

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-521877

(P2005-521877A)

(43) 公表日 平成17年7月21日(2005.7.21)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68	GO 1 N 33/68 Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 9/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 35/00	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-580866 (P2003-580866)
 (86) (22) 出願日 平成15年4月2日(2003.4.2)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年10月4日(2004.10.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2003/001443
 (87) 国際公開番号 W02003/083485
 (87) 国際公開日 平成15年10月9日(2003.10.9)
 (31) 優先権主張番号 0207533.1
 (32) 優先日 平成14年4月2日(2002.4.2)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

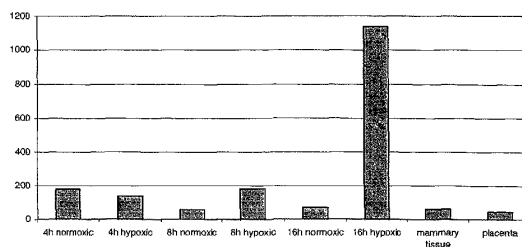
(71) 出願人 504337693
 オックスフォード グライコサイエンス
 (ユーケイ) リミテッド
 イギリス オックスフォードシャー オー
 エックス14 4アールワイ アビンドン
 ミルトン パーク 86 ザ フォーラ
 ム
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084009
 弁理士 小川 信夫
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 稲田 篤
 (74) 代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低酸素関連状態用のタンパク質

(57) 【要約】

本発明は、タウリン輸送体であるSolute Carrier 6(SC6)の、低酸素関連状態、例えば癌の診断、スクリーニング、治療及び予防での新規用途に関する。該タンパク質に免疫特異的な抗体を含め、該タンパク質の発現又は活性を調節するワクチン及び薬剤のような、該タンパク質を含む組成物も提供される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験者の低酸素関連状態のスクリーニング及び/又は診断方法、及び/又は前記状態の治療の有効性のモニタリング方法であって、前記被験者から得た生体試料内で以下のSC6ポリペプチド：

a) 配列番号1のアミノ酸配列を含み、又は配列番号1のアミノ酸配列から成り；

b) 配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫学的活性及び/又は輸送体活性を示すという条件で、配列番号1のアミノ酸配列に対して1つ以上のアミノ酸置換、欠失、挿入若しくは修飾を有する変異体であり；或いは

c) 少なくとも10個のアミノ酸長である、上記a)又はb)で定義したとおりのポリペプチドのフラグメントである；
を検出及び/又は定量する工程を含む方法。 10

【請求項 2】

被験者の低酸素関連状態のスクリーニング及び/又は診断方法、及び/又は前記状態の治療の有効性のモニタリング方法であって、前記被験者から得た生体試料内で以下の単離又は組換えDNA核酸配列：

a) 配列番号2のDNA配列、若しくはそのRNA等価物を含み、又は配列番号2のDNA配列、若しくはそのRNA等価物から成り；

b) a)の配列に相補的な配列であり；

c) a)若しくはb)の配列と同一のポリペプチドをコードする配列であり； 20

d) a)、b)及びc)のいずれかの配列と実質的同一性を示す配列であり；或いは

e) 配列番号1の変異体若しくはフラグメントをコードする配列である；
の量を検出及び/又は定量する工程を含む方法。

【請求項 3】

請求項1で定義したとおりのSC6ポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 4】

該抗体が、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、ヒト化又は二重特異性であり、或いは治療成分、第2抗体若しくはそのフラグメント、細胞毒性物質又はサイトカインに接合している、請求項3に記載の抗体。

【請求項 5】

請求項3又は4で定義したとおりの抗体を用いて前記ポリペプチドを検出及び/又は定量する、請求項1に記載の方法。 30

【請求項 6】

(i) 請求項1で定義したとおりのSC6ポリペプチドの発現若しくは活性、又は

(ii) 請求項2で定義したとおりの核酸分子の発現

を調節する薬剤のスクリーニング方法であって、

候補薬剤の存在下における前記ポリペプチドの発現若しくは活性、又は前記核酸分子の発現を、該候補薬剤の非存在下又は対照薬剤の存在下における前記ポリペプチドの発現若しくは活性、又は前記核酸分子の発現と比較する工程；及び

該候補薬剤が、前記ポリペプチドの発現若しくは活性、又は前記核酸分子の発現を変化させるかどうかを決定する工程
を含む方法。 40

【請求項 7】

SC6ポリペプチドと相互作用する薬剤のスクリーニング方法であって、前記ポリペプチドを候補薬剤と接触させる工程及び該候補薬剤が前記ポリペプチドと相互作用するか否かを決定する工程を含む方法。

【請求項 8】

前記ポリペプチドの発現若しくは活性レベル、又は前記核酸分子の発現レベルを、所定の基準範囲と比較する、請求項6に記載の方法。

【請求項 9】

前記ポリペプチドの発現若しくは活性、又は前記核酸分子の発現を阻害又は下方制御する、請求項 6、7 又は 8 に記載の方法で同定される薬剤。

【請求項 10】

低酸素関連状態を患う被験者の予防及び / 又は治療方法であって、前記患者に、治療的に有効な量の、

(i) 請求項 1 で定義したとおりの SC6 ポリペプチド、

(ii) 請求項 2 で定義したとおりの核酸分子、又は

(iii) SC6 ポリペプチドの発現若しくは活性を阻害若しくは下方制御する薬剤を投与することを含む方法。

【請求項 11】

低酸素関連状態の予防及び / 又は治療用薬物の調製での、

(i) 請求項 1 で定義したとおりの SC6 ポリペプチド、

(ii) 請求項 2 で定義したとおりの核酸分子、又は

(iii) SC6 ポリペプチドの発現若しくは活性を阻害若しくは下方制御する薬剤の使用。

10

【請求項 12】

低酸素関連状態の予防及び / 又は治療用の、

(i) 請求項 1 で定義したとおりの SC6 ポリペプチド、

(ii) 請求項 2 で定義したとおりの核酸分子、又は

(iii) SC6 ポリペプチドの発現若しくは活性を阻害若しくは下方制御する薬剤。

20

【請求項 13】

前記薬剤が、請求項 3 若しくは 4 で定義したとおりの抗体である、請求項 10 に記載の方法、又は請求項 11 若しくは 12 に記載の使用。

【請求項 14】

前記低酸素関連状態が、癌、血管形成及び血管形成関連障害から選択される、請求項 1、2、5、若しくは 10 に記載の方法、又は請求項 11 若しくは 12 に記載の使用。

【請求項 15】

前記癌が、頸部、大腸、腎臓、肺、子宮、乳房又は膵臓細胞癌、リンパ腫及び白血病から選択される、請求項 14 に記載の方法又は使用。

【発明の詳細な説明】

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、タウリン輸送体である Solute Carrier 6 (SC6) の、低酸素関連状態、例えば癌の診断、スクリーニング、治療及び予防での新規用途に関する。該タンパク質に免疫特異的な抗体を含め、該タンパク質の発現又は活性を調節するワクチン及び薬剤のような、該タンパク質を含む組成物も提供される。

【0002】

(Solute Carrier 6)

ヒト Solute Carrier 6 遺伝子、NCBI 受入れ番号 NM_003043 は、Ramamoorthy S らによってクローン化かつ特徴づけされ (1994, Biochem j, 300(Pt 3), 893-900)、タウリン輸送体タンパク質をコードする。この cDNA はヒト胎盤 cDNA ライブラリーから単離され、高度にラット脳タウリン輸送体に関連する (US 5,658,786)。この cDNA を HeLa 細胞内に形質移入すると、タウリン輸送体活性の顕著な増加をもたらす。cDNA 誘導輸送体の活性は、 Na^+ 及び Cl^- の存在によって決まる。クローン化輸送体の Na^+/Cl^- / タウリン化学量論は、2:1:1 である。この輸送体は、タウリン及び アラニンを含む他の アミノ酸に特異的であり、タウリンに高い親和性を示す (ミハエリス-メンテン定数が約 6 マイクロ M)。コーディング領域のヌクレオチド配列は、69,853Da の計算値 M (r) の 620-アミノ酸タンパク質を予測する (Ramamoorthy S ら, 1994)。

40

【0003】

(タウリンの細胞機能)

50

タウリン(2-アミノエタンスルホン酸)偏在性 アミノ酸は、ヒト内で条件的に必須である。それはメチオニンとシステインから誘導され、タンパク質合成には利用されないが、遊離又はいくつかの単純なペプチド内で見られる。細胞内タウリンは、一般的に高濃度で維持されているが、その役割は細胞特異的のようである。血漿タウリンレベルも高いが、外科的損傷及び癌や敗血症を含む多くの病的状態に応じて減少することが観察されている (Stapleton Pら, (1998) J Parenter Enteral Nutr, Jan-Feb, 22(1), 42-8)。

【0004】

タウリンは公知の神経調節物質であり、かつ阻害アミノ酸である。別の重要な機能は、多くの細胞内での浸透質(osmolyte)としての機能である。従って、タウリンは、心リズム、収縮機能、血圧、血小板凝集、神経興奮性、体温、学習、運動行動、食物消費、視力、精子運動性、細胞の増殖と生存能力、エネルギー代謝及び胆汁酸合成を含む多くの生体プロセスを調節しうる。これら作用の多くはイオン輸送又はタンパク質リン酸化の変化に関連する。イオン輸送に及ぼす効果は、膜構造の変化に起因するが、その効果は影響された輸送体の活性の変化によっても等しく影響を受けうる。輸送体活性は、タンパク質発現の増強、タンパク質のリン酸化状態の変化及び細胞骨格の変化によって変わりうる。興味深いことに、これらすべての事象は浸透ストレスによって変化する (Schaffer Sら, (2000) Amino Acids, 19(3-4), 527-46)。

10

さらに、タウリンは低酸素、低血糖、虚血、抗酸化(酸化ストレス及びフリーラジカルの存在)解毒、及び解糖や糖原形成の刺激に関連している。

【0005】

潜在的に重要なタウリンの役割は、低酸素に対する細胞保護にある (Canas PE(1992) Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam, 42(3), 133-7)。腎細胞培養に関する研究は、タウリンが低酸素時に投与されると、随伴細胞損傷が顕著に減少することを示した。それゆえに、タウリンは低酸素時の浸透圧調節低下と再酸素負荷を減少させるので、カルシウムホメオスタシスを著しく改善した。さらに、低酸素時のCa²⁺流出及び再酸素負荷時のCa²⁺過負荷を有意に減らした。タウリンの効果は、部分的にCa²⁺チャンネルブロッカーによって誘導される効果に匹敵する。主として細胞保護の原因である1つの効果は、低酸素及び再酸素負荷にもかかわらず細胞成長プロセスのタウリン誘導加速であるようだ。タウリンの細胞保護効果のスペクトルは、この物質が細胞ホメオスタシス又はエナンチオスタシスの原因である生理的保護物質であるという素因になる (Michalk DVら, (1996) Adv Exp Med Biol, 403, 223-32)。ニューロン損傷状態では、タウリンは興奮毒性、例えば虚血に対する重要な保護メカニズムを構成しうる (Saransaari P, Oja S S, (2000) Amino Acids 19(3-4), 509-26)。

20

30

最後に、タウリン、アルギニン及びホモシステインは、ヒトの循環器病の危険因子に影響することが分かっているアミノ酸である (Nittynen Lら, (1999) Ann Med, Oct;31(5), 318-26)。

【0006】

(低酸素及び腫瘍成長)

腫瘍成長は、局所的な組織血管構造によって供給される酸素と栄養物に依存する。固体腫瘍は、正常組織に比べて不十分な酸素負荷であることは周知である (Vaupel, P. W.ら, (eds.) Tumour Oxygenation pp219-232: Gustav Fisher Verlag, 1995)。低酸素(低い細胞酸素濃度、<1%)は、局所的な血管供給の拡散ゾーンの外側で腫瘍細胞が増殖する時に起こる。血管周囲からの内皮細胞(血液毛管を裏張りする細胞)の成長を刺激する低酸素誘導因子(例えばVEGF)を生成すること(すなわち、血管形成)によって、腫瘍は低酸素に応答する (Weidner Nら, N Engl J Med, 1991, Jan 3, 324:1, 1-8)。これら腫瘍血管内の血流は緩慢かつ不規則であり、結果として不十分な酸素送達となり、腫瘍の低酸素傾向を増殖させる(レビューのため、Brown J. M. Mol Med Today 6; 157-62, 2000参照)。この低酸素誘導血管形成プロセスは、腫瘍細胞を宿主動物の循環系にアクセスさせる。さらに、新しい血管は、腫瘍細胞が血液の循環に入って遠隔部位に転移する入口を提供する (Folkman J, J Natl Cancer Inst., 1990, Jan 3;82(1):4-6)。実際に、新生血管の広が

40

50

りは主要な乳癌、膀胱癌、前立腺癌、非小細胞肺癌、皮膚メラノーマ及び子宮頸癌の転移に非常に関係がある(Ferrara N, Breast Cancer Res Treat, 1995, 36:2, 127-37でレビューされた)。これらの知見は、腫瘍血管新生を癌の状態、すなわち、癌が転移しているか否か、かつどの程度に転移しているかを予測する手段として使用できるだろうと研究者らを導いた。

【0007】

(腫瘍治療での低酸素)

癌腫は、かなりの低酸素フラクシオン、例えば、頭と首の扁平上皮細胞癌の腫瘍の80%及び子宮頸部の癌の腫瘍の50%を有することが知られている(Van De Wiele, Cら, (2000) Nuclear Med, 22, 945-947)。低酸素領域は不均一であり、一部は腫瘍全体に存在する異なった酸素圧が原因である。腫瘍の低酸素領域は、放射線及び化学療法を逃れる傾向がある。これら領域は、血管から最も離れているので、十分に薬物が送達されない。低酸素腫瘍細胞は、緩徐増殖する傾向もあり、多くの化学療法薬物は、急速に分裂する腫瘍細胞だけを標的にする。これは、低酸素が治療後の再発及びさらに攻撃的かつ抵抗性の腫瘍の発生を引き起こしうる理由の1つだろう。低酸素は、細胞の突然変異率を高め、p53のようなプログラム細胞死に感受性の低い突然変異細胞型をもたらす。全体として、腫瘍低酸素は、不十分な予知の予測子として出現した。低酸素は、すべての固体腫瘍内に存在する異常な状態なので、低酸素細胞は抗癌療法に非常に特異的な標的として使用できるだろう。

【0008】

(血管形成)

正常な状態下、血管形成は創傷治癒、組織の修復、再生、成長及び発生を促進するために必要である。しかし、多くの病気状態はこのプロセスに依る。創傷治癒のプロセスは複雑であり、多数の個体に影響する重大な医学的問題を意味する。治癒問題は、褥瘡、重症な火傷、糖尿病性潰瘍及び眼傷害(ドライアイ及び角膜潰瘍を含む)並びに外科的創傷及び他の創傷関連症状のような皮膚創傷に存する。創傷治癒の1つの重要な局面は、創傷部位周囲の組織からの新しい細胞の移動を制御することである。これは、細胞型の正しい分布と新しく発生する組織内の正確な組織機構を確立するためである。上述したように、低酸素は血管成長の増加を促すので腫瘍成長に関連する。さらに、過剰な血管成長は、糖尿病性網膜症、喘息、黄斑変性症、乾癬及びリウマチ性関節炎のような非新生物性障害にも寄与することも分かっている。

