

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-259438

(P2010-259438A)

(43) 公開日 平成22年11月18日(2010.11.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	2G045
C07K 14/52 (2006.01)	C07K 14/52	4B024
C07K 16/24 (2006.01)	C07K 16/24	4B063
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 1O2	4B064
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B065
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 84 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-139230 (P2010-139230)	(71) 出願人	500039463
(22) 出願日	平成22年6月18日 (2010.6.18)		ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバーシテイ・オブ・テキサス・システム
(62) 分割の表示	特願2008-184139 (P2008-184139) の分割		アメリカ合衆国、テキサス・78701、オースティン、ウエスト・セブンス・ストリート・201
原出願日	平成10年1月8日 (1998.1.8)		
(31) 優先権主張番号	08/791, 115	(71) 出願人	500086515
(32) 優先日	平成9年1月30日 (1997.1.30)		ミリアド・ジェネティックス・インコーポレイテッド
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国84108ユタ州ソルト・レイク・シティ、ワカラ・ウェイ320番
		(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 TS10Q23.3と称する腫瘍抑制因子

(57) 【要約】

【課題】 TS10q23.3と称する腫瘍抑制因子に関連する癌の診断および治療方法の提供。

【解決手段】 該腫瘍抑制因子をコードする特定のアミノ酸配列を有する、単離ポリペプチド。腫瘍抑制因子に免疫学的に結合するモノクローナル抗体。該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。腫瘍抑制因子またはそのアレル変異体または突然変異体をコードする領域を含む単離核酸またはその相補体。腫瘍抑制因子の発現を測定する工程を含む、癌の診断方法。腫瘍細胞による該腫瘍抑制因子の取り込みが可能となる条件下で接触させる工程を含む、癌の治療方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T S 1 0 q 2 3 . 3 と称する腫瘍抑制因子をコードする単離ポリペプチド。

【請求項 2】

該腫瘍抑制因子が図 7 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

該腫瘍抑制因子が図 9 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

T S 1 0 q 2 3 . 3 と称する腫瘍抑制因子の約 1 0 ~ 約 5 0 の連続残基を有する単離ペプチド。

【請求項 5】

担体分子にコンジュゲートした、請求項 4 に記載のペプチド。

【請求項 6】

該担体分子が K L H および B S A よりなる群から選ばれる、請求項 5 に記載のペプチド。

【請求項 7】

該腫瘍抑制因子が図 7 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 4 に記載のペプチド。

【請求項 8】

該腫瘍抑制因子が図 9 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 4 に記載のペプチド。

【請求項 9】

T S 1 0 q 2 3 . 3 と称する腫瘍抑制因子に免疫学的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 10】

他のヒトポリペプチドには免疫学的に結合しない、請求項 9 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 11】

非ヒト T S 1 0 q 2 3 . 3 には結合するがヒト T S 1 0 q 2 3 . 3 には結合しない、請求項 9 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 12】

検出可能な標識をさらに含む、請求項 9 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 13】

該標識が、蛍光標識、化学発光標識、放射性標識および酵素よりなる群から選ばれる、請求項 12 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 14】

T S 1 0 q 2 3 . 3 と称する腫瘍抑制因子に免疫学的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

【請求項 15】

該抗体が他のヒトポリペプチドには免疫学的に結合しない、請求項 14 に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項 16】

該抗体が非ヒト T S 1 0 q 2 3 . 3 には結合するがヒト T S 1 0 q 2 3 . 3 には結合しない、請求項 14 に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項 17】

その抗体が T S 1 0 q 2 3 . 3 と称する腫瘍抑制因子に免疫学的に結合する、ポリクローナル抗血清。

【請求項 18】

ヒト、マウスまたはイヌ以外の動物由来のものである、請求項 17 に記載の抗血清。

【請求項 19】

T S 1 0 q 2 3 . 3 と称する腫瘍抑制因子またはそのアレル変異体または突然変異体をコードする領域を含む単離核酸またはその相補体。

【請求項 20】

該腫瘍抑制因子コード領域が、マウス、イヌおよびヒトよりなる群から選ばれる、請求項

10

20

30

40

50

19 に記載の核酸。

【請求項 21】

該腫瘍抑制因子コード領域がヒトからのものである、請求項 20 に記載の核酸。

【請求項 22】

該突然変異体が、欠失突然変異体、挿入突然変異体、フレームシフト突然変異体、ナンセンス突然変異体、ミスセンス突然変異体またはスプライス突然変異体である、請求項 19 に記載の核酸。

【請求項 23】

該腫瘍抑制因子が図 9 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 22 に記載の核酸。

【請求項 24】

該腫瘍抑制因子が図 9 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 22 に記載の核酸。

【請求項 25】

該腫瘍抑制因子が図 9 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 23 に記載の核酸。

【請求項 26】

図 9 に示すコード配列またはその相補体を含む、請求項 24 に記載の核酸。

【請求項 27】

図 9 に示すコード配列またはその相補体を含む、請求項 25 に記載の核酸。

【請求項 28】

ゲノム DNA、相補的 DNA および RNA よりなる群から選ばれる、請求項 21 に記載の核酸。

【請求項 29】

相補的 DNA であり、該腫瘍抑制因子をコードする該領域またはその相補体に作動可能に連結したプロモーターをさらに含む、請求項 28 に記載の核酸。

【請求項 30】

該腫瘍抑制因子をコードする該領域に作動可能に連結したポリアデニル化シグナルをさらに含む、請求項 29 に記載の核酸。

【請求項 31】

複製起点をさらに含む、請求項 30 に記載の核酸。

【請求項 32】

レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスおよびアデノ関連ウイルスよりなる群から選ばれたウイルスベクターである、請求項 31 に記載の核酸。

【請求項 33】

ウイルス粒子中にパッケージングされている、請求項 32 に記載の核酸。

【請求項 34】

リポソーム中にパッケージングされている、請求項 31 に記載の核酸。

【請求項 35】

サイズが、約 1212 塩基、約 1500 塩基、約 2000 塩基、約 3500 塩基、約 5000 塩基、約 10,000 塩基、約 15,000 塩基、約 20,000 塩基、約 25,000 塩基、約 30,000 塩基、約 35,000 塩基、約 40,000 塩基、約 45,000 塩基、約 50,000 塩基、約 75,000 塩基および約 100,000 塩基よりなる群から選ばれる、請求項 21 に記載の核酸。

【請求項 36】

TS10q23.3 と称する腫瘍抑制因子をコードする核酸またはその相補体の約 10 ~ 約 50 の連続塩基からなる単離オリゴヌクレオチド。

【請求項 37】

該腫瘍抑制因子がマウスのものである、請求項 36 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 38】

該腫瘍抑制因子がヒトのものである、請求項 36 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 39】

10

20

30

40

50

該核酸が図9のコード領域である、請求項37に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項40】

該核酸が図9のコード領域である、請求項38に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項41】

長さが約15塩基である、請求項36に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項42】

長さが約17塩基である、請求項36に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項43】

長さが約20塩基である、請求項36に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項44】

長さが約25塩基である、請求項36に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項45】

長さが約50塩基である、請求項36に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項46】

(i)患者から試料を採取し、ついで

(ii)該試料の細胞中での機能性のTS10q23.3腫瘍抑制因子の発現を測定する工程を含む、癌の診断方法。

【請求項47】

該癌が、脳癌、肺癌、肝臓癌、脾臓癌、腎臓癌、リンパ節癌、小腸癌、膵臓癌、血球癌、結腸癌、胃癌、乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌、精巣癌、卵巣癌、皮膚癌、頭頸癌、食道癌、骨髄癌および血液癌よりなる群から選ばれる、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

該癌が前立腺癌または乳癌である、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

該癌が脳癌である、請求項47に記載の方法。

【請求項50】

該脳癌が神経膠腫である、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

該試料が組織試料または流体試料である、請求項46に記載の方法。

【請求項52】

該測定が、該試料からの核酸をアッセイすることを含む、請求項46に記載の方法。

【請求項53】

該試料を、該核酸を増幅するのに適した条件に供することをさらに含む、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

該測定が、該試料をTS10q23.3に免疫学的に結合する抗体と接触させることをさらに含む、請求項46に記載の方法。

【請求項55】

該試料のタンパク質をELISAに供することをさらに含む、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

TS10q23.3の発現を非癌試料中でのTS10q23.3の発現と比較する工程をさらに含む、請求項46に記載の方法。

【請求項57】

該比較が、TS10q23.3の発現レベルを評価することを含む、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

該比較が、TS10q23.3遺伝子、タンパク質または転写物の構造を評価することを含む、請求項56に記載の方法。

【請求項59】

該評価が、シーケンシング、野性型オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、変異

10

20

30

40

50

体オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、SSCP、PCRおよびRNAアーゼ検出よりなる群から選ばれる、請求項58に記載の方法。

【請求項60】

該評価が野性型または変異体オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションであり、該オリゴヌクレオチドがチップまたはウエハー上のアレイとして配置される、請求項59に記載の方法。

【請求項61】

腫瘍細胞をTS10q23.3と称する腫瘍抑制因子と、該腫瘍細胞による該腫瘍抑制因子の取り込みが可能となる条件下で接触させる工程を含む、腫瘍細胞の表現型を変化させる方法。

10

【請求項62】

該腫瘍細胞が、脳組織、肺組織、肝臓組織、脾臓組織、腎臓組織、リンパ節組織、小腸組織、血球組織、膵臓組織、結腸組織、胃組織、乳房組織、子宮内膜組織、前立腺組織、精巣組織、卵巣組織、皮膚組織、頭頸組織、食道組織、骨髄組織および血液組織よりなる群から選ばれた組織からのものである、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

表現型が、増殖、移転、接触阻害、ソフトアガー増殖および細胞周期よりなる群から選ばれる、請求項61に記載の方法。

【請求項64】

該腫瘍抑制因子がリポソーム中に内包されている、請求項61に記載の方法。

20

【請求項65】

腫瘍細胞を、(i)TS10q23.3と称する腫瘍抑制因子をコードする核酸、および(ii)該腫瘍抑制因子をコードする領域に作動可能に連結された、該腫瘍細胞中で活性なプロモーターと、該腫瘍細胞による該核酸の取り込みが可能となる条件下で接触させる工程を含む、腫瘍細胞の表現型を変化させる方法。

【請求項66】

該腫瘍細胞が、脳組織、肺組織、肝臓組織、脾臓組織、腎臓組織、リンパ節組織、小腸組織、血球組織、膵臓組織、結腸組織、胃組織、乳房組織、子宮内膜組織、前立腺組織、精巣組織、卵巣組織、皮膚組織、頭頸組織、食道組織、骨髄組織および血液組織よりなる群から選ばれた組織からのものである、請求項64に記載の方法。

30

【請求項67】

表現型が、増殖、移転、接触阻害、ソフトアガー増殖および細胞周期よりなる群から選ばれる、請求項65に記載の方法。

【請求項68】

該核酸がリポソーム中に内包されている、請求項65に記載の方法。

【請求項69】

該核酸が、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスおよびヘルペスウイルスよりなる群から選ばれたウイルスベクターである、請求項65に記載の方法。

【請求項70】

該核酸がウイルス粒子中に内包されている、請求項69に記載の方法。

40

【請求項71】

患者内の腫瘍細胞をTS10q23.3と称する腫瘍抑制因子と、該腫瘍細胞による該腫瘍抑制因子の取り込みが可能となる条件下で接触させる工程を含む、癌の治療方法。

【請求項72】

該腫瘍細胞が、脳組織、肺組織、肝臓組織、脾臓組織、腎臓組織、リンパ節組織、小腸組織、血球組織、膵臓組織、結腸組織、胃組織、乳房組織、子宮内膜組織、前立腺組織、精巣組織、卵巣組織、皮膚組織、頭頸組織、食道組織、骨髄組織および血液組織よりなる群から選ばれた組織からのものである、請求項71に記載の方法。

【請求項73】

50

該患者がヒトである、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 4】

患者内の腫瘍細胞を、(i) T S 1 0 q 2 3 . 3 と称する腫瘍抑制因子をコードする核酸、および(ii) 該腫瘍抑制因子をコードする領域に作動可能に連結された、該腫瘍細胞中で活性なプロモーターと、該腫瘍細胞による該核酸の取り込みが可能となる条件下で接触させる工程を含む、癌の治療方法。

【請求項 7 5】

該腫瘍細胞が、脳組織、肺組織、肝臓組織、脾臓組織、腎臓組織、リンパ節組織、小腸組織、血球組織、膵臓組織、結腸組織、胃組織、乳房組織、子宮内膜組織、前立腺組織、精巣組織、卵巣組織、皮膚組織、頭頸組織、食道組織、骨髄組織および血液組織よりなる群から選ばれた組織からのものである、請求項 7 4 に記載の方法。

10

【請求項 7 6】

該患者がヒトである、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 7】

T S 1 0 q 2 3 . 3 をコードする遺伝子の両コピーが他の遺伝子で中断または置換されているトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 7 8】

(i) 患者から試料を採取し、ついで

(ii) 該試料の細胞中での機能性の T S 1 0 q 2 3 . 3 腫瘍抑制因子の発現を測定する工程を含む、癌のステージの決定方法。

20

【請求項 7 9】

該癌が脳癌であり、該ステージが低度と神経膠腫との間で識別される、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

該測定が、該試料中の T S 1 0 q 2 3 . 3 核酸またはポリペプチドをアッセイすることを含む、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 1】

(i) 患者から試料を採取し、ついで

(ii) 該試料の細胞中での機能性の T S 1 0 q 2 3 . 3 腫瘍抑制因子の発現を測定する工程を含む、腫瘍の転移の予測方法。

30

【請求項 8 2】

該癌が転移性および非転移性として識別される、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

該測定が、該試料中の T S 1 0 q 2 3 . 3 核酸またはポリペプチドをアッセイすることを含む、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 4】

抗腫瘍活性の候補物質のスクリーニング方法であって、

(i) 機能性の T S 1 0 q 2 3 . 3 ポリペプチドを欠く細胞を用意し、

(ii) 該細胞を該候補物質と接触させ、ついで

(iii) 該細胞に対する該候補物質の作用を決定する

工程を含む方法。

40

【請求項 8 5】

該細胞が腫瘍細胞である、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

該腫瘍細胞が T S 1 0 q 2 3 . 3 のコード領域中に変異を有する、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

該変異が、欠失突然変異体、挿入突然変異体、フレームシフト突然変異体、ナンセンス突然変異体、ミスセンス突然変異体またはスプライス突然変異体である、請求項 8 6 に記載の方法。

50

【請求項 8 8】

該決定が、該候補物質の存在下での該細胞の 1 またはそれ以上の特性を該候補物質の不在下での該細胞の特性と比較することを含む、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 9】

該特性が、TS 1 0 q 2 3 . 3 発現、ホスファターゼ活性、増殖、転移、接触阻害、ソフトアガー増殖、細胞周期制御、腫瘍形成、腫瘍進行および組織浸潤よりなる群から選ばれる、請求項 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 0】

該候補物質が化学療法剤または放射線療法剤である、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 9 1】

該候補物質が小分子ライブラリーから選ばれる、請求項 8 4 に記載の方法。

10

【請求項 9 2】

該細胞をインビトロで接触させる、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 9 3】

該細胞をインビボで接触させる、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 9 4】

抗キナーゼ活性の候補物質のスクリーニング方法であって、

(i) 少なくとも 1 のチロシンキナーゼ部位を含む TS 1 0 q 2 3 . 3 ポリペプチドを有する細胞を用意し、

(ii) 該細胞を該候補物質と接触させ、ついで

(iii) 該部位のリン酸化に対する該候補物質の作用を決定する

工程を含む方法。

20

【請求項 9 5】

該決定が、該候補物質の存在下での該細胞の 1 またはそれ以上の特性を該候補物質の不在下での該細胞の特性と比較することを含む、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

該特性が、TS 1 0 q 2 3 . 3 のリン酸化状態、TS 1 0 q 2 3 . 3 発現、ホスファターゼ活性、増殖、転移、接触阻害、ソフトアガー増殖、細胞周期制御、腫瘍形成、腫瘍進行および組織浸潤よりなる群から選ばれる、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

該候補物質が化学療法剤または放射線療法剤である、請求項 9 4 に記載の方法。

30

【請求項 9 8】

該候補物質が小分子ライブラリーから選ばれる、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 9】

該細胞をインビトロで接触させる、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

該細胞をインビボで接触させる、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

該突然変異体がスプライス突然変異体である、請求項 2 2 に記載の核酸。

【請求項 1 0 2】

該スプライス突然変異体がエクソン C 中に突然変異を有する、請求項 1 0 1 に記載の核酸。

40

【請求項 1 0 3】

該スプライス突然変異の結果、エクソン C のスプライスジャンクションの位置 + 1 で G から T に変化する、請求項 1 0 2 に記載の核酸。

【請求項 1 0 4】

該スプライス突然変異体がエクソン H 中に突然変異を有する、請求項 1 0 1 に記載の核酸。

【請求項 1 0 5】

該スプライス突然変異の結果、エクソン H のスプライスジャンクションの位置 + 1 で G か

50

ら T に変化する、請求項 104 に記載の核酸。

【請求項 106】

該突然変異体が挿入突然変異体である、請求項 22 に記載の核酸。

【請求項 107】

該挿入突然変異がエクソン H 中に存在する、請求項 106 に記載の核酸。

【請求項 108】

該挿入突然変異がエクソン G の位置 98 での T T の 2 塩基対付加である、請求項 107 に記載の核酸。

【請求項 109】

該突然変異体がフレームシフト突然変異体である、請求項 22 に記載の核酸。

10

【請求項 110】

該フレームシフト突然変異がエクソン G 中に存在する、請求項 109 に記載の核酸。

【請求項 111】

該突然変異体がミスセンス突然変異体である、請求項 22 に記載の核酸。

【請求項 112】

該ミスセンス突然変異がエクソン B 中に存在する、請求項 111 に記載の核酸。

【請求項 113】

該突然変異の結果、エクソン B の位置 46 で T から G に変化する、請求項 112 に記載の核酸。

【請求項 114】

該突然変異の結果、腫瘍抑制因子中で L E U から A R G に変化する、請求項 113 に記載の核酸。

20

【請求項 115】

該突然変異の結果、エクソン B の位置 28 で G から A に変化する、請求項 112 に記載の核酸。

【請求項 116】

該突然変異の結果、腫瘍抑制因子中で G L Y から G L U に変化する、請求項 115 に記載の核酸。

【請求項 117】

該突然変異体がナンセンス突然変異体である、請求項 22 に記載の核酸。

30

【請求項 118】

該ナンセンス突然変異がエクソン H 中に存在する、請求項 117 に記載の核酸。

【請求項 119】

該突然変異の結果、エクソン H の位置 202 で C から T に変化する、請求項 117 に記載の核酸。

【請求項 120】

該突然変異が神経膠腫細胞中で生じたものである、請求項 22 に記載の核酸。

【請求項 121】

該突然変異が前立腺細胞中で生じたものである、請求項 22 に記載の核酸。

【請求項 122】

該突然変異が乳房細胞中で生じたものである、請求項 22 に記載の核酸。

40

【請求項 123】

該突然変異がエクソン A 中の欠失である、請求項 121 に記載の核酸。

【請求項 124】

該突然変異がエクソン A の位置 16 および 17 での A A の欠失である、請求項 123 に記載の核酸。

【請求項 125】

該突然変異がエクソン B 中の位置 53 での C から T への変化である、請求項 121 に記載の核酸。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、腫瘍学、遺伝学および分子生物学の分野に関する。より詳しくは、本発明はヒト染色体10番上の腫瘍抑制因子遺伝子の同定に関する。この遺伝子の欠損は例えば神経膠腫などの癌の発達に関する。

【背景技術】

【0002】

腫瘍形成は、フルズ (Foulds) (1958) (非特許文献1) によって、現在では遺伝的損傷の蓄積によって起こると知られる多段階の生物学的プロセスとして記載された。分子レベルで腫瘍形成の多段階プロセスは陽性調節エフェクターおよび陰性調節エフェクターの両方の崩壊に関する (ワインバーグ (Weinberg)、1989 (非特許文献2))。ヒト結腸カルシノーマの分子基礎は、ボゲルステイン (Vogelstein) およびその同僚たち (1990) によって多数の癌原遺伝子である多数の腫瘍抑制因子遺伝子および修復遺伝子に關与すると仮定した (非特許文献3)。同様に、網膜芽腫の発達に導く欠損は他の腫瘍抑制因子遺伝子に關連付けて考えられた (リー (Lee) ら、1987 (非特許文献4))。さらに別の癌原遺伝子および腫瘍抑制因子が他の多様な悪性腫瘍において同定された。不幸なことに、治療可能な癌が少なからず残されており、癌の影響は破局的である --- 米国単独でも一年に150万人を超える人々が死亡しているのだ。

【0003】

癌の破壊的な本質の一例は、中枢神経系の最も一般的な一次腫瘍である星状細胞系の細胞から得た腫瘍に関する (ラッセル (Russell) およびルビンステイン (Rubinstein) 1989 (非特許文献5))。これらの腫瘍の多数は成人に見られる。一次脳腫瘍もまた、小児科患者における最も一般的な固形癌を占め、15歳未満の子供における癌死の第2の原因である。一次脳腫瘍の推定18,500の新規ケースが1994年には診断された (ボーリング (Boring) ら、1994 (非特許文献6))。疫学的研究により脳腫瘍の発生が増加し、それにより18歳から35歳までの患者の癌死の最も一般的な第3原因を表している。脳内での位置のため、および周辺組織に腫瘍細胞が典型的に侵入するため、一次脳腫瘍の治療に関する発明はしばしば制限される。不幸にも、これらの罹患個体の約3分の2は2年以内で死亡にいたるであろう。成人の最も一般的な頭蓋内腫瘍は神経膠細胞系の細胞から生じ、約48%の神経膠細胞腫多形成 (GBM)、21%の星状細胞腫 (A) (未分化 (AA) および低級) および9%の脳室上衣腫および突起膠腫 (レビン (Levin) ら、1993 (非特許文献7)) の頻度で起こる。

【0004】

一次脳腫瘍の癌発生においていくつかの遺伝子およびその対応するタンパク質産物に關係した遺伝子研究がある。報告された多様な変更には：上皮増殖因子受容体の増幅およびそのリガンド、形質転換増殖因子 - 、N - myc ; gli、変形スプライシングおよび繊維芽細胞増殖因子受容体の発現およびp53、p16、Rb、神経繊維芽細胞腫遺伝子1および2、DCC および染色体番号4、10、17 (p53でないもの)、19、22およびX染色体上の推定腫瘍抑制因子遺伝子である (ウォング (Wong) ら、1987 (非特許文献8) ; エル - アゾウジ (El-Azouzi) ら、1989 (非特許文献9) ; ニシ (Nishi) ら、1991 (非特許文献10) ; ジェームズ (James) ら、1988 (非特許文献11) ; カム (Kamb) ら、1994 (非特許文献12) ; ヘンソン (Henson) ら、1994 (非特許文献13) ; ヤマグチ (Yamaguchi) ら、1994 (非特許文献14) ; ビアンチ (Bianchi) ら、1994 (非特許文献15) ; ランソン (Ranson) ら、1992 (非特許文献16) ; ラシード (Rasheed) ら、1992 (非特許文献17) ; シェック (Scheck) およびクーンズ (Coons)、1993 (非特許文献18) ; フォン・デムリング (Von Demling) ら (非特許文献19) ; ルビノ (Rubino) ら、1994 (非特許文献20) ; リットランド (Ritland) ら、1995 (非特許文献21)) 。

