SEQ ID NO: 2(TTK)のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

ii. SEQ ID NO: 2の一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失または挿入されたアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、結果として得られるポリペプチドがSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する、ポリペプチド。

iii. SEQ ID NO: 1の核酸配列から成るポリヌクレオチドにストリンジエントな条件下ハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドで、結果として得られるポリペプチドがSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する、ポリペプチド。

10

b. リン酸化EGFRレベルを検出する工程；および

c. 対照レベルと比較したリン酸化EGFRレベルにおける増減が、試験化合物がEGFRに対するTTKキナーゼ活性を修飾することを示す、対照レベルとリン酸化EGFRレベルを比較する工程。

【 0 0 8 2 】

本方法により同定される薬剤は、TTKが仲介するEGFRのリン酸化を阻害することによって、例えば肺癌の進行を遅延または抑止することができる候補化合物を構成する。したがって、本発明は例えばEGFから独立した、TTKによるEGFRのリン酸化のような、EGFRに対するTTKキナーゼ活性を修飾する化合物のスクリーニング方法を提供する。例えば、EGFRのリン酸化部位はTyr992またはSer967である。上記方法は、TTKまたはEGFRに対するキナーゼ活性を有する機能的等価物と、EGFRまたはTTKによるリン酸化が可能な機能的等価物とを、1つまたは複数の候補化合物と接触させ、リン酸化EGFRレベルを評価することにより実施される。例えば、TTKによるリン酸化が可能なEGFRの機能的等価物は、TTKが仲介するEGFRのリン酸化部位、Tyr992またはSer967を含んでもよい。より好ましくは、EGFRの断片はSEQ ID NO: 42の889アミノ酸から1045アミノ酸領域を含むことができる。TTKまたは機能的等価物による、EGFRのリン酸化を調節する化合物はこれにより同定される。

20

[ 0 0 8 3 ]

したがって、本発明はまた、下記工程を含む、肺癌を治療および/または予防する化合物のスクリーニング方法を提供する：

a. 上記した方法により、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性を修飾する試験化合物を同定する工程、および

30

b. 対照レベルと比較して、リン酸化EGFRレベルを減少させる化食料を選択する工程。

【 0 0 8 4 】

本発明の別の観点はまた、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性を調節する試験化合物の能力を検出するキットを提供する。そのようなキットは以下の構成成分を含むことができる：

A) 以下から成る群から選択されるポリペプチド；

i. SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含むポリペプチド(TTK);

ii. SEQ ID NO: 2の一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失または挿入されたアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、結果として得られるポリペプチドがSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する、ポリペプチド。

40

iii. SEQ ID NO: 1の核酸配列を有するポリペプチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドで、結果として得られるポリペプチドがSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する。ポリペプチド：および

B) EGFRまたはその機能的等価物：

### c) リン酸化EGFRを検出する試薬

[ 0 0 8 5 ]

さらに、この発明はまた、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性を修飾する試験化合物の能力を検出するキットを提供する。そのようなキットは以下の構成成分を含むことができる。

50

:

A) EGFRまたはその機能的等価物と、以下から成る群から選択されるポリペプチドを発現する細胞：

i. SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含むポリペプチド(TTK)；

ii. SEQ ID NO: 2の一つまたは複数のアミノ酸が置換、欠失または挿入されたSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、結果として得られるポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する、ポリペプチド。

iii. SEQ ID NO:1の核酸配列を有するポリペプチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドで、結果として得られるポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと等価な生物活性を有する、ポリペプチド；および

B) リン酸化EGFRを検出する試薬。

【0086】

本発明において、EGFRの機能的等価物はSEQ ID NO:43のアミノ酸配列から成る断片である。さらにまた、キットはリン酸供与体をさらに含むことができる。好ましいリン酸供与体は、ATPである。本発明のキットにおける検出のための試薬はまた、リン酸化EGFR検出のための試薬としてEGFRのリン酸化Tyr992またはSer967を認識する抗体を含んでもよい。

【0087】

本発明はさらに肺癌を治療または予防するための組成物を提供する。当該組成物はEGFRに対するTTKキナーゼ活性を減少させる化合物の薬学的有効量および薬学的に許容される担体から成る。上述したように、本発明の文脈において、用語「機能的等価物」は対象タンパク質が本来のタンパク質の生物活性を保持することを意味する。この場合はEGFRのキナーゼ活性である。対象タンパク質が標的活性を有するか否か、本発明に従って測定することができる。例えば、EGFRのキナーゼ活性はEGFRのリン酸化に適した条件下でポリペプチドとインキュベートし、リン酸化EGFRレベルを検出することにより検出することができる。例えば、TTKによるEGFRのリン酸化はTyr992またはSer967である。

【0088】

所与のタンパク質と機能的に等価なタンパク質の調製方法は、当業者に周知であり、タンパク質に変異を導入する従来の方法を含む。例えば、当業者は部位特異的変異を介してヒトTTKタンパク質のアミノ酸配列に適切な変異を導入することによってヒトTTKタンパク質と機能的に等価なタンパク質を調製できる(Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995), Gene 152, 271-5; Zoller, MJ, and Smith, M. (1983), Methods Enzymol. 100, 468-500; Kramer, W. et al. (1984), Nucleic Acids Res. 12, 9441-56; Kramer W, and Fritz HJ. (1987) Methods. Enzymol. 154, 350-67; Kunkel, TA (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 488-92; Kunkel (1991), Methods Enzymol. 204, 125-39)。アミノ酸変異は、天然において発生することもある。本発明の文脈における使用に適したタンパク質は、1つ又は複数のアミノ酸が変異されたヒトTTKタンパク質のアミノ酸配列を有するタンパク質を含み、結果として得られた変異タンパク質はヒトTTKタンパク質と機能的に等価である。そのような変異体において変異されるアミノ酸数は、通常25アミノ酸以下、好ましくは10から15アミノ酸以下、より好ましくは5から6アミノ酸以下、およびさらにより好ましくは2から3アミノ酸以下である。EGFRに対するキナーゼ活性を維持するために、変異タンパク質のアミノ酸配列におけるキナーゼドメインは保存することが好ましい。例えば、TTKのキナーゼドメインを維持するため、TTKのAsp647は変えられない。

【0089】

変異または改変されたタンパク質、あるアミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸残基を置換、欠失あるいは挿入によって改変されたアミノ酸配列を有するタンパク質は、元の生物活性を保持することが知られている(Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-6, Zoller, M. J. & Smith, M., Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-500, Wang, A. et al., Science (1984) 224, 1431-3, Dalbadie-McFarland, G

10

20

30

40

50

. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-13)。

【0090】

変異させるアミノ酸残基は、アミノ酸側鎖の特性が保存される別のアミノ酸に変異させることが好ましい（「保存的アミノ酸置換」として知られる方法）。典型的なアミノ酸側鎖の特性は、疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）および次の官能基又は共通の特徴を有する側鎖である：脂肪族側鎖（G、A、V、L、I、P）；水酸基を含む側鎖（S、T、Y）；硫黄原子を含む側鎖（C、M）；カルボン酸及びアミドを含む側鎖（D、N、E、Q）；塩基を含む側鎖（R、K、H）；ならびに芳香族官能基を含む側鎖（H、F、Y、W）。挿入された文字はアミノ酸の1文字コードを示すことに注意されたい。

10

【0091】

ヒトTTKタンパク質のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2)に対して、1つまたは複数のアミノ酸残基が挿入または付加されるタンパク質の例は、ヒトTTKタンパク質を含む融合タンパク質である。本発明の文脈における使用に適した融合タンパク質は、例えばヒトTTKタンパク質および他のペプチドまたはタンパク質の融合を含む。融合タンパク質は、当業者に周知の技術を用いて、例えば他のペプチドまたはタンパク質をコードするDNAと本発明のヒトTTKタンパク質をコードするDNAをフレームが合うように結合し、融合DNAを発現ベクターへ挿入し、宿主で発現することによって作製することができる。本発明のタンパク質に融合されるペプチドまたはタンパク質は制限されない。

20

【0092】

TTKタンパク質と融合させるペプチドとして使用可能な公知のペプチドには、例えば、FLAG (Hopp, T. P. et al., (1988) Biotechnology 6, 1204-10)、6個のHis(ヒスチジン)残基を含む6xHis、10xHis、インフルエンザ凝集素(HA)、ヒトc-myc断片、VSP-GP断片、p18HIV断片、T7-タグ、HSV-タグ、E-tag、SV40T抗原断片、Ick タグ、チューブリン断片、B-タグ、プロテインC断片などが含まれる。本発明のタンパク質と融合できるタンパク質の例には、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、インフルエンザ凝集素(HA)、免疫グロブリン定常領域、ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合タンパク質)などが含まれる。

20

【0093】

融合タンパク質は、上述の融合ペプチドまたはタンパク質をコードする市販のDNAを、本発明のタンパク質をコードするDNAと融合させて、調製された融合DNAを発現させることによって調製可能である。

30

【0094】

機能的に等価なタンパク質を単離するための当技術分野で公知の代替法は、例えば、ハイブリダイゼーション技術を用いる方法である(Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. Press)。当業者は、TTKタンパク質をコードするTTK DNA配列（例えば、SEQ ID NO: 1）の全体または一部に対して高い相同意を有するDNAを容易に単離することができ、単離されたDNAからヒトのTTKタンパク質と機能的に等価なタンパク質を単離することができる。本発明で使用されるタンパク質には、ヒトのTTKタンパク質をコードするDNA配列の全体または一部とハイブリダイズするDNAによってコードされるタンパク質、およびヒトのTTKタンパク質と機能的に等価物であるタンパク質が含まれる。これらのタンパク質には、ヒトまたはラットに由来するタンパク質に対応する哺乳動物ホモログ（例えばサル、マウス、ウサギおよびウシ遺伝子によってコードされたタンパク質）が含まれる。ヒトのTTKタンパク質をコードするDNAに対して高い相同意を有するcDNAを動物から単離する際には、精巣または肺癌由来の組織を用いることが特に好ましい。

40

【0095】

ヒトのTTKタンパク質の機能的に等価なタンパク質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーション条件は、当業者によって日常的に選択可能である。例えば、「Rapi d-hyb緩衝液」（アマシャムライフサイエンス）を用いて68 °Cで30分間以上プレハイブリ

50

ダーゼーションを行い、標識プローブを添加して、68°で1時間以上加温することにより、ハイブリダイゼーションを実施することができる。その後の洗浄工程は、例えば低ストリンジエントな条件で行うことができる。典型的な低ストリンジエントな条件とは、例えば42°、2x SSC、0.1% SDS、または好ましくは50°、2x SSC、0.1% SDSである。高ストリンジエントな条件を用いることがより好ましい。典型的な高ストリンジエントな条件とは、例えば、室温で、2x SSC、0.01% SDSでの20分間の洗浄3回、次に37°で、1x SSC、0.1% SDSでの20分間の洗浄3回、および、50°で、1x SSC、0.1% SDSでの20分間の洗浄2回を含む。しかし、温度および塩濃度などのいくつかの要素はハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を及ぼす場合があり、必要なストリンジエンシーを達成するための要素を、当技術分野内の当業者は日常的に十分適切に選択することができる。

10

## 【0096】

ハイブリダイゼーションの代わりに、遺伝子増幅法、例えばポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を利用し、ヒトのTTKタンパク質 (SEQ ID NO: 2) をコードするDNA (SEQ ID NO: 1) の配列情報に基づいて合成されたプライマーを用いて、ヒトのTTKタンパク質と機能的に等価なタンパク質をコードするDNAを単離することができる。

## 【0097】

上記のハイブリダイゼーション技術または遺伝子増幅技術を通じて単離されたDNAによってコードされるヒトTTKタンパク質と機能的に等価なタンパク質は、通常、ヒトTTKタンパク質のアミノ酸配列に対して高い相同意を有する。本発明の文脈において、「高い相同意」という用語は40%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは80%以上、さらにより好ましくは95%以上の相同意を指す。タンパク質の相同意は「Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 726-30」におけるアルゴリズムに従って決定することができる。

20

## 【0098】

本発明の文脈において有用なタンパク質は、それを産生するために用いた細胞もしくは宿主、または利用した精製方法に応じて、アミノ酸配列、分子量、等電点、糖鎖の有無、または形状に変化を有してもよい。言うまでもなく、ヒトTTKタンパク質 (SEQ ID NO: 2) の機能的等価物である限り、本発明の文脈においてそれは有効である。

## 【0099】

本発明の文脈において有用なタンパク質は、当業者に周知の方法によって組換えタンパク質または天然タンパク質として調製することができる。組換えタンパク質は、例えば、以下の工程により調製可能である：本発明のタンパク質をコードするDNA（例えばSEQ ID NO: 1の核酸配列を有するDNA）を適切な発現ベクターに挿入する工程；ベクターを適切な宿主細胞に導入する工程；抽出物入手する工程；抽出物をクロマトグラフィー、例えばイオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過もしくは本発明のタンパク質に対する抗体を固定したカラムを利用するアフィニティクロマトグラフィーに供することにより、または上述のカラムを2つ以上組み合わせることにより、タンパク質を精製する工程。

30

## 【0100】

さらに、本発明の文脈において有用なタンパク質が、宿主細胞（例えば、動物細胞および大腸菌）中で、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として、または複数のヒスチジンを加えた組換えタンパク質として発現する場合、発現された組換えタンパク質を、グルタチオンカラムまたはニッケルカラムを用いて精製することができる。

40

## 【0101】

融合タンパク質の精製後に、必要に応じてトロンビンまたは第Xa因子で切断することにより、目的のタンパク質以外の領域を除くこともできる。

## 【0102】

天然のタンパク質は、当業者に公知の方法により、例えば本発明のタンパク質を発現する組織または細胞の抽出物を、後述のTTKタンパク質に結合する抗体が結合したアフィニ

50

ティーカラムに接触させることにより、単離可能である。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体でありうる。

【0103】

本発明において、TTKまたはその機能的等価物のキナーゼ活性は、当技術分野において公知の方法によって決定可能である。例えば、TTKによるEGFRのリン酸化のための適切なアッセイ条件下で、TTKおよびEGFRはATPとインキュベートすることができる。本発明において、EGFRのリン酸化の典型的な条件は、EGFRまたは細胞抽出物とTTKを接触される段階、およびそれらをインキュベートする段階を含む。本発明において、EGFRのリン酸化条件は、リン酸供与体の存在下でEGFRとTTKのインキュベートによって提供される。ATPは適切なリン酸供与体の一例である。例えば、放射性ラベル化ATPがリン酸供与体となりうる。増加した放射性ラベル化EGFRはあらゆる適切な方法によって検出することができる。例えば、放射性アッセイにおいて、放射性ラベル化EGFRはシンチレーションカウンターで検出される。一方、非放射性アッセイにおいて、リン酸化EGFRは、例えばウエスタンプロットアッセイまたはELISAのような、リン酸化EGFRに結合する抗体を用いて検出する。例えば、TTKによるEGFRのリン酸化に適切な条件を以下に記載する：

反応混合液：

50 mM Tris-HCl (pH 7.4),

10 mM MgCl<sub>2</sub>,

2 mM dithiothreitol,

1 mM NaF,

0.2 mM ATP

【0104】

反応混合液は同定されたTTKを含む試料と混合し、30 で60分間インキュベートする。反応はLaemmli試料バッファーを添加し、95 で5分間加熱することで停止させた。タンパク質はSDS-PAGEおよび、その後リン酸化EGFRに結合する抗体を用いてウエスタンプロットによって分離した。

【0105】

あるいは、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性はシンチレーションカウンターによって放射性標識化EGFRに基づいて評価され得る。リン酸化EGFRは例えばELISAまたはウエスタンプロットアッセイのような抗体に基づいた検出系によって検出され得る。あるいは、リン酸化EGFRは、例えばMALDI-TOF-MSのような、マススペクトロメトリーで検出することができる。例えば、TTKによるEGFRのリン酸化部位はTyr992またはSer967である。Tyr992またはSer967におけるEGFRに対するTTKのキナーゼ活性は、リン酸化EGFR (Tyr992またはSer967) に特異的な抗体を用いて検出することができる。

【0106】

様々なロースループットおよびハイスループットの酵素アッセイ形式が当技術分野で公知であり、これらを、TTKによるEGFRのリン酸化のレベルの検出または測定のために容易に適合させることができる。ハイスループットアッセイ法のため、マルチウェルプレート、スライドまたはチップなどの固体支持体上に、EGFRを好ましくは固定化する。反応後に、上記の方法によってリン酸化EGFRを固体支持体上で検出することができる。リン酸化EGFRを検出するため、例えばリン酸化EGFRに結合する抗体を用いることができる。例えば、TTKによるEGFRのリン酸化部位はTyr992またはSer967である。TTKによるTyr992またはSer967におけるEGFRのリン酸化は、リン酸化EGFR (Tyr992またはSer967) に対する特異的抗体を用いて検出することができる。あるいは、P<sup>32</sup>標識化ATPをリン酸供与体として用いることができる。リン酸化EGFRは放射性P<sup>32</sup>で追跡することができる。そのようなアッセイを容易にするため、固体支持体をストレプトアビジンでコーティングしてEGFRをビオチンで標識化することができる。当業者はスクリーニングの所望のスループット能力に基づいて、適切なアッセイ形式を決定することができる。

【0107】

任意の試験化合物は、例えば細胞抽出物、細胞培養上清、微生物発酵の産物、海洋生物

10

20

30

40

50

からの抽出物、植物抽出物、精製タンパク質または粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成低分子化合物および天然化合物を含むが、これに限定されず、本発明のスクリーニング方法に用いることができる。本発明の試験化合物は、(1)生物学的ライブラリー、(2)扱うことが空間的に可能な並列した固相または液相ライブラリー、(3)デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法、(4)「1ビーズ1化合物」ライブラリー法、および(5)アフィニティクロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー方法を含む、当技術分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多くのアプローチのいずれかを用いて入手することもできる。アフィニティクロマトグラフィー選択を用いる生物学的ライブラリー法はペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の低分子ライブラリーに適用可能である(Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12: 145-67)。分子ライブラリーを合成する方法の例は、当技術分野において見出すことができる(DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909-13; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422-6; Zuckermann et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37: 2678-85; Cho et al. (1993) *Science* 261: 1303-5; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1233-51.)。化合物のライブラリーは、溶液中に提示してもよく(Houghten (1992) *Bio/Techniques* 13: 412-21.)、またはビーズ(Lam (1991) *Nature* 354: 82-4. 参照)、チップ(Fodor (1993) *Nature* 364: 555-6.)、細菌(US Pat. No. 5,223,409)、胞子(US Pat. No. 5,571,698; 5,403,484, および 5,223,409)、プラスミド(Cull et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-9.)、もしくはファージ(Scott and Smith (1990) *Science* 249: 386-90.; Devlin (1990) *Science* 249: 404-6.; Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378-78.; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 301-10.; US 特許出願 2002103360)上に提示してもよい。

#### 【0108】

本発明のスクリーニング方法によって同定された化合物は、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性を阻害する薬剤開発の候補であり、肺癌の治療または予防に適用され得る。特に、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性は、EGF依存的である。もしくは、EGFRのリン酸化部位はTyr992またはSer967である。

#### 【0109】

さらに、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性を阻害する化合物の構造の一部が付加、欠失および/または置換によって変換した化合物もまた、本発明のスクリーニング方法によって得られた化合物に含まれる。

#### 【0110】

##### 肺癌の治療および予防：

本発明は、本発明のスクリーニング方法により選択された化合物のいずれかを含む肺癌の治療または予防のための組成物を提供する。

#### 【0111】

ヒトおよび他の哺乳類、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、羊、ブタ、ウシ、サル、ヒヒ、およびチンパンジー、のための医薬として本発明の方法によって同定された化合物を投与する場合、同定された化合物は直接投与か、または従来の製剤調製方法を用いた剤形に調製できる。例えば、必要に応じて、薬剤は経口的に糖衣錠、カプセル、エリキシルおよびマイクロカプセルとして、または非経口的に無菌液あるいは水または薬学的に許容される他のあらゆる液体の滅菌懸濁液の注射型をとることができる。例えば、化合物は、一般的に許容された薬剤実施のために要求される単位投与量の形において、薬学的に許容される担体または培養液、特に滅菌水、生理的食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香料、賦形剤、溶媒、防腐剤、結合剤、その他と混合することができる。これら製剤における活性成分の量は、指示範囲内で適切な投与量にする。

#### 【0112】

10

20

30

40

50

錠剤およびカプセルを形成するために混合できる添加剤の例は、例えば、ゼラチン、コーンスターーチ、トラガカントゴムおよびアラビアゴムのような結合剤、結晶セルロースのような賦形剤、コーンスターーチ、セラチンおよびアルギン酸のような膨潤剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑油、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味料、ならびにペパーミント、アカモノ油およびサクランボのような香料を含む。単位投与量の形態がカプセルの場合、油のような液体担体はまた、上記成分においてさらに含まれることができる。注射のための滅菌混合物は、注射に用いられる蒸留水のような溶媒を用いた通常の薬剤実施態様で調製することができる。