【0009】

従って、癌の発生に重要であり、かつ癌の診断及び治療で使用できる酸素-調節血管形成経路の新規なマーカー及び可能性のある標的を同定することが要望されている。

【0010】

癌の免疫療法用の理想的なタンパク質標的は、その免疫応答が腫瘍細胞に標的にされ、かつ他の器官に対しては標的にされないように、正常組織内では制限された発現プロファイルを有し、腫瘍細胞内では過剰発現されなければならない。さらに、タンパク質標的は、治療薬に近づきうる細胞表面上で露出されなければならない。cDNAの差次的スクリーニング(Hubert, R.S.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 14523-14528 (1996); Lucas, S., De Plaen, E. & Boon, T. Int. J. Cancer 87, 55-60 (2000))、及び腫瘍特異性抗体によって認識される細胞表面抗原の精製(Catimel, B.ら, J. Biol. Chem. 271, 25664-25670 (1996))のような方法を用いて、多くの癌型の腫瘍抗原が同定されている。

【0011】

本発明は、低酸素に応答してSC6が細胞内で上方制御されるという発見に基づく。我々の発見は、ヒト真皮微小血管内皮(HDMEC)及び腎臓癌(RCC4)細胞系内で低酸素状態下でSC6発現が増加することを示し、SC6が低酸素刺激物に応答することを示している。さらに、SC6は、調査した多くの正常組織内で相対的に低量で発現した。しかし、SC6発現は、頸部、大腸、腎臓、肺及び子宮細胞癌のいくつかの臨床組織試料内、臨床リンパ腫試料及び特定の腫瘍細胞系、例えば、パーキットリンパ腫、骨髄及びT細胞白血病、乳房、腎臓及び膵臓癌細胞系内で上昇し、SC6が多くの癌タイプの発生で役割を果たし、癌の治療及び診

10

20

30

40

50

断で好適な標的であることを示している。

【0012】

SC6のアミノ酸配列は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>で入手可能な国立保健研究所(NIH)が維持しているGenBankデータベースで受入れ番号NP_003034(配列番号1)で見つけることができ、核酸配列は、受入れ番号NM_003043(配列番号2)で示されている。

【0013】

本発明は、限定するものではないが、頸部、大腸、腎臓、肺、子宮、乳房又は膵臓細胞癌のような特定の癌、リンパ腫、例えばパーキットリンパ腫、白血病、例えば骨髄又はT細胞白血病、血管形成及び糖尿病性網膜症、喘息、黄斑変性症、乾癬及びリウマチ性関節炎のような血管形成関連障害における低酸素関連状態の診断、予防及び治療でのSC6タンパク質、例えば全長タンパク質の使用を想定する。具体的には、SC6の細胞外タンパク質に対して産生される治療用抗体の使用を想定する。

10

【0014】

従って、本発明は、被験者内の低酸素関連状態のスクリーニング及び/又は診断及び/又は前記状態の治療の有効性のモニタリング方法が提供される。該方法は、前記被験者から得た生体試料内で、以下のSC6ポリペプチド：

a) 配列番号1のアミノ酸配列を含み、又は配列番号1のアミノ酸配列から成り；

b) 配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫学的活性及び/又は輸送体活性を示すという条件で、配列番号1のアミノ酸配列に対して1つ以上のアミノ酸置換、欠失、挿入若しくは修飾を有する変異体であり；或いは

20

c) 少なくとも10個のアミノ酸長である、上記a)又はb)で定義したとおりのポリペプチドのフラグメントである；

を検出及び/又は定量する工程を含む。

【0015】

一実施形態では、SC6ポリペプチドの量を基準範囲又は対照と比較する。好ましくは、低酸素関連状態は、癌、例えば低酸素癌細胞である。このような検出/定量の便利な手段は抗体の使用を含む。従って、上記方法の一実施形態では、1個以上のSC6ポリペプチドに特異的に結合する抗体を用いて該ポリペプチドを検出及び/又は定量する。

【0016】

以後、用語“SC6ポリペプチド”は、上記a)~c)で述べたとおりのポリペプチドを包含する。

30

用語“低酸素関連状態”は、限定するものではないが、頸部、大腸、腎臓、肺、子宮、乳房又は膵臓細胞癌のような癌、リンパ腫、例えばパーキットリンパ腫、白血病、例えば骨髄又はT細胞白血病、血管形成及び限定するものではないが、糖尿病性網膜症、喘息、黄斑変性症、乾癬及びリウマチ性関節炎のような血管形成関連障害を含む。“癌”は、白血病及びリンパ腫の両者を包含する。“白血病”は、血液形成器官に関与し、かつ体組織中の白血球数の異常な増加を特徴とし、対応して循環血液中の白血球が増加するかしない場合があり、かつ最も顕著に関与する白血球の型によって分類されている急性又は慢性の病気を示すために使用する用語である。“リンパ腫”は、Bリンパ球由来のリンパ芽球の悪性腫瘍を示すために使用する用語である。

40

“生体試料”は、流体、例えば血清又はリンパ液、及び組織、例えば乳房組織、試料を包含する。

用語“薬剤(agent)”は、非限定的に、SC6ポリペプチドと相互作用し、及び/又はその発現又は活性を調節する薬剤、例えば、SC6ポリペプチドに結合する抗体、SC6ポリペプチドのアゴニスト若しくはアンタゴニスト及び分子、例えば化合物、又は生分子、例えばペプチドを意味する。

【0017】

本発明は、被験者内の低酸素関連状態のスクリーニング及び/又は診断及び/又は前記状態の治療の有効性のモニタリング方法も提供される。この方法は、前記被験者から得た生体試料内で以下の単離又は組換えDNA核酸配列：

50

a) 配列番号2のDNA配列、若しくはそのRNA等価物を含み、又は配列番号2のDNA配列、若しくはそのRNA等価物から成り；
 b) a)の配列に相補的な配列であり；
 c) a)若しくはb)の配列と同一のポリペプチドをコードする配列であり；
 d) a)、b)及びc)のいずれかの配列と実質的同一性を示す配列であり；或いは
 e) 配列番号1のアミノ酸を有するポリペプチドの変異体又はフラグメントをコードする配列である；
 の量を検出及び/又は定量する工程を含む。

a)、b)及びc)のいずれかの配列と実質的同一性を示す配列は、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも98%の配列同一性を有することが好ましい。 10

以後、用語“SC6核酸分子”は、上記a)～e)で述べたとおりの核酸配列を含む。

【0018】

さらなる局面では、SC6ポリペプチドの存在の検出方法は、直接又は間接的に標識した検出試薬を用いて捕獲ポリペプチドを検出する工程を含む。

SC6ポリペプチドは、当業者に周知の多くの方法で検出することができる。本発明の診断方法は、以下のような当業者に周知の方法で達成することができ、限定するものではないが、免疫沈降後ドデシル硫酸ナトリウムゲル電気泳動法、2次元ゲル電気泳動法、ウエスタンブロット、免疫細胞化学、免疫組織化学、イムノアッセイ、例えばラジオイムノアッセイ、ELISA(エンザイム-リンクドイムノソルベントアッセイ)、“サンドイッチ”イムノアッセイ、免疫沈降検定法、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散検定法、凝集検定法、補体結合検定法、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ及びタンパク質Aイムノアッセイのような競合及び非競合検定システムが挙げられる。 20

【0019】

本発明は、SC6ポリペプチドに対する捕獲試薬(例えば、抗体)を含む診断キットをも提供する。さらに、該キットは、任意に、1種以上の以下の要素を含むことができる。

(1) 診断、予防、治療モニタリング又はこれら用途のいずれかの組合せのための捕獲試薬の使用説明書；

(2) 捕獲試薬に対する標識化結合パートナー；

(3) 上に捕獲試薬を固定化する固体相(試薬ストリップのような)；及び 30

(4) 診断、予防又は治療用途又はこれらのいずれかの組合せのための調節承認を示す標識又は挿入断片。

捕獲試薬に対する標識化結合パートナーが提供されない場合、抗-ペプチド捕獲試薬自体を検出可能マーカー、例えば化学発光、酵素、蛍光、又は放射性成分で標識化することができる。

【0020】

SC6ポリペプチドは、抗体産生でも用途がある。別の局面では、本発明は、SC6ポリペプチドに結合する抗体を提供する。好ましい抗体は、特異的にSC6ポリペプチドに結合するので、それらを用いて該SC6ポリペプチドを精製し、捕獲し及び/又はその活性を阻害することができる。抗体は、モノクロナール、ポリクロナール、キメラ、ヒト化又は二重特異性でよく、或いは治療成分、第2抗体若しくはそのフラグメント、細胞毒性物質又はサイトカインに接合してよい。 40

【0021】

上述したように、SC6ポリペプチドは、低酸素関連状態の治療措置用標的に相当する。さらに、本発明は、低酸素関連状態の治療又は予防用薬剤の効力を同定又は確認するための薬物発見で使用する検定法を提供する。候補薬剤の低酸素関連状態、例えば癌を患う被験者内のSC6ポリペプチドのレベルを調節する能力について検定することができる。好ましくは、候補薬剤は、SC6ポリペプチドの発現又は活性レベルを阻害する。低酸素関連状態、例えば癌を患う被験者内のSC6ポリペプチドのレベルをいかなる低酸素関連状態も無い被験者内で見られるレベルに向けて調節可能な薬剤を薬物発見の先導薬剤として、又は 50

治療的に使用することができる。SC6ポリペプチドの発現は、例えばイムノアッセイ、ゲル電気泳動後可視化、mRNA若しくはポリペプチド活性の検出、或いは本明細書で教示し又は当業者に公知の他のいずれの方法によっても検定することができる。このような検定法をSC6ポリペプチドの存在量が臨床疾患の代理マーカーとして働きうる臨床モニタリング又は薬物開発で用いて候補薬剤をスクリーニングすることができる。

【0022】

それゆえに、本発明の別の局面は、SC6ポリペプチドの発現（例えば、タンパク質発現）又は活性（例えば、結合/輸送体活性）を調節（例えば、上方制御、下方制御、刺激又は阻害）する薬剤のスクリーニング方法を提供する。従って、本発明は、

(i) SC6ポリペプチドの発現若しくは活性、又は

(ii) SC6核酸分子の発現

を調節する薬剤のスクリーニング方法であって、以下の工程：

候補薬剤の存在下における前記ポリペプチドの発現若しくは活性、又は前記核酸分子の発現を、該候補薬剤の非存在下又は対照薬剤の存在下における前記ポリペプチドの発現若しくは活性、又は前記核酸分子の発現と比較する工程；及び前記候補薬剤が、前記ポリペプチドの発現若しくは活性、又は前記核酸分子の発現を変化させるかどうかを決定する工程を含む方法を提供する。

【0023】

一実施形態では、前記ポリペプチドの発現若しくは活性レベル、又は前記核酸の発現レベルを所定の基準範囲と比較する。好ましくは、該薬剤はSC6ポリペプチドの発現、例えばタンパク質発現、若しくは活性、例えば結合/輸送体活性、又はSC6核酸分子の発現を下方制御又は阻害する。

【0024】

さらに別の局面では、本発明はSC6ポリペプチドと相互作用（例えば、結合）する薬剤のスクリーニング方法であって、前記ポリペプチドを候補薬剤と接触させる工程及び該候補薬剤が前記ポリペプチドと相互作用するか否かを決定する工程を含む方法を提供する。SC6ポリペプチドと相互作用する薬剤は、治療用薬物接合体の調製に使用しうる。

【0025】

スクリーニング検定法は、成長検定法（低酸素状態下）、結合検定法又は翻訳阻害検定法を含む。結合検定法は、候補化合物の結合親和力をSC6の既知酵素基質の結合親和力と比較する競合結合検定法を含み、好ましい酵素基質はタウリンである。

【0026】

上記検定法で活性を試験しうる候補薬剤の例としては、限定するものではないが、核酸（例えば、DNA及びRNA）、炭水化物、脂質、タンパク質、ペプチド、ペプチドミメチックス、アゴニスト、アンタゴニスト、小分子及び他の薬物が挙げられる。薬剤は、技術的に公知の組合せライブラリー法の多数の適切なアプローチのいずれを用いても得ることができ、生物ライブラリー；空間的に処理可能な平行固相又は液相ライブラリー；脱重畳が必要な合成ライブラリー法；“1ビード1化合物”ライブラリー法；及びアフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法が挙げられる。生物ライブラリーアプローチ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又は化合物の小分子ライブラリーに適用できる(Lam, 1997, *Anticancer Drug DES*. 12:145; US 5,738,996及びUS 5,807,683)。

【0027】

分子ライブラリーの合成法の例は、技術的に知られており、例えば、DeWittら, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909; Erbら, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1422; Zuckermannら, 1994, *J. Med. Chem.* 37:2678; Choら, 1993, *Science* 261:1303; Carrellら, 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carrellら, 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; 及びGallopら, 1994, *J. Med. Chem.* 37:1233で見られる。

【0028】

化合物のライブラリーは、例えば、溶液中（例えば、Houghten, 1992, *Bio/Techniques*

10

20

30

40

50

13:412-421)、又はビーズ(Lam, 1991, Nature 354:82-84)、チップ(Fodor, 1993, Nature 364:555-556)、細菌(US 5,223,409)、胞子(US 5,571,698; US 5,403,484; 及びUS 5,223,409)、プラスミド(Cullら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869)又はファージ(Scott及びSmith, 1990, Science 249:386-390; Devlin, 1990, Science 249:404-406; Cwirllaら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382; 及びFelicci, 1991, J. Mol. Biol. 222:301-310)上に存在しうる。

【0029】

一実施形態では、細胞ベース検定システムでSC6ポリペプチド(若しくは核酸)と相互作用(すなわち結合)する薬剤を同定する。この実施形態により、SC6ポリペプチド(若しくは核酸)を発現する細胞を候補薬剤又は対照薬剤と接触させ、候補薬剤のSC6ポリペプチド(若しくは核酸)と相互作用する能力を決定する。所望により、この検定法を用いて多数(例えば、ライブラリー)の候補薬剤をスクリーニングしうる。細胞は、例えば、原核生物起源(例えば、大腸菌)又は真核生物起源(例えば、酵母菌又は哺乳類)でよい。さらに、細胞は内因的にSC6ポリペプチドを発現することができ、或いは遺伝子操作して前記ポリペプチドを発現させることができる。いくつかの実施形態ではSC6ポリペプチド(若しくは核酸)又は候補薬剤を例えば放射性標識(^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S 若しくは ^{125}I のような)又は蛍光標識(フルオレッセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルアルデヒド若しくはフルオレサミン)で標識化して前記ポリペプチド(若しくは核酸)と候補薬剤との間の相互作用の検出を可能にする。候補薬剤のSC6ポリペプチド(若しくは核酸)と直接又は間接的に相互作用する能力は、当業者に公知の方法で決定することができる。例えば、候補薬剤とSC6ポリペプチドとの相互作用はフローサイトメトリー、シンチレーションアッセイ、免疫沈降法又はウエスタンブロット分析法で決定することができる。