【0005】

最も頻繁に起こる変化にはEGF - 受容体 (~40%)、p53の機能の喪失 (~50%)、p16 (~50%)、Rb (~30%) の増幅および染色体10番上での欠失 (>90%) である。さらに

、星状細胞腫瘍の歴史的な悪性の重度または程度は結腸癌腫当業者同様の遺伝的損傷の蓄積に相関がある。さらに、変化の中には相対的に細胞系譜特異的または等級特異的であるようなものもある。例えば、染色体19qに対する喪失は、オリゴデンドロ神経膠腫中に有意に生じる一方、染色体10およびEGF受容体の増幅および突然変異は主としてGBMsにおいて生じている。コピー全体の欠失または染色体番号10のセグメントの欠失は、一次脳腫瘍の最も一般的な形態であるGBMsに関連する最も一般的な遺伝的事象として強く示されている。

【0006】

GBMs上の細胞遺伝子および後の対立遺伝子欠失の研究は、染色体番号10に関連する頻度が高く伸展した遺伝子変化を明らかに証明した（ビグナー（Bigner）ら、1988（非特許文献22）；ランソン（Ranson）ら、1992（非特許文献16）；ラシード（Rasheed）ら、1992（非特許文献17）；ジェームズら、1988（非特許文献11）；フジモト（Fujimoto）ら、1989（非特許文献23）；ファルツ（Fults）ら、1990（非特許文献24）、1993（非特許文献25）；カールボム（Karlbohm）ら、1993（非特許文献26）；ラシードら1995（非特許文献27）；ソノダ（Sonoda）ら、1996（非特許文献28）；アルパロサ（Albarosa）ら、1996（非特許文献29））。細胞遺伝学的分析によりGBMsにおける一般的な事件として染色体番号の変更が変更を示している腫瘍の約60%により明らかに示された。GBMsの対立遺伝子欠失実験は染色体番号10（90%）と関連のある非常に頻繁である対立遺伝子の不均衡も明らかにした。しかしながら、その喪失は、矛盾しない喪失の染色体上の局在化はこれらの分析によって明らかに定義されることができ喪失は非常に拡張的であり頻繁である。

10

20

【0007】

いくつかの最近の実験は10q25 - 26領域、特にD10S190からD10S216の17cM領域を暗示した。D10S587からD10S216のテロメア領域は染色体番号10の部分的喪失しか示さない、一連の下等および高等神経膠腫を用いて対立遺伝子欠失分析によって暗示されている（ラシードら、1995（非特許文献27））。この領域（~1cM）は失われるかまたは11GBMs、4AA's、1Aおよび乏突起膠腫では無益であり、候補領域の局在を示唆している。この研究はまた、神経膠腫中で起こる染色体10番の欠失を例示した。アルパロサ（Albarosa）ら（1996）はD10S221からD10S209までのマーカーから小児脳腫瘍中の対立遺伝子の欠失に基づく動原体の候補領域を示唆する（非特許文献29）。サヤ（Saya）ら、一連のGBMsを使用することにより欠失の2つの一般的な共有領域である10q26および10q24（D10S192）を示唆している。

30

【0008】

染色体10番の短腕もまた他の腫瘍抑制因子遺伝子を含むことに関係している。研究は、最初に神経膠腫の10p上にある腫瘍抑制因子遺伝子の機能的な証拠を提供し（ステック（Steck）ら、1995（非特許文献30））、後に前立腺に関しても後に示した（サンチェズ（Sanchez）ら、1995（非特許文献31）；ムラカミ（Murakami）ら、1996（非特許文献32））。後の研究は、D10S1172およびD10S527の間の11cM領域を示唆した。神経膠腫の対立遺伝子欠失研究は、10p上でさらに広範囲にわたる欠失を示している。神経膠腫の対立遺伝子欠失研究は10p上での広範囲にわたる欠失を示したが、再度確固たる限局は達成されなかった（カールボム（Karlbohm）ら、1993（非特許文献26）；キンメルマン（Kimmelman）ら、1996（非特許文献33））；染色体10番のこれらの領域は、以下の図1に示される。さらにその上、EGF-受容体の増幅はまた、染色体10における欠失を腫瘍に殆ど排他的に生じることを示し、これらの遺伝的変更間の可能性のある結合を示唆している（フォン・デイムリング（Von Deimling）ら、1992（非特許文献19））。

40

【0009】

長腕上の欠失もまた、前立腺、腎臓、子宮、小細胞肺、子宮内膜癌、meningioma、および急性T細胞白血病などに関して報告されている（カーター（Carter）ら、1990（非特許文献34）；モリタ（Morita）ら、1991（非特許文献35）；ハーブスト（Herbst）ら、1984（非特許文献36）；ジョーンズ（Jones）ら、1994；レンペル（Rempel）ら、1993（非特許文献37）；ペイフェン（Peiffen）ら、1995（非特許文献38）；ピーターゼン（Petersen）ら、1997（非特許文献39））。最近、前立腺癌に関する詳細な研究は（1）染色体10番

50

の短腕および長腕は腫瘍抑制因子遺伝子をはっきりと含有しているようであり、および(2)長腕の抑制因子遺伝子マップでは10q23 - 24境界に局在する(グレイ(Gray)ら、1995(非特許文献40); イットマン(Ittmann)1996(非特許文献41)、トリバス(Trybus)ら、1996(非特許文献42))。これらの3群によって同定した共有欠失領域はD10S215周辺に集中し、約10cMを広げる(図1)。候補領域と重複する領域は、しかしながら該領域内での更なる局在はないことが前立腺癌に関して報告された。前立腺癌と関連する対立遺伝子の喪失はまた、試験した腫瘍の約30 - 40%においてのみ起こると見られている。さらに、欠失は、GBM同様、一層進行した段階の腫瘍中で観察され、転移能力に関連するかもしれない(ニヘイ(Nihei)ら、1995(非特許文献43); コミヤ(Komiya)ら、1996(非特許文献44))。これらの結果の組み合わせによりヒト多発性癌は10q23 - 24領域を暗示することを示唆している。

10

【0010】

候補領域の位置における差異はいくつかの可能性を示唆している。最初に、10q上の2またはそれ以上の腫瘍抑制因子遺伝子の存在を可能にする。第2に、すべてではない欠失が腫瘍抑制因子遺伝子座に影響を及ぼす。これらの代わりは相互に排他的ではない。その後の可能性の支持において、潜在的な中心体は遺伝的変更、特に破損を生じるであろう10q25で起こると示唆される(ボウイライアー(Vouillaire)ら、1993(非特許文献45))。

【0011】

このすべての情報にもかかわらず、該遺伝子(または複数の遺伝子)の同定は10q23 - 24関連腫瘍抑制因子が曖昧であることに関する。特定の遺伝子の同定およびそれをコードするタンパク質の推定なくしてこの産物を標的とする効果的な療法を発達させることは不可能である。したがって、この領域に位置する腫瘍抑制因子を単離することおよびその構造および機能を決定することは重要な目的である。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Foulds, The natural history of cancer. J. Chronic Dis., 8:2-37, 1958.

【非特許文献2】Weinberg, Positive and negative controls on cell growth. Biochemistry, 28:8263-8269, 1989.

30

【非特許文献3】Fearon and Vogelstein, A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, 61: 759-767, 1990.

【非特許文献4】Lee et al., Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. Science, 235:1394-1399, 1987.

【非特許文献5】Russell and Rubinstein, Tumors of the neuroepithelial origin, In: Pathology of Tumors of the Nervous System, 5th ed., Williams and Wilkins, eds., pp. 82-219, 1989.

【非特許文献6】Boring et al., Cancer Statistics, 1994 CA, 43: 7-26, 1994.

【非特許文献7】Levin et al., Neoplasms of the central nervous system. In: Cancer: Principles & Practice of Oncology, 4th ed., DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1993.

40

【非特許文献8】Wong et al., Increased expression of the EGF receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 6899-6903, 1987.

【非特許文献9】El-Azouzi et al., Loss of distinct regions on the short arm of chromosome 17 associated with tumorigenesis of human astrocytomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 7186-7190, 1989.

【非特許文献10】Nishi et al., Differential expression of two types of the neurofibromatosis type 1 gene transcripts related to neural differentiation. Oncogene, 6:1555-1559, 1991.

50

- 【非特許文献 1 1】James et al., Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res.*, 48:5546-5551, 1988.
- 【非特許文献 1 2】Kamb et al., A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 264:436-440, 1984.
- 【非特許文献 1 3】Henson et al., The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. *Ann. Neurol.*, 36:714-721, 1994.
- 【非特許文献 1 4】Yamaguchi et al., Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:484-488, 1994.
- 【非特許文献 1 5】Bianchi et al., Mutations in transcript isoforms of the neurofibromatosis 2 gene in multiple human tumor types. *Nature Genetics*, 6:185-192, 1994. 10
- 【非特許文献 1 6】Ransom et al., Correlation of cytogenetic analysis and loss of heterozygosity studies in human diffuse astrocytomas and mixed oligo-astrocytomas. *Genes Chromosom. Cancer* 5:357-374, 1992.
- 【非特許文献 1 7】Rasheed et al., Loss of heterozygosity for 10q loci in human gliomas. *Genes Chromosom. Cancer*, 5:75-82, 1992.
- 【非特許文献 1 8】Scheck and Coons, Expression of the tumor suppressor gene DCC in human gliomas. *Cancer Res.*, 53:5605-5609, 1993.
- 【非特許文献 1 9】von Deimling et al., Deletion mapping of chromosome 19 in human gliomas. *Int. J. Cancer*, 57:676-680, 1994. 20
- 【非特許文献 2 0】Rubio et al., Analysis of the neurofibromatosis 2 gene in human ependymomas and astrocytomas, *Cancer Res.*, 54:45-47, 1994.
- 【非特許文献 2 1】Ritland et al., Region-specific loss of heterozygosity on chromosome 19 is related to the morphologic type of human glioma. *Genes. Chromosom. Cancer*, 12:277-282, 1995.
- 【非特許文献 2 2】Bigner et al., Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res.*, 48:405-411, 1988.
- 【非特許文献 2 3】Fujimoto et al., Loss of heterozygosity on chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *Genomics*, 4:210-214, 1989. 30
- 【非特許文献 2 4】Fults et al., Allelotype of human malignant astrocytoma, *Cancer Res.*, 50:5784-5789, 1990.
- 【非特許文献 2 5】Fults & Pedone, Deletion mapping of the long arm of chromosome 10 in glioblastoma and multiforme. *Genes Chromosom. Cancer* 7:173-177, 1993.
- 【非特許文献 2 6】Karlsson et al., Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. *Hum. Genet.*, 92:169-174, 1993.
- 【非特許文献 2 7】Rasheed et al., *Oncogene*, 11:2243-2246, 1995.
- 【非特許文献 2 8】Sonoda et al., *Cancer Res.*, 55:2166-2168, 1995.
- 【非特許文献 2 9】Albarosa et al., Deletion mapping of gliomas suggest the presence of two small regions for candidate tumor-suppressor genes in a 17-cM interval on chromosome 10q. *Am. J. Genet.*, 58:1260-1267, 1996. 40
- 【非特許文献 3 0】Steck et al., Evidence for two tumor suppressive loci on chromosome 10 involved in glioblastomas, *Genes Chromosom. Cancer*, 12:255-261, 1995.
- 【非特許文献 3 1】Sanchez et al., Tumor suppression and apoptosis of human prostate carcinoma mediated by a genetic locus within human chromosome 10pter-q11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, pp. 2551-2556, 1996.
- 【非特許文献 3 2】Murakami et al., Suppression of the malignant phenotype of human prostate cancer cell line PPC-1 by introduction of normal fragments of human chromosome 10. *Cancer Res.*, 56:2157-2160, 1996. 50

- 【非特許文献 3 3】Kimmelman et al., Loss of heterozygosity of chromosome 10p in human gliomas. *Genomics* 34:250-254, 1996.
- 【非特許文献 3 4】Carter et al., Allelic loss of chromosome 16q and 10q in human prostate carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:8751-8755, 1990.
- 【非特許文献 3 5】Morita et al., Common regions of deletion on chromosomes 5q, 6q, and 10q in renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 51:5817-5820, 1991.
- 【非特許文献 3 6】Herbst et al., Loss of heterozygosity for 10q22-qter in malignant melanoma progression. *Cancer Res.*, 54:3111-3114, 1994.
- 【非特許文献 3 7】Rempel et al., Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res.*, 53:2386-2392, 1993. 10
- 【非特許文献 3 8】Peiffer et al., Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Res.*, 55:1922-1926, 1995.
- 【非特許文献 3 9】Petersen et al., Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 13q, and 17p. *Brit. J. Cancer* 75:79-86, 1997.
- 【非特許文献 4 0】Gray et al., Loss of chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer Res.*, 55:4800-4803, 1995.
- 【非特許文献 4 1】Ittmann, Allelic loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 56:2143-2147, 1996. 20
- 【非特許文献 4 2】Trybus et al., Distinct areas of allelic loss on chromosomal regions 10p and 10q in human prostate cancer. *Cancer Res.* 56:2263-2267, 1996.
- 【非特許文献 4 3】Nihei et al., Localization of a metastasis suppressor gene(s) for rat prostatic cancer to the long arm of human chromosome 10. *Genes Chromosomes Cancer*, 14:112-119, 1995.
- 【非特許文献 4 4】Komiya et al., Allelic losses at loci on chromosome 10 are associated with metastasis and progression of human prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 17:245-253, 1996.
- 【非特許文献 4 5】Voullaire et al., A functional marker centromere with no detectable alpha-satellite, satellite III, or CENP-B protein: activation of a latent centromere? *Am. J. Hum. Genet.*, 52:1153-1163.1993 30
- 【発明の概要】
- 【0013】
- それゆえ、TS10q23.3と称する腫瘍抑制因子を提供することが本発明の目的である。また、TS10q23.31をコードする遺伝子全体またはその一部を代表するDNAを提供するのも本発明の目的である。これらの組成物を用いる方法を提供することもまた目的である。
- 【0014】
- 前述の目的に従い、TS10q23.3と名付けられた腫瘍抑制因子を1つの態様において提供する。一例において、該ポリペプチドは図7または図9に示されるアミノ酸配列を有する。TS10q23.3と称する腫瘍抑制因子の約10～約50間の連続した残基を持つ単離したペプチドを提供する。該ペプチドは、例えば、KLHまたはBSAなどの担体分子にコンジュゲートしてもよい。 40
- 【0015】
- 他の態様において、TS10q23.3と称する腫瘍抑制因子に免疫学的に結合するモノクローナル抗体を提供する。該抗体は他のヒトポリペプチドとクロス反応しないかまたはヒトの他のTS10q23.3には結合するがヒトTS10q23.3には結合しないものである。該抗体は例えば蛍光標識、化学蛍光標識、放射線標識または酵素などの検出可能な標識をさらに含んでいてよい。また、ハイブリドーマ細胞およびそのような抗体を製造する細胞株をも含む。

【0016】

他の態様には、ポリクローナル抗血清、TS10q23.3と称する腫瘍抑制因子に免疫学的に結合する抗体を含む。該抗血清は任意の動物から得てよいが、好ましくはヒト、マウスまたはイヌ以外の動物からのものである。

【0017】

さらに他の態様において、ある領域、またはその相補領域を含む核酸はTS10q23.3と称する腫瘍抑制因子をコードし、またはその対立遺伝子変異体またはその突然変異体をコードする。腫瘍抑制因子コーディング領域は任意の哺乳類動物から得たものであって良いが、特定の態様においては、マウス、イヌおよびヒトからの配列から選択される。突然変異には、欠失変異体、挿入変異体、フレームシフト変異体、ナンセンス変異体、ミスセンス変異体またはスプライシング変異体を含む。特定の態様において、該腫瘍抑制因子は図9のアミノ酸配列を有する。該核酸は、ゲノムDNA、相補的DNAまたはRNAであってもよい。

10

【0018】

さらに別の態様において、核酸は相補的DNAを含み、さらに該領域に作動可能に結合したプロモーターを含み、またはその相補物を含み、該腫瘍抑制因子をコードする。別の要素には、ポリアデニル化シグナルおよび複製起点を含む。

【0019】

レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスおよびアデノ関連ウイルスなどのウイルスベクターが使用されてよい。該ベクターは「そのままの状態」またはウイルス粒子に納まってもよい。代わりに、該核酸はリボソームに包まれた発現ベクターを含んでいてよい。

20

【0020】

核酸の多様な大きさが考慮されるが、制限されるものではない：約1212塩基、約1500塩基、約2000塩基、約3500塩基、約5000塩基、約10,000塩基、約15,000塩基、約20,000塩基、約25,000塩基、約30,000塩基、約35,000塩基、約40,000塩基、約45,000塩基、約50,000塩基、約75,000塩基および100,000塩基である。

【0021】

さらに別の態様において、核酸の約10～約50の連続した塩基の単離されたオリゴヌクレオチド、TS10q23.3と称する腫瘍抑制因子をコードする単離されたオリゴヌクレオチドおよびその相補物を提供する。該オリゴヌクレオチドは長さ約15塩基、約17塩基、約20塩基、約25塩基または約50塩基であってよい。

30

【0022】

さらに別の態様において、(i)被験者からサンプルを入手し；ついで(ii)該サンプルにおける機能的なTS10q23.3腫瘍抑制因子の発現を決定する工程を含む、癌の診断方法を提供する。癌は、悪性脳腫瘍、肺癌、肝臓癌、脾臓癌、腎臓癌、悪性リンパ腫、小腸癌、膵臓癌、血液細胞の癌、胃癌、乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌、睾丸癌、卵巣癌、皮膚癌、頭頸部癌、食道癌、骨髄癌および血液の癌であってよい。好ましい態様において、該癌は前立腺癌または乳癌である。他の好ましい態様において、癌は、例えば悪性脳腫瘍、神経膠腫などである。該サンプルは組織または液体サンプルである。

40

【0023】

ある一形式において、該方法は該サンプルからの核酸のアッセイに関する。該方法は、さらに該核酸を増幅するために適当な条件にサンプルをかけることを含む。代わりに、該方法は該サンプルを例えばELISAなどでTS10q23.3に免疫学的に結合する抗体を接触させることを含んでいてよい。形式にかかわらず、比較には、TS10q23.3の発現と癌でないサンプル中のTS10q23.3を比較することを含む。該比較はTS10q23.3発現のレベルを見てよい。代わりに、該比較はTS10q23.3遺伝子、タンパク質または転写物の構造を評価することを含んでいてよい。そのような形式はシーケンシング、野生型オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、突然変異オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、SSCP、PCR、およびRNアーゼ保護を含んでいてよい。特定の態様は、オリゴヌクレオチドがチップまたはウェーハー上に列を形成する野生型または突然変異オリゴヌクレオチドハイブリダイゼ

50

ーションを評価することを含む。

【0024】

他の態様において、該腫瘍細胞によって腫瘍抑制因子の取り込みを可能にする条件下、TS10q23.3と称する腫瘍抑制因子と該細胞を接触させる工程を含む腫瘍細胞の表現型を変更する方法を提供する。該腫瘍細胞は脳、胚、脾臓、腎臓、リンパ節、卵巣、皮膚、頭頸部、食道、骨髄および血液組織などの組織から由来してよい。該表現型は、増殖、移動、接触阻害、軟アガー増殖または細胞周期から選択されてよい。該腫瘍抑制因子はリボソームに包み込まれるかまたは自由な状態であってもよい。

【0025】

別の態様において、(i) TS10q23.3と称する腫瘍抑制因子をコードする核酸および(ii) 該腫瘍細胞中で活性であるプロモーターであって、該プロモーターは該腫瘍細胞によって核酸の取り込みを可能にする条件下で、腫瘍抑制因子をコードする領域に作動可能に結合しているものと該細胞を接触させる工程を含む腫瘍細胞の表現型を変える方法を提供する。該表現型は、増殖、移動、接触阻害、軟アガー増殖または細胞周期であってよい。該核酸はリボソームに包み込まれていてよい、該核酸がレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスおよびヘルペスウイルスである場合、ウイルス粒子に包まれていてもよい。

【0026】

さらに別の態様において、(i) TS10q23.3と称する腫瘍抑制因子をコードする核酸および(ii) 該腫瘍細胞中で活性であるプロモーターであって、該プロモーターは該腫瘍細胞によって核酸の取り込みを可能にする条件下で、腫瘍抑制因子をコードする領域に作動可能に結合しているものと該細胞を接触させる工程を含む腫瘍を治療する方法を提供する。被験者はヒトであってよい。

【0027】

さらに別の態様において、TS10q23.3をコードする遺伝子の両方のコピーが妨害されるかまたは他の遺伝子と置き換わるトランスジェニック哺乳動物を提供する。

【0028】

さらに別の態様において、(i) 被験者からサンプルを入手し；ついで(ii) 該サンプル中の細胞の機能的TS10q23.3腫瘍抑制因子の発現を決定する工程を含む癌の程度を決定する方法を提供する。該癌は悪性脳腫瘍であり、その程度は初期の癌および神経膠腫とははっきり区別される。その決定はTS10q23.3核酸または該サンプル中のポリペプチドのアッセイを含んでいてよい。

【0029】

さらに別の実施例において、(i) 被験者からサンプルを入手し；ついで(ii) 該サンプル中の細胞中で機能的TS10q23.3腫瘍抑制因子の発現を決定する工程を含む腫瘍転移を推定する方法を提供する。該癌は、転移性および非転移性として区別されるであろう。その決定には、TS10q23.3核酸または該サンプル中のポリペプチドのアッセイを含んでいてよい。

【0030】

さらに別の態様において、(i) 機能的TS10q23.3ポリペプチドを欠如している細胞を提供し；(ii) 候補基質と該細胞を接触させ；ついで(iii) 該細胞に及ぼす候補基質の効果を決定する工程を含む抗腫瘍活性の候補基質をスクリーニングする方法を提供する。該細胞は、腫瘍細胞、例えばTS10q23.3.7のコーディング領域における突然変異を持つ腫瘍細胞であってよい。該突然変異体は欠失変異、挿入変異、フレームシフト変異、ナンセンス突然変異、ミスセンス突然変異またはスプライシング突然変異であってよい。その決定には、候補基質の存在下での1またはそれ以上の細胞の特徴を、候補基質の不在下での細胞の特徴と比較することを含んでいてよい。その特徴は、TS10q23.3発現、ホスファターゼ活性、増殖、転移、接触阻害、軟アガー増殖、細胞周期調節、腫瘍形成、腫瘍の進行および組織浸潤であってよい。候補基質は、化学療法剤または放射線治療剤または小分子ライブラリーから選択されるものであってよい。該細胞はイン・ビトロまたはイン・ビボで