【0113】

生理的食塩水、ブドウ糖、およびD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトールおよび塩化ナトリウムのようなアジュバントを含む他の等張液は、注射用の水溶液として用いられることができる。これらは適切な可溶化剤、例えばアルコール、特にエタノール、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールのようなポリアルコール、ポリソルベート80(商標)およびHCO-50のような非イオン性活性剤と組み合わせて用いることができる。

10

【0114】

ゴマ油およびダイズ油は適切な油性液体の例であり、可溶化剤としての安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールと組み合わせて使用することができ、リン酸緩衝液またはナトリウム酢酸緩衝液のような緩衝液、塩酸プロカインのような鎮痛剤、ベンジルアルコールまたはフェノールのような安定化剤、および抗酸化剤とともに製剤化してもよい。調製された注射物は、適切なアンプルに充填されてもよい。

20

【0115】

当業者に公知の方法は、本発明の医薬品組成物を対象に投与するために用いられることができる。例えば動脈内注射、静脈内注射、または経皮注射、および鼻腔内投与、経気管支性投与、筋肉内投与、または口腔内投与である。投与量および方法は、対象の体重および年齢、ならびに選択した投与方法によって変化し得る。しかしながら、当業者は日常的に適切な投与方法および投与量を選択することができる。前記化合物がDNAによってコード化可能である場合、そのDNAは遺伝子治療のためのベクターに挿入することができ、ベクターは治療を行うため対象に投与することができる。投与量および方法は、対象の体重、年齢、症状によっても変化し得る。しかし、当業者はそれらを最適に選択することができる。

30

【0116】

例えば、TTKに結合し、その活性を調節する化合物の用量は症状次第であるが、正常な成人(体重60kg)へ経口投与する場合、適切な用量は一般的に1日約0.1mgから約100mg、好ましくは1日約1.0mgから約50mg、さらに好ましくは1日約1.0mgから約20mgである。

【0117】

非経口投与する場合、正常な成人(体重60kg)に注射する形では、対象、標的器官、症状および投与方法によりいくらか異なるが、1日約0.01mgから30mg、好ましくは1日約0.1から約20mg、およびより好ましくは1日約0.1から10mgの静脈内注射が簡便である。また、他の動物の場合においても、体重60kgに変換した量を投与することができる。

40

【0118】

別の態様において、本発明は本明細書において記載されている1つ以上の治療化合物を含む、薬学的組成物または治療組成物を含む。薬学的製剤は、経口、直腸、経鼻、局所的(口腔および舌下を含む)、経膣または非経口(筋肉内、皮下および静脈内を含む)投与、あるいは吸入またはガス注入による投与に適したものを含むことができる。製剤は、必要に応じて、薬学的従来技術において使用されている方法のいずれかにより、個別の用量において都合よく提示され、かつ調製することができる。本明細書における全ての薬学的方法は、液体担体または微粉固体担体、必要に応じてはその両方と活性化合物の結合をもたらす段階、および必要な場合は製品を所望の製剤に成型する段階を含む。

【0119】

50

経口投与に適している薬学的製剤は個別の単位、例えばカプセル、カシェ剤または錠剤として都合よく提示されることができ、各々は粉または顆粒として、溶液、懸濁液として、またはエマルジョンとして活性成分の予め定められた量を含む。活性成分はまた、ボーラス、舐剤またはペーストとして提示され、純粋な形態、すなわち担体なしで存在することができる。経口投与用の錠剤およびカプセルは、従来の賦形剤、例えば結合剤、充填剤、潤滑油、崩壊剤または湿潤剤を含むことができる。錠剤は任意に1つまたはそれ以上の製剤成分を用いて、圧縮または成形によって作られることができる。圧縮錠剤は、任意で結合剤、潤滑油、不活性希釈剤、潤滑剤、界面活性剤または分散剤と混合し、例えば粉または顆粒など自由に流れる形態において、活性成分を適切な機械で圧縮することにより調製しても良い。成形された錠剤は、適切な機械において、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末状化合物の混合物を成形することによって作られ得る。錠剤は公知技術の方法に従って被覆しても良い。口腔液製剤(Oral fluid preparations)は、例えば水性または油性の懸濁液、溶液、エマルジョン、シロップまたはエリキシル剤の形で存在するか、あるいは使用前に水または他の適切な溶媒と構成する乾燥製品として提示され得る。そのような液体製剤は、従来の添加剤、例えば懸濁剤、乳化剤、非水溶溶媒(食用油を含んでよい)または防腐剤を含むことができる。さらにまた、錠剤はその中の活性成分の放出を遅くまたは制御して提供するように、任意に調製することができる。

10

## 【0120】

非経口投与用の製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および対象とするレシピエントの血液と製剤を等張にする溶質を含み得る水性および非水性の無菌注射液剤、ならびに、懸濁化剤および増粘剤を含み得る水性および非水性の無菌懸濁剤が含まれる。製剤は、単位投与用容器または複数回投与用容器、例えば、密閉されたアンプルおよびバイアルに入れて提供されてもよく、生理食塩水、注射用水のような無菌液体担体の使用直前の添加のみが必要なフリーズドライ(凍結乾燥)状態で保存されてもよい。あるいは、製剤は、持続注入用として提供されてもよい。即時注射用の液剤および懸濁剤は、先に述べた種類の無菌の粉末剤、顆粒剤および錠剤から調製してもよい。

20

## 【0121】

直腸投与用製剤には、例えばココアバターまたはポリエチレングリコールのような標準的な担体を用いた坐剤として提供してもよい。口内、例えば口腔内または舌下に局所投与するための製剤には、ショ糖、アカシアまたはトラガカントのような風味付き基剤中に活性成分を含む薬用キャンディー、ならびにゼラチンおよびグリセリン、またはショ糖およびアカシアのような基剤中に活性成分を含むトローチが含まれる。活性成分の鼻腔内投与のためには、本発明の化合物は、液体スプレーもしくは分散性粉末剤または滴剤の形態が使用され得る。滴剤は、1種または複数の分散剤、可溶化剤または懸濁剤もまた含む水性または非水性基剤とともに製剤化してもよい。液体スプレーは加圧パックから都合よく送達されてもよい。

30

## 【0122】

吸入による投与のため、本発明の化合物は、吸入器、噴霧器、加圧パックまたは他のエアロゾルスプレーを送達する簡便な方法から、簡便に送達される。加圧パックは、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切なガスのような適切な噴射剤を含み得る。加圧式エアロゾルの場合、投薬単位は、一定量を送達するバルブを備えることによって、決定されてもよい。

40

## 【0123】

あるいは、吸入またはガス注入による投与のため、本発明の化合物は、乾燥粉末組成物、例えば化合物と乳糖またはデンプンのような適切な粉末基剤との混合粉末の形態をとってもよい。粉末組成物は、単位剤形、例えばカプセル、カートリッジ、ゼラチンまたはブリスターパックで提供されてもよく、粉末剤は、それから、吸入器または吸込器の補助により投与され得る。

## 【0124】

必要に応じて、上記の製剤は、活性成分の持続的放出を与えるように適合され、使用さ

50

れてもよい。本発明の医薬品組成物は、抗菌物質、免疫抑制剤または保存剤のような他の活性成分もまた含んでもよい。

【0125】

具体的に前述した成分に加えて、本発明の製剤は、該当する製剤のタイプを考慮して当技術分野で慣例的な他の薬剤を含み得ること、例えば、経口投与に適した製剤は矯味剤を含み得ることが、理解されるべきである。

【0126】

好ましい単位用量製剤は、下記の活性成分の有効量またはその適切なフラクションを含むものである。

【0127】

前述した条件の各々のため、組成物は経口でまたは注射で、1日約0.1から約250mg/kgの用量範囲で投与されることができる。ヒト成人の用量範囲は通常1日約5mgから約17.5g、好ましくは1日約5mgから約10g、および最も好ましくは1日約100mgから約3gである。別々の単位で提供された提示の錠剤または他の単位用量形態は、そのような用量またはその倍数として有効な量、例えば約5mgから約500mg、通常約100mgから約500mgを含む単位、を都合よく含むことができる。

【0128】

医薬品組成物は好ましくは経口または注射（静脈または皮下）で投与され、および対象に投与される正確な量は付き添いの医師の責任である。しかしながら、使用される用量は、対象の年齢、性別、治療されている正確な疾患、およびその重篤度を含む多くの要因に依拠する。さらに、投与経路は条件およびその重篤度によって変えることができる。

【0129】

肺癌の転移の診断

本発明は、TTKのキナーゼドメインにおける様々なアミノ酸置換、特にTTKキナーゼ活性およびその浸潤能力を促進した変異、の発見に一部基づく。TTKのキナーゼドメインにおける1つまたは複数のアミノ酸置換が肺癌の転移と関連しているという、本明細書に提供される証明を考慮して、本発明は肺癌転移予測方法を提供する。当該方法の実施例は以下の工程を含む：TTKのキナーゼドメインにおける1つまたは複数の変異を検出する工程。変異が検出された場合、肺癌の転移の高リスクを示す。本発明の文脈において、TTKのキナーゼドメインにおける1つまたは複数のアミノ酸置換は、SEQ ID NO:2のコドン610におけるバリンからフェニルアラニン（V610F）、コドン753におけるグルタミンからヒスチジン（Q753H）およびコドン574におけるチロシンからシステイン（Y574C）である。検出はシークエンス、ミニシークエンス、ハイブリダイゼーション、制限断片解析、オリゴヌクレオチド連結アッセイまたはアレル特異的PCRによって達成することができる。

【0130】

本明細書において、これまでに未知のTTK変異の存在が肺癌の転移の高リスクと関係することが示される。この知見に基づいて、本発明はまた、当該TTK変異の検出のための方法および試薬を提供する。例えば、本発明はTTKの1つまたは複数の変異を検出する方法を提供し、その変異は少なくともSEQ ID NO: 2のコドン610におけるバリンからフェニルアラニン（V610F）、コドン753におけるグルタミンからヒスチジン（Q753H）およびコドン574におけるチロシンからシステイン（Y574C）から成る群から選択される。本発明の方法は以下の工程を含む：

- 対象ポリペプチドまたはそれをコードするcDNAと、ポリペプチドまたはそれをコードするcDNAの変異のいずれか1つを認識する結合試薬を接触させる工程、
- ポリペプチドまたはそれをコードするcDNAと結合試薬を検出する工程、および
- 工程b)の薬剤の結合が検出される場合にTTKの変異を示す工程。

【0131】

本発明において、ポリペプチドの変異のいずれか1つを認識する結合試薬は、好ましくはSEQ ID NO: 2のコドン610におけるバリンからフェニルアラニン（V610F）、コドン753におけるグルタミンからヒスチジン（Q753H）、およびコドン574におけるチロシンからシ

10

20

30

40

50

ステイン (Y574C) から成る群から選択される少なくとも1つの変異を有するポリペプチドに結合し、実質的にSEQ ID NO: 2のポリペプチドには結合しない抗体である。さらに、抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、または抗原結合領域を含むそれらの断片でもよい。本発明において、当該抗体はTTKポリペプチドまたはその変異を含む免疫学的活性断片の免疫の従来法によって得ることができる。あるいは、抗体ライブラリーからTTK変異を認識する抗体可変部のスクリーニングは、抗原としてTTK変異体を用いて行われることができる。

【0132】

本発明において、好ましい抗体は特にTTK変異体を認識する。当該抗体はTTK変異特異的抗体として適用される。あるいは、本発明において、好ましいTTK変異特異的抗体は、SEQ ID NO: 2のポリペプチドに実質的に結合しない。本発明の文脈において、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を有するTTK野生型と実質的に結合しない抗体は、TTKの野生型との反応性が、TTK変異と比較して一般的に30%以下、好ましくは20%以下、より好ましくは10%以下を示す。

10

【0133】

本発明において、TTK変異は、SEQ ID NO: 2のコドン610におけるバリンからフェニルアラニン (V610F)、コドン753におけるグルタミンからヒスチジン (Q753H)、コドン574におけるチロシンからシステイン (Y574C) から成る群から選択される少なくとも1つの変異を含む。当該変異体は、部位特異的な変異をタンパク質に導入する従来法により調製することができる。例えば、当業者は部位特異的変異誘発を介したヒトTTKタンパク質のアミノ酸配列に部位特異的変異を導入することにより変異を有するタンパク質を調製することができる (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995), Gene 152, 271-5; Zoller, MJ, および Smith, M. (1983), Methods Enzymol. 100, 468-500; Kramer, W. et al. (1984), Nucleic Acids Res. 12, 9441-56; Kramer W, および Fritz HJ. (1987) Methods. Enzymol. 154, 350-67; Kunkel, TA (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 488-92; Kunkel (1991), Methods Enzymol. 204, 125-39)。

20

【0134】

本発明において、TTK変異はまた、TTK変異体をコードするDNAの核酸配列の測定によって検出することができる。例えば、領域のcDNA(またはmRNA)とアニールするプライマーまたはプローブは、SEQ ID NO: 2のコドン610におけるバリンからフェニルアラニン (V610F)、コドン753におけるグルタミンからヒスチジン (Q753H)、コドン574におけるチロシンからシステイン (Y574C) のいずれか1つを含むことができる。

30

【0135】

さらに、本発明はまた、TTKの1つまたは複数の変異を検出する試薬を提供する。その変異はSEQ ID NO: 2のコドン610におけるバリンからフェニルアラニン (V610F)、コドン753におけるグルタミンからヒスチジン (Q753H)、コドン574におけるチロシンからシステイン (Y574C) から成る群から選択される少なくとも1つの変異であり、試薬はポリペプチドまたはそれをコードするcDNAの変異のいずれか1つを認識する結合剤を含む。

【0136】

また、変異箇所を含むTTK変異またはその断片をコードするポリヌクレオチドは、その変異を検出するための対照試料として有効である。したがって、本発明は、A1870G(Y574Cに対する)、G1977T (V610Fに対する)、およびG2408C (Q753Hに対する)から成る群から選択される1つまたは複数の変異が含まれる、SEQ ID NO: 1のヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド、あるいは1つまたは複数の変異を含むその断片を提供する。例えば、ハイブリダイゼーション技術を用いた変異検出において、TTK変異のポリヌクレオチドは陽性対照として用いられることができる。本発明において、少なくとも1つの変異も含まれない限り、TTK変異体のポリヌクレオチドのいかなる断片も当該対照として用いられることが可能である。TTK変異体のポリヌクレオチド断片の好ましい長さは、通常25塩基以上、50塩基以上、100塩基以上、およびより好ましくは200塩基以上である。

40

【0137】

50

変異箇所を含むTTK変異体またはその断片をコードするポリペプチドはまた、変異検出のための対照試料として有効である。したがって、本発明はV610F、Q753HおよびY574Cから成る群から選択される1つまたは複数の変異が含まれる、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチド、あるいは1つまたは複数の変異を含むその断片を提供する。例えば、イムノアッセイ技術を用いた変異検出において、TTK変異体のポリペプチドは陽性対照として用いることができる。本発明において、TTK変異体のポリペプチドの任意の断片を、少なくとも1つの変異も含まない限り、そのような対照として用いることができる。TTKポリペプチドの変異体はまた、全ペプチドまたはその断片の分子質量解析によって検出されることができる。例えば、分子質量分析の好ましい技術は、MALDI-TOF MSである。TTK変異体ポリペプチド断片の長さは、通常10アミノ酸残基以上、好ましくは20アミノ酸残基以上、あるいは50アミノ酸残基以上、およびより好ましくは100アミノ酸残基以上である。

10

## 【0138】

EGFRに対するTTKキナーゼ活性を阻害するドミナントネガティブタンパク質

本発明は、ISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO: 44)またはDVYIMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO: 45)またはFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO: 46)を含む阻害ポリペプチドに関する。好ましい態様において、阻害ポリペプチドはISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO: 44)またはDVYIMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO: 45)またはFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO: 46)、該ポリペプチドと機能的に等価なポリペプチド、またはEGFRに対するTTKキナーゼ活性が欠如したポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。EGFR断片が肺癌細胞増殖を阻害することは本発明による新規の知見である。

20

## 【0139】

本発明の選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドは、そのポリペプチドがISSILEKG ERLPQPPICTI (SEQ ID NO: 44)またはDVYIMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO: 45)またはFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO: 46)を含み、および癌細胞増殖を阻害する限り、いかなる長さでもよい。例えば、アミノ酸配列の長さは、19から76残基、好ましくは19から57残基、さらにより好ましくは19から38残基にわたることができる。

20

## 【0140】

本発明のポリペプチドは、2つ以上の「選択されたアミノ酸配列」を含むことができる。2つ以上の「選択されたアミノ酸配列」は同じまたは異なるアミノ酸配列でもよい。さらにまた、「選択されたアミノ酸配列」は直接連結することができる。あるいは、それらの中で任意の介在配列と配置することもできる。

30

## 【0141】

さらにまた、本発明はここで特に開示されるISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO: 44)またはDVYIMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO: 45)またはFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO: 46)ポリペプチドに相同なポリペプチド（すなわち、配列相同性を共有する）に関する。本発明において、ISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO: 44)またはDVYIMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO: 45)またはFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO: 46)ポリペプチドに相同なポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸残基の付加、欠失、置換および挿入から選択される任意の変異を含み、および機能的等価物である。「機能的等価物」という用語は、EGFRに対するTTKキナーゼ活性を阻害する機能、および細胞増殖を阻害する機能を有することをいう。したがって、本発明においてISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO: 44)またはDVYIMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO: 45)またはFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO: 46)ペプチドと機能的に等価なポリペプチドは、ISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO: 44)またはDVYIMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO: 45)またはFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO: 46)配列以外の部位にアミノ酸変異を有することが好ましい。本発明におけるISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO: 44)またはDVYIMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO: 45)またはFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO: 46)ペプチドと機能的に等価なポリペプチドのアミノ酸配列は、ISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO: 44)またはDVYIMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO: 45)またはFRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO: 46)配列を保存しており、60%以上、通常70%以上、好ましくは80%以上、より

40

50

好ましくは90%以上、あるいは95%以上、およびさらにより好ましくは98%以上、「選択されたアミノ酸配列」に相同性を有する。アミノ酸配列相同性は、公知技術のアルゴリズム、例えばデフォルト設定されるBLASTまたはALIGNセットを用いて測定することができる。

【0142】

本発明のポリペプチドは、選択されたアミノ酸配列に基づいていかなる位置からも化学合成することができる。従来のペプチド化学で用いられる方法は、ポリペプチド合成方法に使用することができる。特に、該方法は以下の文書および日本特許公報に記載されている方法を含む：

Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976;

10

ペプチド合成 (Peptide Synthesis), 丸善(Inc.), 1975;

ペプチド合成の基礎と実験(Fundamental and Experimental Peptide Synthesis), 丸善(Inc.), 1985;

医薬品の開発続(Development of Pharmaceuticals), Vol. 14: ペプチド合成(Peptide Synthesis), 広川書店, 1991;

国際公開公報 WO99/67288.