10

20

【0030】

別の実施形態では、細胞フリー検定システムでSC6ポリペプチド(若しくは核酸)と相互作用(すなわち結合)する薬剤を同定する。この実施形態により、天然若しくは組換えSC6ポリペプチド(若しくは核酸)又はそのフラグメントを候補薬剤又は対照薬剤と接触させ、候補薬剤の該ポリペプチドと相互作用する能力を決定する。所望により、この検定法を用いて多数(例えば、ライブラリー)の候補薬剤をスクリーニングしうる。好ましくは、まず、例えばSC6ポリペプチドを特異的に認識かつ結合する固定化抗体と接触させることによって、或いはポリペプチドの精製製剤をタンパク質と結合するするように設計した表面と接触させることによって、或いは核酸分子の精製製剤を核酸と結合するするように設計した表面と接触させることによって、SC6ポリペプチド(若しくは核酸)を固定化する。SC6ポリペプチド(若しくは核酸)は、部分的又は完全に精製され(例えば、部分的又は完全に他のポリペプチド若しくは核酸がない)、或いは細胞ライセートの一部でよい。さらに、SC6ポリペプチドは、本発明用のSC6ポリペプチド又はその生物活性部分と、グルタチオン-S-トランスフェラーゼのようなドメインとを含む融合タンパク質でありうる。代わりに、SC6ポリペプチドは、当業者に周知の方法を用いてビオチン化することができる(例えば、ビオチン化キット, Pierce Chemicals; Rockford, IL, USA)。候補薬剤のSC6ポリペプチドと相互作用する能力は、当業者に周知の方法で決定できる。

30

40

【0031】

別の実施形態では、細胞ベース検定システムを用いて、SC6ポリペプチドの生産若しくは分解の原因であり或いは該ポリペプチドの翻訳後修飾の原因である酵素、若しくはその生物活性部分のようなタンパク質に結合し、又はタンパク質の活性を調節する薬剤を同定する。一次スクリーニングでは、SC6ポリペプチドの生産、分解、又は翻訳後修飾を調節するため、多数(例えば、ライブラリー)の薬剤を(i) SC6ポリペプチド及び(ii) SC6ポリペプチドのプロセッシングの原因であるタンパク質を自然に又は組換え的に発現する細胞と接触させる。所望により、一次スクリーニングで同定された薬剤を、自然に又は組換え的にSC6ポリペプチドを発現する細胞に対する二次スクリーニングで検定することができる。候補薬剤のSC6ポリペプチドの生産、分解又は翻訳後修飾を調節する能力は、当業

50

者に周知の方法で決定することができ、限定するものではないが、フローサイトメトリー、シンチレーションアッセイ、免疫沈降法及びウエスタンブロット分析法が挙げられる。

【0032】

別の実施形態では、競合的にSC6ポリペプチドと相互作用（例えば、結合）する薬剤を競合結合検定法で同定する。この実施形態により、該ポリペプチドを発現する細胞を、候補薬剤及び該ポリペプチドと相互作用することが分かっている薬剤、例えばタウリンと接触させ；候補薬剤の該ポリペプチドと競合的に相互作用する能力を決定する。代わりに、細胞フリー検定システムで、SC6ポリペプチドを候補薬剤及び該ポリペプチドと相互作用することが分かっている薬剤、例えばタウリンと接触させることによって、SC6ポリペプチドと競合的に相互作用（すなわち、結合）する薬剤を同定する。上述したように、候補薬剤のSC6ポリペプチドと相互作用する能力は、当業者に周知の方法で決定できる。細胞ベースであれ、細胞フリーであれ、これら検定法を用いて多数（例えば、ライブラリー）の候補薬剤をスクリーニングすることができる。

10

【0033】

別の実施形態では、SC6ポリペプチド（若しくは核酸）を発現する細胞（例えば、原核生物若しくは真核生物起源）の細胞を候補薬剤又は対照薬剤（例えば、リン酸緩衝食塩水（PBS））と接触させ、かつSC6ポリペプチド（若しくはSC6ポリペプチドをコードする核酸、例えばmRNA）の発現を決定することによって、SC6ポリペプチド（若しくは核酸）の発現を調節（すなわち上方制御又は下方制御）する薬剤を同定する。候補薬剤の存在下での選択されたSC6ポリペプチド若しくはSC6ポリペプチドをコードするmRNAの発現レベルを、候補薬剤が非存在下（例えば、対照薬剤の存在下）でのSC6ポリペプチド若しくはSC6ポリペプチドをコードするmRNAの発現レベルと比較する。この比較に基づき、SC6ポリペプチドの発現のモジュレーターとして候補薬剤を同定しうる。例えば、候補薬剤の存在下でのSC6ポリペプチド若しくはSC6ポリペプチドをコードするmRNAの発現が、その非存在下におけるより有意に多い場合、該候補薬剤はSC6ポリペプチド若しくはSC6ポリペプチドをコードするmRNAの発現の刺激因子として同定される。代わりに、候補薬剤の存在下でのSC6ポリペプチド若しくはSC6ポリペプチドをコードするmRNAの発現が、その非存在下におけるより有意に少ない場合、該候補薬剤はSC6ポリペプチド若しくはSC6ポリペプチドをコードするmRNAの発現のインヒビターとして同定される。SC6ポリペプチド（若しくは核酸）の発現レベルは、本説明に基づき、当業者に周知の方法で決定することができる。例えば、mRNA発現は、ノーザンブロット分析又はRT-PCRで評価でき、タンパク質レベルはウエスタンブロット分析で評価することができる。

20

30

【0034】

別の実施形態では、SC6ポリペプチドを含有する製剤、又はSC6ポリペプチドを発現する細胞（例えば、原核生物若しくは真核生物細胞）を候補薬剤又は対照薬剤と接触させ、かつ該候補薬剤のSC6ポリペプチドの活性を調節（例えば、刺激若しくは阻害）する能力を決定することによって、本発明用のSC6ポリペプチドの活性を調節する薬剤を同定する。好ましくは、候補薬剤はSC6ポリペプチドの活性を阻害する。SC6ポリペプチドの活性は、その“下流エフェクター”又は基質に及ぼすその効果、例えば、限定するものではないが、該ポリペプチドの細胞信号伝達経路（例えば、細胞内Ca²⁺、ジアシルグリセロール、IP3など）の誘導を検出することによって、適切な基質上の標的の触媒若しくは酵素活性（例えば、タウリン濃度、Shi YRら、(2000) Acta Pharmacol Sin, Oct 23, 10, 910-918及びWarskulat Uら、(1997) 321, 683-690）を検出することによって、リポーター遺伝子（例えば、本発明のポリペプチドに応答性であり、かつ検出可能マーカー、例えばルシフェラーゼをコードする核酸に作動可能に連結された調節要素）の誘導を検出することによって、或いは細胞の応答、例えば、細胞分化、又はありうる場合の細胞増殖を検出することによって、本説明に基づいて評価することができ、これら活性を測定するため、当業者に周知の方法を使用することができる（例えば、US 5,401,639参照）。そして、候補薬剤の対照薬剤に対する効果を比較することで、候補薬剤をSC6ポリペプチドの活性のモジュレーターとして同定することができる。好適な対照薬剤としては、リン酸緩衝食塩水（PBS）

40

50

及び生理食塩水(normal saline(NS))が挙げられる。

【0035】

別の実施形態では、本発明で使用するSC6ポリペプチドの発現、活性又は発現と活性の両方を調節(例えば、上方制御又は下方制御)する薬剤を動物モデルで同定する。適切な動物の例としては、限定するものではないが、マウス、ラット、ウサギ、サル、モルモット、イヌ及びネコが挙げられる。この実施形態により、候補薬剤又は対照薬剤を適切な動物に投与し(例えば、経口的、直腸内又は腹腔内若しくは静脈内のような非経口的に)、該ポリペプチドの発現、活性又は発現と活性の両方に及ぼす効果を決定する。本発明で使用するSC6ポリペプチドの発現の変化は、本説明に基づき、上記いずれかの適切な方法によって評価することができる。

10

【0036】

さらに別の実施形態では、二混成検定法又は三混成検定法において、本発明用のSC6ポリペプチドを“おとりタンパク質”として使用し、SC6ポリペプチドに結合し、又はSC6ポリペプチドと相互作用する他のタンパク質を同定する(例えば、US5,283,317; Zervosら(1993) Cell 72:223-232; Maduraら(1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartelら(1993) Bio/Techniques 14:920-924; Iwabuchiら(1993) Oncogene 8:1693-1696; 及びWO 94/10300参照)。当業者には明らかなように、このような結合性タンパク質は、例えば本発明用のSC6ポリペプチドに関わる信号発信経路の上流又は下流要素のように、本発明用のSC6ポリペプチドによる信号の伝播にも関与するようである。

【0037】

当業者は、SC6ポリペプチドを薬剤、特に前記ポリペプチドの活性を調節(例えば、刺激又は阻害)する小分子の構造に基づいた設計の方法で使用できることを認めるだろう。前記方法は、以下の工程:

20

- 1) 前記ポリペプチドの三次元構造を決定する工程、
- 2) 前記ポリペプチドの有望な反応性若しくは結合性部位の三次元構造を推論する工程、
- 3) この推論した反応性若しくは結合性部位に反応若しくは結合すると予測される候補薬剤を合成する工程、及び
- 4) この候補薬剤が前記ポリペプチドの活性を調節できるかどうかを試験する工程を含む。

【0038】

上記プロセスはおそらく反復プロセスであることが分かるだろう。好ましい実施形態では、該薬剤はSC6ポリペプチドを阻害する。別の好ましい実施形態では、該薬剤は、SC6ポリペプチド上のアロステリック結合性部位に結合し、かつSC6ポリペプチド活性を阻害する。

30

従って、本発明は、さらに、上記スクリーニング検定法で同定された薬剤及びそれらの上述したような治療のための使用を提供する。さらに、本発明は、SC6ポリペプチドと相互作用し、或いはその発現及び/又は活性を調節する薬剤の、低酸素関連状態、例えば癌の治療用薬物の製造における使用をも提供する。好ましくは、本薬剤は、SC6ポリペプチドと相互作用し、或いはその発現及び/又は活性を調節する。このような薬剤は、低酸素関連状態、例えば癌の治療用薬物の製造で使用することができる。特定の薬剤又は薬剤の組合せを用いた病気又は状態の治療又は予防方法に本明細書で言及した場合、このような言及は、該病気又は状態の治療又は予防用薬物(医薬組成物)の調製における当該薬物又は薬物の組合せの使用を包含することを意図している。

40

【0039】

本明細書で論じるように、本発明の薬剤は、低酸素関連状態、例えば癌の治療又は予防での使用を見いだす。従って、別の局面では、本発明は、任意に1種以上の薬学的に許容しうる賦形剤、担体又は希釈剤と共に、少なくとも1種の薬剤を含んでなる医薬組成物を提供する。本発明の別の局面では、該医薬組成物はワクチンとしての用途のため、いずれの添加成分もワクチン用途で許容性である。さらに、当業者は、このようなワクチン製剤に1種以上の適切なアジュバントを添加しうることを認める。

50

【0040】

本医薬組成物は、限定するものではないが、癌、血管形成、及び他の血管形成関連障害、例えば、限定するものではないが、糖尿病性網膜症、喘息、黄斑変性症、乾癬及びリウマチ性関節炎のような低酸素関連状態用の別の適切な治療と同時、別個又は経時的に投与することができる。

本医薬組成物は、薬物投与で通常使用されているいずれの経路によっても被験者に投与することができる、例えば、本医薬組成物は、ヒトを含む哺乳類に対して経口（頬側、舌下を含む）、局所（経皮を含む）、経鼻（吸入を含む）、直腸、経膈又は非経口（皮下、筋肉内、静脈内又は皮内を含む）投与用に適合しうる。所定の場合の投与に最適な経路は、特定の化合物又は医薬組成物、被験者、及び病気の重症度や被験者の体調によって決まるだろう。該組成物は、薬学の分野で公知のいずれの方法、例えば、活性薬剤を担体、賦形剤又は希釈剤と関連づけることによって調製しうる。

10

【0041】

本組成物は、通常、普通薬学的に許容しうる担体を含む無菌の医薬組成物の一部として供給される。この医薬組成物は、いずれの適切な形態でもよい（患者に投与する所望の方法によって決まる）。

経口投与に適合させる医薬組成物は、カプセル剤若しくは錠剤、粉末若しくは顆粒、水性若しくは非水性液体中の溶液若しくは懸濁液、食用泡若しくはホイップ、又は水中油液状エマルジョン若しくは油中水液状エマルジョンのような分離性単位として調製することができる。

20

【0042】

経口投与用のカプセル剤及び錠剤は、単位用量授与形態でよく、結合剤、例えばシロップ、アカシア、ゼラチン、ソルビトール、トラガカント、若しくはポリビニルピロリドン；充填材、例えばラクトース、糖、トウモロコシデンプン、リン酸カルシウム、ソルビトール若しくはグリシン；錠剤化潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール若しくはシリカ；崩壊剤、例えばジャガイモデンプン；又はドデシル硫酸ナトリウムのような許容しうる湿潤剤のような慣習的な賦形剤を含みうる。錠剤は、普通の医薬品プラクティスで周知の方法で被覆することができる。経口液状製剤は、例えば、水性若しくは油性懸濁液、溶液、エマルジョン、シロップ若しくはエリキシル剤の形態でよく、或いは使用前に水又は他の適切な媒体との再構成用乾燥製品として提供することができる。このような液状製剤は、懸濁剤、例えばソルビトール、メチルセルロース、グルコースシロップ、ゼラチン、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ステアリン酸アルミニウムゲル若しくは水素化食用脂、乳化剤、例えばレシチン、ソルビタンモノオレート、若しくはアカシア；非水性媒体（食用油を含みうる）、例えばアーモンド油、グリセリンのような油性エステル、プロピレングリコール、若しくはエチルアルコール；保存剤、例えばメチル若しくはプロピルp-ヒドロキシベンゾエート又はソルビン酸、及び所望により慣習的な香味剤若しくは着色剤を含むことができる。

30

【0043】

局所投与に適合させる医薬組成物は、軟膏、クリーム、懸濁液、ローション、粉末、溶液、ペースト、ゲル、含浸手当用品、スプレー、エアゾール又は油として調製され、かつ保存剤、薬物の浸透を助ける溶媒及び軟膏やクリーム中の軟化剤のような適切な慣習的添加剤を含むことができる。その適用としては、眼又は他の外部組織、例えば口や皮膚への適用が挙げられ、該組成物は、好ましくは局所軟膏又はクリームとして適用される。軟膏に調製される場合、活性薬剤はパラフィン性若しくは水混和性軟膏基剤と共に使用されうる。代わりに、活性薬剤は、水中油クリーム基剤若しくは油中水基剤と共にクリームに調製することができる。組成物は、クリーム若しくは軟膏基剤及びローション用のエタノール若しくはオレイルアルコールのような適合性の慣習的な担体を含んでもよい。

40

【0044】

眼の局所投与に適合させる医薬組成物としては、活性薬剤が適切な担体、特に水性媒体中に分散又は懸濁している点眼剤が挙げられる。

50

口内局所投与に適合させる医薬組成物としては、ロゼンジ、芳香製剤(pastilles)及び口内洗浄剤が挙げられる。

経皮投与に適合させる医薬組成物は、長期間レシピエントの表皮と緊密に接触状態を保持することを意図した分離性パッチとして提供されうる。例えばPharmaceutical Research, 3(6), 318, (1986)に一般的に記載されているようなイオン泳動によって活性薬剤をパッチから送達することができる。