10

20

30

40

50

接触されてよい。

【0031】

さらに別の態様において、(i)少なくとも1つのチロシンキナーゼ部位を含むTS10q23.3ポリペプチドを持つことを提供し；(ii)該細胞を候補基質と接触させ；ついで(iii)候補基質が該部位のリン酸化に及ぼす影響を決定する工程を含む、抗キナーゼ活性の候補基質をスクリーニングする方法を提供する。その決定には、候補基質の存在下での1またはそれ以上の細胞の特徴を候補基質の不在下での細胞の特徴と比較することを含んでよい。その特徴は、TS10q23.3のリン酸化された状態、TS10q23.3の発現、ホスファターゼ活性、増殖、転移接触阻害、軟アガー増殖、細胞周期調節、腫瘍形成、腫瘍の進行および組織浸潤であってよい。候補基質は、化学療法剤または放射線治療剤または小分子ライブラリーから選択されるものであってよい。該細胞は、イン・ピボまたはイン・ピトロで接触してもよい。

10

【0032】

配列のまとめ

配列番号：1 = TS10Q23.3の推定配列；配列番号：2 = ヒト遺伝子配列；配列番号：3 = マウス遺伝子配列；配列番号：4 = イヌ遺伝子配列；配列番号：5 = ヒトペプチド配列；配列番号：6 = マウスペプチド配列；配列番号：7 = イヌペプチド配列；配列番号：8 = エクソンa；配列番号：9 = エクソンb；配列番号：10 = エクソンc；配列番号：11 = エクソンd；配列番号：12 = エクソンe；配列番号：13 = エクソンf；配列番号：14 = エクソンg；配列番号：15 = エクソンh；配列番号：16 = エクソンi；配列番号：17 = 88 ~ 98までの残基かのモチーフ；配列番号：18 = チロシンホスファターゼタンパク質の保存された触媒部位（デュ（Denu）1996）；配列番号：19 = 野生型TS10q23.3ポリペプチドの1 ~ 60残基；配列番号：20 = T98G突然変異TS10q23.3ポリペプチドの1 ~ 60残基；配列番号：21 = KE変異体TS10q23.3ポリペプチドの1 ~ 60残基である。

20

【図面の簡単な説明】

【0033】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明のさらにある側面を証明するべく含まれている。本発明は、本明細書に開示された特定の態様の詳細な記載と併せてこれらの図面の1またはそれ以上を参照することにより、一層よく理解されるであろう：

【図1】ヒト染色体番号10番上の腫瘍抑制因子遺伝子座の候補の位置。ヒト染色体番号10番上の多様な遺伝子座は腫瘍抑制活性の部位でありえるものとして示された。これらの遺伝子座および報告したグループを記載している。

30

【図2】神経膠腫細胞株中の同種欠失の例示。多様な神経膠腫細胞株を染色体番号10番の遺伝子座の両方のコピーにおける欠失の存在に関してスクリーニングした。遺伝子座は垂直軸上に示され、かつ水平軸を横切るように、挙げられている。同種の喪失は色付き楕円によって示されている。

【図3】染色体番号10番の例示：ハイブリッドクローン中のDNA微小衛星マーカの存在または不在。マウスA9細胞にトランスファーした体細胞ハイブリッドクローンU251.N10.7の11のサブクローンからの微小衛星マーカに特異的な染色体番号10番に対応するDNAの存在（塗りつぶした円）または不在（中抜き円）染色体番号10番の領域を示す。U251.N10.6およびU251.N10.8体細胞ハイブリッドは完全に抑圧されたクローンであり、軟アガロス中で全く増殖を示さないか殆ど増殖を示さず、また、U251.N10.5AおよびCサブクローンは部分的に抑圧されている（ステック（Steck）ら、1995）。完全に抑圧されたクローンと部分的に抑圧されたクローンとの差異は、腫瘍抑制因子遺伝子の機能的な局在を提供する。腫瘍抑制因子遺伝子を含む可能性のある領域は、ボックスによって示されている。10q23.3のボックスでは同種欠失と対立遺伝子欠失分析によって示された領域と重複する（図2および図4参照）。

40

【図4】ヒト神経膠腫における染色体番号10番の欠失マップ。D10S551からD10S583までのマーカによって区切られた領域は10cM領域に位置している。微小衛星は、最も確率的にありそうな結合順で示され、ギアペイ（Gyapay）ら、1994によって記載されるように放射

50

ハイブリッドマップに基づいたおよその染色体位置にマッピングされている。未分化アストロサイトーマおよび1つの神経膠腫には関係がない染色体番号101番の領域は、該腫瘍のボックス領域に示されている。同種欠失分析から定義され、この分析によって排除されない重要な領域は右側の実線によって示す。

【図5】BAC 106d16のマッピング。106d16と称するBACのマッピングおよびサザンブロットティングによる同種欠失の証明を示す。106d16の部分的な制限マップを示す。そのブロットティングの説明をEFC-2細胞におけるEcoバンド番号#14(Mr 約11kb)の同種の欠失を示す。

【図6】TS10q23.3のコーディング配列および-5'-および3'-フランキング領域。コーディング領域を太字で、最初にイン・フレームでストップコドンがあるように示している。

【図7】TS10q23.3産物の推定アミノ酸配列。略語は、Aはアラニン；Cはシステイン；Dはアスパラギン酸；Eはグルタミン酸；Fはフェニルアラニン；Gはグリシン；Hはヒスチジン；Iはイソロイシン；Kはリジン；Lはロイシン；Mはメチオニン；Nはアスパラギン；Pはプロリン；Qはグルタミン；Rはアルギニン；Sはセリン；Thaトレオニン；Vはバリン；Wはトリプトファン；Yはチロシンである。ホスファターゼ同一部位は太字で表す；チロシンリン酸化部位はイタリック体で示し、下線を付している。

【図8】10q23.3の欠失分析。10q23.3における同種の欠失を持つと最初に示されている神経膠腫株をTS10q23.3の存在に関して再度分析した。塗りつぶした円はその遺伝子領域が存在することを示し；中抜き円は遺伝子領域中の同種の欠失を示している。*はトラップされたエクソンを示す。

【図9-1】ヒト10q23.3とマウスおよびイヌホモログとのホモロジー比較。開始ATGコドンおよびメチオニンアミノ酸をスタート(1)ポジションで設計している。終結コドンはTGA(1210)である。ゲノムまたはアミノ酸レベルでのヒトおよびマウスまたはイヌの配列間の変更を比較された配列において星に示している。

【図9-2】図9-1の続きを示す図である。

【図9-3】図9-2の続きを示す図である。

【図9-4】図9-3の続きを示す図である。

【図9-5】図9-4の続きを示す図である。

【図9-6】図9-5の続きを示す図である。

【図9-7】図9-6の続きを示す図である。

【図9-8】図9-7の続きを示す図である。

【図9-9】図9-8の続きを示す図である。

【図10-1】TS10q23.3のエクソン配列および周辺イントロン領域。エクソンは開始部位1で大文字で示しており、イントロンは小文字で示している；開始コドンが第1位で始まり、3'エクソン/イントロン境界がそれぞれ79と80位である最初のエクソンは除く。小文字は(表4)、最初のエクソンを除き、この図に存在する配列の数に対応している。U87およびU138の突然変異はエクソン(それぞれGおよびH)の後最初のイントロンG残基[G+I>T]である。T98GおよびKEに関して、点突然変異はそれぞれエクソンBの46位および28位である。LnCap細胞に関して、突然変異は最初のイントロンにおける塩基16および17の欠失である。

【図10-2】図10-1の続きを示す図である。

【図10-3】図10-2の続きを示す図である。

【図10-4】図10-3の続きを示す図である。

【図10-5】図10-4の続きを示す図である。

【図11-1】TS10q23.3における第二構造の分析。図11A：親水性プロット；図11B：表面確率(Surface probability)プロット；図11C：可撓性プロット；図11D：抗原価プロット；図11E：両親媒性ヘリックスプロット；図11Fは両親媒性シートプロット；図11Gは第二構造プロットである。

【図11-2】図11-1の続きを示す図である。

10

20

30

40

50

【図12-1】TS10q23.3における推定の特徴の比較および点突然変異T98GおよびKE。図12A：野生型ポリペプチドの1-60残基の親水性プロット；図12B：野生型ポリペプチドの1-60残基の表面確率プロット；図12C：野生型ポリペプチドの1-60残基の二次構造プロット；図12D：KE変異体の1-60残基の親水性プロット；図12E：KE変異体の1-60残基の表面確率プロット；図12F：KE変異体の1-60残基の第二構造プロット；図12G：T98G変異体の1-60残基の親水性プロット；図12H：T98G変異体の1-60残基の表面確率プロット；図12I：T98G変異体の1-60残基の第二構造プロット。TS10q23.3の42残基でのT98G突然変異（Leu Arg）は、TS10q23.3の提供されたヘリックス第二構造の喪失を生じる。KEの36残基でのT98G突然変異（Gly Gly）は、その領域における提案されたヘリックス第二構造のオリゴヌクレオチド長さを有意に増加させる。両突然変異は同じヘリックス構造に影響を及ぼすであろう。また親水性における少しの変化および表面確率は上昇する。

10

【図12-2】図12-1の続きを示す図である。

【図12-3】図12-2の続きを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0034】

好ましい態様の詳細な説明

1. 本発明

上記に述べたとおり、複数の異なるグループがヒト染色体番号10番の10q領域に関連する腫瘍抑制活性の証拠を示してきた。この多数の業績にもかかわらず、活性を担う遺伝子または複数の遺伝子の同定は決定されていない。腫瘍発生神経膠腫細胞に腫瘍抑制因子遺伝子を宿すと疑われる、染色体または染色体の断片のトランスファーに關与する機能的なアプローチを以前には使用した。これらの努力の結果により、推定腫瘍抑制因子遺伝子の生物学的活性の定義を可能にし、そのような局在化に対する援助を可能にした。染色体2および10はU251神経膠腫細胞にトランスファーされ、また、染色体2および10はLG-11細胞にもトランスファーされた。LG-11細胞は染色体10のそのままのコピーを持たないことを示しており、続いてその中止点は10q24で起こるとわかった。染色体番号10番のトランスファーにより抑制された表現型を示すハイブリッド細胞を生じ、腫瘍発生性を喪失して示し（腫瘍の形成はない）および軟アガロース中で増殖させることができる能力の喪失（50Xから1000Xの減少；パーサハウス（pershouse）ら、1993）を示す。そのハイブリッドの指数関数的増殖速度は親細胞に類似であるが、ハイブリッド細胞の飽和密度は親細胞より有意に低い（10Xから20X）。染色体番号2番のトランスファーは親細胞同様に作用するハイブリッド細胞を生じる。

20

30

【0035】

本研究の1つの目的はネオマイシンタグをつけた染色体番号10番の断片化により染色体番号10番の抑制因子遺伝子の局在を行ない、その後、神経膠腫細胞に断片化した染色体をトランスファーすることである。しかしながら本発明者らはハイブリッド細胞のいくつかが自発的に染色体再配列を受け、挿入された染色体10番の多様な領域しか保有しないハイブリッド細胞を製造することを観察した（パーサハウスら、1993）。ついで本発明者らは、断片化実験を開始する代わりに、そのハイブリッドをサブクロニングし、分析した（ステック（Steck）ら、1995）。挿入された染色体番号10番またはその断片の保有は、情報を与える有益なRFLPマーカーおよびFISH分析によって突き止められた。興味深いことに、挿入された染色体のみが再配列を受ける。染色体番号10番の完全なコピーの挿入は、軟アガロース中で増殖させ、ヌードマウス中で腫瘍を形成するハイブリッド細胞の形質転換した特質の阻害を生じる。

40

【0036】

これらの2つの表現型は、現在、即時分析によって部分的に分離可能であるようである。いくつかのサブクローン（U251.N10.5a-j）は染色体番号第10番の長腕の主要部分の喪失を明らかにし、軟アガー中で増殖し、ヌードマウス中で腫瘍を形成することに失敗し、よって、染色体（10pterから10q11）の残りの部分に腫瘍抑制性の遺伝子座が存在することを示している。対照的に、長腕、10q24から10q26にかけての遠位領域を保有するクロー

50

ンは、軟アガロース中でもヌードマウス中でも増殖できなかった（図4参照）。これは該染色体の遠位領域にある別の表現型の抑制性領域を示唆する。別の10 - 関連物質の欠如はさらに、染色体番号10番の残りの物質が変更された生物学的表現型を担うことを示唆している。これらの結果は神経膠腫親交に関する染色体番号10番上の2つの表現型上独立の抑制領域の存在を示している（ステック（Steck）ら、1995）。

【0037】

本発明により、本発明者らは、神経膠腫、乳癌、前立腺癌および他の癌に関係するTS10q23.3と称する腫瘍抑制因子遺伝子を局在化するいくつかの独立した方策を使用した。これらの方法は、以下の実施例に一層詳細に記載されており、(i)一連のヒト神経膠腫細胞株中での同種の欠失の同定；(ii)腫瘍発生性に関して抑圧されたクローン中での保有の一致領域の決定；および(iii)神経膠腫の多様な程度と対応する正常サンプルに関する対立遺伝子欠失研究を含む。該遺伝子を操作すると、現在、ヒト癌に関連する新規診断および治療方法を発達させる遺伝子によってコードされる情報を利用することができるようである。

10

【0038】

II. 10q23.3腫瘍抑制因子

本発明により、10q23.3遺伝子座中の遺伝子によってコードされ、本明細書においてはTS10q23.3と称する腫瘍抑制因子を同定した。この分子は多様な癌において腫瘍の表現型を抑制することができる。腫瘍抑制因子なる語句は当業者にはよく知られている。他の腫瘍の例としては、少し挙げるとp53、Rbおよびp16である。これらの分子は構造的に顕著である一方、TS10q23.3が成員である機能的に関連のある分子の群を形成する。これらのほかの腫瘍抑制因子が現在開発されている使用法は、同様に本明細書において応用可能である。

20

【0039】

全TS10q23.3分子に加えて、本発明はまた、腫瘍抑制（または他の）活性を保有しているか、またはしていないポリペプチドの断片に関連する。該分子のN - 末端を含む断片はコーディング領域内に翻訳停止部位を遺伝的に操作することによって製造されてもよい（以下に議論する）。代わりに、例えばプロテアーゼとして知られるタンパク質分解酵素でTS10q23.3分子の処理により多様なN - 末端断片、C - 末端断片および内部の断片を製造することができる。断片の例には、長さ6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、75、80、85、90、95、100、200、300、400またはそれを超えるのアミノ酸の図7および図9に与えられている配列の隣接残基を含んでよい。これらの断片は沈殿（例えば硫酸アルミニウム）、HPLC、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー（イムノアフィニティークロマトグラフィー）または多様なサイズ分離（体積、ゲル電気泳動、ゲル濾過）などの公知の方法により精製されてよい。

30

【0040】

A. ポリペプチドの構造上の特徴

TS10q23.3の遺伝子は403アミノ酸ポリペプチドをコードする。この分子の推定分子量47,122である。したがって、最少限でこの分子は、分子量およびpIが試験されるアッセイにおいて標準として使用されてもよい。

40

【0041】

122 - 131残基に位置するホスファターゼ一致部位は、配列： p1411行 のチロシンホスファターゼ(PTP)同一配列を完全にマッチする。活性化ドメインの外側は配列は非常に異なっている。PTPsはリン酸化酵素中間体を通して進む。該酵素反応は、システインのチオラートアニオンにより基質のリン原子の核親和性攻撃後のリン酸システイン中間体の形成に関する酵素反応に関する。その反応は2段階化学的プロセスとして代表されることができる：脱リン酸化産物の急激な放出により伴われる酵素にリン酸基転移；およびリン酸の急激な放出に付随してリン酸チオール中間体の加水分解である。触媒競合要素複体を形成するために、酵素がリン酸含有基質の2価陰イオンと反応する。酵素上で、アス

50

パラギン酸は陽子を加えられなければならない、核親和性システインは、酵素にリン酸基転移に関して2価陽イオンと反応しない(チオラートアニオン)。また、233 - 240および308 - 315残基で位置するチロシンリン酸化が可能なことおよび128、164、223および335残基で位置するcAMPリン酸化にも注目する。ホスファターゼはキナーゼ部位を持つと知られ、これらの酵素のリン酸活性は、これらの部位でのリン酸化により調節されることができる。一般的にプロテインホスファターゼは2つの部類に分類される - セリン/トレオニンホスファターゼおよびチロシンホスファターゼである。チロシンホスファターゼのあるものはまた、ホスホセリンおよびホスホトレオニンに対する活性を持つ。

【0042】

キナーゼおよびホスファターゼ間の相互作用およびポリペプチドの多様なリン酸化状態は細胞生理学において重要な特徴として証明される。多様なメカニズムにより、キナーゼおよびホスファターゼはシグナル伝達、エネルギー保存および細胞調節に関する細胞内の異なる経路で作用する。形質転換タンパク質src(コレット(Collet)およびエリクソン(Erickson)、1978)中の内在性チロシンキナーゼ機能の同定、特にチロシン残基でのリン酸化の役割は細胞増殖および癌の誘発に重要な役割を演じる(ハンター(Hunter)1991; Bishop, 1991)。プロテインホスファターゼが増殖調節において果たす役割は、その他の多くの生物学的生化学的活性同様に生物学的に重要な分子のリン酸化状態に相関する(コーエン(Cohen)、1994)。

【0043】

該分子のN-末端の60程度のアミノ酸はtensinなる接着ブランクに示される細胞骨格タンパク質に幾分のホモロジーを示す。これはTS10q23.3点突然変異が接触障害、侵入、移動または細胞-細胞間シグナル伝達において関与するであろうことを示唆している。ある腫瘍細胞株中に同定されたTS10q23.3点突然変異はこの領域中で二次的に提案された構造に影響を及ぼす。

【0044】

B. 機能的側面

本発明はTS10q23.3または「野生型」活性の機能をいう場合、問題となっている分子は、悪性状態、すなわち任意の種類 of 異常な増殖調節または例えば、異常状態から転移の妨害または侵入性腫瘍の増殖を妨害するために非常に悪性の状態へと形質転換するのを阻害する能力を持つことを意味する。正常なTS10q23.3遺伝子産物によって調節されるとみなされるであろう他の表現型は血管形成、接着、移動、細胞-細胞シグナル伝達、細胞増殖、細胞分化、密度依存性増殖、固定(anchorage)依存性増殖およびそのほかのものである。どの分子がこの活性を持つのかという決定は当業者によく知られたアッセイを用いて決定されてよい。例えば、TS10q23.3またはその変異体をコードする遺伝子を機能的TS10q23.3産物を持たない細胞へと形質転換することおよびそれにより不完全な増殖コントロールを示すものは増殖抑制のためにTS10q23.3機能を持つ分子を同定する。

【0045】

上記の通り、TS10q23.3はホスファターゼであるというきざしがある。残基88から98に位置するチロシンタンパク質の保存された触媒ドメインに完全に合致している。また、推定キナーゼ標的は分子中に局在し、ホスファターゼの他の特徴である。他の腫瘍抑制因子はこの種の活性を同定しているので、TS10q23.3の腫瘍抑制におけるホスファターゼ機能を決定するのが望ましいであろう。これはまた、TS10q23.3機能の不在に関するスクリーニングアッセイを発展させるのに、または癌治療の開発に、例えばTS10q23.3のホスファターゼ機能を標的化すること、TS10q23.3が作用する基質を標的化すること、および/またはTS10q23.3に作用を及ぼすキナーゼまたは複数のキナーゼを標的化することに有利な方法であろう。

【0046】

C. TS10q23.3の変異体

該ペプチドのアミノ酸配列変異体は置換、挿入または欠失変異体であり得る。欠失変異体は機能的活性、または免疫原性活性に必須ではないそのままのタンパク質の1またはそ

10

20

30

40

50

れ以上の残基を欠如し、上記の膜貫通配列を欠如した変異体によって例示される。欠失変異体の別の一般的なタイプは、1つの欠如分泌シグナル配列または細胞の特定の部位に結合するタンパク質に関するシグナル配列である。挿入変異体は、典型的に該ポリペプチド中の末端点ではない点でさらなる物質に関係する。これは免疫応答性のエピトープまたは単純に単一残基の挿入を含む。終末の付加、いわゆる融合タンパク質は以下で議論する。

【0047】

置換変異体は典型的にはタンパク質内の1またはそれ以上の別のアミノ酸の交換を含み、他の機能または特性の喪失なしにタンパク質分解による開裂に対しての安定性などのポリペプチドの1またはそれ以上の特性を調節するために設計されていてもよい。この種の置換は、好ましくは保存的であり、すなわち一つのアミノ酸が同様の形および変化のうちの1つで置換されている。保存された置換は当該技術においてよく知られており、かつ例えば変更を含む：アラニンからセリンへ；アルギニンからリジンへ；アスパラギンからグルタミンまたはヒスチジンへ；アスパラギン酸からグルタミン酸へ；システインからセリンへ；グルタミンからアスパラギンへ；グルタミンからアスパラギン酸；グリシンからプロリンへ；ヒスチジンからアスパラギンまたはグルタミンへ；イソロイシンからロイシンまたはパリンへ；ロイシンからパリンまたはイソロイシンへ；リジンからアルギニンへ；メチオニンからロイシンまたはイソロイシンへ；フェニルアラニンからチロシン、ロイシンまたはメチオニンへ；セリンからトレオニンへ；トレオニンからセリンへ；トリプトファンからチロシンへ；チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニンへ；およびパリンからイソロイシンまたはロイシンへの変更を含む。

10

20

【0048】

以下はタンパク質のアミノ酸の変更に基づき、改良されてさえおり、第2世代分子であり、議論がなされている。例えば、あるアミノ酸は、抗体の抗原部位または基質の分子上の結合部位などの構造と結合能力の相互性の応用可能な喪失なしにタンパク質構造中で置換されているのであろう。その相互作用的能力およびタンパク質の生物学的機能的な活性を定義するので、あるアミノ酸置換体はタンパク質配列中、およびその基礎にあるDNAコーディング領域で製造されることができ、やはり所有物であるのようにタンパク質を入手する。ゆえに、以下に議論するように、生物学的な有用性または活性の適用可能な喪失なしに遺伝子のDNA配列はにおいて多様な変更がなされるであろうということが本発明者らにより考えられている。

30

表1はある独特のアミノ酸をコードするコドンを示している。

【0049】

そのような変化、アミノ酸のヒドロパシー価 (hydropathic index) が考慮されていよい。親水性アミノ酸指標が当該技術分野において一般的に理解されているタンパク質上で相互作用的に生物学的機能値が存在する (カイト (Kyte) およびドゥーリトル (Doolittle), 1982)。アミノ酸の相対的にヒドロパシー特徴は得られたタンパク質の二次構造に貢献し、今度は、該タンパク質と他の分子の相互作用を定義する、例えば酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などである。