【0143】

本発明のポリペプチドはまた、公知の遺伝子工学技術により合成することができる。遺伝子工学技術の例は以下の通りである。特に、所望のペプチドをコードしているDNAは形質転換細胞を調製する適切な宿主細胞に導入される。本発明のポリペプチドはこの形質転換細胞によって產生されるポリペプチドを回収することによって得られる。あるいは、所望のポリペプチドは、タンパク質合成に必要な要素が再構成される、インビトロ翻訳系を用いて、インビトロで合成することができる。

20

【0144】

遺伝子工学技術が用いられる場合、本発明のポリペプチドは異なるアミノ酸配列を有するペプチドを持つ融合タンパク質として発現することができる。所望の融合タンパク質を発現するベクターは、それらが同じリーディングフレームに存在するように、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと異なるペプチドをコードするポリヌクレオチドを連結し、その後結果として得られるヌクレオチドを発現ベクターに導入することによって得ることができる。融合タンパク質は、結果として生じるベクターで適切な宿主を形質転換することによって発現する。形成される融合タンパク質で用いられる異なるペプチドは、以下のペプチドを含む：

30

FLAG (Hopp et al., (1988) BioTechnology 6, 1204-10),

6個のHis (ヒスチジン) 残基から成る6xHis, 10xHis,

インフルエンザ血球凝集素 (HA),

ヒト c-myc 断片,

VSV-GP 断片,

p18 HIV 断片,

T7-tag,

HSV-tag,

40

E-tag,

SV40T 抗原断片,

Ick tag,

a-チューブリン断片,

B-tag,

プロテイン C 断片,

GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ),

HA (インフルエンザ血球凝集素),

免疫グロブリン定常領域,

a-ガラクトシダーゼ, および

50

MBP(マルトース結合タンパク質)。

【0145】

本発明のポリペプチドは、適切なプロテアーゼを用いて產生される融合タンパク質を処理し、その後所望のポリペプチドを回収することによって得ることができる。ポリペプチドを精製するため、融合タンパク質は、融合タンパク質と結合するアフィニティークロマトグラフィーを用いて予め捕獲し、その後捕獲した融合タンパク質をプロテアーゼ処理することができる。プロテアーゼ処理を用いて、所望のポリペプチドはアフィニティークロマトグラフィーから分離され、高純度の所望のポリペプチドが回収される。

【0146】

本発明のポリペプチドは改変ポリペプチドを含む。本発明において、「改変された」という用語は例えば、他の基質との結合を意味する。したがって、本発明において、本発明のポリペプチドはさらに細胞膜透過性物質のような他の基質を含みうる。他の基質は、例えばペプチド、脂質、糖類、および様々な天然または合成ポリマーのような、有機化合物を含む。本発明のポリペプチドは、ポリペプチドがEGFRに対するTTKキナーゼ活性を阻害する所望の活性を保持する限り、いかなる改変も有することができる。ある態様において、阻害ポリペプチドはTTKに結合するEGFRと直接的に競合しうる。改変はまた、本発明のポリペプチドにおいて付加機能を与えることができる。付加機能の例は、標的性、輸送性、安定化を含む。

【0147】

本発明において、改変の好ましい例は、例えば細胞膜透過性物質の導入を含む。通常、細胞内構造は細胞膜によって外部から切り離される。したがって、効率的に細胞外基質を細胞内へ導入することが難しい。細胞膜透過性は細胞膜透過性物質を用いてポリペプチドを改変することによって本発明のポリペプチドに与えられる。その結果、細胞と本発明のポリペプチドを接触させることによって、ポリペプチドはそこで作用するために細胞内へ送達されることができる。

【0148】

「細胞膜透過性物質」とは、細胞質へ入るために哺乳動物細胞膜を透過することができる基質を言う。例えば、特定のリポソームは、細胞内に内容物を放出するため、細胞膜と融合する。一方、ポリペプチドの特定の型は、細胞内に入るため、哺乳動物細胞の細胞質膜を透過する。そのような細胞に入っていく活性を有するポリペプチドに対して、本発明において細胞質膜およびそのようなものは基質として好ましい。特に、本発明は以下の一般式を有するポリペプチドを含む。

[R]-[D]；

[R]は細胞膜透過性物質を表す；[D]はISSILEKGERLPQPPPICTI (SEQ ID NO: 44)またはDVYMI MVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO: 45)またはFRELIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO: 46)を含む断片配列を表す。上記一般式において、[R]および[D]はリンカーによって直接的または間接的に連結されることができる。ペプチド、複数の官能基を有する化合物、またはその他はリンカーとして用いられることができる。特に、-GGG-を含むアミノ酸配列はリンカーとして使用されることができる。あるいは、細胞膜透過性物質および選択された配列を含むポリペプチドは、微粒子の表面に結合することができる。[R]は[D]のいずれの位置でも連結することができる。特に、[R]は[D]のN末端またはC末端、あるいは[D]を構成するアミノ酸側鎖に連結されることができる。さらにまた、1つ以上の[R]分子は[D]の1分子に連結されることができる。[R]分子は[D]分子上の異なる位置に導入することができる。あるいは、[D]は同時に連結される多くの[R]を用いて改変することができる。

【0149】

例えば、細胞膜透過性を有する、天然に生じた、または人工的に合成された様々なポリペプチドが報告されている(Joliot A. & Prochiantz A., Nat Cell Biol. 2004; 6: 189-96)。これら公知の細胞膜透過性物質の全ては、本発明においてポリペプチドを改変するために用いられることができる。本発明において、例えば、以下の群から選択されるいかなる基質も、上述の細胞透過性基質として用いられることができる：

10

20

30

40

50

- [ポリアルギニン]; Matsushita et al., (2003) *J. Neurosci.*; 21, 6000-7.
- [Tat / RKKRRQRRR] (SEQ ID NO: 47) Frankel et al., (1988) *Cell* 55, 1189-93.
- Green & Loewenstein (1988) *Cell* 55, 1179-88.
- [ペネトラチン / RQIKIWFQNRRMKWKK] (SEQ ID NO: 48)
- Derossi et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 10444-50.
- [Buforin II / TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK] (SEQ ID NO: 49)
- Park et al., (2000) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 8245-50.
- [トランスポータン / GWTLNSAGYLLGK1NLKALAALAKKIL] (SEQ ID NO: 50)
- Pooga et al., (1998) *FASEB J.* 12, 67-77.
- [MAP (モデル両親媒性ペプチド) / KLALKLALKALKALA] (SEQ ID NO: 51) 10
- Oehlke et al., (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* 1414, 127-39.
- [K-FGF / AAVALLPAVLLALLAP] (SEQ ID NO: 52)
- Lin et al., (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 14255-8.
- [Ku70 / VPMLK] (SEQ ID NO: 53)
- Sawada et al., (2003) *Nature Cell Biol.* 5, 352-7.
- [Ku70 / PMLKE] (SEQ ID NO: 61)
- Sawada et al., (2003) *Nature Cell Biol.* 5, 352-7.
- [プリオン / MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP] (SEQ ID NO: 54)
- Lundberg et al., (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 85-90.
- [pVEC / LLIIILRRRIRKQAHHSK] (SEQ ID NO: 55) 20
- Elmquist et al., (2001) *Exp. Cell Res.* 269, 237-44.
- [Pep-1 / KETWWETWWTEWSQPKKKRKV] (SEQ ID NO: 56)
- Morris et al., (2001) *Nature Biotechnol.* 19, 1173-6.
- [SynB1 / RGGRLSYSRRRFSTSTGR] (SEQ ID NO: 57)
- Rousselle et al., (2000) *Mol. Pharmacol.* 57, 679-86.
- [Pep-7 / SDLWEMMMVSLACQY] (SEQ ID NO: 58)
- Gao et al., (2002) *Bioorg. Med. Chem.* 10, 4057-65.
- [HN-1 / TSPLNIHNGQKL] (SEQ ID NO: 59)
- Hong & Clayman (2000) *Cancer Res.* 60, 6551-6.
- 【0150】 30

本発明において、細胞膜透過性物質の例として上でリストされたポリアルギニンは、あらゆる数のアルギニン残基によって構成される。特に、例えば連続的な5-20アルギニン残基によって構成される。アルギニン残基の好ましい数は11である(SEQ ID NO: 60)。

【0151】

ISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO: 44) または DVYMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO: 45) または FRELIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO: 46) を含む医薬品組成物

本発明のポリペプチドは肺癌細胞の増殖を阻害する。したがって、本発明は、ISSILEKG ERLPQPPICTI (SEQ ID NO: 44) または DVYMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO: 45) または FRELIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO: 46) を含むポリペプチド、あるいはそれらをコードするポリヌクレオチドを活性成分として含む、癌の治療薬および/または予防薬を提供する。あるいは、本発明は、本発明のポリペプチドを投与する工程を含む肺癌治療方法および/または予防方法に関する。さらにまた、本発明は肺癌を治療および/または予防する医薬品組成物の製造における本発明のポリペプチドの使用に関する。さらに、本発明はまた、肺癌治療および/または予防のためのISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO: 44) または DVYMIM VKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO: 45) または FRELIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO: 46) を含むペプチドから選択されるポリペプチドに関する。 40

【0152】

あるいは、本発明の阻害ポリペプチドは癌細胞のアポトーシスを誘導するために用いられることができる。したがって、本発明は、ISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO: 44) または DVYMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO: 45) または FRELIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO: 46) 50

)を含むポリペプチド、ならびにそれらをコードするポリヌクレオチドを活性成分として含む、細胞のアポトーシス誘導剤を提供する。本発明のアポトーシス誘導剤は癌のような細胞増殖性疾患を治療するために用いられることができる。あるいは、本発明は、本発明のポリペプチドを投与する工程を含む細胞のアポトーシス誘導方法に関する。さらに、本発明は、細胞においてアポトーシスを誘導する医薬品組成物を製造することにおける、本発明のポリペプチドの使用に関する。

【0153】

本発明の阻害ポリペプチドは肺癌のようなTTK発現細胞においてアポトーシスを誘導する。一方、TTK発現はほとんどの正常器官において観察されていない。ある正常器官において、TTK発現レベルは肺癌組織と比較して相対的に低い。したがって、本発明のポリペプチドは肺癌細胞において、特にアポトーシスを誘導することができる。

10

【0154】

肺癌治療または細胞におけるアポトーシス誘導のために、調製された医薬品としてヒトおよび他の哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、ヒヒおよびチンパンジーに本発明のポリペプチドが投与される場合、単離された化合物は直接投与、または医薬品を調製する公知の方法を用いて適切な剤形に調製することができる。例えば、必要に応じて、医薬品は糖衣錠、カプセル、エリキシルおよびマイクロカプセルとして経口投与、または水あるいは薬学的に許容される他のあらゆる液体との滅菌溶液または懸濁液の注射形態で、非経口的に投与されることができる。例えば、一般的に許容される医薬品製造のために必要な単位用量形態において、化合物は薬学的に許容される担体または培地、特に滅菌水、生理的食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、表面活性物質、安定化剤、矯味剤、賦形剤、溶媒、防腐剤および結合剤と混合することができる。これらの製剤における活性成分の量に応じて、特定範囲内の適切な用量を決定することができる。

20

【0155】

錠剤およびカプセルにおいて混合されることのできる添加剤の例は、例えばゼラチン、コーンスターーチ、トラガカントゴムおよびアラビアゴムなどの結合剤、例えば結晶セルロースなどの培地、例えばコーンスターーチ、ゼラチンおよびアルギン酸などの膨潤剤、例えばステアリン酸マグネシウムなどの潤滑油、例えばショ糖、ラクトースまたはサッカリンなどの甘味料、および例えばセイヨウハッカ、ウィンターグリーン油およびサクランボなどの矯味剤である。単位投与形態がカプセルである場合、油のような液体担体が上記成分においてさらに含まれることができる。注射用の滅菌混合液は、通常の医薬品の認識によれば、例えば注射用の蒸留水のような溶液を用いて調製することができる。

30

【0156】

生理的食塩水、ブドウ糖ならびにD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトールおよび塩化ナトリウムのようなアジュバントを含む他の等張液が、注射用水性液剤として使用可能である。これらは、アルコール、特にエタノール；およびプロピレングリコールおよびポリエチレングリコールのような多価アルコール；ならびにポリソルベート80（商標）およびHCO-50のような非イオン性表面活性剤等の適切な可溶化剤と組み合わせて使用することができる。

40

【0157】

ゴマ油またはダイズ油は、油性液体として使用することができ、それらは、可溶化剤として安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールと組み合わせて使用することもでき、それらはさらに、リン酸緩衝液および酢酸ナトリウム緩衝液のような緩衝液；塩酸プロカインのような鎮痛剤、ベンジルアルコールおよびフェノールのような安定化剤、ならびに抗酸化剤とともに製剤化してもよい。調整された注射剤は、適切なアンプル内に充填してもよい。

【0158】

当業者に公知の方法は、例えば動脈内、静脈内、または皮下注射によって、および同様に鼻腔内、経気管、筋肉内、または経口投与によって、患者に本発明の医薬品化合物を投

50

与するために用いられることがある。用量および投与方法は、投与方法と同じく患者の体重および年齢に応じて変化する。しかし、当業者はそれらを日常的に選択することができる。本発明のポリペプチドをコードしているDNAは、遺伝子治療のためのベクターに挿入することができ、そのベクターは治療のために投与することができる。用量および投与方法は患者の体重、年齢および症状に応じて変化するが、当業者はそれらを適切に選択することができる。例えば、それらの活性を調節するため、本発明のポリペプチドに結合する化合物の用量は、正常成人（体重60kg）に経口投与する場合、症状に応じてわずかに変化はするが、1日約0.1mgから約100mg、好ましくは1日約1.0mgから約50mg、より好ましくは1日約1.0mgから約20mgである。

## 【0159】

10

正常な成人（体重60kg）に注射剤形で化合物を非経口投与する場合、患者、標的器官、症状、および投与方法によって多少の差はあるが、1日あたり約0.01mgから約30mg、好ましくは1日あたり約0.1mgから20mg、より好ましくは1日あたり約0.1mgから約10mgの用量を静脈内注射することが好都合である。他の動物の場合も、適切な投与量は、体重60kgに変換することにより同様に算出可能である。

## 【0160】

## TTKまたはEGFRのsiRNA

TTKまたはEGFR遺伝子のsiRNAはTTKまたはEGFR遺伝子の発現レベルを低下させるために用いられることがある。例えば、TTKまたはEGFR遺伝子のsiRNAは肺癌の治療に有効である。特に、本発明のsiRNAは、対応するmRNAに結合し、それによってmRNAの分解を促進し、および/あるいはTTKまたはEGFR遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を阻害し、それによってそのタンパク質の機能を阻害することによって作用することができる。

20

## 【0161】

「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、特に他を示したり意味しなければ、本明細書において、一般的に許容された一文字コードによって互換的に用いられる。用語は、1つまたは複数の核酸がエステル結合によって連結した核酸（ヌクレオチド）ポリマーに適用される。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドはDNA、RNAまたはそれらの組み合わせから成ることができる。

## 【0162】

本明細書で用いられる「二本鎖分子」という用語は、標的遺伝子の発現を阻害する核酸分子を意味し、例えば低分子干渉RNA（siRNA；例えば二本鎖リボ核酸（dsRNA）または低分子ヘアピンRNA（shRNA）および低分子干渉DNA/RNA（siD/R-NA；例えばDNAとRNAの二本鎖キメラ（dsD/R-NA）またはDNAとRNAの低分子ヘアピン型キメラ（shD/R-NA））を含む。

30

## 【0163】

また、TTKまたはEGFR遺伝子に対するsiRNAはTTKまたはEGFR遺伝子の発現レベルを減少させるのに用いることができる。本明細書において、「siRNA」という用語は、標的mRNAの翻訳を妨げる二本鎖RNA分子を意味する。siRNAを細胞に導入する標準的な技術が用いられることができ、RNAから転写されるDNAを鑄型にする方法を含む。本発明の文脈において、siRNAはSEQ ID NO: 62または63に対するセンス核酸配列およびアンチセンス核酸配列から成る。siRNAは、例えばヘアピンのように、単鎖の転写物が標的遺伝子のセンスおよび相補的なアンチセンス配列の両方を有するように構築される。siRNAはdsRNAまたはshRNAでもよい。

40

## 【0164】

本明細書で用いられる「dsRNA」という用語は、互いに相補的な配列を含み、相補的な配列を介して共にアニールして二本鎖RNA分子を形成するRNA二分子の構成物を意味する。二本鎖のヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列のタンパク質コード配列から選択される「センス」または「アンチセンス」RNAのみでなく、標的遺伝子の非コード領域から選択されるヌクレオチド配列を有するRNA分子を含んでもよい。

## 【0165】

本明細書で用いられる「shRNA」という用語は、互いに相補的な第1および第2領域、す

50

なわち、センスおよびアンチセンス鎖を含むステムループ構造を有するsiRNAを意味する。領域の相補性と配向性の程度は、領域間で塩基が対を形成するのに十分であり、第一領域と第二領域はループ領域によって連結され、ループはループ領域内のヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）間の塩基対形成の欠如をもたらす。shRNAのループ領域は、センス鎖とアンチセンス鎖との間に介在する一本鎖領域であり、「介在一本鎖」とも表記され得る。

【0166】

本明細書で用いられる「siD/R-NA」という用語は、RNAとDNAの両方から構成され、RNAとDNAとのハイブリッドおよびキメラを含み、標的mRNAの翻訳を妨げる二本鎖ポリヌクレオチド分子を意味する。本明細書において、ハイブリッドは、DNAから成るポリヌクレオチドとRNAから成るポリヌクレオチドとが互いにハイブリダイズして二本鎖分子を形成している分子を示し、一方、キメラは、二本鎖分子を構成する鎖の一方または両方がRNAおよびDNAを含むことを示す。細胞内にsiD/R-NAを導入する標準的な技術が使用される。siD/R-NAは、TTKまたはEGFRセンス核酸配列（「センス鎖」とも表記される）、TTKまたはEGFRアンチセンス核酸配列（「アンチセンス鎖」とも表記される）またはその両方を含む。siD/R-NAは、単一の転写産物が、標的配列のセンス核酸配列と相補的アンチセンス核酸配列の両方を有するように、例えばヘアピンのように構築されてもよい。siD/R-NAは、dsD/R-NAまたはshD/R-NAのいずれかであってもよい。

10

【0167】

本明細書で用いられる「dsD/R-NA」という用語は、互いに相補的配列を含み、相補的な配列を介して共にアニールして二本鎖ポリヌクレオチド分子を形成している二分子の構成物を意味する。二本鎖のヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列のタンパク質コード配列から選択される「センス」または「アンチセンス」ポリヌクレオチド配列のみでなく、標的遺伝子の非コード領域から選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含んでもよい。dsD/R-NAを構成する二分子の一方または両方は、RNAとDNAの両方から構成されるか（キメラ分子）、あるいは、一方の分子がRNAで構成され、他方がDNAで構成される（ハイブリッド二本鎖）。

20

【0168】

本明細書で用いられる「shD/R-NA」という用語は、ステムループ構造を有するsiD/R-NAを意味し、互いに相補的な第1および第2領域、すなわちセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む。領域の相補性と配向性の程度は、領域間で塩基が対を形成するのに十分であり、第一領域と第二領域はループ領域によって連結され、ループはループ領域内のヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）間の塩基対形成の欠如をもたらす。shD/R-NAのループ領域は、センス鎖とアンチセンス鎖との間に介在する一本鎖領域であり、「介在一本鎖」とも表記され得る。

30

【0169】

本発明の二本鎖分子は、1つまたは複数の修飾ヌクレオチドおよび/または非リン酸ジエステル結合を含んでもよい。当技術分野で周知の化学修飾は、二本鎖分子の安定性、有効性および/または細胞への取り込みを向上させることができる。当業者は、本分子に組み込むことができる他のタイプの化学修飾を理解するであろう(WO03/070744; WO2005/045037)。一実施態様では、修飾は、分解に対する耐性または取り込みを向上させるのに利用することができる。そのような修飾の例としては、ホスホロチオエート結合、2'-O-メチル-4'結合リボヌクレオチド、2'-O-メチルリボヌクレオチド（特に二本鎖分子のセンス鎖におけるもの）、2'-デオキシ-フルオロリボヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、「ユニバーサル塩基」ヌクレオチド、5'-C-メチルヌクレオチド、および逆位デオキシ脱塩基残基の取り込み（inverted deoxyabasic residue incorporation）を含む(US20060122137)。

40

【0170】

他の実施態様では、修飾は、二本鎖分子の安定性の向上またはターゲッティング効率を向上させるために用いることができる。修飾は、二本鎖分子の二本の相補鎖間の化学的架

50

橋結合、二本鎖分子鎖の1つの鎖の3'または5'末端の化学修飾、糖修飾、核酸塩基修飾および/または骨格修飾、2-フルオロ修飾リボヌクレオチドおよび2'-デオキシリボヌクレオチドを含む(WO2004/029212)。他の実施態様では、修飾は、標的mRNAおよび/または相補的な二本鎖分子鎖において、相補的なヌクレオチドに対する親和性を増大または減少させるのに用いることができる(WO2005/044976)。例えば、非修飾ピリミジンヌクレオチドは、2-チオ、5-アルキニル、5-メチル、または5-プロピニルピリミジンと置換され得る。さらに、非修飾プリンは、7-デアザ、7-アルキルまたは7-アルケニルプリンに置換され得る。他の実施態様では、二本鎖分子が3'オーバーハングを有する二本鎖分子である場合、3'-末端ヌクレオチドオーバーハンギングヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドにより置換され得る(Elbashir SM et al., Genes Dev 2001 Jan 15, 15(2): 188-200)。さらなる詳細については、US20060234970のような公開文書が利用可能である。本発明は、これらの実施例に限定されず、結果として生じる分子が標的遺伝子の発現を阻害する能力を保持する限り、本発明の二本鎖分子に対して、如何なる公知の化学修飾も行い得る。

## 【0171】

さらに、本発明の二本鎖分子は、DNAおよびRNAの双方を含んでもよく、例えばdsD/R-NAまたはshD/R-NAである。特に、DNA鎖とRNA鎖のハイブリッドポリヌクレオチドまたはDNA-RNAキメラポリヌクレオチドは、増大した安定性を示す。DNAとRNAとの混合、すなわち、DNA鎖(ポリヌクレオチド)とRNA鎖(ポリヌクレオチド)から成るハイブリッド型二本鎖分子、いずれかまたは両方の一本鎖(ポリヌクレオチド)においてDNAおよびRNA両方を含むキメラ型二本鎖分子または同種のものが、二本鎖分子の安定性を向上させるために形成されてもよい。DNA鎖とRNA鎖のハイブリッドは、標的遺伝子発現細胞に導入されたときに該遺伝子の発現を阻害する活性を有する限り、センス鎖がDNAでありアンチセンス鎖がRNAであるか、またはその逆のハイブリッドのいずれであってもよい。好ましくは、センス鎖ポリヌクレオチドがDNAであり、アンチセンス鎖ポリヌクレオチドがRNAである。同様に、標的遺伝子発現細胞に導入されたときに当該遺伝子の発現を阻害する活性を有する限り、キメラ型二本鎖分子は、センス鎖とアンチセンス鎖の双方がDNAとRNAから構成されるか、またはセンス鎖とアンチセンス鎖のいずれか一方がDNAとRNAから構成されるか、いずれであってもよい。