【0045】

担体が固体である経鼻投与に適合させる医薬組成物としては、例えば20~500ミクロンの範囲の粒径を有する粗粉末が挙げられ、鼻まで近づけて保持した粉末容器から鼻経路を通る急速吸入によって投与される。鼻スプレー又は点鼻薬として投与するための担体が液体の好適な組成物としては、活性成分の水溶液若しくは油溶液が挙げられる。

吸入による投与に適合させる医薬組成物としては、種々タイプの手段の計量用量加圧エアゾール、噴霧器又は散布器によって生成しうる微粒子粉末又は噴霧が挙げられる。

直腸投与に適合させる医薬組成物は、座薬又は浣腸器として提供されうる。座薬は、慣習的な座薬基剤、例えばココアバター又は他のグリセリドを含む。

腔投与に適合させる医薬組成物は、ベッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム又はスプレー組成物として提供されうる。

【0046】

非経口投与に適合させる医薬組成物としては、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤及び意図したレシピエントの血液と等張性の製剤を与える溶質を含有しうる水性及び非水性無菌注射液；懸濁剤及び濃化剤を含みうる水性及び非水性無菌懸濁液が挙げられる。該組成物は、単位用量又は多用量容器、例えば封止アンプル及びバイアル内で提供され、また使用直前に無菌液状担体、例えば注射用水の添加だけが必要な凍結乾燥状態で貯蔵しうる。即時調合注射液及び懸濁液は、無菌粉末、顆粒及び錠剤から調製することができる。

非経口投与では、活性薬剤と、無菌媒体、好ましくは水を利用して流体単位剤形が調製される。使用する媒体と濃度によっては、活性成分を媒体中に懸濁又は分散させることができる。溶液の調製では、活性薬剤を注射用水に溶かし、無菌ろ過後、適切なバイアル又はアンプルに充填かつ封止することができる。

【0047】

有利には、局所麻薬、保存剤及び緩衝剤のような薬剤を媒体に溶かすことができる。溶解性を高めるため、組成物をバイアルに充填後凍結させ、真空下水を除去することができる。凍結乾燥粉末をバイアル内で封止し、注射用水の添付アンプルを供給し、使用前に液体を再構成することができる。非経口懸濁液は、活性薬剤を媒体に溶かす代わりに媒体中で懸濁させ、かつ滅菌はる過によっては達成しえないことを除き、実質的に同じやり方で調製される。活性薬剤は、無菌媒体に懸濁させる前にエチレンオキシドにさらすことで滅菌することができる。有利には、活性成分の均一な分布を促すため組成物に界面活性剤又は湿潤剤を含める。

【0048】

上で特に言及した成分に加え、本組成物は、問題の製剤のタイプを顧慮した本分野で慣習的な他の薬剤を含んでもよいことを理解すべきであり、例えば、経口投与に好適な薬剤としては香味剤が挙げられる。それらは、本発明の薬剤に加え、治療的に活性な薬剤を含むこともできる。該担体は、製剤の約1% w/w ~ 約98% w/wまでのように存在しうる。さらに一般的には、それらは製剤の約80%までを形成する。

本組成物は、投与方法により、0.1質量%、好ましくは10~60質量%の活性物質を含むことができる。

【0049】

本医薬組成物は、単位剤形で提供することができ、一般的に封止容器で提供され、かつキットの一部として提供することができる。このようなキットは、通常(必ずではないが)使用説明書を含む。キットは、多数の前記単位剤形を含むことができる。好ましい単位剤形組成物は、毎日の用量若しくは補助用量、又はその適切な割合の活性成分を含む組成

10

20

30

40

50

物である。

医薬組成物の最適用量は、治療する状態の性質や程度、投与の形態、経路や部位、及び治療する特定被験者によって決まり、このような最適条件は通常の方法で決定することができる。当業者には、治療の最適クール、すなわち定義した日数の間、1日に与える上記組成物の用量数は、治療決定試験の通常のクールを用いて当業者によって確かめられることも分かるだろう。副作用が発生したら、通常の臨床プラクティスに従って、投薬の量及び/又は頻度を減らすことができる。

【0050】

さらなる局面では、本発明は以下の方法及び使用を提供する。

- i) 低酸素関連状態を患う被験者の予防及び/又は治療方法であって、前記被験者に、治療的に有効な量の少なくとも1種の本明細書で述べるとおりのSC6ポリペプチド又はSC6核酸を投与することを含む方法。 10
- ii) 低酸素関連状態を患う被験者の予防及び/又は治療方法であって、前記被験者に、治療的に有効な量の少なくとも1種の本明細書で述べるとおりのSC6ポリペプチドの発現又は活性を阻害する薬剤を投与することを含む方法。
- iii) 低酸素関連状態の予防及び/又は治療のための、少なくとも1種の本明細書で述べるとおりのSC6ポリペプチド又はSC6核酸の使用。
- iv) 低酸素関連状態の予防及び/又は治療のための、少なくとも1種の本明細書で述べるとおりのSC6ポリペプチドの発現又は活性を阻害する薬剤の使用。
- v) 低酸素関連状態の予防及び/又は治療用薬物調製における、少なくとも1種の本明細書で述べるとおりのSC6ポリペプチド又はSC6核酸の使用。 20
- vi) 低酸素関連状態の予防及び/又は治療用薬物調製における、少なくとも1種の本明細書で述べるとおりのSC6ポリペプチドの発現又は活性を阻害する薬剤の使用。

好ましくは、上述したさらなる局面の方法又は使用で用いる薬剤は、SC6ポリペプチドに結合する抗体である。

【0051】

癌におけるSC6の重要性を考慮すると、以下の方法が本発明のなおさらなる局面を形成する：

- vii) 頸部、大腸、腎臓、肺、子宮、乳房若しくは膵臓細胞癌腫、リンパ腫、例えばバーキットリンパ腫、又は白血病、例えば骨髄若しくはT細胞白血病のような癌治療、患者の治療のモニタリング/評価方法であって、前記患者から得た生体試料中の少なくとも1種のSC6ポリペプチドの存否を決定する工程及び/又は少なくとも1種のSC6ポリペプチドを定量する工程を含む方法。 30
- viii) 低酸素の頸部、大腸、腎臓、肺、子宮、乳房若しくは膵臓細胞癌腫、リンパ腫、例えばバーキットリンパ腫、又は白血病、例えば骨髄若しくはT細胞白血病細胞のような低酸素癌細胞の、被験者から得た生体試料中における同定方法であって、少なくとも1種のSC6ポリペプチドの存否を決定する工程及び/又は少なくとも1種のSC6ポリペプチドを定量する工程を含む方法。

【0052】

ここで、本発明をさらに完全に理解してもらうため、SC6ポリペプチドについてさらに詳細に論じる。 40

用語“ポリペプチド”は、ペプチド、ポリペプチド及びタンパク質を包含する。これらは、特定しない限り相互変換可能に使用される。

ポリペプチドは、好ましくは実質的に純粋な形態で提供され、すなわち、それらは実質的限度で他のタンパク質がない。従って、本発明用のSC6ポリペプチドは、それが存在する優勢な成分である組成物で提供される(すなわち、それは、溶媒又は担体を除いて質量/質量基底に基づいて決定した場合、少なくとも50%;好ましくは少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%のレベルで存在する)。

【0053】

本発明用のSC6ポリペプチドは、単離又は組換え形態でよく、他の成分に融合して 50

もよい。SC6ポリペプチドは、“成熟”タンパク質の形態でよく、或いは融合タンパク質のようなより大きいタンパク質の一部でもよい。分泌性若しくはリーダー配列を含む追加アミノ酸配列、プレ-若しくはプレプロ-タンパク質配列、又はアフィニティータグ、例えば、限定するものではないが、多ヒスチジン残基、FLAGタグ、HAタグ若しくはmycタグのような精製で役立つ配列を含むと有利なことが多い。組換え体生産中の安定性を与える追加配列も使用することができる。このような配列は、追加配列若しくはその一部として開裂可能配列を組み込むことによって必要に応じて任意除去することができる。従って、SC6ポリペプチドは、他のポリペプチドを含む他の成分に融合してよい。このような追加配列やアフィニティータグは技術的に周知である。

【0054】

特に、本発明では、グリーン蛍光タンパク質(US 5,625,048、US 5,777,079、US 6,054,321及びUS 5,804,387)、DsRed蛍光タンパク質(Matz, M. V.ら, (1999) Nature Biotech. 17:969-973)又は非生物発光Anthozoa種由来の蛍光タンパク質のような局在化リポータータンパク質とSC6ポリペプチドの融合が具体的に想定される。

【0055】

a) の範囲内のポリペプチド

a) の範囲内のポリペプチドは、配列番号1の特定アミノ酸配列から成り、或いは配列番号1の配列に対して追加のN末端及び/又は追加のC末端アミノ酸を有しうる。

追加のN末端又はC末端配列は、種々の理由で与えられる。このような追加配列を与える方法は技術的に周知である。追加配列を与えて、特定ポリペプチドの特徴を変えることができる。これは、特定の発現系内における発現又は発現の調節を改善するのに有用である。例えば、追加配列はタンパク質分解開裂に対していくらかの保護を与える。これは、ホルモンソマトスタチンについて、そのN末端でガラクトシダーゼ酵素にそれを融合させることによって行われた(Itakwaら, Science 198:105-63 (1977))。

【0056】

追加配列は、ポリペプチドの特性を変えて同定又は精製を助けるためにも有用である。例えば、アフィニティークロマトグラフィーで単離できる成分にポリペプチドが結合されている融合タンパク質を提供することができる。この成分は抗原又はエピトープでよく、アフィニティークラムは、前記抗原又はエピトープに(望ましくは高度の特異性で)結合する固定化抗体又は固定化抗体フラグメントを含むことができる。融合タンパク質は、通常適切な緩衝液の添加によってカラムから溶出しうる。

【0057】

しかし、追加のN末端又はC末端配列は、単にSC6ポリペプチドを得るために用いる特定方法の結果として存在することもあり、該ポリペプチドに対して何ら特に有利な特徴も与える必要がない。

追加のN末端又はC末端配列が存在してもしなくても、好ましくは、結果のポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドの遺伝的活性及び/又は輸送体活性を示すべきである。

【0058】

b) の範囲内のポリペプチド

さて、上記b)で定義したポリペプチドに目を向けると、当業者には、これらポリペプチドが、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドの遺伝的活性及び/又は輸送体活性を示すという条件で、上記a)で与えられるポリペプチドの変異体であることが分かるだろう。

タンパク質の機能に影響しないタンパク質のアミノ酸配列の変化が起こりうる。これらにはアミノ酸置換、欠失、及び挿入が含まれ、選択的スプライシング及び/又は多数の翻訳開始部位と停止部位の存在から起こりうる。このようにしてタンパク質の機能に影響しないアミノ酸配列の変化が許容される。

【0059】

当業者は、特定の活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列に種々の変化が生じて、前

10

20

30

40

50

記活性の少なくとも一部を有する、好ましくは前記活性の実質的部分を有する変異体（時に“muteins”として知られる）を生成しうることが分かるだろう。上記a)で述べたポリペプチドのこのような変異体は本発明の範囲内であり、かつ以下に詳細に後述する。それらには対立形質及び非対立形質変異体が含まれる。

【0060】

本発明用の変異体の例は、1個以上のアミノ酸の1個以上の他のアミノ酸との置換は別として、上記a)で定義したとおりのポリペプチドである。当業者は、種々のアミノ酸が同様の特性を有することを承知している。ある物質のこのような1個以上のアミノ酸は、しばしば当該物質の所望活性を排除せずに1個以上の他のこのようなアミノ酸によって置換されうる。このようにして、アミノ酸グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンは、多くの場合相互に（脂肪族側鎖を有するアミノ酸）置換されうる。これら可能性のある置換のうち、グリシンとアラニンを用いて相互置換され（それらは比較的短い側鎖を有するので）、かつバリン、ロイシン及びイソロイシンを用いて相互置換される（それらは、疎水性である大きい脂肪族側鎖を有するので）ことが好ましい。

10

【0061】

多くの場合相互変換しうる他のアミノ酸としては以下が挙げられる。

- フェニルアラニン、チロシンとトリプトファン（芳香族側鎖を有するアミノ酸）；
- リジン、アルギニンとヒスチジン（塩基性側鎖を有するアミノ酸）；
- アスパラギン酸とグルタミン酸（酸性側鎖を有するアミノ酸）；
- アスパラギンとグルタミン（アミド側鎖を有するアミノ酸）；及び
- システインとメチオニン（イオウ含有側鎖を有するアミノ酸）。

20

この性質の置換は、しばしば“保存的”又は“半保存的”アミノ酸置換と呼ばれる。

【0062】

上記a)で与えられるアミノ酸配列に対してアミノ酸欠失又は挿入を生じさせてよい。従って、例えば、ポリペプチドの活性に実質的な影響を及ぼさず、或いは少なくともこのような活性を排除しないアミノ酸を欠失させうる。このような欠失は、活性を維持しながらポリペプチドの全長と分子量を減らすことができるので有利でありうる。これは、特定の目的に必要なポリペプチドの量を減らすことを可能にし、例えば、投薬レベルを減らすことができる。上記a)で与えられる配列に対してアミノ酸挿入を生じさせることもできる。これを行ってポリペプチドの特性を変える（例えば、融合タンパク質について上で説明したように、同定、精製又は発現を補助する）ことができる。

30

上記a)で与えられる配列に対するアミノ酸変化は、いずれの適切な方法、例えば部位特異的突然変異(Hutchinsonら, (1978) J. Biol. Chem. 253:6551)を用いても行うことができる。

【0063】

本発明の範囲内のアミノ酸置換又は挿入は、天然に存在する或いは非天然のアミノ酸を用いて行えることを理解すべきである。天然アミノ酸であれ、合成アミノ酸を使用しようが、いずれにしてもLアミノ酸のみが存在することが好ましい。

特定の一実施形態では、置換アミノ酸がSC6ポリペプチドの活性に有意に影響し、特異的に該ペプチド上にドミナントネガティブ活性を与えるために選択しうる。別の実施形態では、特異的にポリペプチドを構成的に活性ならしめるために置換アミノ酸を選択することができる。

40

修飾には、限定するものではないが、翻訳後修飾のような天然に起こる修飾と、突然変異によって導入しうるような非天然修飾が含まれる。

【0064】

どんなアミノ酸変化が生じようと（置換、挿入、欠失又は修飾の手段のいずれでも）、好ましいSC6ポリペプチドは、配列番号1のポリペプチドと少なくとも50%の配列同一性を有し、さらに好ましくは配列同一性の度合いが少なくとも75%である。なおさらに好ましくは配列同一性の度合いが少なくとも80%又は少なくとも85%である。少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性が最も好ましい。

50

【0065】

パーセント同一性は技術的に周知の概念であり、2つのアミノ酸又は核酸配列について、最適比較目的で配列を整列化し（例えば、第1配列に該配列とのベストアライメントのためのギャップを導入することができる）、かつそのアミノ酸残基又はヌクレオチドを対応する位置で比較することによって決定される。“ベストアライメント”は、最高のパーセント同一性をもたらす2つの配列のアライメントである。パーセント同一性は、比較する配列中の同一のアミノ酸残基又はヌクレオチドの数によって決定される。すなわち、パーセント同一性 = (同一位置数 / 総位置数) × 100。