【0050】

各アミノ酸は、その疎水性および帯電特徴を基礎に割り当てられる (カイトおよびドゥーリトル)：イソロイシン (+4.5)；パリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン/シスチン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (0.4)；トレオニン (0.7)；セリン (0.8)；トリプトファン (0.9)；チロシン (1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-3.2)；グルタミン酸 (-3.5)；アスパラギン酸 (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；リジン (-3.9)；およびアルギニン (-4.5)である。

40

【0051】

あるアミノ酸は同様のヒドロパシー指価またはスコアを持つ他のアミノ酸によって置換されてもよいし、同様の生物学的活性、すなわち生物学的機能が同等であるタンパク質をさらに入手することになってもよいことは当業者には明らかである。そのような変化を起

50

こす場合、ヒドロパシー値がおおよそ2以内であることが好ましいアミノ酸の置換を起こす場合に、指数がおおよそ1以内であるものが特に好ましく、またさらに0.5以内であるものが特に好ましい。

【0052】

アミノ酸のような置換がヒドロパシーに基づき効果的に作成されることができるとまた理解される。米国特許第4,554,101号（参照のため本明細書に引用する）はその近隣のアミノ酸のヒドロパシーによって支配されるようなタンパク質の最も偉大な局在化した平均的なヒドロパシーがタンパク質の特性に相関する。米国特許第4,554,101号に詳細に記載されるように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割当てられている：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0±1）；グルタミン酸（+3.0±1）；セリン（+0.3）；アスパルギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；トレオニン（0.4）；プロリン（0.5±1）；アラニン（0.5）；ヒスチジン*（0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）；トリプトファン（-3.4）である。

10

【0053】

アミノ酸がタンパク質の同様の親水性値を持つアミノ酸に置換することが可能であることおよび生物学的同等性タンパク質とおよび免疫学的同等性タンパク質をさらに入手できることが理解されている。そのような変化において、その親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、その値が±1以内であるものが特に好ましく、そしてその値が±0.5以内が一層さらに好ましい。

20

【0054】

上記概説のように、アミノ酸置換は一般的にアミノ酸側鎖置換基の相対的な類似性、例えば、その疎水性、親水性、帯電性、大きさなどの類似性に基づく。多様な前記の特徴を考慮する例示的置換基は当業者によく知られており、：アルギニンおよびリジン、グルタミン酸およびアスパルギン酸、セリンおよびトレオニン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；およびバリン、ロイシンおよびイソロイシンが挙げられる。

【0055】

本発明のポリペプチドの調製の別態様は、ペプチド模倣体（mimetics）の使用である。模倣体はタンパク質の二次構造の要素を模倣するペプチド含有分子である。例えば、ジョンソン（Johnson）ら、バイオテクノロジー・アンド・ファーマシー（BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY）、ペズト（Pezzuto）ら、編、チャプマン（Chapman）およびホール（Hall）、ニューヨーク（1993）中の「ペプチド・ターン・ミメティクス（Peptide Turn Mimetics）」参照。ペプチド模倣体の使用に隠れている潜在的な理論的根拠はタンパク質のペプチド骨格は主として抗体および抗原のアミノ酸などの分子相互作用を促進するためのような方法においてアミノ酸側鎖を正しく判断することに存在する。ペプチド模倣体は天然の分子に類似の分子相互作用を可能にするように期待されている。これらの主義は、上記主義概説に関連して使用され、TS10q23.3の多数の天然の特性を持つ第2世代の分子を操作することに使用してよい。

30

【0056】

D. ドメインスイッチング

実施例に記載するように、本発明者らはヒトTS10q23.3遺伝子の推定マウスホモログおよびイヌホモログを同定した。さらに、突然変異はその機能を変更すると信じられているTS10q23.3に同定されてきている。これらの実験は、少なくとも2つの理由にとって重要である。最初に、それらはこの遺伝子のさらに別のホモログ、対立遺伝子変異体および突然変異体が関連の種、例えば、ラット、ウサギ、サル、テナガザル、チンパンジー、ヒトニザル、ヒヒ、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジおよびネコなどの種に存在していてもよい合理的な予測を提供する。これらのホモログ、変異体および突然変異体の単位rに関して八工、タンパク質の分析に関連して、ある活性ドメインまたは機能的ドメインが同定されることができ。第2に、これは該分子のさらに変異分析の出発点を提供するであろう。この情

40

50

報が開発されることができ一つの方法が「ドメインスイッチング」にあるのである。

【0057】

ドメインスイッチングは、異なっているがこの場合では関連するポリペプチドを使用してキメラ分子の製造に係る。該マウス、イヌおよびヒトのTS10q23.3の配列をタンパク質の種のTS10q23.3の配列と比較し、また、これらのポリペプチドの突然変異体および対立遺伝子変異体と比較することによって、これらの分子の機能的に重要な領域に関する推定を行なうことができる。ついで、これらの領域のTS10q23.3機能に対する重要性を決定する努力において、これらの分子の関連ドメインスイッチをいれることが可能である。これらの分子は、これらの「キメラ」が天然の分子から区別可能であるということにおける別の価値を持っていてよく、同じ機能を提供する可能性も一方ではある。

10

【0058】

配列同一性にに基づき、マウス、イヌおよびヒト配列のアミノ酸レベルにおいて、該分子の一次配列における小さな変化でさえ機能に影響を及ぼすことが推論されてもよい。さらに別の突然変異体の分析および二次構造に影響を及ぼす推定される効果がこの理解に添加するであろう。

【0059】

ドメインスイッチング実験の豊富な基礎を提供するTS10q23.3の構造上の別の側面はチロシンフォスファターゼ様ドメインおよび推定チロシンリン酸化ドメインである。このドメインは、この機能の特異性を変更するための他のフォスファターゼドメインに適している。さらにTS10q23.3のと他のホスファターゼ間のホモロジーの調査はこの観察によって保証されている。

20

【0060】

F. 融合タンパク質

挿入変異体の特定化した種は融合タンパク質である。この分子は一般的に、第2のポリペプチドのすべてまたは一部にN-末端またはC-末端に結合したそのままの分子のすべてもしくは実質的な部位を有する。例えば、融合は典型的に異種性宿主におけるタンパク質の組換え発現を可能にするタンパク質の種からのリーダー配列を使用する。タンパク質の有用な融合タンパク質には例えば、抗体エピトープなどの免疫学的に活性のあるドメインを融合タンパク質の精製を容易にするために付加することを含む。融合接合部位またはその近辺部位に開裂部位が含まれることにより、精製後の的外れの除去を容易にするであろう。タンパク質の有用な融合には、例えば酵素からの活性部位、グリコシル化ドメイン、細胞標的化シグナルまたは膜貫通領域からの活性部位などの機能的なドメインの結合を含む。関心のある1つの特定の融合には、TS10q23.3のホスファターゼ部位の欠如しているが、その基質分子を結合することができるそのタンパク質の領域を含む欠失構築物を含むであろう。

30

【0061】

F. タンパク質の精製

TS10q23.3またはその変異体を精製するのは望ましい。タンパク質精製技術は当業者によく知られている。これらの技術には、ある一定のレベルにおいて、ポリペプチドおよび非ポリペプチド断片に対する細胞環境の大まかな分別に係る。他のタンパク質からのポリペプチドを分離すると、関心のあるポリペプチドは、さらにクロマトグラフィーおよび電気泳動技法を用いたさらなる精製により部分的精製または完全な精製（または均一性に対する精製）を行なう。特に純粋なペプチドの調製に適している分析方法はイオン交換クロマトグラフィー、排除クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法である。ポリペプチドの精製に特に有効な方法は、高速タンパク質液体クロマトグラフィーであるかまたはHPLCである。

40

【0062】

本発明のある側面は精製に関しており、特定の態様においてはコードサンプルックタンパク質タンパク質またはペプチドの実質的な精製に関する。本明細書で使用する「精製タンパク質またはポリペプチド」なる語は、組成物に関する意図されており、タンパク

50

質の組成物から単離可能であり、該タンパク質またはペプチドは天然で入手可能な状態に任意の程度比較して精製される。それゆえ、精製したタンパク質またはペプチドはまた、天然に存在するであろう環境から離れたタンパク質またはペプチドをもいう。

【0063】

一般的に「精製された」なる語は、多様なほかの化合物を除去するための再分化を受けやすいタンパク質またはペプチド組成物をいい、その組成物は実質的に生物学的活性を保有している。「実質的に精製している」なる語が使用される場合、この名称は、例えば、組成物中のタンパク質が50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%またはそれを超える割合であるような組成物の主要成分をタンパク質またはペプチドが形成する組成物をいうであろう。

10

【0064】

該タンパク質またはペプチドの精製の程度を定量する多様な方法は本開示に照らし合わせて当業者には公知である。これらには、例えば、活性化区分の特定活性を決定すること、またはSDS/PAGE分析によって画分内のポリペプチドの量を査定することなどが含まれる。

【0065】

ある画分の精製を評価する好ましい方法には、該画分の特定活性を計算し、それを最初の抽出物の特定活性と比較し、ついでしたがって精製の程度を計算し、本明細書において「-倍の精製数(-fold purification number)」によって検出可能である。活性料を表すのに使用する実際の単位は、勿論、精製後に選択した特定のアッセイ技術に依存し、発現したタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すか否かに依存する。

20

【0066】

タンパク質精製に使用するのに適当な多様な技術は当業者によく知られている。これらには、例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体などでの沈殿、または熱変性によるかまたは遠心後；イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびアフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー工程；等電点電気泳動；ゲル電気泳動；およびそれらの組み合わせおよびタンパク質の技法である。当業界において一般的に知られるように、多様な精製工程を行なう順序が変化してもよく、またはある工程は省略してもよく、またさらに実質的に生成したタンパク質またはペプチドの適当な調製方法を生じてもよいことが信じられている。

30

【0067】

該タンパク質またはペプチドがいつも最も精製された状態にて提供されるという一般的な必要条件是全くない。実際、殆ど実質的ではなく精製された産物はある態様における有用性を持つと考えられ得る。部分的な精製は、組み合わせ一層少ない精製工程を用いることにより、または同じ一般的な精製計画の異なる形態を利用することによって達成されてよい。例えば、HPLC機器を用いて達成される陽イオン交換カラムクロマトグラフィーは一般的に低圧カラムクロマトグラフィー系を利用する同じ技法より高「-倍」精製を生じる。相対的に低い程度の精製を示す方法はタンパク質産物の総回収量において利点があり、または発現されたタンパク質の活性を維持することに利点があつてよい。

40

【0068】

ポリペプチドの移動はSDS/PAGEの異なる条件で時折有意に変化することができることは公知である(カパルディ(Capaldi)ら、1977)。それゆえ、異なる電気泳動条件の下で、精製されたまたは部分的に精製された発現産物の明らかな分子量が変化するかもしれない。

【0069】

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、ピークのストラタジーンくれた分析での非常に並外れた迅速な分解によって特徴付けられる。これは、適当な流速を維持する非常にきれいな粒子および高圧を使用して達成される。分離は、数分またはせいぜい1時間で達成されることができ。さらに、該サンプルの非常に少量のみを必要とする。というのは、

50

粒子は非常に小さく、該真空容量がbed容量の非常に小さな画分であるように密に詰められているからである。また、該サンプルの濃度は、バンドが該サンプルの非常にわずかな希釈が存在するとともに狭いものであるため、それほど高い必要はない。

【0070】

ゲルクロマトグラフィーまたは分子篩クロマトグラフィーは、分子の大きさに基づく特別な型の分割クロマトグラフィーである。ゲルクロマトグラフィーの後ろにある理論は、カラムは、小孔を含む不活性基質の小さな粒子で調製されているのだが、大きさにより、分子が孔を通過するかその周辺にあるように小分子と大分子を分離するというものである。粒子が作成される物質が該分子に吸着しない限り、流速を決定する唯一の因子が大きさである。したがって、分子は形が比較的一定である限り、大きさを小さくしてカラムから溶出される。ゲルクロマトグラフィーは異なる大きさの分子を分離するためにしのがれる。というのは、分離は、pH、イオン化強度、温度などのすべての他の因子から独立しているからである。実際には、吸着は全くなく、ゾーンの分離は少なく、そして溶出容量は分子量に対する単純な事象に関連する。

10

【0071】

アフィニティークロマトグラフィーは、単離すべき物質と特異的に結合することができる分子間の特有的なアフィニティを信頼するクロマトグラフィー手法である。カラム物質は結合パートナーの1つを難溶性マトリクスに共有結合させることによって合成される。ついで、カラム物質は該溶液からの物質を特異的に吸収することができる。溶出は結合が起きない条件に変化させることによって起こる（pH、イオン化強度、温度などを変える）。

20

【0072】

炭水化物含有化合物の精製に有用であるアフィニティークロマトグラフィーの特定の型は、レクチンアフィニティークロマトグラフィーである。レクチンは多様なポリサッカリドおよび糖タンパク質に結合する物質の類である。レクチンは通常臭化シアンによってアガロースに結合している。セファロースに結合したConcanavalin Aは使用されるこの種類の最初の物質であり、ポリサッカリドの単離においておよび糖タンパク質の単離において広く使用されレンズマメレクチンを含むタンパク質のレクチン、N-アセチルグリコサミニル残基の精製に有用である小麦胚芽凝集素およびヘリックスボマティア (*Helix pomatia*) レクチンである。レクチンそのものは炭水化物のリガンドを持つアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製される。ラクトースはヒマシマメ (*castor bean*) およびピーナツからのレクチンを純粋にするために使用した；麦芽糖はレンズマメおよびジャックビーン (*jack bean*) から抽出するのに有用である。N-アセチル-Dガラクトサミンはダイズからのレクチンを精製するために使用される；N-アセチルグリコサミニルは麦芽からのレクチンに結合する；D-ガラクトサミンは2枚貝からのレクチンを入手するのに使用し、L-フコースはハスからのレクチンに結合する。

30

【0073】

マトリクスはそれ自身は任意の程度まで分子に吸着しない物質であるべきであり、広い範囲の化学的安定性、物理的安定性および温度安定性を持つ。リガンドは、その結合特性を影響しないような方法で結合すべきである。該リガンドは相対的にしっかりした結合も提供すべきである。およびサンプルまたはリガンドを破壊することなく物質を溶出することができるべきである。アフィニティークロマトグラフィーの最も一般的な形態の1つは、イムノアフィニティークロマトグラフィーである。本発明で使用するために適している抗体の製造については以下に議論する。

40

【0074】

G. 合成ペプチド

本発明はまた、本発明の多様な態様において使用するための一層小さなTS10q23.3関連ペプチドについても記載する。その相対的に小さなサイズのため、本発明のペプチドは従来の技術により、溶液中または固相支持体上で合成されることもできる。多様な自動合成は、市販されており入手可能であり、公知のプロトコールに従って使用することができる

50

。例えば、ステュワート (Stewart) およびヤング (Young) (1984) ; タム (Tam) ら、(1993) ; メリフィールド (Merrifield) (1986) ; およびバラニー (Barany) およびメリフィールド (1979)、各々は参照のため本明細書に含有する。短いペプチド配列または重複ペプチドのライブラリーはたいてい約6から約35から50までのアミノ酸であり、本明細書に記載される選択された領域に対応するものであり、容易に合成でき、ついで応答性のペプチドを同定するために設計されるスクリーニングアッセイにおいてスクリーニングできる。代わりに、組換えDNA技法は本発明のペプチドをコードする各酸配列が発現ベクターに挿入され、適当な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクションされ、ついで発現に適切な条件下で培養されてよい。

【0075】

10

H. 抗原組成物

本発明はまた、抗体の産生に関する動物の免疫に関する抗原としてTS10q23.3タンパク質またはペプチドの使用に関して提供する。TS10q23.3またはその一部がカップリングし、結合し、結び付けられ、コンジュゲートされるかまたはリンカー、ポリリンカーまたは誘導体化されたアミノ酸を介して1またはそれ以上の薬剤に化学的に結合していることを想像できる。これば、両または特異性または多価組成物またはワクチンが製造されるように行なわれる。これらの組成物の調製に使用される方法は、当業者によく知られており、例えば製薬学的に許容し得るように動物に投与するのに適しているべきである。好ましい薬剤は、キーホール・リンペットヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin) (KLH) またはウシ血清アルブミン (BSA) である。

20

III. 核酸

【0076】

本発明はまた、他の具体例において、TS10q23.3コードする遺伝子を提供する。ヒト、イヌおよびマウスのTS10q23.3分子遺伝子が同定されている。しかし、当業者であれば、これらの2つの核酸を用いて、容易に種々の他種の関連する相同体を同定することができるが、本発明はこれらの遺伝子に限定されるものではない(ラット、ウサギ、サル、テナガザル、チンパンジー、類人猿、ヒビ、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコなど)。この遺伝子のマウスとイヌの相同体の発見は、よりヒトに関連性が近い種が、実際に同様の相同体を持っているかもしれないという事実の存在を有望にするものである。

【0077】

30

さらに、本発明が本明細書に開示されている特定の核酸に限定されないことは明白である。以下に議論するように、"TS10q23.3遺伝子"は、種々の異なる塩基を含み、さらにまだ、本明細書に開示するヒトおよびマウス遺伝子と機能的に(幾つかの場合においては、構造的に)区別しえない対応するポリペプチドを産生することができる。

【0078】

同様に、ある核酸に対するどのようなレファレンスでも、その核酸を含む宿主細胞を包囲するものであり、幾つかの場合においては、その核酸の産物を発現することができるものとして理解すべきである。さらに、治療的考察に加えて、本発明の核酸を発現する細胞は、TS10q23.3の機能を誘発、抑制、阻害、増大、妨害、終結、刺激または増強させる作用剤をスクリーニングする際に有用である。

40

【0079】

A.10q23.3をコードする核酸

図6および図9に開示されたヒト遺伝子および図9に開示されたマウス遺伝子が、本発明のTS10q23.3遺伝子である。本発明の核酸は、TS10q23.3遺伝子全体、腫瘍抑制またはホスファターゼ機能を発現するTS10q23.3のドメインまたは本明細書に記載されたTS10q23.3のいずれかの他のフラグメントをコードする。該核酸は、ゲノムDNAから誘導、すなわち、特定の有機体のゲノムから直接クローニングされる。しかし、好ましい具体例において、該核酸は、相補的DNA(cDNA)を包含する。また、cDNAプラス天然のイントロンまたは他の遺伝子から誘導されたイントロンもまた本発明において企図される。このように設計された分子は、“ミニ遺伝子”と呼ば

50

れることもある。最小の使用法として、これらの核酸および本発明の他の核酸は、たとえばゲル電気泳動において分子量標準として用いることができる。

【0080】

語句“cDNA”は、テンプレートとしてメッセンジャーRNA(mRNA)を用いて作製されたDNAを意味することを意図している。ゲノムDNAまたはゲノム、非または部分切断RNAテンプレートからポリメライズされたDNAとは異なって、cDNAを用いる利点は、cDNAが本質的に対応するタンパク質をコードする配列を含むことである。最適発現のために非コーディング領域が必要である場合、あるいは最適発現のためにイントロンなどの非コーディング領域がアンチセンス方策において標的とされている場合など、全または部分ゲノム配列が好ましい場合がある。

10

【0081】

また、核酸配列が僅かに異なるが、それにもかかわらず、同じタンパク質をコードする天然の変異体によって、ある1つの種のある1つのTS10q23.3が表されることも企図している(表1参照)。

【0082】

本明細書において、語句“TS10q23.3をコードする核酸”とは、全細胞核酸から単離された核酸分子を意味する。好ましい具体例において、本発明は、本質的に図6および図9に記載された核酸配列に関する。語句“図6または図9に記載された”とは、該核酸配列が、図6または図9の一部と実質的に対応することを意味する。本明細書において、語句“機能的に等価なコドン”とは、アルギニンまたはセリンに対する6つのコドンなどの同じアミノ酸をコードするコドン(後記表1参照)、および後記に議論するように、生物学的に等価なアミノ酸をコードするコドンを意味する。

20

表1

アミノ酸			コドン					
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
システイン	Cys	C	UGC	UGU				
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU				
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG				
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU				
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		10
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU				
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
リシン	Lys	K	AAA	AAG				
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
メチオニン	Met	M	AUG					
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU				
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		20
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG				
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
トリプトファン	Trp	W	UGG					
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU				30

【 0 0 8 3 】

遺伝暗号の縮重を考慮して、ヌクレオチドの少なくとも50%、通常少なくとも約60%、さらに通常少なくとも約70%、最も多くは約80%、好ましくは少なくとも約90%および最も好ましくは約95%が、図9と同一である配列が、“図9に記載の”配列といえよう。図9に記載の配列と本質的に同じ配列もまた、標準的条件下においてハイブリッド形成して図9の相補配列を含む核酸セグメントとなりうる配列として機能的に定義しうる。

【 0 0 8 4 】

本発明のDNAセグメントとしては、上述したような、生物学的にTS10q23.3と機能が等価のタンパク質およびペプチドをコードするセグメントが挙げられる。このような配列は、核酸配列およびそれによってコードされるタンパク質において天然に生じる事がわかっている、コドンの過剰およびアミノ酸の機能的等価性の結果として生じる。別法として、機能的に等価なタンパク質またはペプチドを、タンパク質の構造において変化を工作するといったような組換えDNA技術を適用して創生することができる。人間によって設計された変化は、部位特異的突然変異誘発技術の適用によって導入することができるが、あるいはランダムに導入した後に所望の機能をスクリーニングしてもよい。

【 0 0 8 5 】

B. オリゴヌクレオチドプローブおよびプライマー

当然、本発明には、図6および図9に記載されている配列に対して相補的であるか、ま

40

50

たは本質的に相補的であるDNAセグメントが包含される。“相補的”である核酸配列とは、標準的ワトソン-クリックの相補ルールに従う塩基対でありうる配列である。

【0086】

本明細書において、語句“相補的配列”とは、上記と同じ核酸比較法で評価しうるような実質的に相補的な配列であるか、または本明細書に記載するような相対的緊縮条件下において図6および図9の核酸セグメントにハイブリダイズしうるものとして定義される核酸配列を意味する。このような配列は、全TS10q23.3タンパク質またはその機能的あるいは非機能的フラグメントをコードすることができる。