## 【0172】

二本鎖分子の安定性を向上させるために、分子はできるだけ多くのDNAを含むことが好ましく、一方、標的遺伝子の発現阻害を誘導するためには、分子は、十分な発現阻害を誘導する範囲内のRNAであることを要求される。キメラ型二本鎖分子の好ましい例は、二本鎖分子の上流部分領域(すなわち、センス鎖またはアンチセンス鎖内の標的配列またはその相補配列に隣接する領域)がRNAである。好ましくは、上流部分領域はセンス鎖の5'側(5'末端)とアンチセンス鎖の3'側(3'末端)を指す。上流部分領域は好ましくは、二本鎖分子のセンス鎖またはアンチセンス鎖内の標的配列または相補的配列の終点から数えて9から13ヌクレオチドから成るドメインである。さらに、キメラ型二本鎖分子の好ましい例は、ポリヌクレオチドの少なくとも上流の半分の領域(センス鎖の5'側領域およびアンチセンス鎖の3'領域)がRNAで、もう一方の半分がDNAである、19から21ヌクレオチド鎖長を有するものを含む。そのようなキメラ型二本鎖分子において、標的遺伝子の発現を阻害する効果は、全アンチセンス鎖がRNAである場合に、非常に高い(US20050004064)。

## 【0173】

本発明において、二本鎖分子はヘアピン構造を形成してもよい。例えば、ショートヘアピンRNA(shRNA)およびDNAとRNAから成る低分子ヘアピン型(shD/R-NA)である。shRNAまたはshD/R-NAは、RNA干渉を介した遺伝子発現のサイレンシングのために用いることが可能な、堅固なヘアピントーンを生じるRNAまたはRNAとDNAの混合物の配列である。。shRNAまたはshD/R-NAは、好ましくは一本鎖上にセンス標的配列とアンチセンス標的配列とを含み、それらの配列は、ループ配列によって分離されている。通常、ヘアピン構造は細胞機構により切断されdsRNAまたはshD/R-NAとなり、その後、RNA誘導サイレンシング複合体

10

20

30

40

50

(RISC)に結合する。この複合体は、dsRNAまたはdsD/R-NAの標的配列とマッチするmRNAと結合し、かつ該mRNAを切断する。

【0174】

他の様において、ハロゲン化RNA、DNAと部分的に置換されたRNA、またはメチル化RNAは、siRNAに対するRNAアーゼ耐性を与えるために用いられることができる。RNAアーゼ耐性を与える核酸誘導体はまた、二本鎖RNAに含まれる。本発明において、二本鎖分子は、リボヌクレオチド、改変リボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド誘導体から構成される二本鎖分子を含んでもよい。

【0175】

TTKまたはEGFR遺伝子のsiRNAは、標的mRNAにハイブリダイズし、正常一本鎖mRNA転写物と結合することによってTTKまたはEGFR遺伝子にコードされるポリペプチドの産生を減少または阻害し、タンパク質の翻訳および発現を妨げる。本発明の文脈において、siRNAは好ましくは500、200、100、50または25ヌクレオチド以下の長さである。より好ましくは、siRNAは19-25ヌクレオチド長である。TTKまたはEGFRsiRNAの産生ための典型的な核酸配列は、標的配列としてSEQ ID NOS:63または64のヌクレオチド配列を含む。siRNAの阻害活性を増大するため、1つまたは複数のウリジン(「u」)ヌクレオチドを標的配列のアンチセンス鎖の3'末端に付加することができる。「u」は少なくとも2つ、一般には2から10、好ましくは2から5で付加される。付加された「u」は、siRNAのアンチセンス鎖の3'末端で一本鎖を形成する。

【0176】

TTKまたはEGFR遺伝子のsiRNAはmRNA転写物に結合可能な形態で細胞に直接導入されることができる。あるいは、siRNAをコードするDNAはベクターで運搬されうる。

【0177】

ベクターは、例えばTTKまたはEGFR遺伝子標的配列を、両鎖の発現が(DNA分子の転写により)可能となるように、TTKまたはEGFR配列に隣接する機能的に連結された制御配列を有する発現ベクターにクローニングすることによって作製する(Lee, N.S., et al., (2002) *Nature Biotechnology* 20: 500-5)。TTKまたはEGFR遺伝子のmRNAに対するアンチセンスであるRNA分子は第1プロモーターによって転写され(例えばクローニングされたDNAの3'側のプロモーター配列)、TTKまたはEGFR遺伝子のmRNAに対するセンス鎖であるRNA分子は第2プロモーターによって転写される(例えばクローニングされたDNAの5'側のプロモーター配列)。センスおよびアンチセンス鎖は、インビオでハイブリダイズして、TTKまたはEGFR遺伝子のサイレシングのためのsiRNA構築物を産生する。あるいは、2つの構築物はsiRNA構築物のセンスおよびアンチセンス鎖を作製するために利用できる。クローニングされたTTKまたはEGFR遺伝子は二次構造、例えばヘアピン、を有する構築物をコードすることができ、単一の転写物は標的配列のセンスおよび相補的アンチセンス配列の両方を有する。

【0178】

任意のヌクレオチド配列から成るループ配列はヘアピンループ構造を形成するためセンスおよびアンチセンス配列の間に位置することができる。したがって、本発明はまた、一般式5' - [A] - [B] - [A'] - 3'を有するsiRNA、ここで、

[A]はTTKまたはEGFR遺伝子配列に一致するリボヌクレオチド配列、

[B]は3から23ヌクレオチドから成るリボヌクレオチド配列、および

[A']は[A]の相補的配列を有するリボヌクレオチド配列、を提供する。

領域[A]は[A']にハイブリダイズし、その後領域[B]から成るループが形成される。

【0179】

ループ配列は3から23ヌクレオチド長であることが好ましい。ループ配列は、例えば、以下の配列からなる群から選択され得る(ambion.com/techlib/tb/tb\_506.html、ワールドワイドウェブ上で見出される)。さらに、23ヌクレオチドから成るループ配列もまた、活性のあるsiRNAを提供する(Jacque, J. M., et al., (2002) *Nature* 418 : 435-8.)。

【0180】

10

20

30

40

50

CCC, CCACC または CCACACC : Jacque, J. M, et al., (2002) *Nature*, Vol. 418: 435-8.

UUCG : Lee, N.S., et al., (2002) *Nature Biotechnology* 20: 500-5.; Fruscoloni, P., et al., (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(4): 1639-44.

UUCAAGAGA : Dykxhoorn, D. M., et al., (2003) *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 457-67.

#### 【 0 1 8 1 】

したがって、ある態様において、ループ配列はCCC、UUCG、CCACC、CCACACCおよびUUCAAGAGAから成る群から選択することができる。好ましいループ配列はUUCAAGAGAである(DNAにおいては「ttcaagaga」)。本発明の文脈における使用に適した典型的なヘアピンsiRNAは以下を含む：

TTK-siRNAに対して；

AACAAGAUGUGUUAAGUGUUUU-[b]-AAAACACUUUAACACAUCUUGUU (SEQ ID NO:62の標的配列に対して)

EGFR-siRNAに対して；

AAGUAACAAGCUCACGCAGUUUU-[b]-AAAACUGCGUGAGCUUGUUACUU (SEQ ID NO:63の標的配列に対して)

#### 【 0 1 8 2 】

適切なsiRNAのヌクレオチド配列はワールドワイドウェブ上のAmbionウェブサイトambion.com/techlib/misc/siRNA\_finder.htmlから入手できる、siRNA設計コンピュータプログラムを用いて設計することができる。コンピュータプログラムは、以下のプロトコルに基づいてsiRNA合成用のヌクレオチド配列を選択する。

#### 【 0 1 8 3 】

TTKまたはEGFR遺伝子配列に隣接する制御配列はそれらの発現が独立して、または時間的もしくは空間的に調節され得るように、同一であるかまたは異なる。。siRNAはTTKまたはEGFR遺伝子テンプレートを、例えば核内低分子RNA(snRNA)U6またはヒトH1RNAプロモーターからのRNAポリメラーゼIII転写ユニットを含むベクターにそれぞれクローニングすることによって、細胞内に転写される。ベクターを細胞へ導入するため、トランスフェクション促進剤が使用することができる。FuGENE (ロシュダイアグノティクス)、Lipofectamine 2000(インビトロジェン)、Oligofectamine (インビトロジェン)、およびNucleofector (和光純薬化学)はトランスフェクション促進剤として有効である。

#### 【 0 1 8 4 】

本発明のsiRNAは本発明のポリペプチドの発現を阻害し、それにより本発明のポリペプチドの生物活性を抑制することに有効である。また、本発明のsiRNAを含む、発現阻害剤は、本発明のポリペプチドの生物活性を阻害することができる点において有効である。したがって、本発明の1つまたは複数のsiRNAから成る組成物は肺癌の治療に有効である。あるいは、本発明は、siRNAを含む阻害性の核酸、または肺癌の治療または予防用薬学的組成物の製造のための核酸を発現するベクターの使用を提供する。さらに、本発明はまた、siRNAを含む該阻害性核酸または肺癌治療または予防用核酸を発現するベクターを提供する。

#### 【 0 1 8 5 】

肺癌の治療または予防方法

TTKまたはEGFRを過剰発現することを特徴とする腫瘍を有する患者は、それぞれTTKまたはEGFRのsiRNAを投与することにより治療される。siRNA療法は、肺癌に罹患している、または肺癌発生のリスクのある患者のTTKまたはEGFRの発現を阻害するために使用される。当該患者は特定の腫瘍型の標準的方法により同定される。肺癌細胞は、例えばCT、MRI、ERCP、MRCP、コンピュータ断層撮影、または超音波によって診断される。TTKまたはEGFRの発現における減少、あるいは対象における腫瘍のサイズ、罹患率、または転移能の減少のように、臨床的有用性を導くのであれば、治療は有効である。治療が予防的に適用される場合、「有効な」は、治療によって、腫瘍の形成が遅延するかもしくは妨げられる、また

10

20

30

40

40

50

は腫瘍の臨床症状が妨げられるかもしくは軽減されることを意味する。効用は、特定の腫瘍型の診断または治療のための任意の公知方法に関連して測定される。

#### 【0186】

siRNA療法は本発明のsiRNAをコードする標準ベクター、および/または合成siRNA分子を送達する遺伝子送達システムにより、siRNAを患者へ投与することによって行われる。概して、合成siRNA分子はインビボでヌクレアーゼ分解を防ぐために化学的に安定化される。化学的に安定化したRNA分子の調製方法は、公知技術である。概して、当該分子はリボヌクレアーゼの作用を妨げるための改変骨格およびヌクレオチドを含む。例えば、コレステロール結合siRNAは薬理学的性質の改善を示したように、他の修飾もまた可能である(Song et al. Nature Med. 9:347-351 (2003))。

10

#### 【0187】

適切な遺伝子送達システムはリポソーム、受容体仲介送達システム、またはヘルペスウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターを含むことができる。治療用核酸組成物は薬学上許容される担体において調製される。治療組成物はまた、上記のような遺伝子送達システムを含むことができる。薬学上許容される担体は、例えば生理的食塩水のように、動物への投与に適した生物学的に適合性のある溶媒である。化合物の治療上の有効量は、治療動物におけるTTKまたはEGFR遺伝子産物の産生の減少、増殖のような細胞成長の減少、または腫瘍成長の減少といった、医薬的に望ましい結果をもたらすことができる量である。

20

#### 【0188】

非経口的投与、例えば静脈、皮下、筋肉内および腹腔内送達ルート、はTTKまたはEGFRのsiRNA組成物を送達するために用いられることができる。肺癌治療のため、癌の組織または部位近くへの直接注入は有効である。

#### 【0189】

患者への投与量は、患者のサイズ、体表面積、年齢、投与される特定の核酸、性別、時間および投与経路、全体の健康、および併用投与されている他の薬剤などを含む、多数の要因に依拠する。核酸の静脈注射用の投与量は、核酸分子約106から1022コピーである。

30

#### 【0190】

筋肉または皮膚などの組織の間質腔への注射、血流または体腔への導入ならびに吸入またはガス注入などの標準的方法によって、ポリヌクレオチドは投与される。ポリヌクレオチドは薬学上許容される液体担体、例えば水性または部分的に水性である液体担体、を用いて動物に投与または送達される。ポリヌクレオチドはリポソームと関連している(例えば、カチオンまたはアニオノリポソーム)。ポリヌクレオチドは例えばプロモーターなどの、標的細胞による発現に必要な遺伝情報を含んでいる。

30

#### 【0191】

##### siRNAを含む医薬品組成物

したがって、本発明は肺癌の予防および治療のどちらかまたは両方に有効な薬物および方法を含む。これらの薬物および方法は、疾患細胞増殖の減弱または停止を達成するのに効果的な量で、TKK (SEQ ID NO: 62) または EGFR (SEQ ID NO: 63) の発現を阻害するsiRNAを含む。より詳細には、本明細書の文脈において、治療上の有効量は、治療を受けている対象の進行を予防する、あるいは既存の症状を軽減する有効量を意味する。

40

#### 【0192】

本発明の方法を用いて治療される個体は、肺癌に罹患している任意の個体を含む。当該個体は、例えばヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、またはヤギを含む哺乳動物のような脊椎動物、あるいは他の動物、特に商業的に重要な動物または家畜動物を含むことができる。

40

#### 【0193】

本発明の文脈において、適切な薬学的製剤は、経口、直腸、鼻、局所(口腔および舌下を含む)、腹内または非経口的(筋肉内、皮下および静脈)投与、あるいは吸入またはガス注入による投与に適している薬学的製剤を含む。好ましくは、投与は静脈である。製剤は、適宜、容量単位別に封入する。

50

## 【0194】

経口投与に適した製剤処方には、カプセル、カシェ剤、または錠剤が含まれ、それぞれ所定量の活性成分を含む。適切な製剤には、粉末剤、顆粒剤、液剤、懸濁剤および乳剤もまた含まれる。活性成分には、任意に、ボーラス、舐剤またはペースト剤として投与される。経口投与のための錠剤およびカプセルは、例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む糖類などの充填剤、例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、イネデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および/またはポリビニルピロリドン(PVP)などのセルロース調製物、結合剤、潤滑剤、および/または加湿剤などの従来の添加剤を含んでもよい。所望であれば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸またはアルギン酸ナトリウムのようなそれらの塩などの崩壊剤を添加してもよい。

10

## 【0195】

錠剤は、任意に1つまたは複数の製剤用成分とともに圧縮または成形することによって、製造されてもよい。圧縮錠剤は、粉末または顆粒のような易流動性形態の活性成分を、任意に、結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、潤滑剤、表面活性剤および/または分散剤と混合して、適切な機械の中で圧縮することによって、調整し得る。成形錠剤は、不活性な液体希釈剤で湿らせた粉末状化合物の混合物を、適切な機械の中で成形することにより、製造し得る。錠剤は、当技術分野において周知の方法に従って、コーティングしてもよい。経口用液体調製物は、例えば、水性または油性懸濁剤、液剤、乳剤、シロップ剤またはエリキシル剤のような形態でもよく、使用前に、水または他の適切な溶剤で構成するための乾燥製品として提供されてもよい。当該液体調製物は、懸濁剤、乳化剤、非水性溶剤(食用油を含み得る)、pH維持剤、および/または保存剤のような通常の添加剤を含んでもよい。錠剤は、その中の活性成分の徐放または制御放出を提供するように、任意に製剤化してもよい。錠剤のパッケージは、月毎に服用されるべき1つの錠剤を含んでもよい。

20

## 【0196】

非経口投与に適した製剤には、任意に抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、および対象とするレシピエントの血液と製剤を等張にする溶質を含み得る水性および非水性無菌注射剤、ならびに懸濁化剤および/または増粘剤を含む水性および非水性無菌懸濁剤が含まれる。製剤は、単位投与用容器または複数回投与用容器、例えば密閉されたアンプルおよびバイアルに入れて提供されてもよく、生理食塩水、注射用水のような無菌液体担体の使用直前の添加のみが必要なフリーズドライ(凍結乾燥)状態で保存されてもよい。あるいは、製剤は、持続注入用として提供されてもよい。即時注射用の液剤および懸濁剤は、先に述べた種類の無菌の粉末剤、顆粒剤および錠剤から調製してもよい。

30

## 【0197】

直腸投与に適した製剤は、ココアバターまたはポリエチレングリコールのような標準的な担体を用いた坐薬が含まれる。口内、例えば口腔内または舌下に局所投与に適した製剤には、ショ糖およびアカシアまたはトラガカンタのような風味付き基剤中に活性成分を含む薬用キャンディー、ならびにゼラチンおよびグリセリン、またはショ糖およびアカシアのような基剤中に活性成分を含むトローチが含まれる。鼻腔内投与のためには、本発明の化合物の液体スプレー、分散性粉末剤または滴剤の形態が使用され得る。滴剤は、1種または複数種の分散剤、可溶化剤および/または懸濁剤をもまた含む水性または非水性基剤とともに製剤化してもよい。

40

## 【0198】

吸入による投与の場合、化合物は注入器、ネブライザ、加圧パックまたは他の便宜なエアロゾルスプレー送達方法から、簡便に送達される。加圧パックは、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切なガスのような適切な噴霧剤を含み得る。加圧エアロゾルの場合には、投薬単位は一定量を送達するバルブを備えることによって、決定されてもよい。

## 【0199】

50

あるいは、吸入またはガス注入による投与の場合、化合物は、乾燥粉末組成物、例えば化合物と乳糖またはデンプンのような適切な粉末基剤との混合粉末の形態をとってもよい。粉末組成物は、単位剤形、例えば、カプセル、カートリッジ、ゼラチンまたはブリストーパックで提供されてもよく、粉末剤はそれから、吸入器または注入器の補助により投与され得る。

【0200】

他の製剤には、治療薬剤を放出する埋め込み装置および接着パッチが含まれる。

【0201】

必要に応じて、上記の製剤は、活性成分の持続的放出を与えるように適合され、使用されてもよい。薬学的組成物は、抗菌剤、免疫抑制剤および/または保存剤のような他の活性成分もまた含んでもよい。

10

【0202】

具体的に前述した成分に加えて、この発明の製剤は、該当する製剤のタイプを考慮して当従来技術で慣例的な他の薬剤を含み得ること、例えば、経口投与に適した製剤は矯味剤を含み得ることが、理解されるべきである。

【0203】

例えば、投与経路によって、投与される試験化合物の濃度によって、または治療がタンパク質、試験化合物をコードする核酸、もしくは試験化合物を分泌することができる細胞を活性成分として含む薬剤を用いるかどうかによって、特定の添加剤賦形剤が、より好ましい場合があることが当業者には明らかであろう。

20

【0204】

本発明の薬学的組成物は、それ自体公知の様式で、例えば、通常の混合、溶解、顆粒化、糖衣丸形成、研和、乳化、カプセル化、封入 (entrapping)、または凍結乾燥などのプロセスによって、製造しうる。適正な製剤は、選択された投与ルートに依存する。

【実施例】

【0205】

実施例

実施例1：材料および方法

(a) 肺癌細胞株および組織試料

肺癌細胞株は10%ウシ胎仔血清 (FCS) を加えた適切な培地中で単層で増殖させ、37<sup>o</sup>C、5%CO<sub>2</sub>の加湿空気雰囲気下で維持した。肺腺癌試料由来の原発性肺癌および転移性脳腫瘍は、以前に記載されたとおり、インフォームドコンセントを得て入手した (Kikuchi et al., Oncogene. 2003 Apr 10;22(14):2192-205., Int J Oncol. 2006 Apr;28(4):799-805., Taniwaki et al., Int J Oncol. 2006 Sep;29(3):567-75.)。埼玉県立がんセンター（埼玉、日本）で外科手術を受けた患者から、366例のホルマリン固定原発性腫瘍（234例の腺癌 (ADC)、104例の扁平上皮癌 (SCC)、28例の大細胞癌 (LCC)）および隣接する正常肺組織試料がこの発明で用いられた。全部で12例のSCLC組織試料も埼玉県立がんセンターで得られた。

30

【0206】

(b) 半定量RT-PCR解析

全RNAが、製造業者のプロトコルに従い、Trizol試薬 (Life Technologies, Inc.) を用いて、培養細胞および臨床組織から抽出された。抽出されたRNAおよび正常ヒト組織ポリ(A)RNAはDNase(Nippon Gene)で処理され、オリゴ(dT)20 プライマーおよびスーパースクリプトII逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて逆転写された。半定量的RT-PCR試験は、以下の合成遺伝子特異的プライマーまたは内部標準としてのα-アクチン (ACTB) 特異的プライマーを用いて行われた：