【0066】

2配列間のパーセント同一性の決定は、当業者に公知の数値アルゴリズムを用いて達成しうる。2配列を比較するための数値アルゴリズムの例は、Karlin及びAltschul(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268のアルゴリズムであり、Karlin及びAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877で修正されている。Altschulら(1990), J. Mol. Biol. 215:403-410のNBLAST及びXBLASTプログラムはこのようなアルゴリズムを組み込んだ。BLASTヌクレオチド検索をNBLASTプログラム、スコア = 100、語長 = 12で行って本発明の核酸分子に相同的なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索をXBLASTプログラム、スコア = 50、語長 = 3で行って本発明のタンパク質分子に相同的なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的用のギャップドアライメントを得るため、Altschulら(1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402で述べられているようにGapped BLASTを利用できる。代わりに、PSI-Blastを用いて、分子間の距離関係を検出する繰返し検索を行うことができる(同上)。BLAST、Gapped BLAST、及びPSI-Blastプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム(例えばXBLASTとNBLAST)のデフォルトパラメータを使用できる。http://www.ncbi.nlm.nih.govを参照せよ。

【0067】

配列の比較に使用する数値アルゴリズムの別の例は、Myers & Miller, CABIOS(1989)のアルゴリズムである。CGC配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)は、このようなアルゴリズムを組み込んだ。技術的に公知の配列分析用の他のアルゴリズムとしては、Torellis & Robotti(1994) Comput. Appl. Bio sci., 10:3-5に記載されているようなADVANCEとADAM; 及びPerson & Lipman(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8に記載されているFASTAが挙げられる。FASTA内では、ktup が検索の感度と速度を設定するコントロールオプションである。高度の配列同一性が存在する場合、アミノ酸配列内には相対的に差異が少ないだろう。従って、例えば配列同一性が20未満、10未満、5未満の差異ですらありうる。

【0068】

c) の範囲内のポリペプチド

上述したように、ポリペプチドの長さを減じることは、結果の減少した長さのポリペプチドが所望の活性を有し、或いは有用な抗体又はワクチンを生じさせうることを条件として有利なことが多い。従って、特徴c)は、上記ポリペプチドa)又はb)のフラグメントを包含する。

当業者は、上で開示した方法を用いて特定フラグメントが活性を有するか否かを決定することができる。好ましいフラグメントは、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも50又は少なくとも100個のアミノ酸長である。

【0069】

SC6ポリペプチドは、低酸素関連状態、特に癌に対する治療アプローチで用途を見いだすだろう。当業者は、本発明用の1種以上のポリペプチドの調製に好ましいアプローチは組換えDNA法を基礎とすることを認めるだろう。

遺伝コードの周知の縮重を考慮して、多種の核酸分子によってSC6ポリペプチドをコードすることができる。これらすべての分子は、本発明の範囲内である。それらをベクター中に挿入かつクローン化して、さらなる研究用の大量のDNA又はRNAを生産することができる。当業者に公知の技法を用いて、好適なベクターを宿主細胞中に組み込み、SC6ポリペ

プチドの発現を可能にする。

上で用いた用語“RNA等価物”は、RNA中で該遺伝子コードの“U”が“T”に取って代わるという事実を斟酌して、ある特定のRNA分子が、ある特定のDNA分子の配列に相補的である配列を有することを示す。核酸分子は、単離、組換え又は化学的合成形態でよい。

【0070】

ポリペプチドのクローン化、発現及び精製法は当業者に周知である。DNA構成物は、技術的に周知の方法で容易に生成することができる。これら技法は、例えばJ. Sambrookら、Molecular Cloning 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Old & Primrose Principles of Gene Manipulation 第5版、Blackwell Scientific Publications(1994); 及びStryer, Biochemistry 第4版、W H Freeman and Companyに開示されている。そして、プロモーター、エンハンサー、シグナル配列、リーダー配列、翻訳の開始と停止部位及びDNA安定性制御領域の付加、又は融合パートナーの付加のような、DNA構成物や発現タンパク質の修飾を促進することができる。

10

【0071】

通常、DNA構成物は、ファージ又はプラスミド起源でよいベクター中に挿入される。タンパク質の発現は、このベクターの、真核生物又は原核生物起源でよい宿主細胞中への形質転換又は形質移入によって達成される。このようなベクター及び適切な宿主細胞が本発明のさらなる局面を形成する。

核酸構造の知識を用いて抗体を産生させ、かつ遺伝子療法に使用することができる。このための技法は当業者に周知である。

20

適切な発現系を用い、グリコシル化又は非グリコシル化形態でSC6ポリペプチドを発現させる。非グリコシル化形態は、大腸菌のような原核生物宿主内での発現によって生成する。

N末端メチオニンを含むポリペプチドは特定の発現系を用いて生成するが、他の発現系では成熟ポリペプチドはこの残基を欠いているだろう。

【0072】

好ましい本発明の基質のクローン化、発現及び精製方法について以下に概要を述べる。

自然のまま又は変性条件下でポリペプチドを調製してから引き続きリフォールディングする。バキュロウィルス発現ベクターは、枠内にクローン化されたエピトープタグ配列(例えば、myc、V5又はHis)を有して欠失を助け、かつ該タンパク質のその後の精製を斟酌する分泌プラスミド(PharmingenからのpACGP67のような)を含む。哺乳類発現ベクターは、pCDNA3とpSecTag(両方ともInvitrogen)、及びpREP9とpCEP4(Invitrogen)を含む。大腸菌系は、pBadシリーズ(His tagged-Invitrogen)又はpGexシリーズ(Pharmacia)を含む。

30

【0073】

本明細書で“コーディング”核酸分子と呼ぶ本発明用のSC6ポリペプチドをコードする核酸分子に加え、本発明は、それに相補的な核酸分子をも包含する。従って、例えば、二本鎖核酸分子の両鎖が本発明の範囲内に含まれる(それらが相互に関連していてもいなくても)。mRNA分子及び相補的DNA分子(例えばcDNA分子)も包含される。

【0074】

上述したいずれのかの核酸分子にハイブリダイズする核酸分子も本発明の範囲に包含される。このような核酸分子は、本明細書では“ハイブリダイズする”核酸分子と呼ばれる。ハイブリダイズする核酸分子は、例えば、プローブ又はプライマーとして役に立ちうる。

40

望ましくは、このようなハイブリダイズする分子は、少なくとも10ヌクレオチド長さ、好ましくは少なくとも25又は少なくとも50ヌクレオチド長さである。ハイブリダイズする核酸分子は、好ましくは具体的に上述したようなa)、b)、c)、d)、又はe)の範囲内の核酸にハイブリダイズする。

望ましくは、ハイブリダイズする分子は、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下でこのような分子にハイブリダイズする。ストリンジェントハイブリダイゼーション

50

条件の一例は、試みられるハイブリダイゼーションが約35 ~ 約65 の温度で、約0.9モル濃度の塩溶液を用いて行われる条件である。しかし、当業者は、プローブ長、塩基組成、存在するイオンのタイプ等のような可変量を考慮に入れるため、このような条件を適宜変えることができるだろう。

【0075】

タンパク質をコードするDNAの操作は、タンパク質を修飾するため及び精製目的用の大量のタンパク質を生成するための両者で特に強力な技術である。これは、所望の核酸配列を増幅するためのPCR法の使用を含みうる。PCR法に対するさらなる代替として、化学合成を使用しうる。これは自動化することができる。比較的短い配列を化学的に合成し、一緒に連結してより長い配列を与えることができる。

10

【0076】

こうして本明細書で提供されるデータを用いてPCR用のプライマーを設計できるので、所望配列を標的にしてから高度に増幅させることができる。典型的に、プライマーは少なくとも5ヌクレオチド長であり、一般的に少なくとも10ヌクレオチド長（例えば、15~25ヌクレオチド長）である。ある場合には、少なくとも30又は少なくとも35ヌクレオチド長のプライマーを使用することができる。

プライマー及び/又はプローブとして使用することに加え、ハイブリダイズする核酸分子をアンチセンス分子として用い、相補的核酸分子に結合することでSC6ポリペプチドをコードする核酸の発現を変えることができる。この技術はアンチセンス療法で使用することができる。

20

【0077】

ハイブリダイズする核酸分子は、その長さに沿って上記a)~e)の特定範囲内の核酸分子と高度の配列同一性（例えば、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%又は少なくとも90%又は少なくとも95%）を有しうる。当業者には明らかのように、ある特定の一本鎖核酸分子が別の核酸分子との配列同一性が高いほど、それは適切な条件下で当該他の核酸に相補的である核酸分子に多くハイブリダイズするようである。

【0078】

前述の説明に照らして、当業者は、多数の核酸が本発明で役立つことが分かるだろう。文脈が別なように表さない限り、本発明の核酸分子は、1つ以上の以下の特徴を有する。

30

- 1) それらはDNA又はRNAでありうる；
- 2) それらは一本鎖又は二本鎖でありうる；
- 3) それらは組換え型で提供され、すなわち5'及び/又は3'フランキング配列に共有結合して天然に存在しない分子を生成している；
- 4) それらは、普通に天然に存在する5'及び/又は3'フランキング配列なしで提供されうる；
- 5) それらは、実質的に純粋形態で提供されうる。従って、それらは混入タンパク質及び/又は他の核酸が実質的にない形態で提供されうる；及び
- 6) それらはイントロンがあり、或いはイントロン無しで（例えば、cDNAのように）提供されうる。

40

【0079】

以下、本発明用の1種以上のSC6ポリペプチドに特異的に結合する抗体について詳述する。

SC6ポリペプチド、そのフラグメント若しくは他の誘導體、又はその類似体を免疫原として用い、該免疫原に免疫特異的に結合する抗体を生じさせることができる。本発明の抗体としては、限定するものではないが、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、ヒト化又は二重特異性、一本鎖抗体、Fabフラグメント及びF(ab')フラグメント、Fab発現ライブラリーによって生成されるフラグメント、抗イディオタイプ（抗-Id）抗体、及び上記いずれかのエピトープ結合フラグメントが挙げられる。抗体を治療成分、第2抗体又はそのフラグメント、細胞毒性物質又はサイトカインに接合させてよい。

50

【0080】

本明細書で使用する場合、用語“抗体”は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なタンパク質、すなわち抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を意味する。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子のいずれのクラス（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD及びIgA）又はサブクラスでもよい。

抗体の生産では、所望抗体のスクリーニングは技術的に公知の方法、例えばELISA（エンザイム-リンクドイムノソルベントアッセイ）で達成することができる。例えば、SC6ポリペプチドの特異的ドメインを認識する抗体を選択するため、該ドメインを含有するポリペプチドフラグメントに結合する産物用に生成したハイブリドーマを検定することができる。第1ポリペプチド相同体に結合するが、第2ポリペプチド相同体には特異的に結合しない（又は弱く結合する）抗体の選択では、該第1ポリペプチド相同体に対するポジティブな結合性と、該第2ポリペプチド相同体に対する結合性の欠如（又は結合性の低減）を基礎として選択できる。

10

【0081】

SC6ポリペプチド又はそのフラグメント若しくは類似体に向けたモノクロナール抗体(mAbs)の調製では、培養内の連続的な細胞系による抗体分子の産生用に提供されるいずれの技法も使用しうる。例えば、最初はKohlerとMilstein(1975, Nature 256:495-497)によって開発されたハイブリドーマ法、並びにトリオーマ(trioma)法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozborら, 1983, Immunology Today 4:72)、及びヒトモノクロナール抗体を生成するためのEBV-ハイブリドーマ法(Coleら, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96)。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及びそのいずれかのサブクラスを含むいずれの免疫グロブリンでもよい。本発明のmAbsを産生するハイブリドーマをインビトロ又はインビボ培養することができる。本発明のさらなる実施形態では、技術的に公知の技術を利用して無菌動物内で産生させることができる。

20

【0082】

モノクロナール抗体としては、限定するものではないが、ヒトモノクロナール抗体及びキメラモノクロナール抗体（例えば、ヒト-マウスキメラ）が挙げられる。キメラ抗体は、ヒト免疫グロブリン定常部とマウスmAb由来の可変部を有する抗体のような、異なる部分が異なる動物種由来である分子である（例えば、Cabillyら, US 4,816,567；及びBossら, US 4,816,397参照）。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1つ以上の相補性決定領域(CDRs)と、ヒト免疫グロブリン分子由来の枠組み構造領域を有する非ヒト種由来の抗体分子である（例えば、Queen, US5,585,089参照）。

30

【0083】

キメラ及びヒト化モノクロナール抗体は、技術的に公知の組換えDNA法によって、例えばWO 87/02671；EP 184,187；EP 171,496；EP 173,494；WO 86/01533；US 4,816,567；EP 125,023；Betterら, 1988, Science 240:1041-1043；Liuら, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3499-3443；Liuら, 1987, J. Immunol. 139:3521-3526；Sunら, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218；Nishimuraら, 1987, Canc. Res. 47:999-1005；Woodら, 1985, Nature 314:446-449；及びShawら, 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559；Morrison, 1985, Science 229:1202-1207；Oiら, 1986, Bio/Techniques 4:214；US 5,225,539；Jonesら, 1986, Nature 321:552-525；Verhoeyanら (1988) Science 239:1534；及びBeidlerら, 1988, J. Immunol. 141:4053-4060に記載されている方法を用いて生産することができる。

40

【0084】

ヒト患者の治療では完全ヒト抗体が特に望ましい。このような抗体は、内因性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子を発現できないが、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子を発現できるトランスジェニックマウスを用いて生産することができる。選択抗原、例えばSC6ポリペプチドのすべて又は一部でトランスジェニックマウスを普通の様式で免疫化する。該抗原に向けたモノクロナール抗体は、慣習的なハイブリドーマ技術を用いて得ることができる。B細胞分化の間に、トランスジェニックマウスによって隠されているヒト免疫グロブリン導

50

入遺伝子が再配列し、引き続きクラススイッチ及び体細胞突然変異を受ける。従って、このような技法を用いると、治療的に有用なIgG、IgA、IgM及びIgE抗体を産生させることができる。ヒト抗体を産生させるためのこの技術の概要については、Lonberg及びHuszar(1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93)を参照せよ。ヒト抗体とヒトモノクロナール抗体の産生についてのこの技術及び該抗体産生手順の詳細な議論については、例えばUS 5,625,126 ; US 5,633,425 ; US 5,569,825 ; US 5,661,016 ; 及びUS 5,545,806を参照せよ。さらに、Abgenix, Inc.(Freemont, CA, USA) 及びGenpharm(San Jose, CA, USA)のような会社は、上記技術と同様の技術を用いて選択抗原に向けたヒト抗体を提供するために従事することができる。

【0085】

選択エピトープを認識する完全ヒト抗体は、“誘導選択(guided selection)” と呼ばれる方法を用いて生成することができる。このアプローチでは、選択した非ヒトモノクロナール抗体、例えばマウス抗体を用い、同一エピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を誘導する(Jespersら(1994) *Bio/Technology* 12:899-903)。