【0087】

また、該ハイブリダイズセグメントは、より短いオリゴヌクレオチドであってもよい。長さが17塩基の配列は、ヒトゲノム内で一回だけ発生すべきであり、したがって、独特の標的配列を特定するのに十分である。より短いオリゴヌクレオチドのほうがインピボ経路において作りやすく、かつ増やしやすけれども、ハイブリッド形成の特異性の測定において、多数の他の因子が関わってくる。その相補的標的に対するオリゴヌクレオチドの結合親和性および配列特異性は、長さが増えると増大する。たとえば、これらに限定されるものではないが、8、9、10、11、12、12、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100またはそれ以上の塩基対からなるオリゴヌクレオチドを用いることを企図するものである。250、500、1000、1212、1500、2000、2500、3000または3431塩基およびさらに長い塩基をコードする、より長いポリヌクレオチドも企図するものに含まれる。このようなオリゴヌクレオチドを、たとえばサザンプロットおよびノーザンプロットにおけるプローブとして、および増幅反応におけるプライマーとして用いる。

【0088】

好適なハイブリッド形成条件は、当業者には公知である。或る適用、たとえば、部位特異的突然変異誘発によるアミノ酸の置換では、より低い緊縮条件が必要であることがわかる。これらの条件下では、プローブおよび標的鎖の配列が完全に相補的ではなくて、1つまたはそれ以上の位置にミスマッチがある場合でさえもハイブリッド形成が生じる。塩濃度の増加および温度の低下によって、条件の緊縮性が低くなる。たとえば、NaCl約0.1~0.25M、温度約37~約55において、中程度の緊縮条件になり、塩約0.15~0.9M、温度約20~約55において、低い緊縮条件になる。このように、ハイブリッド形成条件は、容易に操作することができ、それゆえに所望の結果に応じて選択し得る一般的な方法となるのである。

【0089】

他の具体例では、たとえば、50mMトリス-HCl(pH8.3)、3mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール、温度約20~約37において、ハイブリッド形成が達成される。他のハイブリッド形成条件としては、10mMトリス-HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5μM MgCl₂、温度約40~約72が挙げられる。ホルムアミドおよびSDSも他のハイブリッド形成条件に用いることができる。

【0090】

本発明のプローブおよびプライマーを用いる方法のひとつは、TS10q23.3に関連する遺伝子の探索、特に他の種からのTS10q23.3の相同体の探索である。マウス相同体が存在することによって、ヒトTS10q23.3の他の相同体が、マウスよりも、より近い種およびより遠縁の種において発見されるであろうことが強く示唆される。スクリーニングにはRNA分子の分析が含まれるが、通例、標的DNAは、ゲノムまたはcDNAである。ハイブリッド形成の緊縮性およびプローブの領域を変化させることによって、相同性の程度の異なる相同体を見出すことができる。

【0091】

本発明のプローブおよびプライマーを開発するためのもう1つの方法は、部位特異的突然変異誘発である。部位特異的突然変異誘発は、基本的なDNAの特異的突然変異誘発を

10

20

30

40

50

介して、個別のペプチド、または生物学的機能等価タンパク質またはペプチドを製造するのに有用な技術である。該技術はさらに、前述の考察の1つあるいはそれ以上を組み合わせ、1つあるいはそれ以上のヌクレオチド配列の変化をDNAへ導入することによって、配列変異体を作製し、試験することが容易になる。部位特異的突然変異誘発によって、所望の突然変異ならびに十分な数の近接のヌクレオチドのDNA配列をコードする特定のオリゴヌクレオチド配列を用いる突然変異体の産生が行われ、トラバースされる欠失ジャンクションの両端に安定な二重体を形成するのに十分な大きさと配列複雑性をもつプライマー配列が提供される。代表的には、変更される配列ジャンクションの両端に約5から0残基をもつ長さ約17~25ヌクレオチドのプライマーが好ましい。

【0092】

該技術は、代表的には、一本鎖体および二本鎖体の両方で存在するバクテリオファージベクターを使用する。部位特異的突然変異誘発に有用な代表的なベクターとしては、M13ファージといったようなベクターが挙げられる。このようなファージベクターは、市販されており、その使用方法は、一般に当業者には公知である。二本鎖プラスミドもまた部位特異的突然変異誘発において日常的に使用され、対象の遺伝子をファージからプラスミドへ移す段階を省くことができる。

【0093】

一般に、部位特異的突然変異誘発は、最初、その配列内に所望のタンパク質をコードするDNA配列を含む一本鎖ベクターを得るか、または二本鎖ベクターの二本の鎖を解くことによって行われる。所望の突然変異を生じさせるオリゴヌクレオチドは、合成的に製造される。次いで、このプライマーを、ハイブリッド形成条件を選択する際のミスマッチの程度を考慮して、一本鎖DNA調製物とアニーリングし、E. coliポリメラーゼIクレノーフラグメントなどのDNAポリメライズ酵素で処理し、突然変異を生じた鎖の合成を完成する。このようにして、1つの鎖がもとの非変異配列をコードし、第二の鎖が所望の突然変異を含むヘテロ二重体を形成する。次いで、このヘテロ二重体ベクターを用いて、E. coliなどの適当な細胞の形質転換を行い、突然変異配列アレンジメントを生じている組換えベクターを含む配列を選択する。

【0094】

部位特異的突然変異誘発を用いて選択された遺伝子の配列変異体の作製は、潜在的に有用な種を作製するという手段で提供されるが、これらに限定されるものではなく、遺伝子の配列変異体を得られる他の方法がある。たとえば、所望の遺伝子をコードする組換えベクターを、ヒドロキシルアミンなどの突然変異誘発剤で処理して配列変異体を得てもよい。

【0095】

C. アンチセンス構築物

突然変異腫瘍サプレッサーが機能しない場合が幾つかある。それどころか、“野生型”分子において突然変異ポリペプチドが過剰量で発現される場合でさえも、それらは遺伝子置換療法によって克服することができない突然変異的機能をもっている。アンチセンス処置は、このような状況に立ち向かう方法のひとつである。アンチセンス技術はまた、細胞系またはトランスジェニックマウスの発達におけるTS10q23.3の“ノックアウト”機能に対し、調査、診断およびスクリーニングの目的でも使用できる。

【0096】

アンチセンス方法論の利点は、核酸がその“相補的”配列と対を形成する傾向にあるという事実である。相補性とは、ポリヌクレオチドがワトソン-クリック相補性ルールに従って塩基対を形成することができるということを意味する。すなわち、相対的に大きいプリンが、相対的に小さいピリミジンと塩基対を形成して、DNAの場合、グアニンとシトシン(G:C)およびアデニンとチミン(A:T)、あるいはRNAの場合、アデニンとウラシル(A:U)という組み合わせを形成する。ハイブリッド形成配列においてイノシン、5-メチルシトシン、6-メチルアデニン、ヒポキサンチンなどの普遍性の少ないものを含めても、対形成に干渉しない。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 7 】

ポリヌクレオチドで二本鎖 (d s) D N A を標的化すると、三重ヘリックスが形成され ; R N A を標的化すると二重ヘリックスが形成される。アンチセンスポリヌクレオチドは、標的細胞に導入されが場合、その標的ポリヌクレオチドに特異的に結合し、転写、R N A 切断、移入、翻訳および / または安定性に干渉する。アンチセンス R N A 構築物、あるいはこのようなアンチセンス R N A をコードする D N A を用いて、インビトロまたはインビボにて、ヒトを含めた宿主動物といったような宿主細胞内における遺伝子転写または翻訳もしくはその両方を阻害することができる。

【 0 0 9 8 】

アンチセンス構築物は、遺伝子のプロモーターおよび他のコントロール領域、エクソン、イントロンに、あるいはエクソン - イントロン境界にさえも結合するように設計することができる。ほとんどの有効なアンチセンス構築物は、イントロン / エクソンスプライスジャンクションに相補的な領域を含むことを企図されている。したがって、好ましい具体例は、50 - 200 塩基対からなるイントロン - エクソンスプライスジャンクション領域に相補的なアンチセンス構築物を含むことが求められる。その標的選択性に大きく影響を及ぼすことなく該構築物に含めることができるエクソン配列がいくつか存在することが観察されている。含まれるエキソン性部分の量は、使用する特定のエキソンおよびイントロン配列に応じて変化する。エクソン過剰 D N A が含まれるかどうかは、単純に該構築物をインビトロでテストし、正常な細胞機能に影響を及ぼすかどうか、あるいは相補的配列を有する関係する遺伝子の発現に影響を及ぼすかどうかを決定することによって容易にテストすることができる。

【 0 0 9 9 】

前記にて定義したように、“相補性”または“アンチセンス”は、その全長において実質的に相補的であり、僅かな塩基ミスマッチをもつポリヌクレオチド配列を意味する。たとえば、長さ15 塩基対では、それらが13 または14 の位置において相補的ヌクレオチドをもつ場合に相補的であるということが出来る。天然においては、完全に相補的な配列とは、その全長において完全に相補的であり、塩基対のミスマッチがない配列である。相同性の程度がより低いその他の配列も含まれる。たとえば、相同性が高い限定された領域をもつが、非相同領域 (リボザイムなど、後記) も含んでいるアンチセンス構築物を設計することができる。これらの分子の相同性は50 % より小さいけれども、適切な条件下においては、標的配列に結合することができる。

【 0 1 0 0 】

ゲノム D N A の一部と c D N A または合成配列とを組み合わせ、特異的構築物を作製することができる。たとえば、最も遠い構築物においてイントロンが望まれる場合、ゲノムクローンをを用いる必要がある。構築物の残りの部分に対して、c D N A または合成ポリヌクレオチドが、より都合の良い制限部位を提供し、したがって、配列の残部に対して使用される。

【 0 1 0 1 】

D . リボザイム

“負の優性”突然変異腫瘍抑制剤への他のアプローチは、リボザイムを使用することである。タンパク質は核酸の触媒として伝統的に用いられているが、別のクラスの巨大分子が、この試みにおいて有用であることがわかってきている。リボザイムは、部位特異的に核酸を切断する R N A - タンパク質複合体である。リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を有する特異的触媒部位をもつ (Kim および Cook、1987 ; Gerlach ら、1987 ; Forster および Symons、1987) たとえば、多くのリボザイムは、高度の特異性をもってホスホエステルトランスファー反応を促進し、オリゴヌクレオチド基質において、数個のホスホエステルのうちのただ1つを切断する (Cook ら、1981 ; Michel および Westof、1990 ; Reinhold-Hurek および Shub、1992) 。この特異性は、基質が化学反応に先だて、特異的塩基対相互反応を介してリボザイムの内部ガイド配列 (I G S) に結合するという要件に起因している。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 2 】

最初、リボザイム触媒は、核酸に関係する配列特異的切断/ライゲーション反応の一部として観察されている (Joyce、1989; Cookら、1981)。たとえば、米国特許第5354855には、あるリボザイムが、公知のリボヌクレアーゼよりも大きな配列特異性をもつエンドヌクレアーゼとして作用し、DNA制限酵素の配列特異性に似ているが報告されている。したがって、配列特異的リボザイムが媒介する遺伝子発現の阻害は、特に治療としての適用に適している (Scanlonら、1991; Sarverら、1990)。近年、リボザイムが、それらが適用される幾つかの細胞系において遺伝子の変化を誘発させ、変化した遺伝子が癌遺伝子H-ras、c-fosおよびHIVの遺伝子を含むことが報告された。この種の研究のほとんどに、特異的リボザイムによって切断される特異的突然変異コドンに基づく、標的mRNAの修飾が関係している。

10

【 0 1 0 3 】

E. クローニング、遺伝子移入および発現のためのベクター

いくつかの具体例においては、発現ベクターを用いてTS10q23.3ポリペプチド産物を発現させ、次いで、精製し、たとえば、ワクチン接種された動物に抗血清またはモノクローナル抗体を産生させるのに用い、さらにそれを用いてさらに実験を行う。他の具体例では、発現ベクターを遺伝子療法に用いる。発現には、ベクターに提供される適当なシグナルが必要であり、それには、宿主細胞を対象の遺伝子を発現させる、ウイルスおよび哺乳動物由来のエンハンサー/プロモーターといったような種々の調節要素が含まれる。宿主細胞内におけるメッセンジャーRNAの安定性および翻訳能力を最適化するように設計されたエレメントも定義される。産物を発現する永続的で、安定な細胞クローンを創立するための多数の優性ドラッグ選択性マーカーの使用条件もまた提供される。ドラッグ選択性マーカーの発現とポリペプチドの発現をリンクするエレメントである。

20

【 0 1 0 4 】

(i) 調節エレメント

この適用において、語句“発現構築物”とは、核酸をコードする配列の一部または全部が転写されるような遺伝子産物をコードする核酸を含む、どのようなタイプの遺伝子構築物もが含まれることを意味する。転写物は、タンパク質に翻訳されるが、必須というわけではない。ある具体例において、発現には、遺伝子の転写および遺伝子産物へのmRNAの翻訳の両方が含まれる。他の具体例では、発現には、対象の遺伝子をコードする核酸の転写のみが含まれる。

30

【 0 1 0 5 】

好ましい具体例において、遺伝子産物をコードする核酸は、プロモーターの転写調節下にある。“プロモーター”とは、遺伝子の特異的転写を開始するのに必要な、細胞の合成機構によって認識されるDNA配列、または合成機構を導入するDNA配列を意味する。語句“転写調節下”とは、プロモーターがRNAポリメラーゼ開始および遺伝子発現を調節する核酸に関連して、正しい位置および方向性にあることを意味する。

【 0 1 0 6 】

語句“プロモーター”は、本明細書においては、RNAポリメラーゼIIに対する開始部位の周囲に集まる転写調節モジュールのグループを意味する。どのようにプロモーターが組織されるかについての多くの見解は、HSVチミジンキナーゼ(tk)およびSV40早期転写酵素ユニットなどの数種のウイルスプロモーターの分析から得られている。より最近の研究によって予測されてきたように、これらの実験から、プロモーターが、それぞれおよそ7-20bpのDNAからなり、一個またはそれ以上の転写アクチベーターまたはリプレッサータンパク質に対する認識部位を含む、分離した機能モジュールからなるということがわかってきている。

40

【 0 1 0 7 】

各プロモーターにおいて少なくとも1つのモジュールが、RNA合成の開始部位を置くように機能する。このもっとも良く知られている例は、TATAボックスであるが、哺乳類末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーターおよびSV40

50

遅延遺伝子のプロモーターといったような、TATAボックスを持たないいくつかのプロモーターにおいては、それ自身の開始部位に横たわっている分離エレメントが開始場所の決定を補助する。

【0108】

さらなるプロモーターエレメントは、転写開始の頻度を調節する。近年、多数のプロモーターが機能エレメントを開始部位の下流に含むことがわかってきているが、代表的には、これらは開始部位の上流30 - 110 bpの領域に位置している。プロモーターエレメント間のスペーシングは、しばしばフレキシブルであり、そのためエレメントがもう1つのエレメントに対して逆方向になるかまたは移動する場合、プロモーター機能は保存される。tkプロモーターにおいて、プロモーターエレメント間のスペーシングは、活性の低下芽始まる前に、50 bpまで増加可能である。プロモーターに応じ、個々のエレメントが、共同作動的または独立的のいずれかにて機能して、転写を活性化しうることがわかる。

10

【0109】

それが、標的細胞内で核酸の発現を指示することが可能である限りは、対象の核酸配列の発現を調節するのに用いる特定のプロモーターは、重要であるとは考えられない。したがって、ヒト細胞が標的である場合、核酸コーディング領域に近接した位置にあり、ヒト細胞において発現可能なプロモーターのコントロール下にあることが好ましい。一般的に述べると、このようなプロモーターはヒトあるいはウイルスプロモーターのいずれかを含んでいる。

20

【0110】

種々の具体例において、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)早期遺伝子プロモーター、SV40プロモーター、ラウス肉腫ウイルス長末端リピート、ラットインスリンプロモーターおよびグリセロアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼを用いて、対象コード配列の高レベルの発現を得ることができる。発現レベルが既定の目的にとって十分であるならば、対象のコード配列の発現を達成することが当業者には公知である他のウイルスおよび哺乳類細胞またはバクテリオファージプロモーターも同様に本発明に企図される

【0111】

公知のポリペプチドをもつプロモーターを採用することにより、トランスフェクションまたは形質転換後の対象のタンパク質の発現レベルおよびパターンを最適化することができる。さらに、特定の生理的シグナルに应答して調節されるプロモーターを選択することにより、遺伝子産物の誘導可能な発現が得られる。表2および表3は、本発明において、対象の遺伝子の発現を調節するのに使用しうる数種のエレメント/プロモーターをリストしている。このリストは、遺伝子発現のプロモーションに関連する可能なエレメントのすべてを挙げる事を意図するものではなく、その例示にすぎない。

30

【0112】

エンハンサーは、同じDNA分子において離れた位置にあるプロモーターからの転写を増強する遺伝子エレメントである。エンハンサーは、プロモーターと良く似たように組織される。すなわち、それらは多くの個別のエレメントからなり、各エレメントは、1つまたはそれ以上の転写タンパク質に結合する。

40

【0113】

エンハンサーとプロモーターの間の基本的な差異は、操作上のことである。エンハンサー領域は全体として、離れたところで転写を刺激することができなければならない。このことはプロモーター領域またはその成分エレメントでは層である必要はない。一方、プロモーターは、特定の部位および特定の方向性においてRNA合成の開始を指示する、1つまたはそれ以上のエレメントをもたなければならないが、エンハンサーにはこのような特性はない。プロモーターおよびエンハンサーはしばしばオーバーラップし、隣接しており、非常に類似したモジュラー組織を持つように見えることが多い。

【0114】

下記に示すのは、発現構築物において対象遺伝子をコードする核酸と組み合わせて用い

50

ることができるウイルスプロモーター、細胞プロモーター/エンハンサーおよび誘導プロモーター/エンハンサーのリストである(表2および表3)。補足すると、(真核プロモーターデータベースEPDBによる)どのようなプロモーター/エンハンサー組み合わせ物でも、遺伝子発現に用いることができる。デリバリーコンプレックスの一部または付加的遺伝子発現構築物のいずれかとして、適当な細菌ポリメラーゼが提供されれば、真核細胞は、細菌プロモーターからの細胞質転写をサポートすることができる。

表2

<u>エンハンサー／プロモーター</u>	
免疫グロブリン重鎖	
免疫グロブリン軽鎖	
T細胞受容体	
HLA DQ α およびDQ β	
β インターフェロン	
インターロイキン2	
インターロイキン2受容体	
MHCクラスII5	10
MHCクラスII HLA DR α	
β アクチン	
筋クレアチンキナーゼ	
プレアルブミン (トランスチレチン)	
エラスターゼI	
メタロチオネイン	
コラゲナーゼ	
アルブミン遺伝子	
α フェトタンパク質	20
τ グロブリン	
β グロブリン	
e-fos	
c-HA-ras	
インスリン	
神経細胞接着分子 (NCAM)	
α 1アンチトリプシン	
H2B (TH2B) ヒストン	
マウスまたはI型コラーゲン	
グルコース調節タンパク質 (GRP94およびGRP78)	30
ラット成長ホルモン	
ヒト血清アミロイドA (SAA)	
トロポニンI (TN I)	
血小板由来増殖因子	
デュシェンヌ筋ジストロフィー	
SV40	
ポリオーマ	
レトロウイルス	
パピローマウイルス	40
B型肝炎ウイルス	
ヒト免疫不全ウイルス	
サイトメガロウイルス	
<u>テナガザル白血病ウイルス</u>	

エレメント	インデューサー
MT I I	ホルボールエステル (TPA) (重鎖)
MMTV(マウス哺乳類腫瘍ウイルス)	グルココルチコイド
β インターフェロン	ポリ (r I) X ポリ (r c)
アデノウイルス 5 E 2	E 1 a
c-jun	ホルボールエステル(TPA), H ₂ O ₂
コラゲナーゼ	ホルボールエステル(TPA)
ストロメライシン	ホルボールエステル(TPA), I L-1
SV 4 0	ホルボールエステル(TPA)
マウスMX遺伝子	インターフェロン, ニューカッスル病ウイルス
GRP 7 8 遺伝子	A 2 3 1 8 7
α -2-マクログロブリン	I L-6
ビメンチン	血清
MHC クラス I 遺伝子 H-2 k B	インターフェロン
HSP 7 0	E 1 a、SV 4 0 ラージ T 抗原
プロリフェリン	ホルボールエステル-TPA
腫瘍壊死因子	FMA
甲状腺刺激ホルモン	甲状腺ホルモン
インスリンEボックス	グルコース

10

20

30

40

50

【 0 1 1 5 】

c D N A 挿入物を用いる場合、遺伝子転写の適切なポリアデニル化を起こすためにポリアデニル化シグナルを含むことが望ましい。ポリアデニル化シグナルの性質は、本発明の実行を成功させることにおいて極めて重大であるとは考えられず、ヒト成長ホルモンおよび S V 4 0 ポリアデニル化シグナルなどの配列も用いることができる。ターミネーターもまた発現カセットのエレメントとして企図されるものである。これらのエレメントは、カセットから他の配列へのメッセージレベルを増強することおよび読みを最小化するのに役立つ。

【 0 1 1 6 】

(ii) 選択可能なマーカー

本発明の具体例において、細胞には本発明の核酸構築物が含まれ、ひとつの細胞は発現構築物内にマーカーを含むことによってインビボまたはインビトロで同定することができる。このようなマーカーによって、細胞に同定可能な変化が付与され、発現構築物を含む細胞を容易に同定することができるようになる。通常、薬物選択的マーカーはクローニングおよび形質転換物の選択を助け、たとえば、ネオマイシン、プロマイシン、ハイグロマイシン、D H F R、G P T、ゼオシンおよびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は、有用な選択可能なマーカーである。また、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (t k) またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T) などの酵素を使用してもよい。免疫学的マーカーも使用することができる。遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現されることが可能である限りは、使用する選択可能なマーカーが重要なものであるとは考えられない。さらなる選択可能なマーカーが当業者にとって公知である。

【 0 1 1 7 】

(iii) 多重遺伝子構築物および I R E S

本発明の具体例において、内部リボソーム結合部位 (I R E S) エレメントを使用して

多重遺伝子またはポリシストロン性メッセージを作成する。IRESエレメントは、5'メチル化Cap依存性翻訳のリボソームスキャンモデルをバイパスし、内部部位で翻訳を開始することができる(PelletierおよびSonenberg、1988)。ピカノウイルスファミリーに属する2つのメンバー(ポリオおよびエンケファロマイオカルジチス)のIRESエレメント(PelletierおよびSonenberg、1988)および哺乳類メッセージのIRES(MacejakおよびSarnow、1991)が開示されている。IRESエレメントは、異種オープンリーディングフレームに結合することができる。多重オープンリーディングフレームは、は一緒に転写され、それぞれIRESによって分離され、ポリシストロン性メッセージを作成する。IRESエレメントのおかげで、各オープンリーディングフレームがリボソームにアクセスして、翻訳することができる。多重遺伝子は、シングルメッセージを転写するためのシングルプロモーター/エンハンサーを用いて発現される。

10

【0118】

どのような異種オープンリーディングフレームでもIRESエレメントに結合することができる。これには、分泌タンパク質、マルチサブユニットタンパク質、独立した遺伝子によってコードされるタンパク質、細胞内または膜結合タンパク質および選択可能なマーカーに対する遺伝子が含まれる。この経路において、数種のタンパク質の発現を、1つの構築物および1つの選択可能なマーカーとともに同時に細胞内へ遺伝子工作することができる。