40

TTK,

5'-TCTTGAATCCCTGTGGAAATC-3' (SEQ ID NO: 5) および

5'-TGCTATCCACCCACTATTCCA-3' (SEQ ID NO: 6);

ACTB,

50

5' -GAGGTGATAGCATTGCTTCG-3' (SEQ ID NO: 7) および  
5' -CAAGTCAGTGTACAGGTAAGC-3' (SEQ ID NO: 8)。

PCR反応は、増幅の対数期内で産物強度を確保するサイクル数に最適化された。

【0207】

(c) ノーザンプロット解析

ヒト多組織プロット (BD Biosciences Clontech) が、<sup>32</sup>Pで標識されたTTKのPCR産物とハイブリダイズされた。TTKの全長cDNAは、プライマーを使用して、RT-PCRにより調製した。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションおよび洗浄が、供給元の推奨に従って行われた。プロットは、増感スクリーンを用いて、室温で72時間、オートラジオグラフされた。

10

【0208】

(d) ウエスタンプロット解析

細胞は、プロテアーゼ阻害剤カクテルセット III(CALBIOCHEM) およびホスファターゼ阻害剤(1 mM フッ化ナトリウム, 1 mM オルトバナジウム酸ナトリウム, 2 mM イミダゾール, 4 mM 酒石酸ナトリウム)を含む、RIPA緩衝液[50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate-Na, 0.1% SDS]で溶解させた。細胞質および核抽出物はNE-PER 核および細胞質抽出試薬(PIERCE)によって単離された。タンパク質試料はSDS-ポリアクリルアミドゲルで分離され、Hybond-ECL ニトロセルロース膜上へ電気的に転移された(GE ヘルスケアバイオサイエンス)。プロットは、マウスモノクローナル抗Mps1(TTK)抗体(Upstate)、ウサギポリクローナル抗リン酸化EGFR抗体(Tyr-845, Tyr-992, Tyr-1045, Tyr-1068, Tyr-1148, および Tyr-1173; Cell Signaling Technology, Inc.)、ウサギポリクローナル抗EGFR抗体(Cell Signaling Technology, Inc.)、ウサギポリクローナル抗リン酸化PLC 1(Tyr-771)抗体(Cell Signaling Technology, Inc.)、ウサギポリクローナル抗PLC 1抗体(Cell Signaling Technology, Inc.)、ウサギポリクローナル抗リン酸化p44/42 MAPK(Thr202/Tyr204)抗体(Cell Signaling Technology, Inc.)、ウサギポリクローナル抗p44/42 MAPK抗体(Cell Signaling Technology, Inc.)、マウスモノクローナル抗Flag抗体(SIGMA)またはマウスモノクローナル抗 アクチン抗体(SIGMA)とともにインキュベートした。抗リン酸化EGFR(Ser-967)抗体は、Ser-967リン酸化ペプチドに対して產生され、当該リン酸化ペプチドカラムで精製された。西洋ワサビペルオキシダーゼに結合した二次抗体を用いて抗原-抗体複合体を検出した(GE ヘルスケアバイオサイエンス)。タンパク質のバンドはECLウエスタンプロットティング検出試薬(GE ヘルスケアバイオサイエンス)によって可視化した。

20

【0209】

(e) 免疫細胞化学的解析

培養細胞を、37℃で15分間4%のパラホルムアルデヒド溶液中で、または氷上で15分間10% トリクロロ酢酸を用いて固定した。固定した細胞は0.1% Triton X-100含有PBS(-)中で10分間インキュベートされ、その後PBS(-)で洗浄された。一次抗体反応の前に、固定された細胞は、非特異的抗体結合を防止するため、10分間CAS-BLOCK(ZYMED Laboratories Inc.)で覆った。その後、細胞をマウスモノクローナル抗Mps1(TTK)抗体(Upstate)および、ウサギポリクローナル抗リン酸化EGFR(Tyr-992)(Cell Signaling Technology, Inc.)またはポリクローナル抗リン酸化-p44/42 MAPK(Thr202/Tyr204)抗体(Cell Signaling Technology, Inc.)、あるいはマウスモノクローナル抗Flag抗体(SIGMA)とともにインキュベートした。抗体は、Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)に結合した抗マウス二次抗体、およびAlexa Fluor 594 (Molecular Probes)に結合した抗ウサギ二次抗体で染色した。DNAを、4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)で染色した。488, 594 nmの波長で共焦点顕微鏡を用いて画像を観察し、評価した(TCS SP2 AOBS: ライカマイクロシステムズ)。

30

【0210】

(f) 免疫組織化学および組織マイクロアレイ

臨床試料におけるTTKまたはリン酸化EGFR(Tyr-992)タンパク質の存在を調査するために、ENVISION+ Kit/horseradish peroxidase (HRP) (DakoCytomation)を用いて組織切片を

40

50

染色した。簡潔にいえば、内因性ペルオキシダーゼおよびタンパク質のプロッキング後に、抗ヒトTTK抗体(NOVUS Biologicals, Inc.)または抗リン酸化EGFR(Tyr-992)抗体(Cell Signaling Technology, Inc.)あるいは抗リン酸化EGFR(Ser-967)抗体(上述)が添加され、組織切片は二次抗体としてHRP標識抗ウサギIgGとともにインキュベートされた。発色基質が添加され、試料はヘマトキシンで対比染色した。

#### 【0211】

腫瘍組織マイクロアレイは以前発表されたように構築された(Chin et al., Mol Pathol. 2003 Oct;56(5):275-9.; Callagy et al., Diagn Mol Pathol. 2003 Mar;12(1):27-34., J Pathol. 2005 Feb;205(3):388-96.)。スライド上の対応するHE染色切片を用いた視覚的配置に基づいて、サンプリング用の組織部が選択された。ドナー腫瘍ブロックから採取された3、4または5つの組織コア(直径0.6 mm; 高さ3 - 4 mm)が、組織マイクロアレイヤー(Beecher Instruments)を用いて、レシピエントパラフィンブロック中に置かれた。正常組織領域のコアが、各症例から穴を開けて採取された。マイクロアレイブロックから得られた5 μm切片が、免疫組織化学的解析のために使用された。TTKまたはリン酸化EGFR(Tyr-992)またはリン酸化EGFR(Ser-967)タンパク質の陽性は、臨床病理学的データに関する予備知識のない独立の調査官3名によってそれぞれ陰性(スコア3211dを0として)、弱((1+))、または強陽性(2+)として染色強度を記録することによって、半定量的に評価した。全評価者がそのようにそれらを定義した場合、症例は強い陽性(2+)のみに確定した。

#### 【0212】

##### (g)統計解析

分割表を用いて、年齢、性別、病理組織学的検査所見、喫煙歴、腫瘍サイズ(pT)、およびリンパ節転移(pN)などの臨床病理学的変数を、組織マイクロアレイ解析によって決定されたTTKおよび/またはリン酸化EGFR(Tyr-992)および/またはリン酸化EGFR(Ser-967)の陽性と相関させることを試みた。腫瘍特異的生存曲線は、手術の実施日からNSCLCに関連した死亡時まで、または最新の追跡調査結果まで算出した。カプラン・マイヤー曲線を、それぞれの関連変数、およびTTKおよび/またはリン酸化EGFR(Tyr-992)および/または(Ser-967)発現について算出し、患者のサブグループ内の生存期間の差を、ログランク検定を用いて解析した。コックスの比例ハザード回帰モデルを用いて、単変量解析を実施し、臨床病理学的変数と癌関連死亡率との関連を判定した。

#### 【0213】

##### (h)RNA干渉アッセイ

##### (i)ベクターベースのアッセイ

哺乳動物細胞でsiRNAを合成するように設計されたベクターベースのRNA干渉(RNAi)システム、psiH1BX3.0が、以前に確立されている(Suzuki et al., 2003, 2005; Kato et al., 2005; Furukawa et al., 2005)。10igのsiRNA発現ベクターが、30igのリポフェクタミン2000(Invitrogen)を用いて、内因的にTTKを過剰発現させたNSCLC細胞株LC319およびA549内に導入された。導入細胞は、適切な濃度のジェネテシン(G418)の存在下で5日間培養され、その後ギムザ染色および3連のMTTアッセイで細胞数および生存率が評価された。RNAi用合成オリゴヌクレオチドの標的配列は以下の通りである：

対照1(ルシフェラーゼ: Photinus pyralisルシフェラーゼ遺伝子)、5'-CGTACGCGGAATACT TCGA-3' (SEQ ID NO: 9);

対照2(Scramble: 5S および16S rRNAをコードするchloroplast Euglena gracilis遺伝子)、5'-GCGCGCTTGTAGGATTG-3' (SEQ ID NO:10);

siRNA-TTK (si-TTK-1), 5'-ACAGTGTCCGCTAAGTGA-3' (SEQ ID NO: 11);

siRNA-TTK (si-TTK-2), 5'-ATCACGGACCAGTACATCT-3' (SEQ ID NO: 12)。

RNAiシステムを検証するために、個々の対照siRNA(ルシフェラーゼおよびScramble)が、半定量的RT-PCRによって試験され、一過的にCOS-7細胞に導入された対応する標的遺伝子の発現の減少が確認された。si-TTKによるTTK発現の下方制御は、対照によっては確認されなかったが、このアッセイに用いられた細胞株において半定量的RT-PCRで確認された。

10

20

30

40

50

## 【0214】

## (ii) オリゴベースのアッセイ

オリゴ-siRNAs (Dharmacon, Inc., Lafayette, CO) (600 pM) は 30 μl の リポフェクタミン2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて 製造元の プロトコルに従い、 適切な 肺癌細胞株に 導入した。 以下の 配列と一致する リボヌクレオチド配列が オリゴ-siRNA として 用いられた。

RNAi-TTK (オリゴ): CAAGATGTGTTAAAGTGT TTTT (SEQ ID NO: 62); および

RNAi-EGFR (オリゴ): GTAACAAGCTCACGCAG TTTT (SEQ ID NO: 63)。

## 【0215】

## (i) 細胞増殖アッセイ

哺乳動物細胞の TTK の 増殖効果は また、 TTK を 発現する プラスミド または モック プラスミド を 一過的に トランスフェクション した COS-7 および NIH-3T3 細胞を 用いて 検討された。 細胞は 10%FCS および ジェネティシン を 含む DMEM で 14 日間 培養され、 MTT アッセイ が 行われた。

## 【0216】

## (j) 脱リン酸化解析

有糸分裂的に 静止した 細胞を得るために、 抽出物が ウエスタンプロット 解析のために 調製される 前に 培養細胞を コルセミド (WAKO) で 24 時間 処理した。 ホスファターゼ処理のため、 細胞抽出物は ホスファターゼ (New England Biolabs) と ホスファターゼ バッファー または バッファー のみの中 で 37° で 1 時間 インキュベート し、 その後 イムノプロット により 解析された。

## 【0217】

## (k) 組換えTTKの調製

TTK の 全長 cDNA は pFastBac HT ベクター に サブクローニング された。 組換え シャトルベクター は、 Bac-to-Bac 発現系 (Invitrogen) の 製造元 指示書に従って、 Tn7 部位 特異的 転位 を 用いて、 DH10Bac コンピテントセル (Invitrogen) において バキュロウイルスゲノム (bacmid DNA) へ 形質転換 された。 組換え bacmid DNA は 同定され、 精製され、 Sf9 細胞 (Invitrogen) に 導入され (組換えバキュロウイルス)、 次の 感染 に 用いられた。 対数期 Sf-9 細胞は 感染効率 (MOI) 1 で 組換えバキュロウイルス に 感染し、 その後、 感染した Sf-9 細胞は 72 時間 27° で 浮遊状態で 増殖した。 Sf-9 細胞の 抽出物は 収集され、 His 融合 タンパク質 は 標準的 プロトコル を 用いて、 HiTrap HP カラム (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を 用いて 精製された。 触媒的に 不活性な TTK (TTK-KD) を 構築するため、 点変異 (Ala) が コドン 647 (Asp) で 導入された。 TTK-KD は pGEX6T ベクター (GE ヘルスケアバイオサイエンス) に クローニングされた。 GST 融合 タンパク質 は 大腸菌株 BL21 で 発現され、 グルタチオンセファロース 4B (GE ヘルスケアバイオサイエンス) によって 標準的 プロトコル に従って 精製された。

## 【0218】

## (l) インビトロキナーゼアッセイ

TTK による タンパク質の リン酸化 を 調べるため、 精製された 組換え His タグ付加 TTK は、 細胞株から 調製された 全 抽出物 または 精製された EGFR の 様々な 細胞質領域 を 含む GST タグ付加 タンパク質 と、 キナーゼアッセイ バッファー (50 mM Tris, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ジチオスレイトール, 1 mM NaF, 0.2 mM ATP) 中で 30° で 60 分間 インキュベート された。 反応は Laemmli サンプルバッファー の 添加 によって 停止し、 5 分間 95° で 加熱された。 タンパク質は SDS-PAGE によって 分離され、 その後 ウエスタンプロット または <sup>32</sup>P 取り込み 解析を行った。

## 【0219】

## (m) ヌードマウス異種移植モデルにおける腫瘍成長

TTK トランスフェクタント は 回収され、 5 × 10<sup>6</sup> 個の 細胞 が 成長因子を 減少させた フェノールレッド フリーマトリゲル (BD Bioscience) に 懸濁され、 6 週齢の nu/nu BalbC 雌マウス (Charles River Laboratories) の 右背側へ 皮下 注射された。 腫瘍 サイズ は 定規 を 用いて 測定され、 腫瘍容積 は 式  $V = (W/2)^2 \times L$  を 用いて 算出された。 W は 腫瘍の 幅の 距離、 L は 縦の 長

10

20

30

40

50

さである。

【0220】

(n) TTK発現定常的トランスフェクタント

TTK発現定常的トランスフェクタントは標準的プロトコルに従って樹立された。本発明者らは、FuGENE 6 トランスフェクション試薬 (Roche Diagnostics)を用いて、TTK発現プラスミド(pCAGGS-n3FH-TTK)またはモックプラスミド(pCAGGS-n3FH)をHEK293細胞およびNIH3T3細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞は10% FCS およびG418を含むDMEMで培養され、その後個々のコロニーはトリプシン処理され、限界希釈アッセイによって定常的トランスフェクタントがスクリーニングされた。TTK発現はRT-PCR、ウエスタンプロットティング、および免疫染色によって各クローンで測定された。TTKを定常的に発現するHEK293またはNIH3T3トランスフェクタントは6穴プレートへ播種され(5 X 10<sup>4</sup> 細胞/well)、10% FCS および 0.4 mg/ml G418を含む培地で7日間維持された。各時点で、細胞増殖はCell Counting Kits (WAKO)を用いたMTTアッセイにより評価された。全ての実験は3連で行われた。

【0221】

(o) TTK変異解析

全RNAは製造元のプロトコルに従ってRNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いてNSCLC細胞株から抽出された。抽出されたRNAはDNase I (日本ジーン)で処理され、oligo (dT) プライマーおよびSuperScript II逆転写酵素 (Invitrogen)を用いて逆転写された。TTKの増幅は、合成TTK特異的プライマーを用いて行われた。

5' -GTGTTGCGGAAAGGAGTTT-3' (SEQ ID NO: 13),  
 5' -CAACCAGTCCTCTGGTTGT-3' (SEQ ID NO: 14);  
 5' -AACTCGGAACTGTTAACAAA-3' (SEQ ID NO: 15),  
 5' -GTGCATCATCTGGCTCTTGA-3' (SEQ ID NO: 16);  
 5' -TGTTCCGCTAAGTGATGCTC-3' (SEQ ID NO: 17),  
 5' -GCAAATTTCTTGCAGTTGCTC-3' (SEQ ID NO: 18);  
 5' -TCAAGAGCCAGATGATGCAC-3' (SEQ ID NO: 19),  
 5' -TCTTTCCCTCCTCTGAAAGCA-3' (SEQ ID NO: 20);  
 5' -AAGCTGTAGAACGTGGAGCAG-3' (SEQ ID NO: 21),  
 5' -CATCTTGTGGTGGCATGTT-3' (SEQ ID NO: 22);  
 5' -CGGTTCACTTGGCATTAC-3' (SEQ ID NO: 23),  
 5' -CCAAATCTGGCATTCTGAT-3' (SEQ ID NO: 24);  
 5' -AGCCCAGATTGTGATGTGAA-3' (SEQ ID NO: 25),  
 5' -TTGATTCCGTTTATTCTTCAGG-3' (SEQ ID NO: 26);  
 5' -TCAAGGAACCTCTGGTGTCA-3' (SEQ ID NO: 27),  
 5' -GACAGGTTGCTAAAAGTGG-3' (SEQ ID NO: 28);  
 5' -ACTGGCAGATTCCGGAGTTA-3 (SEQ ID NO: 29) ',  
 5' -CAACTGACAAGCAGGTGGAA-3' (SEQ ID NO: 30);  
 5' -GACACCAAGCAGCAATACCTTGG-3' (SEQ ID NO: 31),  
 5' -AACACCTGAAATACCTTGCTTGAAC-3' (SEQ ID NO: 32);  
 5' -ATGAATGCATTCGGTTAAAGG-3' (SEQ ID NO: 33),  
 5' -TTTCCACACTCCATTACCATG-3' (SEQ ID NO: 34);  
 5' -ACAGTGATAAGATCATCCGAC-3' (SEQ ID NO: 35),  
 5' -ACACTGTTGTATCTGGTTGC-3' (SEQ ID NO: 36);  
 5' -TTTCTGATAGTTGATGGAATGC-3' (SEQ ID NO: 37),  
 5' -GAAATCTGATTAATTATCTGCTG-3' (SEQ ID NO: 38);  
 5' -TGATGTTGGTCCTTAGGATG-3' (SEQ ID NO: 39),  
 5' -ATTCTTCAGTGGTCCCTTG-3' (SEQ ID NO: 40) and  
 5' -AGCTCCTGGCTCATCCCTAT-3' (SEQ ID NO: 41),  
 5' -TGCTATCCACCCACTATTCCA-3' (SEQ ID NO: 6)

10

20

30

40

50

次に、PCR産物の配列解析がABI Prism 3700 DNAシーケンサー (Applied Biosystems) を用いて行われた。

【0222】

(p)マトリゲル浸潤アッセイ

製造元の説明書に従って、FuGENE 6 トランスフェクション試薬 (Roche Diagnostics) を用いて、NIH-3T3 またはCOS-7 細胞にTTK (pCAGGS-n3FH-TTK)、TTK-KD (D647A)、変異 TTK (RERF-LC-AI 細胞由来)を発現するプラスミド、またはモックプラスミド (pCAGGS-n 3FH)をトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞は回収され、FCSを含まないDMEMに懸濁された。細胞懸濁液が調製される前に、マトリゲルマトリックス (Becton Dickinson Labware)の乾燥層が室温で2時間、DMEMで再水和された。その次に、10% FCS を含むDMEMが24穴マトリゲル浸潤チャンバーの各下部チャンバーへ添加され、細胞懸濁液が上部チャンバーの各挿入物に添加された。挿入物のプレートは37 °Cで22時間インキュベートされた。インキュベート後、マトリゲルで被覆した挿入物を通過した浸潤細胞がギムザによって固定され染色された。

【0223】

(q)合成された細胞透過性ペプチド

TTK相互作用領域の可能性がある領域を含むEGFRタンパク質の部分と対応する17~31アミノ酸ペプチド配列は、そのNH2末端で、膜伝達11ポリアルギニン配列と共に結合的に連結した(Hayama, S, et al. Cancer Res. 66, 10339-48 (2006), Futaki S, et al. J Biol Chem. 276, 5836-5840 (2001))。3つの細胞透過性ペプチドを合成した：

11R-EGFR889-907: RRRRRRRRRRRR-GGG-KPYDGIPASEISSILEKGE;

11R-EGFR899-917: RRRRRRRRRRRR-GGG-ISSILEKGERLPQPPICTI (SEQ ID NO: 44);

11R-EGFR918-936: RRRRRRRRRRRR-GGG-DVYMIMVKCWMIDADSRPK (SEQ ID NO: 45);

11R-EGFR937-955: RRRRRRRRRRRR-GGG-FRELIIIEFSKMARDPQRYL (SEQ ID NO: 46);

11R-EGFR958-976: RRRRRRRRRRRR-GGG-QGDERMHLPSPPTDSNFYRA;

11R-EGFR983-1001: RRRRRRRRRRRR-GGG-MDDVVADEYLIPQQGFFS; および

11R-EGFR965-994: RRRRRRRRRRRR-GGG-LPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVADEYLI。

最も効率的な11R-EGFR937-955 ペプチド由来のScramble ペプチドは対照として合成された：Scramble、RRRRRRRRRRR-GGG-EFMAELLRYFRPQSKRDII。

ペプチドは調製用の逆相高圧液体クロマトグラフィにより精製された。A549細胞は2.5、5、および7.5 μモル/Lの濃度で5日間、11Rペプチドとインキュベートされた。培地は、各ペプチドを適切な濃度として48時間ごとに交換され、細胞生存率は処理後5日でMTTアッセイによって評価された。