【0086】

本発明の抗体は、技術的に公知の種々のファージ表示法を用いても生成することができる。ファージ表示法では、機能性抗体ドメインをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面上に機能性抗体ドメインが表示される。特に、このようなファージを利用してレパートリー又は組合せ抗体ライブラリー(例えば、ヒト又はマウス)から発現される抗原結合ドメインを表示することができる。問題の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、例えば、標識化抗原又は固体表面若しくはビードに結合若しくは捕獲されている抗原を用いて、抗原で選択又は同定することができる。これら方法で使用するファージは、典型的には糸状ファージであり、Fabを有するファージから発現されるfd及びM13結合ドメイン、ファージ遺伝子III若しくは遺伝子VIIIタンパク質のどちらかに組換え的に融合されているFv若しくはジスルフィド安定化Fv抗体ドメインを含む。本発明の抗体を産生させるために使用できるファージ表示法としては、Brinkmanら, *J. Immunol. Methods* 182:41-50(1995); Amesら, *J. Immunol. Methods* 184:177-186(1995); Kettleboroughら, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958(1994); Persicら, *Gene* 187 9-18(1997); Burtonら, *Advances in Immunology* 57:191-280(1994); WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; US 698,426; US 5,223,409; US 5,403,484; US 5,580,717; US 5,427,908; US 5,750,753; US 5,821,047; US 5,571,698; US 5,427,908; US 5,516,637; US 5,780,225; US 5,658,727; US 5,733,743及びUS 5,969,108に開示される方法が挙げられる。

【0087】

上記参考文献に記載されているように、ファージ選択後、ファージ由来の抗体コーディング領域を単離して用い、ヒト抗体を含む全抗体、又は他のいずれの所望抗原結合フラグメントを生成し、かつ例えば詳細に後述するように哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母菌、及び細菌を含むいずれかの所望宿主内で発現させることができる。例えば、WO 92/22324; Mullinaxら, (1992) *Bio Techniques* 12(6):864-869; 及びSawaiら, (1995) *AJRI* 34:26-34; 及びBetterら, (1988) *Science* 240:1041-1043で開示されている方法のような技術的に公知の方法で組換え的にFab、Fab'及びF(ab')₂フラグメントを産生させる技術を利用することもできる。

単鎖Fvs及び抗体の生成に使用可能な技術の例としては、US 4,946,778及びUS 5,258,498; Hustonら, (1991) *Methods in Enzymology* 203:46-88; Shuら, (1993) *PNAS* 90:7995-7999; 及びSkerraら, (1998) *Science* 240:1039-1040に記載されている技術が挙げられる。

【0088】

さらに、本発明は技術的に公知の方法で調製できる二重特異性抗体の使用を提供する。全長の二重特異性の伝統的生産は、2本の異なった特異性を有する2本の免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の共発現を基礎とする(Milsteinら, 1983, *Nature* 305:537-539)。免疫グロブリン重鎖と軽鎖のランダムな組合せのため、これらハイブリドーマ(クワドローマ(quad

10

20

30

40

50

romas))は、10種の異なる抗体分子の潜在的な混合物を産生するが、その抗体分子の1つだけが正しい二重特異性構造を有する。この正しい分子の精製、通常アフィニティークロマトグラフィー工程で行われる精製はかなり扱いにくく、かつ生産収率が低い。同様の手順は、WO 93/08829及びTrauneckerら、(1991) EMBO J. 10:3655-3659に開示されている。

【0089】

異なるアプローチによって、所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変部を免疫グロブリン定常部配列に融合させる。この融合は、好ましくは少なくともヒンジ、CH2、及びCH3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常部を伴う。融合の少なくとも1つに存在する、軽鎖結合に必要な部位を含む第1重鎖定常部(CH1)を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするDNAsと、所望により、免疫グロブリン軽鎖を別個の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物中に共-形質移入する。これは、その構築で用いる3つのポリペプチド鎖の等しくない割合が最適収率を与える実施態様では、3つのポリペプチドフラグメントの相互比率の調整で大きなフレキシビリティを与える。しかし、等しい割合の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高収率をもたらす、或いはその割合が特に意味がない場合、1つの発現ベクター内で3つのポリペプチド鎖の2つ又はすべてのコーディング配列を挿入することができる。

10

【0090】

このアプローチの好ましい実施形態では、二重特異性抗体は、一方のアーム内の第1結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖と、他方のアーム内のハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第2結合特異性を与える)から構成されている。二重特異性分子の半分中だけの免疫グロブリン軽鎖の存在が分離の容易な方法を与えるので、この非対称構造が所望の二重特異性化合物の不要免疫グロブリン鎖化合物からの分離を容易にすることが分かった。このアプローチは、WO 94/04690に開示されている。二重特異性抗体産生のさらなる詳細については、例えば、Sureshら、Methods in Enzymology, 1986, 121:210を参照せよ。

20

【0091】

本発明は、抗-SC6ポリペプチド免疫グロブリン分子の機能的に活性なフラグメント、誘導体又は類似体を提供する。機能的に活性とは、該フラグメント、誘導体又は類似体が、該フラグメント、誘導体又は類似体が誘導される抗体によって認識される抗-抗-イディオタイプ抗体(すなわち第3抗体)を誘発できることを意味する。具体的には、好ましい実施形態では、免疫グロブリン分子のイディオタイプの抗原性が、特異的に該抗原を認識するCDR配列に対するC末端である枠組みとCDR配列の欠失によって高められる。CDR配列が抗原に結合するかを決定するため、技術的に公知のいずれかの結合検定法による該抗原との結合性検定で該CDR配列を含有する合成ペプチドを使用できる。

30

【0092】

本発明は、限定するものではないが、F(ab')₂フラグメント及びFabフラグメントのような抗体フラグメントを提供する。特異性エピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の技法で産生しうる。F(ab')₂フラグメントは可変部、軽鎖定常部及び重鎖のCH1ドメインから成り、抗体分子のペプシン消化によって生成される。Fabフラグメントは、F(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を減らすことによって生成される。本発明は、本発明の抗体の重鎖と軽鎖のディマー(dimers)、又はそのFvs若しくは一本鎖抗体(SCAs)のようないずれかの最小フラグメント(例えば、US 4,946,778; Bird(1988) Science 242:423-42; Hustonら、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; 及びWardら、(1989) Nature 334:544-54に記載されているような)、又は本発明の抗体と同一の特異性を有する他のいずれの分子をも提供する。一本鎖抗体は、Fv領域の重鎖と軽鎖フラグメントをアミノ酸架橋によって連結し、一本鎖ポリペプチドになることで形成される。大腸菌中の機能性Fvフラグメントの構築法を使用しうる(Skerraら、(1988) Science 242:1038-1041)。

40

【0093】

他の実施形態では、本発明は、本発明の免疫グロブリンの融合タンパク質(又は機能的に活性なそのフラグメント)、例えば該免疫グロブリンがN末端又はC末端のどちらかで

50

、免疫グロブリンでない別のタンパク質のアミノ酸配列（又はその一部、好ましくは該タンパク質の少なくとも10、20又は50アミノ酸部分）に共有結合（例えば、ペプチド結合）によって融合している融合タンパク質を提供する。好ましくは、免疫グロブリン、又はそのフラグメントは、定常部のN末端で他のタンパク質に共有結合している。上述したように、このような融合タンパク質は、精製を容易にし、生体内半減期を増やし、かつ抗原の上皮関門を横断する免疫系への送達を促すことができる。

【0094】

本発明の免疫グロブリンは、どちらも修飾、すなわち該共有結合が免疫特異的結合性を減じない限りいずれかのタイプの分子の共有結合によって修飾されている類似体又は誘導体を包含する。例えば、限定するものではないが、免疫グロブリンの誘導体及び類似体として、さらに例えば、グリコシル化、タンパク質分解開裂、細胞リガンド又は他のタンパク質への結合などによって修飾されているものが挙げられる。多数の化学修飾のいずれも、限定するものではないが、特異的な化学開裂、アセチル化、ホルミル化などを含む公知技術で行うことができる。さらに、類似体又は誘導体は、1つ以上の非古典的アミノ酸を含みうる。

10

【0095】

前述の抗体は、SC6ポリペプチドの局在化及び活性に関連する公知の方法で、例えば、これらポリペプチドを診断法等で画像化又は放射画像化するため、適切な生理学的試料中のそのレベルを測定するため、また放射線療法のために使用することができる。

本発明の抗体は、抗体合成用のいずれの公知方法によっても、特に化学合成又は組換え発現によって産生され、好ましくは、組換え発現法によって産生される。

20

【0096】

抗体、又はそのフラグメント、誘導体若しくは類似体の組換え発現は、該抗体をコードする核酸の構築を必要とする。抗体のヌクレオチド配列が既知の場合、該抗体をコードする核酸は、化学的に合成したオリゴヌクレオチドから構築することができ（例えば、Kutmeierら、(1994) *Bio Techniques* 17:242）、簡単には、抗体をコードする配列の部分を含むオリゴヌクレオチドの重ね合わせ、そのオリゴヌクレオチドのアニリング及び連結、次いでその連結したオリゴヌクレオチドのPCRによる増幅という合成法を含む。

【0097】

これとは別に、抗体をクローン化して、抗体をコードする核酸を得ることができる。特定抗体をコードする核酸を含むクローンを入手できないが、抗体分子の配列が分かっている場合、該抗体をコードする核酸は、適切な起源（例えば、抗体cDNAライブラリー、又は該抗体を発現する組織若しくは細胞から生成されるcDNAライブラリー）から、該配列の3'及び5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを用いるPCR増幅によって、或いは特定遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いるクローン化によって得ることができる。

30

【0098】

特定抗原を特異的に認識する抗体分子（又は該抗体をコードする核酸をクローン化するためのcDNAライブラリーの起源）が入手できない場合、特定抗原に特異的な抗体は、技術的に公知のいずれの方法によっても、例えば、ウサギのような動物を免疫化してポリクロナール抗体を産生させ、或いはモノクロナール抗体を産生させることによって、生産しうる。代わりに、抗体の少なくともFab部分をコードするクローンは、特定抗原と結合するFab発現のクローン用Fab発現ライブラリーのスクリーニングによって（例えば、Huseら、(1989) *Science* 246:1275-1281に記載されているような）、又は抗体ライブラリーのスクリーニングによって（例えば、Clacksonら、(1991) *Nature* 352:624；Haneら、(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4937参照）得られる。

40

【0099】

一旦、抗体分子の少なくとも可変部をコードする核酸が得られると、それを該抗体分子の定常部をコードする核酸配列を含むベクター中に導入することができる（例えば、WO 86/05807；WO 89/01036；及びUS 5,122,464参照）。完全抗体分子の発現を可能にする

50

核酸との共-発現用の完全な軽鎖又は重鎖を含有するベクターも利用できる。そして、抗体をコードする核酸を用いて、スルフィジル基を含まないアミノ酸残基との鎖内ジスルフィド結合に關与する1つ以上の可変部システイン残基を置換(又は欠失)するのに必要なヌクレオチド置換又は欠失を導入することができる。このような修飾は、ヌクレオチド配列内の特異的な突然変異又は欠失導入のための技術的に公知のいずれの方法によっても、例えば、限定するものではないが、化学的突然変異法、インビトロ部位特異性突然変異法(Hutchinsonら, (1978) J. Biol. Chem. 253:6551)、PCRを基礎とした方法などで行うことができる。

【0100】

さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライスすることによる“キメラ抗体”の生産のために開発された技法(Morrisonら, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:851-855; Neubergerら, (1984) Nature 312:604-608; Takedaら, (1985) Nature 314:452-454)を使用することができる。前述したように、キメラ抗体は、マウスmAb由来の可変部と、ヒト抗体定常部、例えばヒト化抗体を有するもののような、異なるタンパク質が異なる動物種から派生している分子である。

【0101】

一旦本発明の抗体をコードする核酸を得ると、本分野で周知の技術を用いる組換えDNA法によって、該抗体の産生用ベクターを作ることができる。従って、本明細書では、抗体分子を含有する核酸の発現による本発明のタンパク質の調製方法について述べる。当業者に周知な方法を用いて抗体分子コーディング配列と、適切な転写及び翻訳制御信号を含有する発現ベクターを構築できる。これら方法としては、例えば、インビトロ組換え法、合成法、及びインビボ遺伝子組換え法が挙げられる。例えば、Sambrookら, (1990) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 及びAusubelら(1998) Current Protocols in Molecular Biology, eds., John Wiley & Sons, NYに記載されている方法を参照せよ。

【0102】

発現ベクターを常法で宿主細胞に伝達し、この形質移入細胞を常法で培養して本発明の抗体を産生させる。

本発明の組換え抗体の発現に用いる宿主細胞は、大腸菌のような細菌、又は好ましくは特に全組換え抗体分子の発現用真核生物細胞でよい。特に、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要な中間体初期遺伝子プロモーター要素のようなベクターと共に、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)のような哺乳類細胞が、抗体用の有効な発現系である(Foeckingら, (1986) Gene 45:101; Cockettら, (1990) Bio/Technology 8:2)。

【0103】

種々の宿主-発現ベクター系を利用して、本発明の抗体分子を発現させうる。このような発現-ベクター系は、それによって問題のコーディング配列を生成し、引き続き精製しうる媒体を意味するが、適切なヌクレオチドコーディング配列で形質転換又は形質移入されると、本発明の抗体分子をインサイツ発現しうる細胞をも意味する。これには、限定するものではないが、抗体コーディング配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌(例えば、大腸菌、枯草菌(*B. subtilis*))のような微生物; 抗体コーディング配列を含有する組換え酵母菌発現ベクターで形質転換した酵母菌(例えば、サッカロミセス、*Pichia*); 抗体コーディング配列を含有する組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)で感染した昆虫細胞系; 組換え発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV)で感染し、又は抗体コーディング配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換した植物細胞系; 或いは哺乳類細胞のゲノム由来のプロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)又は哺乳類ウイルスのゲノム由来のプロモーター(例えば、アデノウイルス後期プロモーター; ワクチンウイルス7.5Kプロモーター)を含有する組換え発現構成物を隠し持っている哺乳類細胞系

(例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3細胞)が含まれる。

【0104】

細菌系では、有利には発現される抗体分子の意図した用途によって、多数の発現系が選択される。例えば、抗体分子を含む医薬組成物製造ため、大量の該タンパク質が産生される場合、容易に精製しうる高レベルの融合タンパク質産物の発現に向けたベクターが望ましい。このようなベクターとしては、限定するものではないが、融合タンパク質が産生されるように、lac Zコーディング領域を有する枠内で、抗体コーディング配列をベクター中に個々に結合しうる大腸菌発現ベクター-pUR278 (Rutherf, (1983) EMBO J. 2:1791) ; pINベクター (Inouye & Inouye, (1985) Nucl. Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, (1989) J. Biol. Chem. 24:5503-5509) などが挙げられる。pGEXベクターを用いて、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として外来性ポリペプチドを発現させることもできる。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、母体グルタチオン-アガロースビーズに吸着かつ結合させた後、遊離グルタチオンの存在下における溶出によって可溶化細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターは、クローン化された標的遺伝子産物がGST成分から遊離できるように、トロンピン又は因子Xaプロテアーゼ切断部位を含めて設計される。