【0119】

(iv) 発現ベクターのデリバリー

20

発現ベクターを細胞に導入する経路は多数存在する。本発明の具体例において、発現構築物は、ウイルスまたはウイルスゲノム由来の工作された構築物を含んでいる。受容体媒介性エンドサイトーシスを介して細胞内へ入るウイルスの能力、宿主ゲノムへ組み込まれ、ウイルス遺伝子を安定的および効率的に発現するウイルスの能力ゆえに、ウイルスは哺乳類細胞に外来性遺伝子を移入するための魅力的な候補である(Ridgeway、1988; NicolasおよびRubenstein、1988; BaichwalおよびSuden、1986; Temin、1986)。遺伝子ベクターとして最初に用いられたウイルスは、パポウイルス(シミアンウイルス40、ウシパピローマウイルス、およびポリオーマ)(Ridgeway、1988; BaichwalおよびSuden、1986)およびアデノウイルス(Ridgeway、1988; BaichwalおよびSuden、1986)といったようなDNAウイルスであった。これらは、相対的に外来性DNA配列に対するキャパシティが小さく、宿主の範囲に制限がある。さらに、許容細胞内でのそれらの発癌力および細胞毒効果は安全性に関する事柄を提起する。それらは、たった8kbまでの外来性遺伝物質しか収容することができないが、用意に種々の細胞系および実験動物に導入することができる(NicholasおよびRebinstein、1988; Temin、1986)。

30

【0120】

インビボデリバリーの好ましい方法のひとつでは、アデノウイルス発現ベクターを使用する。“アデノウイルス発現ベクター”とは、(a)構築物のパッケージングをサポートする;および(b)クローニングされたアンチセンスポリヌクレオチドを発現するのに十分なアデノウイルス配列を含む構築物を包含することを意味する。これに関連して、発現は遺伝子産物が合成されることを必要としない。

40

【0121】

発現ベクターは、遺伝子的に工作されたアデノウイルスである。アデノウイルスの遺伝子的組織の知識(36kb、直線、二本鎖DNAウイルス)によって、アデノウイルスDNAの大きなピースと7kbまでの外来性配列の置換が可能になる(GrunhausおよびHorwitz、1992)。レトロウイルスとは異なって、なアデノウイルスDNAは潜在的遺伝毒性なしにエピソーム的作法で複製することができるので、宿主細胞がアデノウイルスに感染しても、染色体組み込みは起こらない。また、アデノウイルスは、構造的に安定であり、大量に増殖した後にゲノム再構成が検出されていない。アデノウイルスは、細胞サイクルの時期を考慮することなく、実質上すべての上皮細胞に感染することができる。これ

50

までに、アデノウイルス感染は、ヒトの急性呼吸器疾患などの軽い疾患のみに関係していることがわかっている。

【0122】

アデノウイルスは、ゲノムが中程度の大きさであり、取り扱いが容易であり、力価が高く、標的細胞の範囲が広く、かつ感染能力が高いので、遺伝子運搬ベクターとして特に好適である。ウイルスゲノムの両端には、ウイルスDNAの複製およびパッケージングに必要なcisエレメントである、100 - 200塩基対の逆方向反復 (ITRs : inverted repeats) が含まれている。ゲノムの初期 (E) および後期 (L) 領域は、ウイルスDNA複製の開始によって分けられる異なる転写ユニットを含んでいる。E1領域 (E1AおよびE1B) は、ウイルスゲノムおよび2、3の細胞遺伝子の転写の調節をつかさどるタンパク質をコードする。E2領域 (E2AおよびE2B) の発現により、ウイルスDNA複製のためのタンパク質の合成がなされる。これらのタンパク質は、DNA複製、後期遺伝子の発現および細胞停止に関与している (Renan、1990)。ウイルスキャプシドタンパク質の大部分が含まれる、後期遺伝子の産物は、主要後期プロモーター (MLP) によって生み出されるシングル第1次転写物の重大なプロセッシング後のみに発現される。MLP (16 . 8m.u.に位置する) は、感染の後期中特に有効であり、このプロモーターから生み出されるすべてのmRNAは、それらを翻訳に適したものにす、5' - 3分節リーダー (TPL) 配列をもつ。

10

【0123】

現在のシステムでは、組換えアデノウイルスは、シャトルベクターとプロウイルスベクターを用いた相同的組換えから作製される。2つのプロウイルスベクター間の可能な組換えにより、野生型アデノウイルスが、このプロセスから作製される。したがって、個々のプラークからウイルスのシングルクローンを単離し、そのゲノム構造を審査することが重要である。

20

【0124】

複製不能である、アデノウイルスベクターの作製および増殖は、ヒト胚腎細胞からAd5 DNAフラグメントによって形質転換され、E1タンパク質を構成的に発現する、293と称されるユニークヘルパー細胞系に従属している (Graham、1977)。E3領域はアデノウイルスゲノムから分与しうるので (JonesおよびShenk、1978)、293細胞のヘルプを受けて、アデノウイルスベクターは、E1、E3または両方の領域に外来性DNAを運搬する (GrahamおよびPrevec)。天然において、アデノウイルスは、およそ105%の野生型ゲノムをパッケージすることができるが (Ghosh-Choudhuryら、1987)、これは約2kb過剰のDNAに対するキャパシティである。E1およびE3領域に置換可能な約5 . 5kbのDNAと組み合わせ、アデノウイルスベクターの最大キャパシティは7 . 5kb以下、あるいはベクター全長の約15%である。80%以上のアデノウイルスゲノムがベクターバックボーンに残り、それらはベクターが生み出す細胞毒性源である。また、E1欠失ウイルスの複製不能性は不完全である。たとえば、ウイルス遺伝子発現の漏れが、高度多重性感染 (MOI) において現在入手可能なベクターに観察された (Muligan、1993)。

30

【0125】

ヘルパー細胞系がは、ヒト胚腎細胞、筋細胞、造血細胞または他のヒト胚間充織細胞または上皮細胞といったようなヒト細胞から誘導することができる。また、ヘルパー細胞は、ヒトアデノウイルスに対して許容性である他の哺乳類の細胞から誘導することもできる。このような細胞として、たとえば、ペロ細胞または他のサル胚間充織細胞または上皮細胞がある。上述したように、好ましいヘルパー細胞は、293である。

40

【0126】

近年、Racherら (1995) に、293細胞および増殖するアデノウイルスの改良された培養法が開示された。ひとつの方法では、天然の細胞集合体を個々の細胞を、100 - 200mlの培地を入れた1リットルのシリコンコーティングしたスピネルフラスコ (Technique、ケンブリッジ、UK) にて培養することによって成長させる。40rpmで攪拌し、細

50

胞の生存率をトリパンプルーで評価する。他の方法では、Fibra - Celマイクロキャリア (Bibby Sterlin, ストーン、UK) (5 g / l) を次のように用いる。5 ml の培地で再懸濁した細胞植え込み物を 250 ml のエルレンマイヤーフラスコに入れた該キャリア (50 ml) に加え、時々震とうしながら 1 - 4 時間置く。次いで培地を 50 ml の新鮮な培地と交換し、震とうを開始する。ウイルス産生のために、細胞を約 80 % の集密となるまで成長させ、その後、培地を交換し (最終体積の 25 % まで)、0.05 の MOI でアデノウイルスを加える。培養物を一夜静置し、次いで、体積を 100 % まで増加し、さらに 72 時間震とうする。

【0127】

アデノウイルスベクターが複製不能であること、または少なくとも条件付不能であることという要求以外には、アデノウイルスベクターが本発明を成功裏に実行することによって重大であるとは考えられない。アデノウイルスは、42 種類の異なるセロタイプまたはサブグループ A - F のいずれであってもよい。本発明に用いる条件付複製不能アデノウイルスベクターを得るためには、サブグループ C の 5 型アデノウイルスが好ましい開始材料である。5 型アデノウイルスは、生化学的および遺伝子的常包が非常によくわかっており、歴史的にアデノウイルスをベクターとして用いる構築物のほとんどに用いられてきているヒトアデノウイルスであるというのがその理由である

【0128】

上述したように、本発明の代表的なベクターは複製不能であり、アデノウイルス E1 領域を持たない。したがって、E1 コーディング配列が除去された位置に対象遺伝子をコードするポリヌクレオチドを導入するのが、もっとも簡便である。しかし、構築物をアデノウイルス配列に挿入する位置は、本発明において重大なことではない。Karlsonら (1986) に記載されているように、対象の遺伝子をコードするポリヌクレオチドを、E3 置換ベクターにおいて消失した E3 領域の代わりに、もしくは E4 が欠失したヘルパー細胞系またはヘルパーウイルス補体の E4 領域に挿入することもできる。

【0129】

アデノウイルスは成長および増殖させるのが容易であり、インビトロおよびインビボにおいて宿主範囲が広範である。このグループのウイルスは高力価 (10^9 10^{11} ユニット / ml など) であり、感染応力も高い。アデノウイルスのライフサイクルは、宿主細胞ゲノムへの組み込み必要としない。アデノウイルスベクターによってデリバリーされる外来性遺伝子はエピソーマルであり、それゆえに宿主細胞に対する遺伝毒性が低い。野生型アデノウイルスを用いたワクチン接種の研究においても副作用は報告されておらず (Couchra, 1963 ; Topら, 1971)、その安全性および治療上有効なインビボ遺伝子運搬ベクターであることは明らかである。

【0130】

アデノウイルスベクターは、真核遺伝子発現 (Levreroら, 1991 ; Gomez-Foixら, 1992) およびワクチンの開発 (GrunhausおよびHorwitz, 1992 ; GrahamおよびPrevenc, 1992) に用いられている。近年、動物実験により、組換えアデノウイルスを遺伝子療法に用いることが示唆された (Stratford-PerricaudetおよびPerreicaudet, 1991 ; Stratford-Perricaudetら, 1990 ; Richら, 1993) 組換えアデノウイルスを異なる組織に投与する研究として、気管滴下 (Rosenfeldら, 1991 ; Rosenfeldら, 1992)、筋肉注射 (Ragotら, 1993)、末梢静脈血管注射 (HerzおよびGerard, 1993) および脳内ステレオタクチック植え込み (Le Gal La Salleら, 1993) などがある。

【0131】

レトロウイルスは、逆転写を行って感染した細胞内でその RNA を二本鎖 DNA に変換する能力を特徴とする一本鎖 RNA ウイルスのグループである (Coffin, 1990)。次いで、得られる DNA をプロウイルスとして細胞内染色体へ安定に組み込み、ウイルスタンパク質の合成を行う。組み込みによって、レシピエント細胞およびその子孫細胞にウイルス遺伝子配列が保有される。レトロウイルスゲノムは、キャプシドタンパク質、ポリメ

10

20

30

40

50

ラーゼ酵素およびエンベロープ成分をそれぞれコードするgag、polおよびenvの3つの遺伝子を含んでいる。gag遺伝子から上流に発見された配列は、ゲノムをピリオンにパッケージングするシグナルを含んでいる。2つの長い末端反復(LTR)配列が、ウイルスゲノムの5'および3'末端に存在する。これらは、強力なプロモーターおよびエンハンサー配列を含んでおり、宿主細胞ゲノムに組み込むためにも必要である(Coffin、1990)。

【0132】

レトロウイルスベクターを構築するためには、複製不能なウイルスを産生するためのウイルス配列の代わりに、対象の遺伝子をコードする核酸をウイルスゲノムへ挿入する。ピリオンを産生するためには、gag、polおよびenv遺伝子を含むが、LTRを含まないパッケージング細胞系およびパッケージング成分を構築する(Mannら、1983)。cDNA、およびレトロウイルスLTRならびにパッケージング配列を含む組換えプラスミドを細胞系に導入する場合(リン酸カルシウム沈降法などにより)、パッケージング配列によって、組換えプラスミドのRNA転写物がウイルス粒子にパッケージされるようになり、次いで培養培地へ分泌される(NicolasおよびRubenstein、1988; Temin、1986; Mannら、1983)。次いで、組換えレトロウイルスを含む培地を、集め、必要に応じて濃縮し、遺伝子運搬に使用する。レトロウイルスベクターは、広範なタイプの細胞に感染することができる。しかし、組み込みおよび安定した発現には、宿主細胞の分割が必要である(Paskindら、1975)。

10

【0133】

近年、レトロウイルスベクターを特異的に標的化するために設計される新規なアプローチが、ウイルスエンベロープにラクトース残基を化学的に付加することによるレトロウイルスの化学的修飾にもとづいて発達してきた。この修飾によってシアログリコタンパク質受容体を介する肝細胞の特異的感染が可能になった。

20

【0134】

レトロウイルスエンベロープタンパク質および特定の細胞受容体に対するビオチン化抗体を使用するという、組換えレトロウイルスの標的化への異なるアプローチが設計された。クラスIおよびクラスIIの主要細胞適合性複合体抗原に対する抗体を用いて、異所性ウイルスによる、表面抗原を生み出す種々のヒト細胞の感染が実証された(Rouxら、1989)。

30

【0135】

本発明のすべての態様において、レトロウイルスベクターの使用に対しては制限がある。たとえば、通常、レトロウイルスベクターは、細胞ゲノム内のランダムな部位に組み込む。このことから、宿主遺伝子の遮断またはウイルス調節配列の挿入による挿入突然変異誘発が起こり、フランキング遺伝子の機能を妨害する(Varmusら、1981)。欠陥ウイルス使用に関するもうひとつの関係は、パッケージング細胞における野生型複製コンピテントウイルスの潜在的出現である。これは、組換えウイルスの完全な配列が、宿主細胞ゲノムに組み込まれたgag、pol、env配列の上流に挿入されるという組換えイベントに由来する。しかし、今や新規なパッケージング細胞系が入手可能であり、組換えの可能性は大きく減少すべきである(Markowitzら、1988; Hersdorfferら、1990)。

40

【0136】

本発明において、発現構築物として、他のウイルスベクターを用いてもよい。ワクシニアウイルス(Ridgeway、1988; Baichwalおよびsugden、1986; Couperら、1988)、アデノ関連ウイルス(AAV)(Ridgeway、1988; Baichwalおよびsugden、1986; HermonatおよびMuzycska、1984)および単純ヘルペスウイルスなどのウイルス由来のベクターを用いることができる。これらは、種々の哺乳類細胞に対していくつかの興味ある特徴を提供する(Friedmann、1989; Ridgeway、1988; Baichwalおよびsugden、1986; Couperら、1988)。

【0137】

欠陥B型肝炎ウイルスの細菌において最近認識されたことは、異なるウイルス配列の構

50

造 - 機能の関係について新しい洞察が得られたことである。インビトロの実験から、該ウイルスが、そのゲノムの80%が欠失しているにも関わらず、ヘルパー依存性パッケージングおよび逆転写能力を保有しうることが示された。このことから、ゲノムの大部分を外来性の遺伝物質で置きかえることが可能であることが示唆された。肝臓関連遺伝子の運搬にとって、ヘパトロピズムおよび耐性(組み込み)が特に興味ある特性であった。Changらは、最近、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子をポリメラーゼ、表面およびプレ表面コーディング配列の位置において、アヒルB型肝炎ウイルスゲノムに導入した。それは、野生型ウイルスとともにトリ肝臓癌細胞系に共移入された。高い力価の組換えウイルスを含む培養培地を用いて一次カモ肝細胞を感染させた。安定なCAT遺伝子の発現が感染後少なくとも24日間検出された(Changら、1991)

10

【0138】

センスおよびアンチセンス遺伝子構築物を効率よく発現させるために、発現構築物を細胞内にデリバリーしなければならない。このデリバリーは、細胞系の形質転換を行う実験操作としてインビトロにて、あるいは疾患の治療としてインビボまたはインビトロにて行うことができる。デリバリーのメカニズムのひとつは、ウイルス感染を介することであり、発現構築物を感染ウイルス粒子内に封入する。

【0139】

発現構築物を培養した哺乳類細胞内に運搬する方法としてウイルスを用いない幾つかの方法も本発明に用いることができる。これらの方法として、リン酸カルシウム沈降法(GrahamおよびVan Der Eb、1973;ChenおよびOkayama、1987;Rippeら、1990)、DEDA-デキストラン(Gopal、1985)、電気穿孔法(Tur-Kaspaら、1986;Potterら、1984)、直接マイクロインジェクション(HarlandおよびWeintraub、1985)、DNA-装填リポソーム(Nicolau、およびSene、1982;Fraleleyら、1979)およびリポフェクタミン-DNA複合体、細胞音波処理法(Fecheimerら、1987)、高速マイクロ発射装置による遺伝子爆撃法(Yangら、1990)および受容体媒介移入(WuおよびWu、1987;WuおよびWu、1988)が挙げられる。これらの技術のいくつかは、インビボまたはインビトロの使用において有効である。

20

【0140】

発現構築物を細胞にいったんデリバリーすると、対象遺伝子をコードする核酸を異なる部位に配置し、発現させることができる。具体例においては、該遺伝子をコードする核酸を細胞のゲノム内に安定に組み込む。この組み込みは、相同的組換えによって同種の位置および方向性にする(遺伝子置換)か、あるいはランダムな不特定の位置にする(遺伝子オーギュメンテーション)ことができる。他の具体例においては、DNAの分離したエピソームセグメントとして核酸を細胞内に安定に維持する。このような核酸セグメントまたは“エピソーム”は、宿主細胞のサイクルとは独立して、あるいは同調して維持および複製を行うに十分な配列をコードしている。どのように発現構築物を細胞にデリバリーするか、そして細胞内のどこで核酸を保持するかは、使用した発現構築物のタイプに応じて決める。

30

【0141】

本発明の他の具体例においては、発現構築物は、単純に、無処置(NAKED)の組換えDNAまたはプラスミドからなる。該構築物の運搬は、物理的または化学的に細胞膜を透過し得る、前述の方法いずれ方法でもおこなってもよい。このことは特にインビトロにおける運搬に適用されるが、インビボでも同様に適用することができる。

40

【0142】

Dubenskyら(1984)は、ポリオーマウイルスDNAをリン酸カルシウム沈降体として成体および新生児マウスの肝臓および脾臓に注入し、活発なウイルス複製および急性感染を実証するのに成功した。BrevenistyおよびNeshif(1986)もまた、リン酸カルシウム沈降処理したプラスミドの直接腹腔内注射により、移入された遺伝子の発現が得られることを実証した。対象遺伝子をコードするDNAもまた同様の作法でインビボにて運搬

50

され、遺伝子産物を発現することができることが想定される。

【0143】

さらに他の本発明の具体例においては、無処置のDNA発現構築物を細胞内に運搬するために粒子爆撃法が用いられる。この方法は、細胞を生かしたまま細胞膜に孔を穿ち、DNAを細胞内に導入するための、DNA被覆マイクロ発射体を高速に加速する能力に依存している(Kleinら、1987)。小さい粒子を加速するいくつかの装置が開発されている。

このような装置のひとつは、高圧放電を用いて、作動力を順に生み出す電流を発生させることを利用している(Yangら、1990)。使用するマイクロ発射体は、タングステンまたは金のビーズなどの生物学的に不活性な物質からなる。

10

【0144】

ラットおよびマウスの肝臓、皮膚および筋組織などの選択された器官が、インビボにて爆撃されている(Yangら、1990; Zeleninら、1991)。これには、組織または細胞を外科処置に付し、銃砲と標的器官の間にある組織を切除することが必要である(エクスピボ処置)。特定の遺伝子をコードするDNAをこの方法によってデリバリーすることができ、この方法は本発明の参考として組み込まれている。

【0145】

本発明のさらに他の具体例においては、発現構築物をリポソーム内に補足する。リポソームは、リン脂質二重膜および内部水性媒体を特徴とする小胞構造である。多重ラメラリポソームは、水性媒体によって分離される多重脂質層をもつ。これは、リン脂質を過剰の水性媒体に懸濁すると形成される。閉鎖構造が形成される前に脂質成分は自己再構成され、水分および脂質二重層間の溶解した溶質を補足する(GhoshおよびBachhawat、1991)。リポフェクタミン-DNA複合体も本発明に含まれる。

20

【0146】

インビトロにおけるリポソーム媒介性核酸デリバリーおよび外来性DNAの発現は非常に成功しやすい。Wongら(1980)には、培養されたヒヨコ胚、HeLaおよび肝臓癌細胞における、リポソーム媒介性デリバリーおよび外来性DNAの発現が実証されている。Nicolauら(1987)は、ラットにおいて静脈内注射後のリポソーム媒介性遺伝子運搬に成功した。

【0147】

本発明の別の具体例においては、リポソームと血液凝集ウイルス(HVJ)との複合体を作製する。このことによって、細胞膜との融合が促進され、リポソームに封入されたDNAの細胞内への導入をプロモートされることが示されている(Kanedaら、1989)。他の具体例では、リポソームを核非ヒストン染色体タンパク質(HMG-1)と複合あるいは結合させている(Katoら、1991)さらに他の具体例では、リポソームをHVJおよびHMG-1の両方と複合あるいは結合させている。このような発現構築物がインビトロおよびインビボにて核酸の運搬および発現に有効に用いられる場合、それらは、本発明に適用可能である。細菌プロモーターをDNA構築物に用いる場合、リポソーム内に適当な細菌ポリメラーゼが含まれることも望まれる。

30

【0148】

特定の遺伝子をコードする核酸を細胞へデリバリーするのに用いることができる他の発現構築物は、受容体-媒介性デリバリービヒクルである。これらは、ほとんどの真核細胞における受容体-媒介性エンドサイトーシスによる巨大分子の選択的取り込みという利点をもっている。種々の受容体の細胞型特異的分散により、デリバリーは特異性が高い(WuおよびWu、1993)。

40

【0149】

受容体媒介性遺伝子標的化ビヒクルは、一般に2つの成分からなる：細胞受容体-特異的リガンドとDNA-結合剤である。いくつかのリガンドが受容媒介性遺伝子運搬に用いられてきた。最も広範囲にわたって特徴がわかっているリガンドは、アシアロオロソムコイド(ASOR)(WuおよびWu、1987)およびトランスフェリン(Wagnerら、199

50

0)。最近、ASORと同じ受容体を認識する合成ネオ糖タンパク質は、遺伝子デリバリービヒクルとして使用されている (Fercolら、1993; Peralesら、1994) および上皮増殖因子 (EGF) もまた遺伝子をうるこ状のカルシノーマ細胞へデリバリーするのに用いられている (Myers、EPO0273085)。