【0224】

実施例2：肺腫瘍および正常組織におけるTTK発現

肺癌治療薬および/または診断マーカーの開発のための新規分子標的を探索するため、cDNAマイクロアレイによって解析された、肺癌の50%以上で5倍以上の発現を示した遺伝子が最初にスクリーニングされた。スクリーニングされた27,648の遺伝子の中で、TTKプロテインキナーゼをコードする遺伝子が、肺癌の様々な型においてしばしば過剰発現しているものとして同定された。この発現レベルは、さらなる14のNSCLC症例のうち11 (7例の腺癌 (ADC) のうち5例、7例の扁平上皮癌 (SCC) のうち6例) で確認された (図1a)。さらに、TTKの上方制御は23の肺癌細胞株全てにおいて観察された (図1b)。さらにまた、肺腫瘍におけるTTK発現は、抗TTK抗体を用いたウエスタンプロット解析で、内因性TTKタンパク質の発現を検討することにより、7つの肺癌細胞株全てにおいて確認された (図1c)。プローブとしてTTK cDNA用いたノーザンプロット法により、検討された24の正常ヒト組織の中で、精巣において特異的に3.0 kbの転写産物が同定された (データ示さず)。NSCLC細胞株、A549およびLCC319におけるTTKの細胞内局在は、抗TTK抗体を用いた免疫細胞化学的およびウエスタンプロット解析によって検討され、細胞質および核に主に局在することが判明した (図1eおよび1f)。

【0225】

10

20

30

40

50

## 実施例3：予後不良とTTK過剰発現の関連

TTKの生物学的および臨床病理学的な重要性を確認するために、TTKタンパク質発現が、12人の患者由来のSCLC組織、ならびに、366人の患者由来のNSCLC組織を含む組織マイクロアレイによって、臨床NSCLCで検討された。TTK陽性染色は、外科的に切除されたNSCLCの68.6%(251/366)およびSCLCの66.7%(8/12)で観察され、その一方で正常肺組織のいずれにおいても染色は観察されなかった(図2a)。次に、さまざまな臨床病理学的パラメータとの陽性染色との相関が、366人のNSCLC患者で検討された。組織アレイ上のTTK発現レベルは陰性(スコア0)から弱い/強い陽性(スコア1+～2+)の範囲で分類された(図2a;実施例1参照)。検討された366のNSCLC症例のうち、TTKは135例で強く染色され(36.9%;スコア2+)、116例で弱く染色され(31.7%;スコア1+)、115症例では染色されなかった(31.4%;スコア0)。性別(男性で高い;  $P = 0.0006$  フィッシャーの直接確率検定)、組織学的分類(SCCで高い;  $P = 0.0206$  カイ二乗検定)、pTステージ(T2,T3,T4で高い;  $P < 0.0001$  カイ二乗検定)、およびpNステージ(N1,N2で高い;  $P = 0.0006$  カイ二乗検定)は強いTTK陽性(スコア2+)と有意に関連していた(表1a)。Kaplan-Meier法はNSCLCにおけるTTKの強い陽性染色と腫瘍特異的生存との間の有意な関係を示した( $P < 0.0001$  ログランク検定)(図2b)。単変量解析によって、年齢(≥65 対 <65)、性別(男性対女性)、組織学的分類(非ADC対ADC)、pTステージ(T2,T3,T4対T1)、pNステージ(N1,N2対N0)、および強いTTK陽性(スコア2+対1+,0)は全てNSCLC患者で腫瘍特異的生存不良に有意に関連していた(表1b、上)。予後因子の多変量解析において、年齢、pTステージ、pNステージおよび強いTTK陽性は、独立予後因子であることが示された(表1b、下)。

## 【0226】

(表1a) NSCLC組織におけるTTK陽性と患者の特徴との関係(n=366)

10

20

性別	TTK		TTK		P値 強/弱 対 陰性	10
	全体	強	弱	陰性		
	陽性	陽性	陽性	陰性		
	n = 366	n = 135	n = 116	n = 115		
性別						
男性	253	108	79	66	0.0006*	10
女性	113	27	37	49		
年齢 (歳)						
<65	180	66	58	56	N.S.	
≥65	186	69	58	59		
組織学的型						20
ADC	234	78	73	83	0.0206*,**	20
SCC	104	49	31	24		
LCC	28	8	12	8		
pT因子						
T1	124	24	37	63	<0.0001*	
T2+T3+T4	242	111	79	52		
pN因子						30
N0	226	68	70	88	0.0006*	30
N1+N2	140	67	46	27		

ADC, 腺癌; SCC, 扁平上皮癌; LCC, 大細胞癌

P &lt; 0.05 (カイ二乗検定)

NS, 有意差なし

SCC 対 他 (ADC + LCC)

【 0 2 2 7 】

(表1b) NSCLC患者における予後因子のコックスの比例ハザードモデル解析

変数	ハザード比	95% CI	不良／良好	P値
<b>单变量解析</b>				
TTK	2.306	1.719- 3.094	強 (+) / 弱 (+) または (-)	<0.0001*
年齢 (歳)	1.448	1.076- 1.947	65≥ / <65	0.0144*
性別	1.664	1.184- 2.338	男性／女性	0.0033*
組織学的型	1.236	0.906- 1.686	SCC 1 / 他	NS
pT因子	2.693	1.861- 3.898	T2+T3+T4 / T1	<0.0001*
pN因子	2.536	1.890- 3.403	N1+N2 / N0	<0.0001*
変数	ハザード比	95% CI	不良／良好	P値
<b>多变量解析</b>				
TTK	1.692	1.247- 2.296	強 (+) / 弱 (+) または (-)	0.0007*
年齢 (歳)	1.606	1.189- 2.169	65≥ / <65	0.0020*
性別	1.322	0.932- 1.875	男性／女性	NS
pT因子	1.956	1.331- 2.873	T2+T3+T4 / T1	0.0006*
pN因子	2.286	1.686- 3.100	N1+N2 / N0	<0.0001*

1SCC, 扁平上皮癌

\* P &lt; 0.05

NS, 有意差なし

【0228】

実施例4: TTKに対するsiRNAによる肺癌細胞の増殖抑制

TTKが肺癌細胞の増殖/生存に重要であるかどうか評価するため、2つの対照プラスミド(ルシフェラーゼ(LUC)、またはScramble(SCR)に対するsiRNA)、ならびに、TTKに対するsiRNA(si-TTK-1 および -2)を発現するプラスミドが構築され、LC319およびA549細胞に各

々トランスフェクションされた (LC319の代表データを図3aに示す)。si-TTK-1をトランスフェクションした2つのNSCLC細胞株におけるTTK転写物の量は、2つの対照siRNAと比較して著しく減少した (図3a、左上パネル)。MTTおよびコロニー形成アッセイで測定された、si-TTK-1をトランスフェクションした細胞の細胞生存度およびコロニー数は、2つの対照siRNAの場合と比較して著しく減少した (図3a、左下および右パネル)。si-TTK-2は弱いTTK発現の減少およびわずかな増殖抑制効果を示した。この結果はNSCLC細胞におけるTTKの増殖促進効果を示唆した。

## 【0229】

## 実施例5：TTKによる増殖促進効果

TTKが細胞増殖で重要な役割をしているかどうか決定するため、TTKを定的に発現するHEK293由来トランスフェクタントが樹立された。外因性TTKを発現しているHEK293細胞の増殖は、モックベクターをトランスフェクションした対照細胞の増殖と比較して、TTKの発現レベルに合致して有意な度合いで促進された (図3bおよび3c)。マウス皮下に移植されたTTK導入HEK293細胞も、対照細胞と比較して高い増殖速度を呈した (図3d)。この結果は、NSCLC細胞におけるTTKの増殖促進効果を示唆した。

10

## 【0230】

## 実施例6：TTKによる細胞内浸潤活性の活性化

組織マイクロアレイにおける免疫組織化学的解析が、TTK強陽性腫瘍を有する肺癌患者がTTK陰性の患者より癌特異的生存期間が短いことを示したことから、本発明者らは、TTKが細胞浸潤能力において役割を果たすかどうか調べるため、マトリゲル浸潤アッセイを行った。マトリゲルを通じた、TTK発現ベクターをトランスフェクションしたNHI-3T3細胞の浸潤は、モックまたはTTK-KDベクターをトランスフェクションした対照細胞と比較して有意に促進され、TTKが肺癌細胞の高度に悪性な表現型にも関与しうることを示唆した (図3e)。

20

## 【0231】

## 実施例7：TTKに対する新規基質タンパク質としてのEGFRの同定

発癌におけるTTKキナーゼの機能を解明するため、本発明者らはTTKによってリン酸化され、細胞増殖シグナルを活性化する基質タンパク質を同定することを試みた。TTKに対するキナーゼ基質のイムノプロットスクリーニングは、TTK発現ベクターをトランスフェクションしたCOS-7細胞の細胞溶解液、および癌細胞シグナルに関連したリン酸化タンパク質に対して特異的な一連の抗体を用いて行われた (実施例1参照)。合計31個のリン酸化タンパク質がスクリーニングされた (表2)。EGFRのTyr-992はTTK発現ベクターをトランスフェクションした細胞において、モックベクターを用いたものと比較して有意にリン酸化されることが判明した (図4a)。このスクリーニングにおいて、EGFRの細胞質ドメイン内の様々なリン酸化Tyr残基 (Tyr-845, Tyr-992, Tyr-1045, Tyr-1068, Tyr-1148, およびTyr-1173) (Amos S, et al., J Biol Chem. 2005 Mar 4;280(9):7729-38. Epub 2004 Dec 23; Biscardi JS, et al., J Biol Chem. 1999 Mar 19;274(12):8335-43; Honegger A, et al., EMBO J. 1988 Oct;7(10):3045-52; Sorkin A, et al., J Biol Chem. 1991 May 5;266(13):8355-62; Wang XQ, et al., J Biol Chem. 2003 Dec 5;278(49):48770-8. Epub 2003 Sep 25.) を認識するもの、ならびに、リン酸化Ser-1046/1047を認識するもの (Countaway JL, et al., J Biol Chem. 1992 Jan 15;267(2):1129-40; Gamou S & Shimizu N. J Cell Physiol. 1994 Jan;158(1):151-9.)、合計7つのリン酸化特異的抗体がEGFRに関して検討され、Tyr-992リン酸化のみが見出された (データ示さず)。TTKキナーゼによるTyr-992の特異的リン酸化を確認するため、触媒的に不活性なTTK-KD発現ベクターをCOS-7細胞にトランスフェクションしたところ、Tyr-992でのEGFRのリン酸化の増強は検出されなかった (図4a)。これらのデータは、TTKキナーゼ活性がEGFRシグナルにおいて非常に選択的にTyr-992リン酸化を制御できることを示唆する。

30

## 【0232】

(表2) TTKキナーゼに対する基質タンパク質のイムノプロットスクリーニングに使用したリン酸化特異的抗体のリスト

40

50

抗体名	供給元	カタログ番号	
1 Phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology, Inc.	9275	
2 Phospho-Akt (Thr309)	Cell Signaling Technology, Inc.	9271	
3 Phospho-ATM (Ser1981)	Cell Signaling Technology, Inc.	4526	
4 p-Bad (Ser136)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-7999	
5 p-Bcl-2 (Ser 87)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-16323	
6 Phospho-cdc25C (Ser216)	Cell Signaling Technology, Inc.	9528	10
7 Phospho-Chk2 (Thr68)	Cell Signaling Technology, Inc.	2661	
8 Phospho-EGF Receptor (Tyr845)	Cell Signaling Technology, Inc.	2231	
9 Phospho-EGF Receptor (Tyr992) Phospho-EGF Receptor	Cell Signaling Technology, Inc.	2235	
10 (Tyr1045) Phospho-EGF Receptor	Cell Signaling Technology, Inc.	2237	
11 (Ser1046/1047) Phospho-EGF Receptor	Cell Signaling Technology, Inc.	2238	20
12 (Tyr1068) Phospho-EGF Receptor	Cell Signaling Technology, Inc.	2234	
13 (Tyr1148)	Cell Signaling Technology, Inc.	4404	
14 phospho-EGFR (Ty1173)	Upstate	05-483	
15 phospho-Histone H2A.X (Ser139)	Upstate	05-636	
16 p-IkappaB-alpha	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-8404	
17 p-IKK alpha/beta (Thr 23)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-21660	30
18 p-NIK (Thr 559)-R	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-12957	
19 Phospho-NPM (Thr199)	Cell Signaling Technology, Inc.	3541	
20 Phospho-p53 (Ser15)	Cell Signaling Technology, Inc.	9284	
21 Phospho-p53 (Ser20)	Cell Signaling Technology, Inc.	9287	
22 Phospho-p53 (Ser46)	Cell Signaling Technology, Inc.	2521	
23 p-Rb (Ser 249/Thr 252)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-16671	
24 p-Rb (Ser 807/811)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-16670-R	
25 p-Rb (Thr 821/826)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-16669	40
26 p-Smad2/3 (Ser 433/435)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-11769	
27 p-Smad1 (Ser 463/Ser 465)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-12353	
28 Phospho-Stat1 (Tyr701)	Cell Signaling Technology, Inc.	9171	
29 Phospho-Stat3 (Tyr705)	Cell Signaling Technology, Inc.	9131	
30 Phospho-Stat3 (Ser727)	Cell Signaling Technology, Inc.	9134	
31 Phospho-Stat5 (Tyr694)	Cell Signaling Technology, Inc.	9351	

肺癌細胞におけるTTKとEGFRとの間の内因性の結合はまた、A549細胞からの抽出物を用いた免疫沈降実験により検討され、これら2つのタンパク質間の相互作用はEGF刺激に関係なく検出された（図4b）。EGFR情報伝達に対するTTKの関連をさらに検討するため、A549細胞においてTTKまたはEGFR機能を抑制し、細胞形態を顕微鏡的に観察した。RNAi-TTK（oligo）またはRNAi-EGFR（oligo）のトランスフェクション後の細胞と同様に、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤、AG1478（トリリフォスチン4-(3-クロロアニリノ)-6,7-ジメトキシキナゾリン）で処理したA549細胞は、多核を伴い非常に大型化した（図4c）。これらの結果は、TTKがEGF非依存的な細胞内EGFR活性化シグナルに関連していることを支持する。

#### 【0234】

TTKによるEGFR Tyr-992の特異的リン酸化をさらに確認するため、インビトロキナーゼアッセイが、COS-7細胞から調製された全細胞抽出物と精製されたHisタグ付加TTKとをインキュベートすることで行われた。個々のリン酸化部位を調べるために、EGFRの細胞質ドメイン内の様々なリン酸化Tyr残基に対応する、EGFRに対するリン酸化特異的抗体（Tyr-845, Tyr-992, Tyr-1045, Tyr-1068, Tyr-1148, and Tyr-1173）が適用された。ウエスタンプロット解析は、用量依存的な組換え型TTKによるEGFR Tyr-992のリン酸化を示し、一方でEGFRにおける他のTyr残基のリン酸化は検出されなかった（図4d、左パネル）。他方、これら全てのTyr残基は、COS-7細胞におけるリガンドEGFを用いたEGFRの刺激によりリン酸化され、各リン酸化EGFR特異的抗体が各リン酸化部位を正確に認識できることを示唆した（図4d、右パネル）。COS-7細胞におけるEGF刺激が6つのTyr残基全てのリン酸化を誘導するという証拠は、EGFRのTyr-992に対するTTKの特異的キナーゼ活性をさらに支持する。

10

20

30

#### 【0235】

EGFRチロシンリン酸化部位は、基質としてEGFRの様々な細胞質領域を含むGSTタグ付加タンパク質を用いたTTKによってさらに評価された（EGFR-DEL1, -DEL2, および -DEL3；図4e）。GSTタグ付加EGFRタンパク質は大腸菌内で産生され、精製した組換え型TTKを用いたインビトロキナーゼアッセイに供され、その後、抗リン酸化Tyr992 EGFR抗体でウエスタンプロット解析された。GSTタグ付加EGFR-DEL2タンパク質（アミノ酸889-1045）におけるEGFR Tyr-992のリン酸化はTTK用量依存的に促進され、一方GSTタグ付加EGFR-DEL1（アミノ酸692-891）、EGFR-DEL2およびEGFR-DEL3（アミノ酸1046-1186）タンパク質における他のチロシン残基は全くリン酸化されなかった（図4f）。基質として触媒的に活性のある組換え型GSTタグ付加ヒトEGFR（active-rhEGFR；Upstate）を用いたインビトロキナーゼアッセイ、および、続く抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタンプロット解析により、ATP存在下でactive-rhEGFRがチロシン上の自己リン酸化を受けることが示された（図4g、レーン2）。このリン酸化は、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤、AG1478（トリリフォスチン4-(3-クロロアニリノ)-6,7-ジメトキシキナゾリン）によって用量依存的に阻害された（データ示さず）。しかし、図4g、レーン4に示すように、TTKによるactive-rhEGFRのリン酸化はAG1478によって阻害されなかった。この結果は、TTKによるEGFRの直接的なリン酸化をさらに確認した。

30

40

#### 【0236】

免疫組織化学的解析がさらに、336例のNSCLCおよび12例のSCLC組織から成る組織マイクロアレイを用いて抗リン酸化EGFR（Tyr-992）抗体により行われた。366のNSCLC症例のうち、123症例（33.6%）は強いリン酸化EGFR（Tyr-992）染色（スコア2+）を示し、121症例（33.1%）は染色が弱く（スコア1+）、122症例（33.3%）では染色が観察されず（スコア0）、一方リン酸化EGFR（Tyr-992）の染色は検討された正常肺組織のいずれにおいても観察されなかった（図4h）。12例のSCLCのうち3例（25%）はリン酸化EGFR（Tyr-992）に陽性であった。336例のうち203例はTTKおよびリン酸化EGFR（Tyr-992）両方の腫瘍に陽性（1+～2+としてスコアした）であり、74例は両タンパク質とも陰性であった。366症例のうち48例はTTKのみ陽性であり、41例はリン酸化EGFR（Tyr-992）のみ陽性であった。リン酸化EGFR（Tyr-992）陽性のパターンがこれらの腫瘍におけるTTK陽性と有意に一致した（ $\div 2 = 72.585$ ； $P < 0.0001$ ）という事実は、インビトロアッセイによって得られた結果を独立に確認した。NSCLCにおけるリン酸化EGFR（Tyr-992）の強発現（スコア2+）が、性別（男性で高い； $P$

50

= 0.0086 フィッシャーの正確確率検定)、組織学的分類 (SCCで高い;  $P = 0.0483$  カイニ乗検定)、pTステージ (T2、T3、T4で高い;  $P = 0.0006$  カイニ乗検定)、pNステージ (N1、N2で高い;  $P < 0.0001$  カイニ乗検定)、および腫瘍特異的生存率 ( $P < 0.0001$  ログランク検定)と有意に関連することが判明した (表3a; 図4i)。予後因子の単変量および続く多変量解析において、年齢、pTステージ、pNステージ、および強いリン酸化EGFR (Tyr-992)陽性は、独立予後因子であることが示された (表3b、上および下)。腫瘍がTTKもリン酸化EGFR (Tyr-992)も発現していないNSCLC患者は、最も延命効果を受け、一方両マーカーが強い陽性値の患者は最も短い腫瘍特異的生存率であった ( $P < 0.0001$ 、ログランク検定; 図4j)。

【0237】

10

(表3a) NSCLC組織におけるリン酸化EGFR陽性と患者の特徴との関連 (n=366)

性別	リン酸化EGFR		リン酸化EGFR		P値
	全体	強陽性	弱陽性	無発現	
		n = 366	n = 123	n = 121	
男性	253	96	76	81	0.0086*
女性	113	27	45	41	
年齢 (歳)					20
<65	180	67	60	53	NS
≥65	186	56	61	69	
組織学的型					30
ADC	234	69	88	77	0.0483*
SCC	104	43	29	32	
LCC	28	11	4	13	
pT因子					40
T1	124	27	44	53	0.0006*
T2+T3+T4	242	96	77	69	
pN因子					
N0	226	55	86	85	<0.0001*
N1+N2	140	68	35	37	

ADC, 腺癌; SCC, 扁平上皮癌; LCC, 大細胞癌

\*  $P < 0.05$  (カイニ乗検定)

NS, 有意差なし

【0238】

(表3b) NSCLC患者における予後因子のCoxの比例ハザードモデル解析

変数	ハザード比	95% CI	不良／良好	P 値
単変量解析				
リン酸化 EGFR (Tyr-992)	2.058	1.530-2.767	強(+) / 弱(+) または(-)	<0.0001 *
年齢 (歳)	1.448	1.076-1.947	65≥ / <65	0.0144 *
性別	1.664	1.184-2.338	男性／女性	0.0033 *
組織学的型	1.446	1.076-1.943	SCC 1/ 他	NS
pT 因子	2.693	1.861-3.898	T2+T3+T4 / T1	<0.0001 *
pN 因子	2.536	1.890-3.403	N1+N2 / N0	<0.0001 *