10

【0105】

昆虫系では、Autographa californica核多角体病ウイルス(AcNPV)をベクターとして用いて外来性遺伝子を発現させる。このウイルスは、Spodoptera frugiperda細胞内で成長する。該ウイルスの非本質的領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子)中で抗体コーディング配列を別個にクローン化し、AcNPVプロモーター(例えば、ポリヘドリンプロモーター)の制御下に置くことができる。哺乳類宿主細胞内では、多くのウイルスベース発現系(例えば、アデノウイルス発現系)を利用しうる。

20

【0106】

上述したように、挿入された配列の発現を調節し、或いは所望の特定様式で遺伝子産物を修飾及びプロセッシングする宿主細胞株を選択することができる。タンパク質産物のこのような修飾(例えば、グリコシル化)やプロセッシング(例えば、開裂)は、タンパク質の機能に重要である。

組換え抗体の長期的な高収率産生、安定した発現が好ましい。例えば、問題の抗体を安定的に発現する細胞系は、該抗体のヌクレオチド配列と、選択可能マーカー(例えば、ネオマイシン又はハイグロマイシン)のヌクレオチド配列を含む発現ベクターで細胞に形質移入し、その選択可能マーカーの発現を選択することによって生成することができる。このような操作された細胞系は、特に該抗体分子と直接又は間接的に相互作用する化合物のスクリーニング及び評価で有用である。

30

【0107】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって高めることができる(レビューのため、Bebbington及びHentschel, DNAクローニングにおける哺乳類細胞中のクローン化遺伝子の発現のための遺伝子増幅を基礎としたベクターの使用, (1987) Vol.3 Academic Press, New Yorkを参照せよ)。抗体を発現させるベクター系中のマーカーが増幅可能な場合、宿主細胞の培養中に存在するインヒビターのレベルの上昇がマーカー遺伝子のコピー数を増やすだろう。増幅された領域は抗体遺伝子と関連するので、抗体の産生も増えるだろう(Crouse, (1983) Mol. Cell. Biol. 3:257)。

40

【0108】

本発明の2種の発現ベクター、すなわち重鎖誘導ポリペプチドをコードする第1ベクターと軽鎖誘導ポリペプチドをコードする第2ベクターを宿主細胞に共-形質移入することができる。2種のベクターは、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの同等発現を可能にする同一の選択可能マーカーを含みうる。代わりに、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方をコードする単一のベクターを使用することができる。このような場合、重鎖の前に軽鎖を置いて、毒性フリー重鎖の過剰を避けるべきである(Proudfoot, (1986) Nature 322:52; Kohler, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197)。重鎖及び軽鎖のコーディング配列はcDNA

50

又はゲノムDNAを含みうる。

【0109】

本発明の抗体分子が組換え的に発現されたら、抗体分子の精製の技術的に周知のいずれの方法によっても、例えば、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、タンパク質A又は特異的抗原とのようなアフィニティークロマトグラフィー、及びサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、差次的溶解性によって、或いはタンパク質精製の他のいずれの標準的な方法によっても精製することができる。

【0110】

これとは別に、いずれの融合タンパク質も、発現される融合タンパク質に特異的な抗体を利用して容易に精製することができる。例えば、Janknechtらによって記載されたシステムは、ヒト細胞系内で発現される未変性融合タンパク質の迅速な精製を斟酌する（Janknechtら, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897）。このシステムでは、問題の遺伝子をワクシニア組換えプラスミド中にサブクローン化して、該遺伝子の開いた読み枠を6個のヒスチジン残基から成るアミノ末端タグに翻訳的に融合させる。このタグは、融合タンパク質の母体-結合ドメインとして働く。組換えワクシニアウイルスで感染された細胞からの抽出物を Ni^{2+} ニトリロ酢酸-アガロースカラム上に装填し、イミダゾール含有緩衝液でヒスチジン-標識タンパク質を選択的に溶出する。

10

【0111】

好ましい実施形態では、本発明の抗体、又はそのフラグメントを診断又は治療成分に接合させる。抗体は、診断のために使用でき、或いは所定の治療措置の有効性を決定するために使用することができる。抗体を検出可能物質に結合することで検出を容易にすることができる。検出可能物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性核種、ポジトロン放出金属（ポジトロン放出断層撮影用）、及び非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。本発明の診断用の抗体に接合しうる金属イオンについて一般的にはUS 4,741,900を参照せよ。好適な酵素としては、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；好適な補欠分子族としてはストレプトアビジン、アビジン及びビオチンが挙げられ；好適な蛍光物質としてはウンベリフェロン、フルオレッセイン、フルオレッセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレッセイン、塩化ダンシル及びフィコエリトリンが挙げられ；好適な発光物質としてはルミノールが挙げられ；好適な生物発光物質としてはルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが挙げられ；かつ好適な放射性核種としては ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 及び ^{99}Tc が挙げられる。

20

30

【0112】

本発明の抗体又はそのフラグメントを治療薬剤又は薬物成分と接合させて所定の生物応答を変えることができる。治療薬剤又は薬物成分は、古典的な化学的治療薬剤に限定するものと理解すべきでない。例えば、薬物成分は、所望の生物活性を有するタンパク質又はポリペプチドでよい。このようなタンパク質としては、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、又はジフテリア毒素のような毒素；腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲン活性因子、血栓性物質又は抗-血管形成物質、例えばアンギオスタチン(angiostatin)若しくはエンドスタチンのようなタンパク質；又はリンホカイン、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-6(IL-6)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、神経成長因子(NGF)又は他の成長因子のような生物応答修飾因子が挙げられる。

40

【0113】

このような治療成分を抗体に接合させる技術は周知であり、例えば、Arnonら, “癌治療における薬物の免疫標的モノクローナル抗体”, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeldら(1985)eds. Alan R. Liss, Inc. pp. 243-56; Hellstromら, “薬物送達用抗体”, Controlled Drug Delivery (1987), eds. Robinsonら(Marcel Dekker, Inc.

50

) pp. 623-53; Thorpe, “癌治療における細胞毒薬剤の抗体キャリアー：レビュー”, Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pincheraら (eds.), pp.475-506(1985); “癌治療における放射標識抗体の治療的使用の分析、結果及び将来の展望”, Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwinら (eds.), pp. 303-16(Academic Press 1985), Thorpeら, “抗体-毒素接合体の調製と細胞毒特性”, Immunol. Rev., 62:119-58(1982)及びDubowchikら, 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123を参照せよ。

【0114】

これとは別に、SegalによってUS 4,676,980に記載されているように、抗体を第2抗体に結合して抗体異種接合体を形成することができる。

治療成分が結合し或いは結合していない抗体は、単独で或いは細胞毒因子及び/又はサイトカインと組み合わせて投与する治療薬として使用することができる。

検出/定量化のために単独で使用する抗体は、該抗体が交差反応し、それでも本発明用のヒトSC6ポリペプチドを認識するという条件で、他の哺乳類種、例えばウサギ内で産生させてヒトSC6の相同体に向けることができる(例えば、ウサギ抗-ラットタウリン輸送体(TAU 11)カタログ番号TAU-11S, Alpha Diagnostic International Inc., San Antonio, TX 78238 USA)。

【0115】

ここで、以下の実施例を参照して本発明を説明するが、実施例はいかなる場合にも本発明の範囲を限定するものと解釈すべきでない。実施例は図を参考にする。

実施例1：低酸素状態下でのSC6 mRNAの発現

(正常酸素及び低酸素状態下での初生内皮細胞の成長)

HDMEC細胞を正常酸素又は低酸素(1% O₂)状態のどちらかに4、8、又は16時間さらすことによって処理した(Ratcliffe Pら, Nature, 1999, 399, 271-275に記載されているような細胞培養の方法論)。さらした後、細胞をmRNA調製のため収集した。

(遺伝子発現マイクロアレイ(GEM)分析)

正常酸素(対照)又は低酸素(処理)状態下で4、8及び16時間成長したHDMEC細胞内での差次的遺伝子発現の詳細な分析は、Incyte Genomic, Ltd(Paloalto, USA)によって提供されているGEMTMマイクロアレイサービスを用いて行った。簡単には、調査中(この場合、低酸素対正常酸素)の重要な比較に対応するポリA+mRNAsの対を供給した。mRNAの調製は、Incyte手順によって行った。Incyteは標識化プローブを調製し、これらプローブとの競合的ハイブリダイゼーション反応をその標準的ヒトマイクロアレイの1つについて行った。

【0116】

初生内皮細胞のGEM分析は、低酸素下でSC6用遺伝子が増えることを示した。

表1. 10,000cDNA Incyteアレイを用いたGEM分析によるSC6の倍変化

低酸素(時間)	4	8	16
正常酸素下の細胞と比較したSC6発現の倍増加	2.4	2.8	6.1

【0117】

(RT-PCRによるSC6 mRNAの定量化)

GEM分析結果を確認するため、我々は実時間定量的RT-PCR(実施例2で述べるような)を用い、正常酸素及び低酸素状態下で培養した初生内皮細胞培養、HDMEC内でのSC6 mRNAの発現を分析した。

正常酸素又は低酸素状態下に4、8及び16時間さらした後、HDMEC内皮細胞内のSC6 mRNAの発現を定量した(図1)。GEM分析の結果と一致して、我々は、低酸素に16時間さらした後の細胞のSC6 mRNAレベルが正常酸素状態にさらした細胞と比較して劇的に増加することを見いだした。

低酸素又は正常酸素状態下で16時間培養した腎細胞癌系、(RCC4)、及び2種の乳癌細胞

10

20

30

40

50

系、(ヒトコーカシアン (caucasian) 乳腺癌、ECACC、MCF7及び乳房/乳腺転移性部位胸水、腺管癌、ATCC、MDA-435)内でもSC6 mRNAの発現を定量した(図2)。

低酸素の存在は、すべての場合にSC6 mRNAの発現の大きな増加に関連しており、SC6発現が低酸素因子によって誘発されることを示している。

【0118】

実施例2：ヒト組織内でのSC6 mRNAの発現

実時間定量的RT-PCRを用い(Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. Genome Res. 6, 986-994(1996); Morrison, T.B., Weis, J.J. & Wittwer, C.T. Biotechniques 24, 954-958(1998))、正常ヒト組織内(図3)、調和させた臨床的な正常組織と腫瘍組織内(図4と5)、腫瘍細胞系内(図6)でのSC6 mRNAの分布を分析した。

10

(RT-PCRによるSC6 mRNAの定量化)

RT-PCRを用いて、正常ヒト組織mRNAs(Clontech)内、及び調和させた癌組織と正常組織(Clontech)内でのSC6発現を定量的に測定した。PCRに用いたプライマーは以下のとおり：

センス 5' atcggctatgcctccgttgtaa 3' (配列番号3)

アンチセンス 5' agttggtggagctgatggtgat 3' (配列番号4)

【0119】

RT-PCRキット用(Life Technologies)の上付き(Superscript)第1鎖合成によって調製した5ngのcDNAと、SYBRグリーン配列検出試薬(PE Biosystems)と、センス及びアンチセンスプライマーを含む反応をABI7700配列検出システム(PE Biosystems)で分析した。PCR条件は10分間95℃で1サイクル後、30秒間95℃及び1分間65℃で40サイクルだった。PCR産物の蓄積は、SYBRグリーン蛍光の増加として実時間で測定し、データはSequence Detectorプログラムv1.6.3(PE Biosystems)を用いて解析した。増幅PCR産物を鋳型として用い、蛍光及び増幅サイクルに対する初期鋳型コピー数の関係の標準曲線を生成し、これを使用して各試料中のSC6コピー数を計算した。SC6 mRNAの発現は、mRNAの相対的な発現レベルとして示される(コピー数 ng^{-1} cDNA)。

20

SC6 mRNAの発現は、ほとんどの正常組織内で低く、扁桃腺、呼吸管及び正常乳房組織内で最高レベルの発現が見られた(図3)。

【0120】

正常組織と乳房腫瘍組織(IMM, Oxford, UKの許可によって得た)の調和させた7種の臨床試料内におけるSC6 mRNAの発現を調べた。すべての場合に、調和させた正常組織試料に比し、腫瘍試料内でSC6 mRNA発現が増加した(図4)。

30

さらに、調和させた正常組織と、乳房、頸部、大腸、腎臓、肺、胸腺及び子宮試料からの腫瘍組織内でSC6 mRNAのレベルを調べた(図5)。これら試料はBD Biosciences Clontech, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA 94303から得た。我々は、頸部(1/1)、大腸(2/3)、腎臓(1/1)、肺(2/2)、及び子宮(1/1)細胞癌内で、対応する調和させた対照試料と比較してSC6 mRNA発現が増加することを見いだした。

【0121】

多くのヒト腫瘍細胞系内でもSC6 mRNAの発現を決定した(図6)。以下に列記するヒト細胞系を調査した：ヒト骨肉腫(MG63)；乳癌(MDA-MB-453；MDA-MB-468；BT20、BT474、CAL51、DU4475及びT47D)；腎臓癌(Wilm)；形質転換した正常腎細胞系(293)；形質転換した正常線維芽細胞系(MRC-5)；子宮肉腫(MES-SA)；頸癌(Hela S3)；膵臓癌(Mia Paca、Panc 1、PC3、PC3M)；ヒト真皮微小血管内皮細胞(HDMECQ及びHDMECQ-VEGF)。これら細胞系は、以下の供給元から得：American Type Culture Collection(ATCC), Manassas, USA；European Collection of Cell Cultures(ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK及びBioWhittaker House, Workingham, Berkshire, UK、供給元の使用説明書に従って培地内で育成した。我々は、SC6 mRNAレベルは特定の乳癌細胞系内で高く、かつSC6 mRNAレベルは腎臓、子宮及び膵臓癌細胞系内で特に増えることを見いだした。

40

【0122】

さらに、我々は、臨床及び正常リンパ系試料内でのSC6 mRNAレベルを調べた。病理学的に有効な臨床リンパ腫試料は、Institutional Review Boardの承認後にArdais Coraporat

50

ion(Lexington, MA, USA)から得た(図7)。さらに、パーキットリンパ腫(Raji、Daudi、CA46、Namalwa、Ramos)；T細胞白血病(Jurkat)；急性単球性白血病(THP-1)；慢性骨髄性白血病(K-562)；急性骨髄性白血病(KG-1)；前骨髄球性白血病(HL-60) - すべてATCC又はECACCから入手可能 - 及び他の白血病細胞系、MUTU III、BL58、OZ、SUD HL6、KHM108、REC1 MV、K1106、K-231、AS293、及びBL115を含むリンパ腫/白血病細胞系の範囲内でSC6 mRNA発現を比較した。図3の癌細胞系に関しては、パーキットリンパ腫(1/5)、急性単球性白血病(1/1)、慢性骨髄性白血病(1/1)細胞系及びSUD HL6を含む特定のリンパ腫/白血病細胞系がSC6 mRNA発現の増加を示した。

【0123】

同様に、正常のリンパ系試料と比較した場合臨床リンパ腫試料の65%でSC6 mRNAの増加が観察された。このような場合、SC6は、例えばヒト抗-SC6抗体又はSC6の発現若しくは活性を阻害若しくは下方制御する薬剤による治療措置用の良い標的だろう。 10

臨床環境では、癌の特定領域はおそらく低酸素だろう。我々の知見は、SC6が低酸素に応じて上方制御されることを示す。(いくらかの細胞又はすべての細胞で)癌組織がその低酸素応答について制御解除され、ひいてはSC6が恒常的に過剰発現されるのはこの事例だろう。