【0150】

他の具体例においては、デリバリービヒクルは、リガンドおよびリポソームからなる。たとえば、Nicolauら (1987) は、ラクトシル-セラミド、ガラクトース末端アシアルガングリオシドをリポソームに封入し、肝細胞によるインスリン遺伝子の取り込みの増加を観察した。したがって、リポソームを持つ/持たない、いくつかの受容体-リガンド系によって、特定の遺伝子をコードする核酸を、肺、上皮または腫瘍細胞などのタイプの細胞へ特異的にデリバリーすることができる。たとえば、EGF受容体のアップレギュレーションを呈している多くの腫瘍細胞において、遺伝子をコードする核酸の媒介性デリバリーのための受容体として上皮増殖因子 (EGF) を用いることができる。マンノースを用いて肝臓細胞上のマンノース受容体を標的化することができる。また、CD5 (CLL)、CD22 (インパ腫)、CD25 (T細胞白血病) およびMAA (黒色肉腫) に対する抗体も、同様に標的化部分として用いることができる。

10

【0151】

別の具体例においては、遺伝子運搬を、エクスピボ条件下で、より容易に行うことができる。エクスピボ遺伝子療法とは、動物からの細胞を単離し、インビトロにて細胞へ核酸をデリバリーし、次いで修飾細胞を動物へ戻すことを意味する。これには、動物、または細胞および組織の一次培養物から、組織/器官を外科的に除去することが含まれる。

20

【0152】

一次哺乳類細胞培養物は、種々の方法で調製することができる。インビトロ実験中、および発現構築物と接触している間中、細胞を生かしておくためには、細胞を、正しい割合の酸素と二酸化炭素ならびに栄養と接触させ、微生物による汚染からは保護することが必要である。細胞培養技術については、文献が多数存在するが、Freshner (1992) にも開示されている。

【0153】

前述の具体例のひとつにおいては、タンパク質の産生のために遺伝子トランスファーを使用して細胞を不死化することが関係している。対象の遺伝子を前述のようにして適当な宿主細胞へ運搬し、次いで、細胞を適当な条件下で培養する。実質上いずれかのポリペプチドをコードする遺伝子をこの方法において用いることができる。組換え発現ベクター、およびそれらに含まれるエレメントの製造については前に記している。別の言い方をすれば、産生されるべきタンパク質は、細胞内で正常に合成される内在性タンパク質である。

30

【0154】

有用な哺乳類宿主細胞系の例としては、VeroおよびHeLa細胞ならびにチャイニーズハムスター卵巣の細胞系、W138、BHK、COS-7、293、HePG2、NIH3T3、RINおよびMDC細胞が挙げられる。さらに、挿入された配列の発現を調節する宿主細胞株、あるいは所望の作法で遺伝子産物を修飾し、プロセッシングする宿主細胞株を選択する。タンパク質産物のこのような修飾 (グリコシル化など) およびプロセッシング (切断など) はタンパク質の機能にとって重要である。異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳後プロセッシングおよび修飾のための特徴的および特異的メカニズムをもっている。適当な細胞系または宿主系を選択して、発現した外来性タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にすることができる。

40

【0155】

それぞれ、tk-、hgprt-またはaprt-細胞内にある、HSVチミジンキナーゼ、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼおよびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子などの多くの選択系を用いることができるが、これらに限定されるものではない。また、抗代謝産物耐性を、dhfr (に耐性を付与); gpt (ミコフェノール酸に対する耐性を付与); neo (アミノグリコシドG418に対

50

する耐性を付与) ; および h y g r o (ヒグロマイシンに対する耐性を付与) に対する選択の基準として用いることができる。

【 0 1 5 6 】

動物細胞をインビトロにて2つのモードで増殖させることができる : 増殖するとき、培養物のバルク全体に懸濁物として成長する非足場依存性細胞として、または固体基質への付着を必要とする足場依存性細胞 (すなわち、単層型細胞増殖) として、である。

【 0 1 5 7 】

連続樹立細胞系からの非足場依存性あるいは懸濁培養物は、細胞あるいは細胞製品を大規模に製造する場合に最も広範囲に用いられている手段である。しかし、懸濁培養細胞は、潜在的腫瘍化能および付着T細胞よりもタンパク質産生が低いといったような制限を有している。

10

【 0 1 5 8 】

攪拌タンク内での大規模な哺乳動物細胞の培養は、組換えタンパク質の製造において通例の方法である。2つの懸濁培養反応槽のデザイン、すなわち、攪拌型反応槽と空気揚水型反応槽が広く用いられている。攪拌型槽は、インターフェロンの製造において8000リットルのキャパシティで順調に用いられている。細胞は、高さと直径の比率が1 : 1 ~ 3 : 1のステンレスのタンク内で増殖する。通常、培養物は、平たいブレード状のディスクあるいは海中で用いるプロペラのパターンをもつ、1つまたはそれ以上の攪拌器で混合される。平たいブレードよりも剪断力の小さい攪拌器システムもある。混合は、磁氣的に組み合わせられた駆動力によって直接的あるいは間接的に駆動される。間接的駆動では、攪拌軸をシールすることによって微生物による汚染のリスクが軽減される。

20

【 0 1 5 9 】

最初は微生物発酵用に使用され、後に哺乳動物培養に用いられた空気揚水反応槽は、培養物の攪拌および酸素処理の両方のために気流を利用している。気流は、反応槽内の上昇セクションに導入され、内容物を循環させる。気体は、培養物の表面で開放され、液体を含まない気体のバブルは、反応層の下降セクションに移動する。このデザインの主な利点は、単純性および機械的攪拌を必要としないことである。代表的には、高さと直径の比率は10 : 1である。空気揚水反応槽のスケールアップは比較的容易であり、それによって気体の移動性は良好になり、剪断力はより小さくなる。

【 0 1 6 0 】

本発明の抗体は、免疫沈降法を用いた抗原の単離に特に有用である。免疫沈降法は、複合体混合物から標的抗原成分を分離することが必要であり、少量のタンパク質の区別あるいは単離に用いられる。胆汁塩などの他の作用剤もよいが、非イオン性塩が好ましく、酸性pHまたは二価のカチオンの存在下で沈降する。抗体およびその用途について以下にさらに記載する。

30

III . T S 1 0 q 2 3 . 3 との反応性を有する抗体の発生

【 0 1 6 1 】

別の面では、本発明は本発明の T S 1 0 q 2 3 . 3 分子と免疫反応性である抗体、またはその一部を意図するものである。抗体はポリクローナルまたはモノクローナル抗体であってよい。好ましい実施態様では、抗体はモノクローナル抗体である。抗体を製造および確認する手法は該分野でよく知られている (例えば、ハウエル (Howell) およびレーン (Lane) (1988) を参照) 。

40

【 0 1 6 2 】

簡潔に言えば、ポリクローナル抗体は本発明のポリペプチドからなる免疫原で動物を免疫化し、該免疫化した動物から抗血清を収集することで製造する。広範囲の動物種を抗血清の産生において使用可能である。典型的に、抗 - 抗血清の産生に使用する動物は兎、マウス、ラット、ハムスター、豚または馬などの非 - ヒトの動物である。比較的大量の血液量を有しているために、兎はポリクローナル抗体の産生にとって好ましい選択肢である。

【 0 1 6 3 】

イソ型の抗原にとって特異的なポリクローナルおよびモノクローナル両抗体は、該分野

50

の当業者にとって一般的に知られているように、通常の免疫化の技法を用いて製造可能である。本発明の化合物の抗原エピトープを含有する組成物を兔またはマウスなどの1以上の実験動物を免疫化させ、次いで本発明の化合物に対して特異的な抗体を産生させることができる。抗体が発生する時間が経過した後、単に該動物から採血し、全血液から血清試料を製造して、ポリクローナル抗血清を得ることができる。

【0164】

本発明のモノクローナル抗体は、エライザ法およびウエスタンブロット法などの標準的免疫化学操作法や組織染色などの免疫組織化学操作法、さらにTS10q23.3 - 関連抗原エピトープに特異的な抗体を利用し得る他の操作法に適用することが提案される。加えて、異種のあるTS10q23.3に特異的なモノクローナル抗体を他の有用な応用に利用することも提案される。

10

【0165】

一般的に、TS10q23.3に対するポリクローナルおよびモノクローナル両抗体を様々な実施態様において使用可能である。例えば、それらをcDNAまたは他のTS10q23.3をコードする遺伝子を得るために、抗体クローニングプロトコールにおいて使用可能である。それらはまた、細胞または動物中のTS10q23.3関連ペプチドの影響を分析するための阻害研究においても使用可能である。抗-TS10q23.3抗体をまた、様々な細胞事象の間TS10q23.3の分布を分析するために、例えば細胞周期における異なる時点でのTS10q23.3ポリペプチドの細胞または組織 - 特異的分布を決定するために免疫局在化研究においても有用となる。該抗体の特に有用な利用は、天然または組換えTS10q23.3を精製する場合、例えば抗体アフィニティーカラムを用いる場合である。該免疫学的技法全てにおける操作が本発明の開示に照らして当業者に知られている。

20

【0166】

抗体を製造および確認する手法は該分野でよく知られている（例えば、ハーロウ(Harlow)およびレーン(Lane)(1988)による引例（このものを本明細書中に盛り込む）を参照）。モノクローナル抗体製造のより特定の例として、以下の実施例を挙げる。

【0167】

該分野でよく知られているとおり、得られた組成物は該免疫原性において多岐にわたる。したがって、ペプチドまたはポリペプチド免疫原を担体にカップリングさせることで達成可能となるように、宿主免疫系を促進することが場合により必要となる。典型的かつ好ましい担体としては、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)および牛血清アルブミン(BSA)が挙げられる。オボアルブミン、マウス血清アルブミンおよび兔血清アルブミンなどの他のアルブミンもまた担体として使用可能である。担体タンパク質にポリペプチドを接合する手法は該分野でよく知られており、グルタルアルデヒド、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミドおよびビス-ジアゾ化ベンジジンが挙げられる。

30

【0168】

該分野でよく知られているとおり、特定の免疫原組成物の免疫原性をアジュバントとして知られる免疫応答の非-特異的刺激物質を用いることで拡張可能である。典型的および好ましいアジュバントとしては、完全フロイントアジュバント（殺菌した結核菌を含有する免疫応答の非-特異的刺激物質）、不完全フロイントアジュバントおよび水酸化アルミニウムアジュバントなどが挙げられる。

40

【0169】

ポリクローナル抗体の産生に用いる免疫原組成物の量は免疫化するのに用いた動物と同様に免疫原の性質で変わってくる。該免疫原を投与するのに、様々な経路を用いることが可能である（皮下、筋肉内、皮内、静脈内および腹腔内）。免疫化した後、免疫化された動物の血液を様々な時点でサンプリングすることで、ポリクローナル抗体の産生を追跡可能である。第2に、プースター、注入を行なうことも可能である。適当な力価を達成するまで、プースティングおよびタイターリングの工程を繰り返した。免疫原性の望むレベ

50

ルが得られると、該免疫化動物から血を採り、血清を単離、貯蔵可能であり、および/または m A b s を発生させるために該動物を使用することもできる。

【0170】

M A b s を、米国特許第4,196,265号に例示の技法(本明細書中に引例として盛り込む)などの公知技法を用いて容易に製造可能である。典型的に、本技法は選択した免疫原組成物、例えば精製もしくは部分的に精製した T S 1 0 q 2 3 . 3 タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドまたは高レベルの T S 1 0 q 2 3 . 3 を発現する細胞を用いて適当な動物を免疫化することを含有する。該免疫化組成物を、抗体産生細胞を刺激するのに有効な方法で投与する。マウスおよびラットなどのげっ歯類が好ましい動物であるが、しかしながら、兎、羊、蛙細胞を使用することも可能である。ラットを用いると特定の利点を供することが可能であるが(ゴードینگ(Goding)による(1986))、好ましいのはマウスであり、最も煩雑に用いられおよび一般的に高いパーセンテージで安定な融合が得られる理由で B A L B / c マウスが最も好ましい。

10

【0171】

免疫化に続き、抗体を産生する能力を有する体細胞、特に B - リンパ球(B - 細胞)を m A b 発生プロトコールにおいて使用するために選択する。該細胞は生検脾臓、扁桃もしくはリンパ節から得られ、または末梢血液試料から得られる。脾臓細胞および末梢血球が好ましく、前者は分裂血漿未分化期にある抗体産生細胞の源として豊富であるため、また後者は末梢血液が容易に入手可能であるために好ましい。しばしば、1群の動物を免疫化し、最も高い抗体力価を有する動物の脾臓を取り、該脾臓をシリンジで均一化することで脾臓リンパ球を得る。典型的に、免疫化したマウスからの脾臓はおよそ $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ リンパ球を含有する。

20

【0172】

次いで、免疫化した動物からの抗体産生 B リンパ球を不死化骨髄腫細胞、一般的に免疫化した動物と同種のもの細胞と融合する。ハイブリドーマ産生融合法に使用するのに適した骨髄腫細胞系としては、抗体を産生せず、高い融合効率を有し、目的の融合細胞(ハイブリドーマ)だけの増殖を支持する特定の選択培地では生長し得ないような酵素欠損のものが好ましい。

【0173】

当業者に知られているように、多くの骨髄腫細胞のいずれか1つを使用可能である(ゴードینگによる(1986); キャンベル(Campbell)による(1984))。例えば、免疫化された動物がマウスである場合、P 3 - X 6 3 / A g 8、P 3 - X 6 3 - A g 8 . 6 5 3、N S 1 / 1 . A g 4 1、S P 2 1 0 - A g 1 4、F O、N S O / U、M P C - 1 1、M P C 1 1 - X 4 5 - G T G 1 . 7 および S 1 9 4 / 5 X X 0 B u 1 を; ラットの場、R 2 1 0 . R C Y 3、Y 3 - A g 1 . 2 . 3、I R 9 8 3 F および 4 B 2 1 0 を; 並びに U - 2 6 6、G M 1 5 0 0 - G R G 2、L 1 C R - L O N - H M y 2 および U C 7 2 9 - 6 を使用可能であり、これらは全て、細胞融合と併せて有用である。

30

【0174】

抗体産生脾臓もしくはリンパ節細胞および骨髄腫細胞のハイブリッドを発生する方法は通常、体細胞を骨髄腫細胞と 2 : 1 の比で混合することからなるが、該比は細胞膜の融合を促進する1個の薬剤または複数の薬剤(化学的または電氣的)の存在下、各々約 2 0 : 1 ~ 約 1 : 1 までの多岐にわたる。センダイウイルスを用いた融合法は既に記載されており(コーラー(Kohler)およびミルステイン(Milstein)による(1975); (1976))、37%(v/v) P E G などのポリエチレングリコール(P E G)を用いるものがある(ゲフター(Geffer)らによる(1977))。電氣的に誘導された融合法の使用もまた適当である(ゴードینگによる(1986))。

40

【0175】

融合製法により通常、低頻度($1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-8}$)で生長しうる(viable)ハイブリッドを産生する。しかしながら、生長しうる融合したハイブリッドは選択培地中で培養することによって母細胞、未融合細胞(特に、通常無限に分割し続ける未融合骨髄腫

50

細胞)から分化するので、このことは問題にならない。該選択培地は一般的に、組織培養培地においてヌクレオチドの新生合成を遮断する薬剤を含有するものである。典型的かつ好ましい薬剤はアミノプテリン、メトトレキセートおよびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキセートはプリンおよびピリミジンの両新生合成を遮断する一方、アザセリンはプリン合成だけを遮断する。アミノプテリンもしくはメトトレキセートを用いる場合、培地はヌクレオチドの源としてヒポキサンチンおよびチミジンで補足する(HAT培地)。アザセリンを用いる場合、培地をヒポキサンチンで補足する。

【0176】

好ましい選択培地はHAT培地である。ヌクレオチド再生経路を操作することの可能な細胞だけがHAT培地中で生存可能である。該骨髄腫細胞は再生経路の重要な酵素、例えばヒポキサンチン・ホスホリボシル・転移酵素(HPRト)が欠損しており、生存不可能である。B-細胞は本経路をオペレートすることができるが、それらは培地中で限られた寿命を有しており、一般的に約2週間以内に死亡する。したがって、選択培地中で生存可能な唯一の細胞は骨髄腫とB-細胞から形成するハイブリッドである。

10

【0177】

本培地により、選別された特定のハイブリドーマ由来のハイブリドーマの集団が提供される。典型的に、ハイブリドーマの選別はマイクロタイタープレート中で単クローン希釈によって細胞を培養し、続いて個々のクローン上清を目的の反応に対して調べる(約2~3週間後)ことを行なう。該アッセイは感度がよく、簡単でかつ早急なラジオイムノアッセイ、酵素免疫アッセイ、細胞毒性アッセイ、ブランクアッセイ、ドット免疫結合アッセイなどが挙げられる。

20

【0178】

次いで、選別したハイブリドーマを連続して希釈し、個別に抗体-産生細胞系中でクローンし、次いで該クローンを無限に生長させてmAbを得る。該細胞系を2通りの基本的な方法でmAb産生に利用可能である。ハイブリドーマの試料を、初期の融合において体細胞と骨髄腫細胞を提供するために使用するタイプの組織適合性動物中(腹腔腔中が多い)に注入する。該注入された動物は融合細胞ハイブリッドによって産生された特定のモノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発生させる。次いで、血清もしくは腹水などの動物の体液を採取して、高濃度のmAbを得る。該個々の細胞系はインビボで培養することもでき、その場合mAbは培地中に自然に分泌され、該培地から高濃度で容易に得られる。どちらの手法により産生したmAbも、できれば過、遠心分離、およびHPLCもしくはアフィニティークロマトグラフィーなどの様々なクロマトグラフィー法を用いてさらに精製される。

30

【0179】

IV. TS10q23.3を含有する癌の診断

本発明者はTS10q23.3の改変が悪性腫瘍と関連することを見出した。したがって、Ts10q23.3およびそれに対応する遺伝子を癌の診断または予後指示物質として使用可能である。さらに特に、TS10q23.3に関連する点突然変異、欠先変異、挿入または調節摂動(regulatory perturbation)は、癌を引き起こしたりもしくは癌の発生を促進し、一次部位での癌の進行を引き起こしたりもしくは促進し、および/または転移を引き起こしたりもしくは促進する可能性がある。TS10q23.3によって影響をうけ得る悪性腫瘍に関連した他の現象としては血管形成および組織侵襲が挙げられる。

40

【0180】

A. 遺伝子診断

本発明の1実施態様は、TS10q23.3の発現における変化を検出する方法からなる。この方法は、TS10q23.3のレベルを決定することまたは発現させた生成物における特定の改変を決定することからなり得る。明らかに、この種のアッセイは関連癌の診断において重要性を持つ。該癌としては脳の癌(神経こう、髄芽腫、神経こう星状細胞腫、乏突起こう腫、脳室上皮腫)、肺、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、小腸、血球、リンパ節、結腸、乳、子宮内膜、胃、前立腺、精巣、卵巣、皮膚、頭部と頸部(head and neck)、

50

食道、骨髄、血液または他の組織の癌を含有する。特に、本発明は神経こう腫（グリオーム）の診断に関する。

【0181】

生体試料はいかなる組織または液体であってもよい。様々な実施態様としては、皮膚、筋肉、顔、脳、前立腺、乳、子宮内膜、肺、頭部と頸部、膵臓、小腸、血球、肝臓、精巣、卵巣、結腸、皮膚、胃、食道、脾臓、リンパ節、骨髄もしくは腎臓の細胞が挙げられる。他の実施態様としては、末梢血液、リンパ液、腹水、血漿、胸膜滲出液（胸水）、痰、脳脊髄液、涙液、便もしくは尿などの液体試料が挙げられる。

【0182】

使用する核酸は、標準方法論（サンプルックらによる(1989)）に従い、生体試料中に含まれる細胞から単離する。該核酸は遺伝的DNAまたは分画もしくは全細胞RNAであってよい。RNAを用いる場合、該RNAを相補的DNAに変換することを望むことも可能である。1実施態様において、RNAは全細胞RNAであり、他方ではポリ-A RNAである。通常、核酸は増幅される。

10

【0183】

場合によっては、試料中の関係する特定の核酸を増幅によって直接に、または増幅後第2の公知の核酸を用いて同定する。次に、同定した生成物を検出する。特定の利用の場合、該検出は可視手段（例えば、ゲルの臭化エチジウム染色）により行ない得る。別法として、該検出は放射線標識もしくは蛍光標識の化学発光、放射性シンチグラフを介した、または電気的もしくは熱的インパルス信号を用いるシステムを介した該成物の間接的な同定

20

【0184】

検出に続いて、該患者において見られた結果を、正常人およびTS10q23.3に関連した病気を持った患者の統計学的に有意な対照群のデータと比較する。本方法において、様々な臨床状態で検出したTS10q23.3の量もしくは種類を関連付けることが可能である。

【0185】

様々なタイプの欠損が同定されている。したがって、“改変”とは欠損、挿入、点突然変異および重複をはじめとするものであると理解できる。点変異により停止コドン、フレームシフト変異またはアミノ酸置換が生じる。体細胞突然変異は非-胚芽細胞系列組織中で起こるものである。胚芽細胞系列組織はいかなる組織中でも生じ、遺伝可能である。

30

【0186】

コード領域の内側および外側での変異はまた、遺伝子の転写を変えることで産生した、あるいは不安定化する際にまたは他に転写物(mRNA)もしくはタンパク質のプロセッシングを変える際に産生したTS10q23.3の量に影響を及ぼし得る。

【0187】

多岐にわたり異なるアッセイが本観点において予想され、例えばフロレッセント・イン・シチュー・ハイブリダイゼーション(fluorescent in situ hybridization; FISH)、直接DNAシーケンシング、PFG分析(パルスフィールド電気泳動)、サザンもしくはノーザンブロット法、一本鎖立体配座分析(single-stranded conformation analysis; SCA)、RNAse保護アッセイ(リボヌクレアーゼ保護アッセイ)、対立遺伝子-特異的オリゴヌクレオチド(allele-specific oligonucleotide; ASO)、ドットブロット分析、変性勾配ゲル電気泳動法、PFLPおよびPCR-SSCPが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【0188】

(i) プライマーおよびプローブ

本明細書中で定義する通り、語句「プライマー」は鋳型-依存工程において形成されつつある核酸の合成を初回免疫可能ないかなる核酸をも含有することを意味する。典型的に、プライマーは長さ：10~20塩基対のオリゴヌクレオチドであるが、それより長い配

50

列も使用可能である。プライマーは二本鎖もしくは一本鎖の形態で供されるが、一本鎖の形態が好ましい。プローブはプライマーとして作用し得るが、プローブは個別に定義する。プローブはおそらく初回免疫可能であろうが、標的DNAもしくはRNAに結合するよう設計し、増幅工程で使用する必要はない。

【0189】

好ましい実施態様では、該プローブまたはプライマーは放射性同位元素 (^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^3H もしくは他の標識)、発蛍光団(ローダミン、フルオロセリン)または化学発光物質(ルシフェラーゼ)を用いて標識する。

【0190】

(ii) 鋳型依存性増幅法 (Template Dependent Amplification Methods)

多くの鋳型依存性工程は与えられた鋳型試料中に存在するマーカー配列を増幅するのに役立つ。最善の公知増幅法の1つは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCRTM と呼ばれる) であり、このものは米国特許番号第4,683,195、4,683,202および4,800,159中およびインニスら(1990)中に詳細に記載されており、該各々を本明細書中にそっくりそのまま引例として盛り込む。