変数	ハザード比	95% CI	不良／良好	P 値
多変量解析				
リン酸化 EGFR (Tyr-992)	1.538	1.124-2.267	強(+) / 弱(+) または(-)	0.0071 *
年齢 (歳)	1.677	1.241-2.267	65≥ / <65	0.0008 *
性別	1.382	0.977-1.956	男性／女性	NS
pT 因子	2.028	1.383-2.973	T2+T3+T4 / T1	0.0003 *
pN 因子	2.218	1.625-3.027	N1+N2 / N0	<0.0001 *

1 SCC, 扁平上皮癌

\* P &lt; 0.05

NS, 有意差なし

## 【0239】

次に、TTKによるEGFRのリン酸化に対するEGFの必要性が検討された。TTKは血清を欠乏させたCOS-7細胞で外因的に過剰発現させ、リン酸化EGFR(Tyr-992)が、TTKのみを発現する細胞において核周辺に小さい点として検出されることが顕微鏡的に観察された（図4kおよび4l）。内因性リン酸化EGFR(Tyr-992)は、内因的にTTKを過剰発現している、血清を欠乏させたA549細胞の核に局在していたが（図4m、左パネル）、RNAi-TTK (oligo)によるTTKタンパク質の減少は、有意にリン酸化EGFR (Tyr-992)を減少させた（図4m、右パネル）。このデータは、EGF刺激と独立して生じる、EGFRのTyr-992でのTTK誘導性のリン酸化、およびその内部移行を示唆した。

## 【0240】

実施例8：TTK依存的腫瘍形成経路における、リン酸化EGFR(Tyr-992)によるMAPKシグナルの活性化

次に、EGFR Tyr-992のリン酸化レベルがA549細胞の分裂期において検討され、このときTTK発現レベルは著しく上昇していた（図5a）。Tyr-992におけるEGFRのリン酸化レベルはリン酸化TTKの発現レベルと一致していた。TTKの大量発現が癌細胞におけるEGFR Tyr-992に必須であるか評価するため、TTK mRNAの発現をTTKに対するsiRNA(RNAi-TTK (oligo))を用いてA549細胞において選択的にノックダウンした。RNAi-TTK (oligo)によるTTKタンパク質の減少はEGFR Tyr-992のリン酸化を減少させ（図5b）、肺癌細胞における内因性TTKがEGFRのリン酸化を誘導することを示した。

10

20

30

40

50

## 【0241】

EGFRのTyr-992は2つのアダプタータンパク質、ホスホリパーゼC (PLC) およびShcの結合部位であることが公知であり、そのリン酸化はこれらアダプタータンパク質15-17の活性化（リン酸化）に必要とされる。そのため、本発明者らはRNAi-TTK(oligo)によるTTK発現の下方制御後、これらのアダプタータンパク質のリン酸化レベルを検討した。RNAi-TTK(oligo)によるリン酸化EGFR Tyr-992の減少に従って、リン酸化PLC およびp44/42 MAPKのリン酸化の減少が観察された一方で、このRNAiはPLC またはp44/42 MAPKタンパク質の量には影響を与えたなかった（図5b）。免疫細胞化学的解析により、TTK発現ベクターを用いてトランスフェクションしたCOS-7細胞の核において、リン酸化p44/42 MAPKが蓄積されていることが検出された（図5c）。さらに、PLC とEGFRとの間の相互作用が、TTK発現ベクターをトランスフェクションしたCOS-7細胞由来の抽出物を使用した免疫沈降実験により確認され、その一方で、それらの結合はTTK-KDまたはモックベクターをトランスフェクションした細胞ではほとんど観察されなかった（図5d）。

10

## 【0242】

## 実施例9：EGFRにおけるTTKによる新規リン酸化部位（Ser-967）の同定

TTKによってリン酸化されたGSTタグ付加EGFR-DEL2タンパク質は二重バンドとして検出された（図4f、右パネル）。EGFR Tyr-992がEGFR上の唯一のリン酸化部位であるかどうかを確認するため、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATPインビトロキナーゼアッセイを、Tyr-992がアラニンに置換された、GSTタグ付加EGFR-DEL2(Y992A)タンパク質を用いて行った。この変異は下部バンドの強度を顕著に減少したが、上部バンドの強度は減少させなかった（図6a）。その事実は本発明者らに、EGFR上の他のTTK依存的リン酸化部位のスクリーニングを促した。MALDIタンデム質量分光分析が、TTKによってインビトロリン酸化されたGSTタグ付加EGFR-DEL2タンパク質を用いて行われ、EGFR Ser-967のリン酸化が検出された（データ示さず）。次に、Ser-967リン酸化合成功能ペプチドを用いて抗リン酸化EGFR (Ser-967)抗体が免疫化のために産生され、肺癌細胞におけるTTKの発現パターン、リン酸化EGFR (Ser-967)および全EGFRがウエスタンプロットティングにより検討された。興味深いことに、NSCLC細胞におけるEGFR Ser-967のリン酸化レベルはTTKのタンパク質発現レベルと有意に相関し（図6b）、EGFR Ser-967がTTKによってリン酸化されたことを示した。次にTTKをCOS-7細胞において過剰発現させ、リン酸化EGFR (Ser-967)がTTK発現細胞の核で増加することを顕微鏡的に観察した（図6c）。免疫細胞化学的解析により、内因性リン酸化EGFR (Ser-967)が内因性TTKを過剰発現させたA549細胞の核に局在することが証明されたが（図6d、左パネル）、RNAi-TTK (oligo)によるTTKタンパク質発現の抑制はリン酸化EGFR Ser-967のレベルを有意に減少させた（図6d、右パネル）。これらの結果は、EGF刺激と独立に生じる、EGFRのSer-967におけるTTK誘導性リン酸化、およびその核移行を示唆する。

20

## 【0243】

免疫組織化学的解析はまた、374例のNSCLCから成る組織マイクロアレイを用いた抗リン酸化EGFR (Ser-967)抗体について行われ、リン酸化EGFR (Ser-967)陽性のパターンが、これら腫瘍におけるTTK陽性と有意に一致することが見出され（ $P < 0.0001$ ）、インビトロアッセイによって得られた結果を独立に確認した。NSCLCにおけるリン酸化EGFR (Ser-967)の強い発現は腫瘍特異的生存度と有意に相関していた（ログランク検定により $P < 0.0001$ ）（図6eおよび6f；詳細は表4aおよび4bに示す）。これらの証拠はまた、TTKによるEGFRのSer-967でのリン酸化が、肺癌細胞の増殖および悪性の性質に有意に影響を与えることを示している。

30

## 【0244】

（表4a）NSCLC組織における核EGFR陽性と患者の特徴の相関（n=351）

40

	全体	EGFR 967 N 強陽性	EGFR 967 N 弱陽性	EGFR 967 N 陰性	P 値 強 対 弱/陰性
	n = 351	n = 164	n = 158	n = 29	
性別					
男性	246	121	90	35	0.0465*
女性	105	39	48	18	
年齢（歳）					10
<65	173	75	79	19	
≥65	178	89	79	10	NS
組織学的型					
ADC	225	95	108	22	
SCC	88	49	38	1	0.0261*
他	38	20	12	6	
pT 因子					
T1	116	40	59	17	
T2-T4	235	124	99	12	0.0014*
pN 因子					20
N0	216	99	96	21	
N1+N2	135	65	62	8	NS
喫煙歴					
非喫煙者	106	41	51	14	
喫煙者	245	123	107	15	0.0487*

ADC, 腺癌; SCC, 扁平上皮癌

他, 大細胞癌および腺扁平上皮癌

\*ADC 対 他の組織学的診断

†P &lt; 0.05 (Fisherの直接確率検定)

NS, 有意差なし

【0 2 4 5】

(表4b) NSCL患者における予後因子のCoxの比例ハザードモデル解析

変数	ハザード比	95% CI	不良／良好	P 値
<b>单变量解析</b>				
核 EGFR 967	2.012	1.486-2.724	強(+) / 弱(+) または (-)	<0.0001*
年齢(歳)	1.427	1.056-1.929	65≥ / <65	0.0206
性別	1.619	1.115-2.271	男性／女性	0.0052 *
組織学的型	1.386	1.026-1.874	他 / ADC <sup>1</sup>	0.0337*
pT 因子	2.656	1.817-3.883	T2-4 / T1	<0.0001 *
pN 因子	2.530	1.876-3.413	N1+N2 / N0	<0.0001 *
<b>多变量解析</b>				
核 EGFR 967	1.750	1.281-2.391	強(+) / 弱(+) または (-)	0.0004*
年齢(歳)	1.611	1.185-2.190	65≥ / <65	0.0023*
性別	1.361	0.928-1.995	男性／女性	0.1145
組織学的型	0.972	0.694-1.360	他 / ADC <sup>1</sup>	0.8675
pT 因子	2.042	1.383-3.016	T2-4 / T1	0.0003*
pN 因子	2.446	1.798-3.326	N1+N2 / N0	0.0004*

10

20

30

40

<sup>1</sup> ADC, 腺癌

\* P &lt; 0.05

## 【0246】

## 実施例10：TTK-EGFR経路を標的とすることによる細胞増殖/浸潤の阻害

TTKにより誘導される細胞の増殖/浸潤におけるEGFRの関与をさらに調べるため、本発明者らは次に、TTKを定常的に発現するHEK293由来トランスフェクタントにRNAi-EGFR(oligo)を導入した。HEK293細胞の増殖はRNAi-EGFR(oligo)によってほとんど減少しなかったが(P=0.2439) ( モックベクターを導入した対照細胞 )、TTK誘導性細胞増殖はRNAi-EGFRによって有意に減少した(P = 0.0032) ( 図7a )。マトリゲルを通じたTTK導入HEK293細胞における浸潤は、対照細胞と比較して有意に促進され(P < 0.0001)、およびTTK誘導性細胞浸潤はRNAi-EGFRによってベースレベル近くまで減少した(P < 0.0001)。対照細胞の浸潤はRNAi-EGFR (oligo)によってわずかに減少した(P < 0.0001) (P < 0.0161) ( 図7b )。

## 【0247】

次に、TTKとEGFRタンパク質との結合の生物学的重要性、および肺癌の治療的な標的としてのその可能性が検討された。図3cに示されるように、GSTタグ付加EGFR-DEL2タンパク質(アミノ酸889-1045)におけるEGFR Tyr-992のリン酸化はTTK用量依存的に促進され、一方、EGFR-DEL4(アミノ酸977-1045)タンパク質と称されるEGFR-DEL2のN末端切断型はTyr-992でリン酸化されなかった(データ示さず)。これらの実験は、EGFRにおける88アミノ酸ポリペプチド(アミノ酸889-976)がTTKとの相互作用のために重要な役割を果たすことを示唆した。肺癌細胞の増殖または生存のためのTTKとEGFRとの相互作用の機能的意義を調べるため、本発明者らはこれら2つのタンパク質の結合を阻害すると予測される生物活性細胞透過性ペプチドを開発した。EGFRのコドン889-1001が含まれる19または30アミノ酸配列の、7つの異なるペプチドが合成された(実施例1参照)。これらのペプチドは、膜伝達性11アルギニン残基(11R)にNH2末端で共有結合させた。増殖に対する効果は、A549細胞の培地に7つの11R-EGFRペプチドを添加することにより評価し、11R-EGFR899-917 (SEQ ID NO:44)、11R-EGFR918-936 (SEQ ID NO:45)あるいは11R-EGFR937-955 (SEQ ID NO: 46)ペプチドによる処理は、MTTアッセイによって測定される細胞生存度を有意に減少させた(図7c)。

## 【0248】

## 実施例11：肺癌におけるTTKの活性化型変異

50

キナーゼドメインにおける体細胞変異による発癌プロテインキナーゼ活性化は、腫瘍形成の一般的機序の一つである(Herbst, R.S., et al., *Nat Rev Cancer.* 4, 956-965. (2004); Pal, S.K. and Pogram, M., *Anticancer Drugs.* 16, 483-494. (2005))。TTKの変異活性化の存在を検討するため、TTKキナーゼドメインが36例の肺癌細胞株および60例の臨床肺癌組織試料から調製したmRNAを用いて直接的に配列決定された（30例の原発性NSCLCおよび30例の原発性NSCLC由来の転移性脳腫瘍）。ミスセンス変異がRERF-LC-A1細胞株のコドン574 (Y574C) で見出され、それはSNPデータベースで報告されていなかった(JSNP: [http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index\\_ja.html](http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html); DBSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) (図8a、左パネル)。さらに、2つのミスセンス変異が原発性肺腺癌由来の2つの転移性脳腫瘍の臨床検体で同定された。前記変異はアミノ酸置換を生じた；コドン610でのバリンからフェニルアラニン (V610F) (症例2;図8a、中パネル) およびコドン753でのグルタミンからヒスチジン (Q753H) (症例8;図8a、右パネル)。これら2人の患者由来の対応正常脳組織は野生型DNA配列のみを示し、これら2つの変異は腫瘍形成または進行の間に体細胞的に生じたことを示している。

10

## 【0249】

変異解析によって同定された変異TTKの機能的特性を評価するため、2つの変異TTKタンパク質 (Y574CまたはQ753H) を培養哺乳動物細胞において発現させた。自己リン酸化TTK (phospho-TTK) レベルは、野生型TTK (wt-TTK) 発現ベクターをトランスフェクションした細胞よりも、変異TTKを発現するNIH-3T3細胞において有意に高く、これらの変異がTTKタンパク質のキナーゼ活性を促進し得ることを示した（図8b）。NIH-3T3細胞の浸潤能力はwt-TTK一過性発現により促進されたため（図3e）、次に、マトリゲル浸潤アッセイをTTK-Y574C構築物をトランスフェクションしたNIH-3T3細胞を用いて行った。NIH-3T3細胞への変異TTK (Y574CまたはQ753H) のトランスフェクションは、wt-TTKのトランスフェクションと比較して、浸潤細胞数の有意な増加をもたらした（図8cおよび8d）。これらの結果は、キナーゼドメインにおけるTTK変異は、肺癌進行に寄与し得る機能亢進型変異のカテゴリに属すると考えられることを示す。

20

## 【0250】

## 考察

Mps1 (TTKはそのヒトホモログである)は中心体複製において必要とされる因子として出芽酵母で最初に発見され(Winey M, et al., *J Cell Biol.* 1991 Aug;114(4):745-54.)、その後紡錘体チェックポイントにおける重要な機能を有することが示された (Weiss E & Winey M. *J Cell Biol.* 1996 Jan;132(1-2):111-23.)。ヒトにおいて、TTKの過剰発現はいくつかの癌において発見されているが、しかし発癌におけるその機能的意義はいまだ不明確なままである(Stucke VM, et al., *EMBO J.* 2002 Apr 2;21(7):1723-32.)。

30

## 【0251】

TTKに対する特異的なsiRNAを用いたNSCLC細胞の処理は、その発現を減少させ、増殖抑制を生じることが本明細書において示されている。哺乳動物細胞におけるTTKの導入による増殖促進効果はまた、その発癌機能をサポートする。インビトロおよびインビボアッセイによって得られた結果は、ヒト癌におけるTTKの重要な役割、ならびにTTK経路を標的とした分子のスクリーニングが肺癌治療のための有望な治療的アプローチを提供することを示唆する。その経路が様々な組織の発癌に関連しているEGFRは、本明細書においてTTKキナーゼの新規な細胞内標的分子として明らかにされている。また、TTKおよびリン酸化EGFR (Tyr-992またはSer-967) の高いレベルを示すNSCLC患者が、より短い腫瘍特異的生存期間を示すという、組織マイクロアレイ解析による発見が、本明細書中に示されている。EGFR自己リン酸化はEGF刺激の後のMAPKカスケードの活性化において重要な役割を果たすことが示されている。EGFRのリン酸化部位のうち、Tyr-992はPLC $\gamma$ に対する高い結合親和性部位であることが証明されており、EGF刺激によるPLC $\gamma$ 活性化に必要とされる(Rotin D, et al., *EMBO J.* 1992 Feb;11(2):559-67.)。PLC $\gamma$ は、イノシトール1,4,5-三リン酸産生および細胞質Ca<sup>2+</sup>における周期的変動によってRas/MAPKカスケードを活性化する(Schmidt-Ullrich RK, *Oncogene.* 2003 Sep 1;22(37):5855-65.)。MAPキナーゼ経路の活性化は細

40

50

胞分裂と関連しており、その異常な活性は腫瘍において発生する制御できない細胞増殖に関連すると推測される(Pal SK & Pogram M. Anticancer Drugs. 2005 Jun;16(5):483-94.)。興味深いことに、本明細書におけるデータは、TTKによるTyr-992およびSer-967でのEGFRのリン酸化がEGF刺激とは独立していることを示している。EGFR Ser-967のリン酸化は、恒常的なリン酸化であることが報告されているが(Elisabetta et al., 2005)、しかし、その機能のどの役割にも関連していなかった。Ser-967でのEGFRのリン酸化は主に核EGFRにおいて検出された。核EGFRは近年、転写因子または転写コアクチベーターとして報告された(Lin et al., Nat Cell Biol. 3:802-8 (2001))。本発明者らのデータはSer-967でのEGFRのリン酸化は肺癌形成の間、EGFRの核移行に重要であるかもしれないことを示した。

10

#### 【0252】

36例の肺癌細胞株ならびに60例の原発性および転移性NSCLCにおけるTTKキナーゼドメインのDNA配列もまた検討され、そこから細胞浸潤活性を促進する活性化変異を有する1つの肺扁平上皮癌細胞株が同定された。点変異はまた、腺癌の脳転移性病変の2例においても発見された。興味深いことに、TTKプロテインキナーゼの大量発現は様々な組織学的型の肺癌試料の大多数において観察され、進行期腫瘍でより高い発現が、特に脳転移において観察された(図9)。以前の報告はまた、EGFR-PLCシグナル経路が、前立腺癌、乳癌ならびに頭頸部扁平上皮癌の浸潤性および転移性部位において特に重要な役割を果たすことを示している(Chen P, et al., J Cell Biol. 1994 Feb;124(4):547-55.; Chen P, et al., J Cell Biol. 1994 Nov;127(3):847-57.; Thomas SM, et al., Cancer Res. 2003 Sep 1;63(17):5629-35.)。これらのインビトロおよびインビボのデータは、EGFR-PLC情報伝達経路の活性化を介したTTKが、脳転移と関連する鍵分子として重要な役割を果たすこと、およびTTK変異を保有する肺癌患者の特異的集団は、より脳転移性疾患になる可能性があることを示した。

20

#### 【0253】

要約すると、本発明はEGFR情報伝達が活性化TTKキナーゼによって細胞内で制御されること、TTK酵素活性を標的にすることにより、肺癌患者の治療のための新しい戦略が開発されるものと期待されることを、初めて強く示している。

30

#### 【0254】

##### 産業上の利用可能性

本明細書において示されたように、TTKはEGFRに対するキナーゼ活性を有しており、およびこの活性の抑制は肺癌細胞の細胞増殖の抑制につながる。したがって、EGFRに対するTTKのキナーゼ活性を阻害する薬剤は、肺癌の治療のための抗癌剤としての、治療上の有用性を有する。例えば、TTKによるEGFRのリン酸化部位は、EGFから独立したリン酸化である、Tyr922またはSer967である。

40

#### 【0255】

また、本発明はEGFRに対するTTKキナーゼ活性を阻害する抗癌剤のスクリーニング方法を提供する。EGFRは成長シグナル伝達経路の重要な仲介物質として認識されている。したがって、細胞増殖のための重要な工程を阻害する候補化合物が本発明により同定され得ると予測される。

#### 【0256】

さらに、本発明はTTKに対するsiRNAを用いた肺癌細胞の治療が、その発現を抑制とともに、Tyr-992またはSer-967でのEGFRに対するTTKのキナーゼ活性を抑制し、したがって、癌細胞の増殖を抑制することを示している。このデータは、TTK機能の上方制御およびEGFRに対するTTKのキナーゼ活性が肺癌形成の一般的特徴であることを意味する。したがって、TTKキナーゼ活性の選択的な抑制は、肺癌患者の治療のための有望な治療的戦略となりうる。

#### 【0257】

あるいは、肺癌は、診断マーカーとしてEGFRに対するTTKキナーゼ活性を用いて検出することができる。

50

## 【0258】

さらに、TTK発現および/またはリン酸化EGFRの高いレベルは、肺癌を有する患者の予後不良と有意に関連していることが本明細書において示された。従って、肺癌の予後は、TTK発現レベルおよび/またはリン酸化EGFR (Tyr992またはSer967) を測定することで評価または判定することができる。

## 【0259】

また、本発明において、TTK変異が肺癌転移の高いリスクと関連していることが示されている。従って、肺癌転移のリスク評価は上記変異を検出することによって達成することができる。さらに、TTK変異の検出方法も本発明によって提供される。

## 【0260】

本明細書で引用された全ての特許、特許出願及び刊行物は、それらの全体において、引用により組み込まれる。しかしながら、本明細書において、本発明は先願発明による開示が先行するために権利を与えられないと自認しているものと解釈されるべきではない。