【0124】

要約すると、SC6は正常組織内では低い発現プロファイルを示すが、特定の、例えば、頸部、大腸、腎臓、肺、子宮、乳房及び膵臓細胞癌、さらに、パーキットリンパ腫及び骨髄性白血病の腫瘍組織及び癌細胞系内で上昇する。特に、低酸素状態下でSC6が上昇するので、SC6は低酸素腫瘍の細胞マーカーでありうることを示している。 20

SC6上方制御が働いて、低酸素腫瘍細胞内のタウリンレベルを高めるので、低酸素濃度による細胞損傷から腫瘍細胞を保護する。さらに、この保護メカニズムが腫瘍細胞の連続した増殖と運動性を可能にするだろう。従って、SC6は、癌の診断でのマーカーとして、或いは癌の治療における標的としての用途を有するだろう。

【0125】

この出願で述べた特定の実施形態は、本発明の個々の局面の単なる説明を意図したものであり、本発明は、これら実施形態によって限定されるものではない。当業者には、前記説明と添付図面から、本明細書で列挙した方法及び装置に加え、本発明の範囲内の機能的に等価な方法及び装置が明かだろう。このような変更及び変形は添付の特許請求の範囲内に含まれることを意図している。 30

この出願で引用した各参考文献、特許及び特許出願の内容は、参照によってその全体が本明細書に取り込まれる。本発明の各局面の好ましい特徴は、必要な変更を加えて他の各局面に対しても同様である。

【図面の簡単な説明】

【0126】

【図1】正常酸素状態及び低酸素状態下、ヒト真皮微小血管内皮細胞(HDMEC)内におけるSC6 mRNAの4~16時間にわたる経時的な発現を示す。SC6 mRNAのレベルは実時間RT-PCRで定量した。mRNAレベルはコピー数 ng^{-1} cDNAとして表される。

【図2】正常酸素状態(N)及び低酸素状態(H)下、乳癌細胞系(MCF7とMDA435)及び腎臓細胞癌細胞(RCC4)内におけるSC6 mRNAの発現を示す。黒塗り棒は低酸素のカウントを示し、クリアな棒は正常酸素のカウントを示す。mRNAレベルはコピー数 ng^{-1} cDNAとして表される。 40

【図3】SC6 mRNAの組織分布を示す。SC6 mRNAのレベルは実時間RT-PCRによる正常組織のパネル内で定量した。mRNAレベルはコピー数 ng^{-1} cDNAとして表される。

【図4】7種の調和させた乳腫瘍組織内でのSC6 mRNAの発現を示す。腫瘍組織は(T)で示され、調和させた正常組織は(N)で示される。mRNAレベルはコピー数 ng^{-1} cDNAとして表される。

【図5】乳房、頸部、大腸、腎臓、肺、胸腺及び子宮由来の調和させた腫瘍及び対照組織内におけるSC6 mRNAの発現を示す。SC6 mRNAのレベルは実時間RT-PCRによって定量した。 50

mRNAレベルはコピー数 ng^{-1} cDNAとして表される。黒塗り棒は腫瘍組織のカウントを示し、クリアな棒は対照組織のカウントを示す。

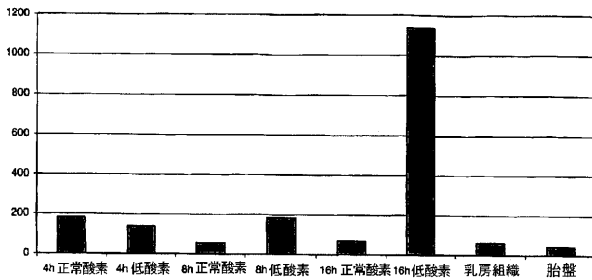
【図6】種々の癌細胞系内でのSC6 mRNAの発現を示す。調査したヒト細胞系のパネルは以下のとおりである：ヒト骨肉腫(MG63)；乳癌(MDA-MB-453、MDA-MB-468、BT20、BT474、CAL51、DU4475及びT47D)；腎臓癌(Wilm)；形質転換した正常腎臓細胞系(293)；形質転換した正常線維芽細胞系(MRC-5)；子宮肉腫(MES-SA)；頸癌(HeLa S3)；膵臓癌(Mia Paca、Panc 1、PC3、PC3M)；ヒト真皮微小血管内皮細胞(HDMECQ及びHDMECQ-VEGF)。SC6 mRNAのレベルは実時間RT-PCRによって定量した。mRNAレベルはコピー数 ng^{-1} cDNAとして表される。

【図7】臨床及び正常リンパ系試料内におけるSC6 mRNAの発現を示し、臨床：リンパ腫試料9-37及び正常：CD34+、末梢血中白血球、脾臓及び胸腺。さらに、パーキットリンパ腫(Raji、Daudi、CA46、Namalwa、Ramos)；MUTU III、BL58、OZ、SUD HL6、KHM108、T細胞白血病(Jurkat)；急性単球性白血病(THP-1)；慢性骨髄性白血病(K-562)；急性骨髄性白血病(KG-1)；REC1 MV、K1106、K-231、AS293、BL115及び前骨髄球性白血病(HL-60)を含むリンパ腫/白血病細胞系のパネルについてもSC6 mRNA発現を示す。mRNAレベルはコピー数 ng^{-1} cDNAとして表される。

10

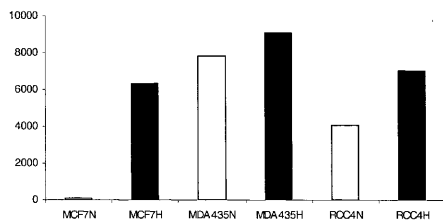
【図1】

Figure 1



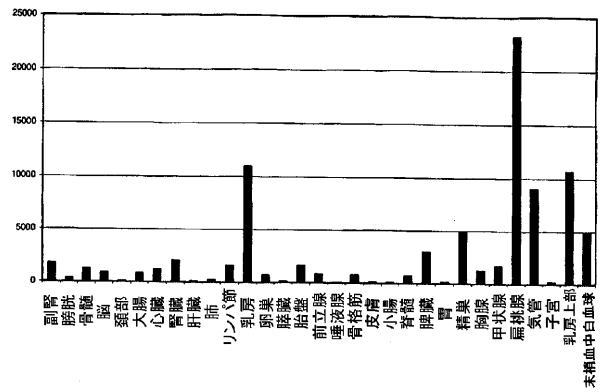
【図2】

Figure 2



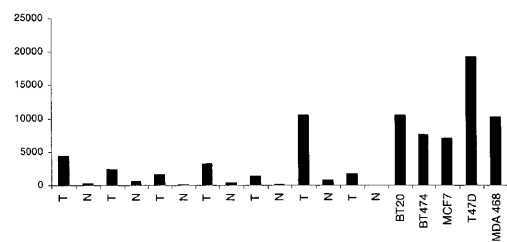
【図3】

Figure 3



【図4】

Figure 4



【配列表】

2005521877000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 03/01443
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	G01N33/68 A61K48/00	G01N33/574 C07K16/00
	C12Q1/68	A61K38/00
		A61K39/00
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) IPC 7 G01N		
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, PAJ, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 90148 A (INCYTE GENOMICS INC; PATTERSON CHANDRA (US); TRIBOULEY CATHERINE M) 29 November 2001 (2001-11-29) Seq ID 5 and 11 are SC6 page 59, line 16-23; claims 10,25-27-56; tables 5,6	3,6,7,12
X	EP 0 982 400 A (SMITHKLINE BEECHAM PLC) 1 March 2000 (2000-03-01) claims 1-17	3,7,12
X	WO 93 18143 A (SYNAPTIC PHARMA CORP) 16 September 1993 (1993-09-16) Seq ID 5 & 6 claims 7,20,63,101,102,140	3,6,7,12
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 *I* document which may throw doubt 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 9 December 2003		Date of mailing of the International search report 30/12/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HW Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gunster, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB 03/01443

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'OnLine! EBI; 1 February 1993 (1993-02-01) JHIANG S M ET AL: "taurine transporter" retrieved from HTTP://SRS.EBI.AC.UK, accession no. HSTAUTRAN Database accession no. Z18956.1 XP002264290 abstract	12
A	TIRUPPATHI CHINNASWAMY ET AL: "Constitutive expression of the taurine transporter in a human colon carcinoma cell line" AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, vol. 263, no. 5 PART 1, 1992, pages G625-G631, XP008025250 ISSN: 0002-9513 the whole document	1-8, 11-15
A	HAN XIAOBIN ET AL: "Is TauT a target gene of the WT1 tumor suppressor gene?" JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, vol. 11, no. Program and Abstract Issue, September 2000 (2000-09), pages 43A-44A, XP008025331 33rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology and the 2000 Renal Week; Toronto, Ontario, Canada; October 10-16, 2000 ISSN: 1046-6673 abstract	1-8, 11-15
A	HAN XIAOBIN ET AL: "Regulation of the taurine transporter gene (TauT) by the WT1 tumor suppressor gene" PEDIATRIC RESEARCH, vol. 47, no. 4 Part 2, April 2000 (2000-04), page 447A XP008025332 Joint Meeting of the Pediatric Academic Societies and the American Academy of Pediatrics.; Boston, Massachusetts, USA; May 12-16, 2000 ISSN: 0031-3998 abstract	1-8, 11-15
P, X	WO 02 064798 A (BAIS ANTHONY JOHN ;BIONOMICS LTD (AU); CALLEN DAVID FREDERICK (AU)) 22 August 2002 (2002-08-22) claims 1-69	1-8, 11-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 03/01443

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 02 098467 A (PLOWMAN GREGORY D ;BELVIN MARCIA (US); FRIEDMAN LORI (US); EXELIXI) 12 December 2002 (2002-12-12) page 12 -page 29; claims 6,23,24 -----	1-8, 11-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB 03/01443

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.: 10 'completely!' and 13-15 'partially!'
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy
2. Claims Nos.: 9 'completely!' and 10-12 'partially!'
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 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 all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/GB 03 01443

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 9 'completely! and 10-12 'partially!

Present claims 9-12 relate to an agent defined by reference to a desirable characteristic or property, namely its ability to down regulate SC6 expression.

The claims cover all agents having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for none of such agents. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the agents by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the SC6 polypeptides as defined in claim 1 and nucleic acids as defined in claim 2.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB 03/01443

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 0190148 A	29-11-2001	AU 6331001 A	03-12-2001		
		CA 2408141 A1	29-11-2001		
		EP 1355943 A2	29-10-2003		
		WO 0190148 A2	29-11-2001		
EP 0982400 A	01-03-2000	CA 2249037 A1	28-02-2000		
		EP 0982400 A1	01-03-2000		
		JP 2000069981 A	07-03-2000		
		US 6238883 B1	29-05-2001		
		US 2001012627 A1	09-08-2001		
WO 9318143 A	16-09-1993	AU 691469 B2	21-05-1998		
		AU 3789393 A	05-10-1993		
		AU 707934 B2	22-07-1999		
		AU 8090698 A	15-10-1998		
		CA 2131444 A1	16-09-1993		
		EP 0631623 A1	04-01-1995		
		JP 7507446 T	24-08-1995		
		WO 9318143 A1	16-09-1993		
		US 5658786 A	19-08-1997		
		US 6225115 B1	01-05-2001		
		US 2003143729 A1	31-07-2003		
		WO 02064798 A	22-08-2002	WO 02064798 A1	22-08-2002
				WO 02064775 A1	22-08-2002
WO 02064780 A1	22-08-2002				
WO 02098467 A	12-12-2002	WO 02098356 A2	12-12-2002		
		WO 02099040 A2	12-12-2002		
		WO 02099041 A2	12-12-2002		
		WO 02099042 A2	12-12-2002		
		WO 02099044 A2	12-12-2002		
		WO 02099122 A1	12-12-2002		
		WO 02099138 A2	12-12-2002		
		WO 02099046 A2	12-12-2002		
		WO 02098467 A1	12-12-2002		
		WO 02099426 A1	12-12-2002		
		WO 02099047 A2	12-12-2002		
		WO 02099048 A2	12-12-2002		
		WO 02099049 A2	12-12-2002		
		WO 02099050 A2	12-12-2002		
		WO 02099051 A2	12-12-2002		
		WO 02099052 A2	12-12-2002		
		WO 02099053 A2	12-12-2002		
		WO 02098889 A2	12-12-2002		
		WO 02099140 A1	12-12-2002		
		WO 02098898 A2	12-12-2002		
		WO 02098468 A1	12-12-2002		
		WO 02098890 A2	12-12-2002		
		WO 02098891 A2	12-12-2002		
		WO 02098899 A2	12-12-2002		
		WO 02099054 A2	12-12-2002		
		WO 02099055 A2	12-12-2002		
		WO 02099056 A2	12-12-2002		
WO 02099057 A2	12-12-2002				
WO 02099058 A2	12-12-2002				
WO 02099059 A2	12-12-2002				
WO 02099427 A1	12-12-2002				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB 03/01443

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02098467 A		WO 02099125 A1	12-12-2002
		WO 02099060 A2	12-12-2002
		WO 02099068 A2	12-12-2002
		WO 02099074 A2	12-12-2002
		WO 02099075 A2	12-12-2002
		WO 02099083 A2	12-12-2002
		US 2003165497 A1	04-09-2003
		US 2003036076 A1	20-02-2003
		US 2003013144 A1	16-01-2003
		US 2002192695 A1	19-12-2002
		US 2003165809 A1	04-09-2003
		US 2003087266 A1	08-05-2003
		US 2003027188 A1	06-02-2003
		US 2003017489 A1	23-01-2003

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 43/00	1 0 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A

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

(74) 代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72) 発明者 パテル ソナル

イギリス オックスフォードシャー オーエックス14 4アールワイ アビンドン ミルトン
パーク 86 ザ フォーラム

Fターム(参考) 2G045 AA40 CB01 DA14 DA36 FA37 FB02 FB08 FB12 GC15
4B024 AA01 AA11 BA31 BA44 CA01 HA12
4B063 QA19 QQ02 QQ42 QR32 QR55 QS34 QX02
4C084 AA02 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 MA02 NA14 ZA36
ZB26 ZB27 ZC41
4H045 AA11 BA10 BA72 CA40 DA76 EA23 EA28 EA31

专利名称(译)	缺氧相关病症的蛋白质		
公开(公告)号	JP2005521877A	公开(公告)日	2005-07-21
申请号	JP2003580866	申请日	2003-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	牛津含甘油科学顺裕祺有限公司		
申请(专利权)人(译)	牛津含甘油科学顺 (Yukei) 有限公司		
[标]发明人	パテルソナル		
发明人	パテル ソナル		
IPC分类号	A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P9/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C07K16/18 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/47 A61K38/00 G01N33/574 G01N33/68 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/68.ZNA A61K45/00 A61K48/00 A61P9/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00.101 C07K16/18 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D A61K37/02 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB02 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA36 4C084/ZB26 4C084/ZB27 4C084/ZC41 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA23 4H045/EA28 4H045/EA31		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	2002007533 2002-04-02 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及溶质载体6 (SC 6) (一种牛磺酸转运蛋白) 在诊断, 筛选, 治疗和预防缺氧相关病症如癌症中的新用途。还提供了包含蛋白质的组合物, 例如疫苗和包括对蛋白质免疫特异性的抗体并调节蛋白质的表达或活性的试剂。