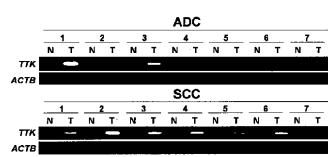
## 【0261】

本発明は詳細に、およびその特定の実施態様に関して記載されているが、前述の記載は、事実上例示的および説明的なものであって、本発明およびその好ましい態様を例示することを意図するものと理解されるべきである。当業者は、日常的な実験を通して、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更および修正がなされ得ることを容易に理解すると考えられる。当業者により理解されるように、さらなる利点および特徴が、合理的な等価物により決定されるべき特許請求の範囲とともに、添付の特許請求の範囲から明白となるであろう。それゆえ、本発明は上記の記載によって規定されるのではなく、添付の特許請求の範囲およびそれらの等価物によって規定されることが意図される。

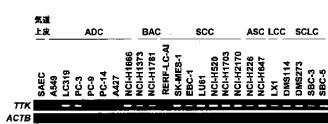
10

20

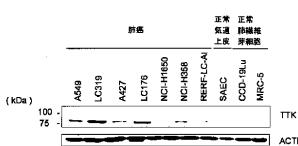
## 【図1a】



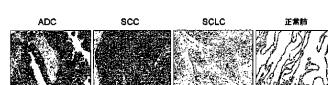
## 【図1b】



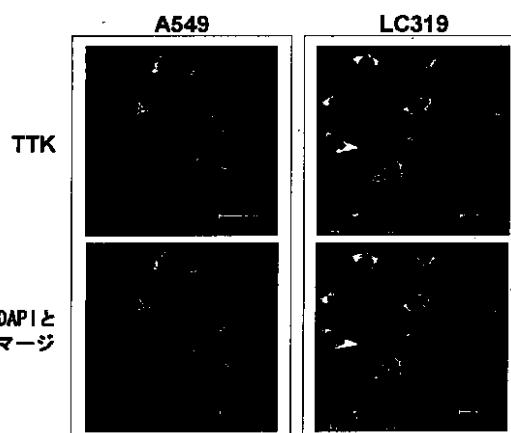
## 【図1c】



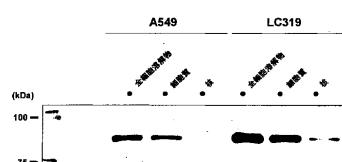
## 【図1d】



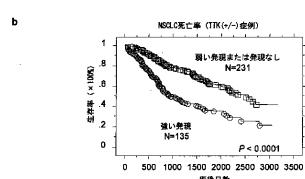
## 【図1e】



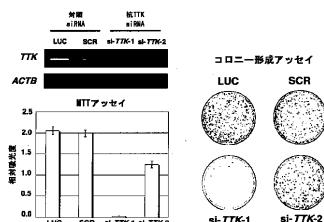
## 【図1f】



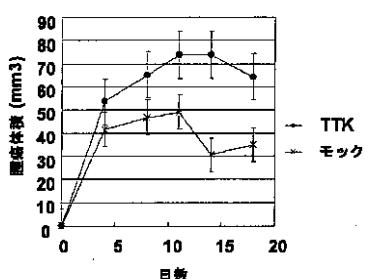
【図2】



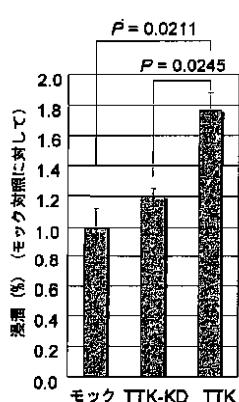
【図3 a】



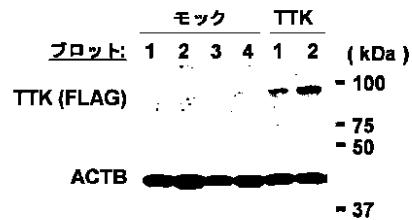
【図3 d】



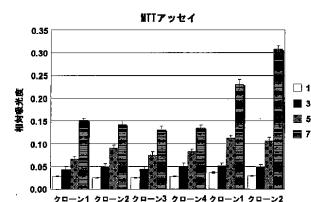
【図3 e】



【図3 b】



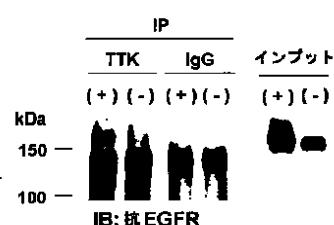
【図3 c】



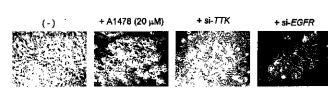
【図4 a】



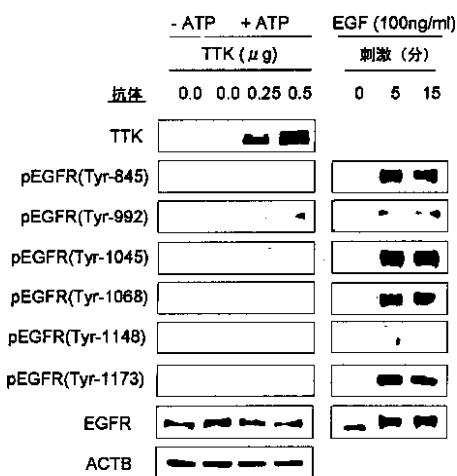
【図4 b】



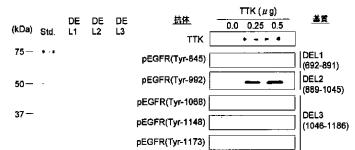
【図4 c】



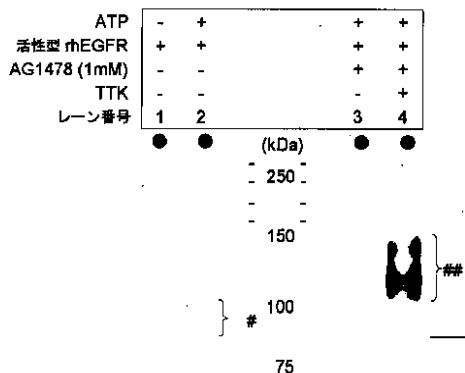
【図4d】



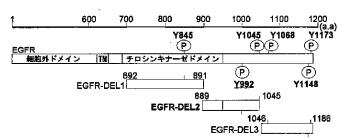
【図4f】



【図4g】



【図4e】



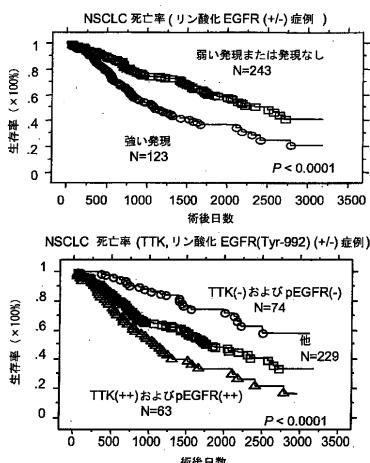
【図4h】



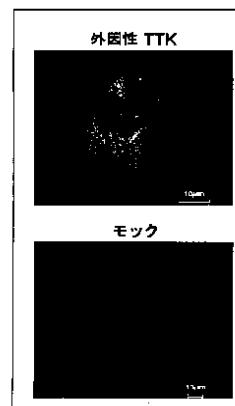
【図4i】



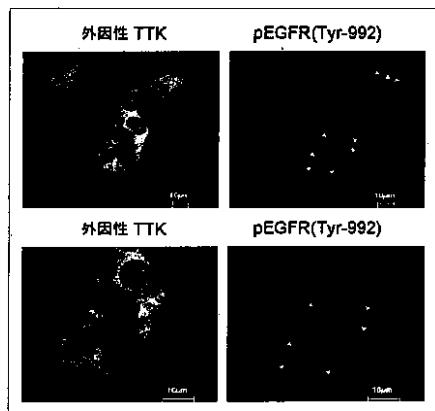
【図4j】



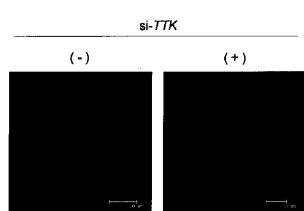
【図4k】



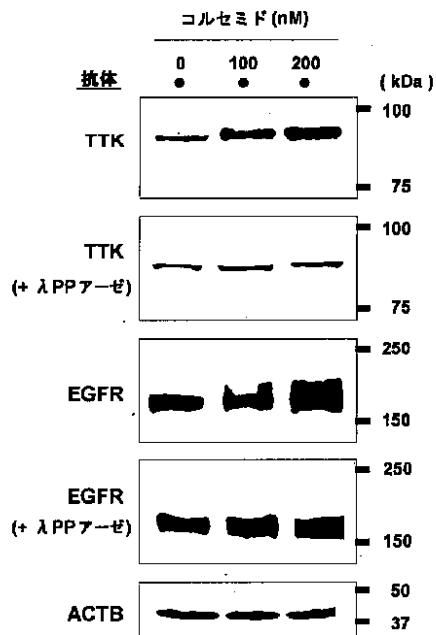
【図4 l】



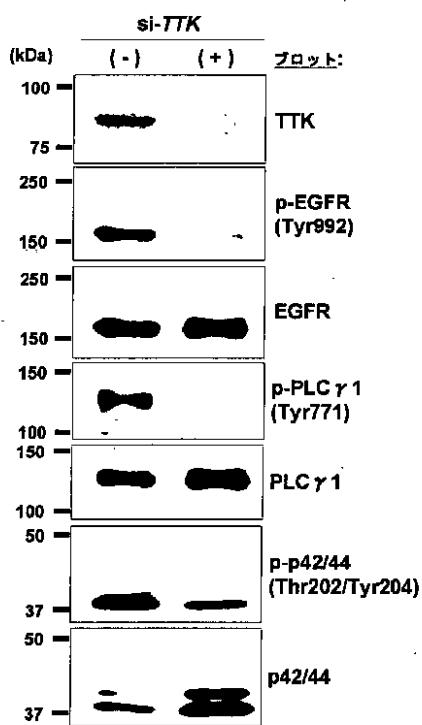
【図4 m】



【図5 a】



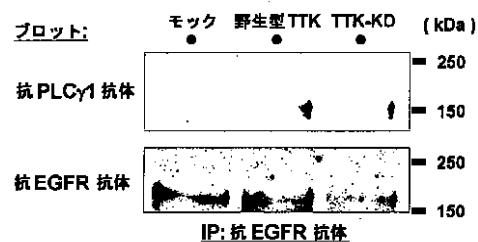
【図5 b】



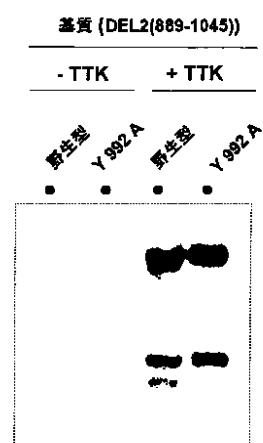
【図5 c】



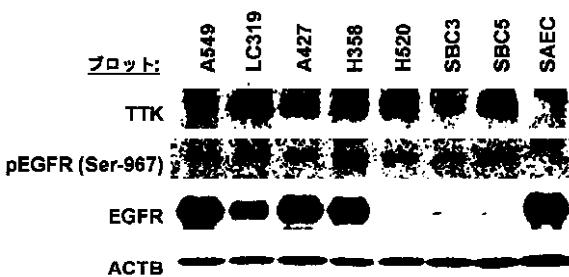
【図 5 d】



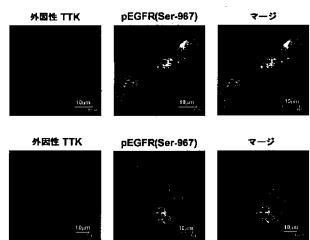
【図 6 a】



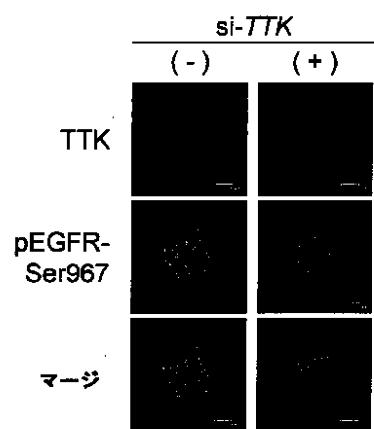
【図 6 b】



【図 6 c】



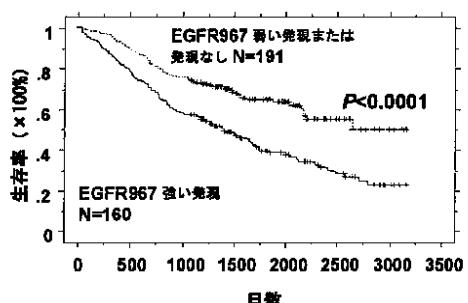
【図 6 d】



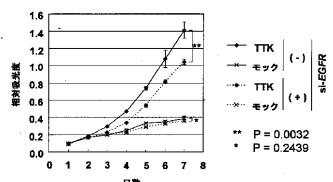
【図 6 e】



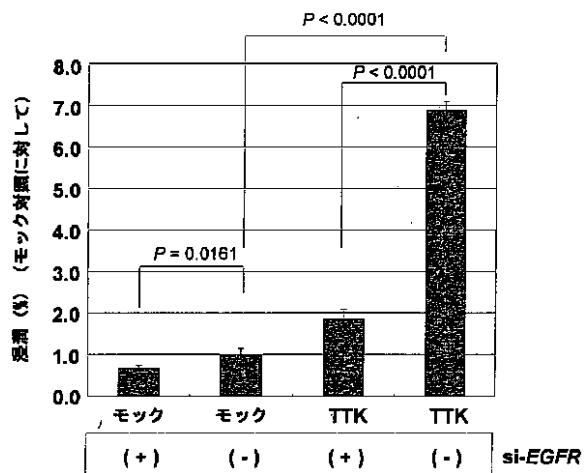
【図 6 f】



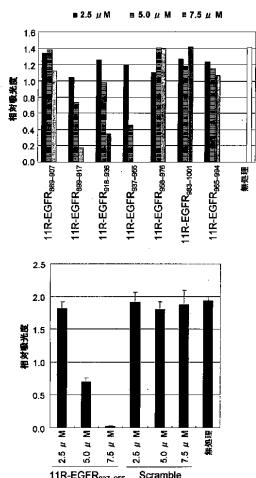
【図 7 a】



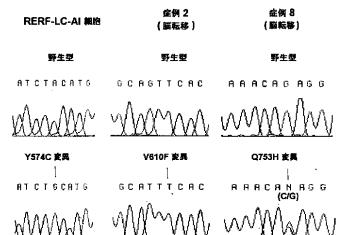
【図 7 b】



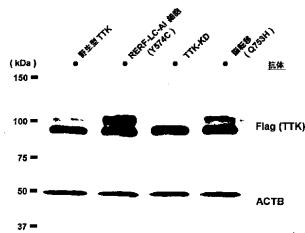
【図 7 c】



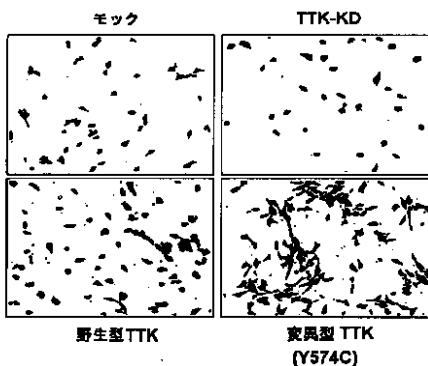
【図 8 a】



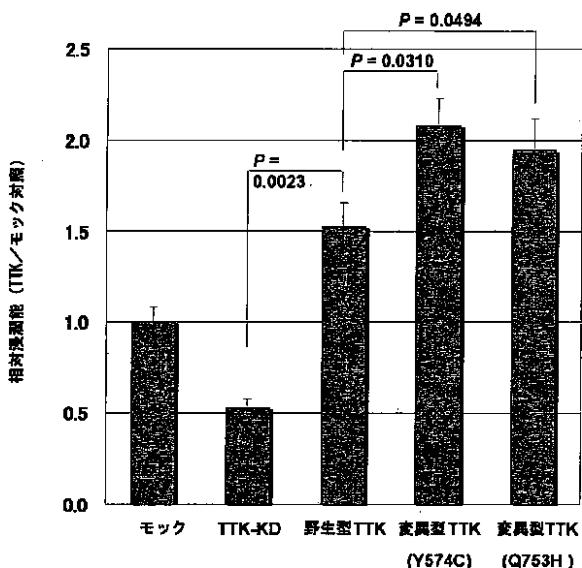
【図 8 b】



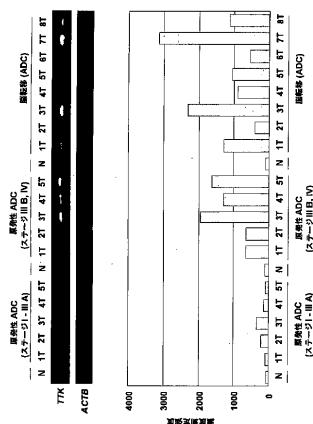
【図 8 c】



【図 8 d】



【図9】



## 【配列表】

201051273000001.xml

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP2007/074359

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12Q1/68

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)  
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/068444 A (CHIRON CORP.) 6 September 2002 (2002-09-06) abstract; claims 25,31,32 page 2, line 17 - page 5, line 16 page 19, lines 18-33; examples 1-8	1,2,5-8, 11-13
X	WO 2006/062811 A (AVENTIS PHARMA INC.) 15 June 2006 (2006-06-15) abstract; claims 1,2,15,17,20,27,29 page 11, line 16	1,2,5 -/-

Further documents are listed in the continuation of Box C.

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 document but 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

Date of mailing of the International search report

20 May 2008

06/06/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Barz, Wolfgang

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/JP2007/074359

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STUCKE V.M. ET AL.: "Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 21, no. 7, 2 April 2002 (2002-04-02), pages 1723-1732, XP002408934 ISSN: 0261-4189 the whole document	5,14,15, 45-47
X	ROTN D. ET AL.: "SH2 DOMAINS PREVENT TYROSINE DÉPHOSPHORYLATION OF THE EGF RECEPTOR IDENTIFICATION OF TYR992 AS THE HIGH-AFFINITY BINDING SITE FOR SH2 DOMAINS OF PHOSPHOLIPASE C-GAMMA" EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 11, no. 2, 1992, pages 559-568, XP002480214 ISSN: 0261-4189 cited in the application abstract	5,14,15
A	ERBA E.B. ET AL.: "Systematic analysis of the epidermal growth factor receptor by mass spectrometry reveals stimulation-dependent multisite phosphorylation" MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, vol. 4, no. 8, August 2005 (2005-08), pages 1107-1121, XP002480215 ISSN: 1535-9476 cited in the application the whole document	1-47
A	HAYAMA S. ET AL.: "Activation of CDCA1-KNTC2, members of centromere protein complex, involved in pulmonary carcinogenesis" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, vol. 66, no. 21, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 10339-10348, XP002410940 ISSN: 0008-5472 the whole document	35-44
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/JP2007/074359

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FUTAKI S. ET AL.: "Arginine-rich peptides: An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AL, vol. 276, no. 8, 17 November 2000 (2000-11-17), pages 5836-5840, XP002210171 ISSN: 0021-9258 the whole document	35-44

International Application No. PCT/JP2007/074359

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## Continuation of Box II.1

Although claims 35 and 45-46 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP2007/074359

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 35 and 45-46 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the Invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/JP2007/074359

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 02068444	A 06-09-2002	CA 2438092	A1	06-09-2002
		CN 1492875	A	28-04-2004
		EP 1377596	A1	07-01-2004
		JP 2004526716	T	02-09-2004
		NZ 527421	A	27-05-2005
WO 2006062811	A 15-06-2006	AR 051523	A1	17-01-2007
		AU 2005314335	A1	15-06-2006
		CA 2589918	A1	15-06-2006
		CN 101072883	A	14-11-2007
		EP 1831398	A2	12-09-2007
		KR 20070085986	A	27-08-2007

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 38/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02
<b>A 6 1 K 48/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00
<b>A 6 1 P 35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00
<b>G 0 1 N 33/50</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/50
<b>G 0 1 N 33/68</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/68
<b>G 0 1 N 33/15</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/50
		Z
		G 0 1 N 33/15
		Z

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

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 中村 祐輔

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 醍醐 弥太郎

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 中鶴 修一

神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内

F ターム(参考) 2G045 DA14 DA36

4B024 AA01 AA11 AA12 BA10 BA63 CA07 CA12 DA02 DA06 EA04

GA11 HA03 HA14 HA17

4B063 QA05 QA17 QA18 QA19 QQ08 QQ27 QQ53 QR07 QR08 QR32

QR48 QR56 QR62 QS25 QS33 QS34 QS36 QX02

4C084 AA02 AA13 BA01 BA18 BA23 CA59 DC32 NA14 ZB262 ZC422

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 EA28 EA50 EA51

FA74