【0191】

簡潔に言えば、PCRにおいて、マーカー配列の反対相補鎖上の領域に相補的である2個のプライマー配列を製造する。過剰のデオキシヌクレシド・トリホスフェートをDNAポリメラーゼ(例えば、タック(Taq)ポリメラーゼ)と共に反応混合物に加える。マーカー配列が試料中に存在するならば、該プライマーは該マーカーに結合し、ポリメラーゼはヌクレオチドを加えることでマーカー配列に沿ってプライマーを伸張するようになる。反応混合物の温度を上昇および低下させることで、該伸張プライマーは該マーカーから解離して反応生成物を形成し、過剰のプライマーはマーカーおよび反応生成物に結合し、そして該工程は繰り返される。

【0192】

逆転写PCR増幅製法を増幅されたmRNAの量を定量するのに用いられる。逆転写RNAのcDNAへの逆転写方法は公知であり、サンプルックら(1989)により記載されている。逆転写の改変法は熱的に安定なRNA-依存DNAポリメラーゼを使用する。該方法はWO90/07641(1990年12月21日発行)中に記載されている。ポリメラーゼ連鎖方法は該分野で公知である。

【0193】

別の増幅方法はリガーゼ連鎖反応("LCR")であり、このものはEPO番号320 308中に記載されており、このものを引例として本明細書中にそっくりそのまま盛り込む。LCRにおいては、2個の相補的プローブ対を作製し、標的配列の存在下、各対を互いに接する(abut)ように標的の反対相補鎖に結合させる。リガーゼの存在下、2個のプローブ対を連結させると一本鎖単位を形成する。PCRの場合と同様に温度を繰り返し変化させることで、結合ライゲート単位は標的から解離し、次いで過剰のプローブ対のライゲーションに対する"標的配列"として作用する。米国特許番号第4,883,750号では、プローブ対の標的配列に対する結合についてLCRと同様の方法を記載している。

【0194】

Q-レプリカーゼ(PCIT出願番号 PCIT/US87/00880に記載)をまた、本発明においてさらに別の増幅方法として使用可能である。本方法においては、標的の領域と相補的な領域を有するRNAの複製配列をRNAポリメラーゼの存在下試料に加える。ポリメラーゼは複製配列をコピーし、次いで検出可能となる。

【0195】

等温増幅法(該方法において、制限エンドヌクレアーゼおよびリガーゼを、制限部位の一方の鎖におけるヌクレオチド: 5'-[アルファ-チオ]トリホスフェートを含む標的分子の増幅を達成するために使用する)をまた、本発明の核酸の増幅に使用可能である(ウォルカー(Walker)らによる(1992))。

【0196】

10

20

30

40

50

鎖置換増幅 (S D A) は鎖置換の多重ラウンドおよび合成 (すなわち、ニックトランスレーション) を含む核酸の等温増幅を行なう別方法である。修復連鎖反応 (R C R) と呼ばれる同様な方法は、増幅用に標的にされた領域にわたるいくつかのプロープのアニーリング、続いて4個の塩基中2個だけが存在する修復反応を含有するものである。該他方の2個の塩基を簡易検出用にピオチニル化した誘導体として加えることも可能である。同様なアプローチがS D Aにおいて用いられる。標的特異的配列をまた環状プロープ反応 (C P R) を用いて検出可能である。C P Rにおいては、非-特異的D N Aの3'および5'配列並びに特異的R N Aの中間配列を有するプロープを試料中に存在するD N Aにハイブリッドさせる。ハイブリダイゼーションの際、反応液をリボヌクレアーゼHを用いて処理し、該プロープの生成物を消化後、放出される異なる生成物として同定する。初期の鑄型を別の環状プロープにアニーリングし、該反応を繰り返す。

10

【0197】

さらに別の増幅方法 (G B 番号2 202 328およびP C T 出願番号P C T / U S 89 / 01025中に記載し、これらの各々は引例として本明細書中にそっくりそのまま盛り込む) を本発明に関連して使用可能である。前者の利用としては、"修飾"プライマーをP C R - 似、鑄型 - および酵素 - 依存性合成において使用する。該プライマーを捕捉分子 (例えば、ピオチン) および/または検出分子 (例えば、酵素) を用いて標識化することにより、修飾可能である。後者の利用においては、過剰の標識化プロープを試料に加える。標的配列の存在下、該プロープは結合し、触媒的に切断される。切断後、該標的配列は過剰のプロープによって結合された無傷のまま放出される。該標識プロープの切断により、標的配列の存在がシグナルされる。

20

【0198】

他の核酸増幅法としては、転写に基づく増幅システム (transcription-based amplification systems: T A S)、例えば核酸配列に基づく増幅 (nucleic acid sequence based amplification: N A S B A) および3 S R (コー(Kwoh)らによる(1989); ギンゲラス(Gingeras)らによるP C T 出願W O 88 / 10315、本明細書中に引例としてそっくりそのまま盛り込む) が挙げられる。N A S B Aの場合において、核酸は増幅のために、標準フェノール/クロロホルム抽出、臨床試料の熱変性、溶菌緩衝液を用いた処理、並びにD N AおよびR N Aを単離するためのミニスピンカラムまたはR N Aの塩化グアニジニウム抽出により製造可能である。これらの増幅法は標的特異的配列を有するプライマーのアニーリングを含有する。重合に続き、二本鎖D N A分子を再び熱変成しながら、D N A / R N AハイブリッドをリボヌクレアーゼHを用いて消化する。どちらの場合も、一本鎖D N Aは第2の標的特異的プライマーを加え、続いて重合することで完全に二本鎖となる。次いで、該二本鎖D N A分子をT 7もしくはS P 6などのR N Aポリメラーゼにより多重的に転写する。等温サイクリック反応において、該R N Aを一本鎖D N Aに逆転写し、次いで二本鎖D N Aに変換し、次いでT 7もしくはS P 6などのR N Aポリメラーゼを用いて再び1回転写する。該生じた生成物は、先端を切った状態もしくは完全な状態に関わらず、標的特異的配列を示す。

30

【0199】

ダベイ(Davey)ら (E P O 番号329 822、このものを本明細書中に引例としてそっくりそのまま盛り込む) は、一本鎖R N A ("s s R N A"), s s D N Aおよび二本鎖D N A (d s D N A) (これらは本発明と関連して使用可能である) の臨床的な合成を含有する核酸増幅工程を開示している。該s s R N Aは第1のプライマーオリゴヌクレオチド用の鑄型であり、このものは逆転写酵素 (R N A - 依存性D N Aポリメラーゼ) により伸張される。次いで、リボヌクレアーゼH (リボヌクレアーゼH、D N AもしくはR N Aのどちらかを含有する二重らせん中でのR N Aに特異的なリボヌクレアーゼ) を作用させて、該R N Aを生成したD N A : R N A二重らせんから除去する。生成したs s D N Aは第2のプライマー用鑄型であり、このものとしてはまた鑄型に相同なR N Aポリメラーゼプロモーター (T 7 R N Aポリメラーゼにより例示される) 5'の配列が挙げられる。次いで、本プロモーターをD N Aポリメラーゼ (大腸菌D N AポリメラーゼIのラージ"クレノウ"フ

40

50

ラグメントによって例示される)によって伸張し、二本鎖DNA (“dsDNA”)分子(該分子はプライマー間で初期のRNAのものと同じの配列を有し、加えて一方の末端でプロモーター配列を有する)を生じる。本プロモーター配列は該DNAの多くのRNAコピーを作るために適当なRNAポリメラーゼによって使用可能である。次いで該コピーを非常に速やかな増幅を起こす該サイクルに再入力可能である。酵素を適当に選ぶことで、本増幅は各サイクルで酵素を加えることなく等温的に行うことが可能となる。本工程の臨床性の理由で、出発配列をDNAもしくはRNAどちらの形態もとるように選択可能である。

【0200】

ミラー(Miller)らによるPCT出願WO89/06700(このものを本明細書中に引例としてそっくりそのまま盛り込む)では、標的一本鎖DNA (“ssDNA”)へのプロモーター/プライマー配列のハイブリダイゼーション、続いて該配列に関する多くのRNAコピーの転写に基づく核酸配列の増幅スキームを開示している。本スキームはサイクリックではなく、すなわち新しい鑄型は生成するRNA転写物から産生されるものではない。他の増幅方法としては“RACE”および“一部位での(one-sided)PCR”(フローマン(Frohman)、M.A.による、PCRプロトコール：方法と利用の指針(PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS)、アカデミック・プレス、N.Y.(1990);オーハラ(Ohara)による(1989);各々を本明細書中に引例としてそっくりそのまま盛り込む)が挙げられる。

10

【0201】

核酸(生成する“ジ-ヌクレオチド”の配列を有し、結果該ジ-ヌクレオチドを増幅する)の存在下、2個(もしくはそれ以上)のオリゴヌクレオチドのライゲーションに基づく方法もまた、本発明の増幅段階で使用可能である。フー(Wu)らによる(1989)(このものを本明細書中に引例としてそっくりそのまま盛り込む)。

20

【0202】

(iii) サザン/ノーザンプロット法

プロット法は当業者にとって公知である。サザンプロット法は標的としてのDNAの使用を含有し、一方ノーザンプロット法は標的としてのRNAの使用を含有する。cDNAプロット法は多くの点でRNA種のプロット法に類似であるが、各々は異なる種類の情報を提供する。

30

【0203】

簡単に言えば、プローブは、適当なマトリックス(ニトロセルロースのフィルターが多い)上で免疫化したDNAもしくはRNA種を標的にするのに使用する。分析を促進するために、該異なる種をいくらか分離するべきである。このことは核酸種のゲル電気泳動、続く該フィルター上での“プロッティング”により達成されることが多い。

【0204】

引き続き、該プロットされた標的を変性および再ハイブリダイゼーションを促進する条件下、プローブ(通常、標識化したもの)と共にインキュベートする。該プローブは該標的との塩基対となるように設計されているので、プローブは変性条件下標的配列の一部と結合する。次いで、未結合プローブを除去し、検出を上記に記載の通り達成する。

40

【0205】

(iv) 分離法

一般に、特定の増幅が起こったかどうかを決定する目的で、鑄型および過剰のプライマーから1または2段階で増幅生成物を分離することが望ましい。1実施態様において、標準法を用いたアガロース、アガロース-アクリルアミドまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動により、増幅生成物を分離する。サンプルックら(1989)を参照。

【0206】

または、分離を達成するためにクロマトグラフィー法を使用可能である。このものとしては、本発明において使用可能な多くの種類;吸着、分配、イオン-交換およびモレキュラーシーブのクロマトグラフィーがあり、それらを使用するための多くの専門的な技法と

50

してはカラム、ペーパー、薄層およびガスクロマトグラフィーが挙げられる（フライフェルダ－(Freifelder)による(1982)）。

【0207】

(v) 検出法

該マーカ－配列の増幅を確認するために、生成物を視覚化してもよい。1つの典型的な視覚化方法としては臭化エチジニウムを用いたゲルの染色およびUV光下での視覚化が挙げられる。または、該増幅生成物を放射線 - または蛍光 - 標識化ヌクレオチドを用いて完全に標識化するならば、該増幅生成物をX - 線フィルムに被曝するかまたは適当な刺激スベクトルの下で視覚化し、続いて分離することが可能である。

【0208】

1実施態様においては、視覚化を間接的に達成する。増幅生成物の分離に続いて、標識化した核酸およびプローブを該増幅化したマーカ－配列と接触させる。該プローブは蛍光団と接合させることが好ましいが、放射線標識化してもよい。別の実施態様では、該プローブを結合パートナーに接合させるが、該結合パートナーとは抗体もしくはビオチンおよび検出可能な分子を持つ他の結合対などである。

【0209】

1実施態様においては、標識化したプローブによって検出を行なう。該技法は該分野の当業者にとってよく知られており、また分子プロトコルに関する多くの標準的な本の中にも示されている。サンプルックら(1989)を参照。例えば、発色団または放射性同位体プローブもしくはプライマーは増幅の間またはその後の標的を同定する。

【0210】

前述の1例が米国特許第5,279,721号に記載されており（このものを本明細書中に引例として盛り込む）、そこでは自動化電気泳動用の装置および方法並びに核酸の転移が開示されている。該装置によりゲルの余分な操作が必要なく、電気泳動およびプロットイングが可能であり、理論的には本発明による方法を実行するのに適当である。

【0211】

加えて、上記に記載の増幅生成物を、標準配列分析法を用いて特定の種類の变化を同定するために配列分析に供することが可能である。或る方法においては、最適シーケンシング用に設計したプライマーの組を用いた配列分析により遺伝子の完全分析を行なう（ピグノン(Pignon)らによる(1994)）。本発明は該タイプの分析の一部もしくは全部に使用可能な方法を提供する。本明細書中に開示の配列を用いて、直接シーケンシングにより分析可能なTS10q23.3遺伝子を通じて配列の増幅が許容されるようにオリゴヌクレオチドプライマーを設計可能である。

【0212】

(vi) キット成分

TS10q23.3を検出およびシーケンシングするのに要する必須の物質および試薬の全て並びにそれらの変形を、キット中で共に組み立てることが可能である。このものは一般的に予め選択したプライマーおよびプローブからなる。また、様々なポリメラーゼ（RT、Taq、シークエナーゼTMなど）をはじめとした核酸を増幅するのに適当な酵素、デオキシヌクレオチドおよび緩衝液を、増幅するのに必要な反応混合物を提供するために含有してもよい。該キットはまた一般的に適当な媒体中、各プライマーもしくはプローブに対するのと同様に各個々の試薬および酵素に対して異なる内容物からなる。

【0213】

(vii) 相対定量的(Relative Quantitative) RT - PCRに関するデザインおよび理論的考察

RNAのcDNAへの逆転写(RT)、続く相対定量的PCR(RT - PCR)を、患者から単離した特定のmRNA種の相対濃度を決定するのに使用可能である。特定のmRNA種の濃度変化を決定することで、特定のmRNA種をコードする遺伝子が別々に発現したことが分かる。

【0214】

10

20

30

40

50

PCRの場合、増幅される標的DNAの分子の数は、ある要因によって増加し、ある試薬が限定に達するまで、反応の各サイクルで2近くまで増加する。その後、増幅の速度はサイクル間での増幅された標的が増加しなくなるまで次第に減少する。周期の数(cycle number)をX軸にとり、増幅した標的DNAの濃度のlogをY軸にとってグラフをプロットするならば、プロットした点を結ぶことで特徴的な形の曲線を形成する。第1のサークルではじめると、該線の勾配は正でかつ一定となる。これは曲線の直線部分という。試薬が限界に達した後、該線の勾配は減少し始め、結局は0となる。この点で、増幅した標的DNAの濃度は漸近線となり、ある一定値となる。このことを曲線のプラトー部分という。

【0215】

PCR増幅の直線部分における標的DNAの濃度は、反応を始める前は標的の出発濃度に対して正比例である。同数の周期で完結し、該直線範囲内にあるPCR反応における標的DNAの該増幅生成物の濃度を決定することで、初期のDNA混合物における特定の標的配列の相対濃度を決定することが可能となる。該DNA混合物が異なる組織もしくは細胞から単離したRNAから合成したcDNAであるならば、誘起された標的配列由来の特定mRNAの相対的含量(relative abundance)を個々の組織または細胞について決定可能である。PCR生成物の濃度と相対的mRNA含量の間で本正比例することは該PCR反応において直線範囲においては真実である。

【0216】

該曲線のプラトー部分における標的DNAの最終濃度は、反応混合物中の試薬の利用率(availability)によって決定され、このものは標的DNAの初期濃度から独立している。したがって、RNA母集団を収集するために、mRNA種の相対的含量をRT-PCRで決定する前に満たさなければいけない第1の条件は、増幅PCR生成物の濃度をPCR反応が曲線の直線部分にある時にサンプリングすることである。

【0217】

特定のmRNA種の相対的含量を十分に決定するためにRT-PCR実験において満たさなければいけない第2の条件は、増幅可能なcDNAの相対的含量をある程度独立した基準にまで規格化しなければいけないことである。RT-PCR実験の目標は試料中の全mRNA種の平均含量に相対的な特定のmRNA種の含量を決定することである。下記に記載する実施例において、 α -アクチン、アスパラギン合成酵素およびリポコルテンIIのmRNAを、他のmRNAの相対的含量を比較するための外部および内部標準として使用可能である。

【0218】

競争的PCRにおける多くのプロトコールは、標的としてほとんど無視できる内部PCR標準を使用可能である。該PCR増幅の生成物を該直線期の中にサンプルする場合、該戦略は有効である。反応がプラトー期に達するときに該生成物をサンプルするならば、含量の劣る生成物が相対的に過剰に現れてくる。異なる発現に対してRNA試料を調べる場合のように、多くの異なるRNA試料について相対的含量を比較することは、RNAの相対的含量の差異が実際よりも少なく現れるように曲解することになる。内部標準が標的よりもずっと多いならば、このことは重大な問題ではない。内部標準が標的よりも多いならば、RNA試料間で直接に直線の比較を行なうことが可能である。

【0219】

上記の議論は、臨床的に誘導された物質におけるRT-PCRアッセイに関する理論的考察を記載するものである。臨床的試料中に内在する問題はその量が多岐にわたること(規格化が問題になる)、およびその質が多岐にわたること(信頼できる内部コントロール(標的よりも大きいものが好ましい)との共増幅を必要とする)。RT-PCRを内部標準と共に相対定量的RT-PCRとして行なうならば、これらの問題の両方を克服できるであろうが、その場合内部標準は標的cDNAフラグメントよりも大きい増幅可能なcDNAフラグメントであり、また内部標準をコードするmRNAの存在量が標的をコードするmRNAのおよそ5~1000倍以上である必要がある。本アッセイは、各mRNA

10

20

30

40

50

種の絶対含量ではなく、相対的含量を測定するものである。

【0220】

外部標準プロトコールと共により簡便な相対定量的RT-PCRを用いて、他の研究を行なうことも可能である。該アッセイは増幅曲線の直線部分においてPCR生成物をサンプルする。該サンプリングに対して至適なPCRサイクルの数は、各標的cDNAフラグメントに対して経験的に決定しなければいけない。加えて、様々な組織試料から単離した各RNA母集団の逆転写生成物を増幅可能なcDNAの等濃度について注意深く規格化しなければいけない。該アッセイは絶対mRNA含量を測定するので本濃度は非常に重要である。絶対mRNA含量は規格化した試料中のみの異なる遺伝子発現の手段として使用可能である。増幅曲線の直線範囲を経験的に決定しおよびcDNA製造を規格化することは煩雑かつ時間を浪費する工程であるが、生じるRT-PCRアッセイは内部標準と併せた相対定量的RT-PCRアッセイから派生するアッセイよりも優れていることがある。

10

【0221】

本利点の1つの理由としては、内部標準/競合物質がなくても全試薬を増幅曲線の直線範囲内の単一PCR生成物に変換することが可能であり、したがって該アッセイの感度が増加することである。別の理由としては1個のPCR生成物とだけ共にある場合、電気泳動ゲル上での生成物の表示または別の表示方法が複雑にならず、バックグラウンドがほとんどなく、および解釈がより容易であることである。

【0222】

(viii) チップ技法

本発明者によって特に熟考されたものは、ハシア(Hacia)ら(1996)およびシューマカー(Shoemaker)ら(1996)により記載されたものなどのチップに基づいた-DNA技法である。簡単に言えば、該技法は大量の遺伝子を早急にかつ正確に分析するための定量方法である。遺伝子をオリゴヌクレオチドと付加するかまたは一定のプロブアレイを用いることで、標的分子を高密度アレイとして分離し、またハイブリダイゼーションに基づいてこれらの分子をスクリーニングするために、チップ技法を使用できる。ピース(Pease)らによる(1994); フォドル(Fodor)らによる(1991)をも参照。

20

【0223】

B. 免疫診断

本発明の抗体は、エライザ法およびウエスタンブロット法などの技法を用いて、健康なおよび病的組織中のTS10q23.3内容物を確認するのに使用できる。これはまた悪性腫瘍の存在の有無に関するスクリーンまたは将来の癌の予測に供し得る。

30

【0224】

エライザアッセイにおいて本発明の抗体を使用することを考えてみる。例えば、抗-TS10q23.3抗体は選択表面上に、好ましくはポリスチレンマイクロタイタープレートのウェルなどのタンパク質アフィニティーを阻害する表面に免疫化する。不完全に吸収された物質を除去するために洗浄後、試験抗血清に関して抗原的に中性であると知られている、牛血清アルブミン(BSA)、カゼインもしくは粉末ミルクの溶液などの非特異的タンパク質を用いて、該アッセイプレートウェルを結合もしくは被覆することが望ましい。このため、免疫化表面上での非特異的吸収部位は遮断され、したがって該表面上での抗原の非特異的結合によってバックグラウンドは減少する。

40

【0225】

抗体を該ウェルに結合させ、バックグラウンドを減少するために未反応物質を用いて被覆しおよび非結合物質を除去するために洗浄した後、該免疫化した表面を該試料と接触させ、免疫複合体(抗原/抗体)が形成するような方法で調べた。

【0226】

試験試料と結合抗体間で特定の免疫複合体を形成させ、続いて洗浄し、免疫複合体の挙動およびその形成量を、第1抗体と異なるTS10q23.3に対して特異性を有する第2抗体に同様に供することによって決定した。適当な条件としては、BSA、牛ガンマグロブリン(BGG)およびホスフェート緩衝塩液(PBA)/ツイーン(Tween、登録商

50

標)などの希釈剤を用いて試料を希釈することが好ましい。該添加剤はまた非特異的バックグラウンドの減少を助ける傾向がある。次いで、層化した抗血清を約2~4時間、好ましくは約25~約27の次数の温度でインキュベートする。インキュベートに続き、抗血清と接触させた表面を非免疫複合物質を除去するために洗浄する。好ましい洗浄方法としては、PBS/ツイーン(登録商標)などの溶液、またはボレート緩衝液を用いた洗浄が挙げられる。

【0227】

検出手段を供給するために、第2の抗体が適当な色素原性の基質を用いてインキュベートする場合に着色を生じさせる会合した酵素を有することが好ましい。したがって、例えば該第2抗体と結合させた表面を、免疫複合体の形成が生じるのに好ましい期間および条件下でウレアーゼもしくはペルオキシダーゼ接合抗ヒトIgGを用いて接触およびインキュベートさせることが望まれる(例えば、PBS/ツイーン(登録商標)などのPBS含有-溶液中室温で2時間インキュベートする)。

【0228】

第2の酵素標識化抗体を用いてインキュベートし、引き続いて非結合物質を除去するために洗浄後、標識の量を、酵素標識がペルオキシダーゼの場合、尿素およびプロモクレゾールパープルもしくは2,2'-アジノ(azino)-ジ-(3-エチル-ベンゾチアゾリン)-6-スルホン酸(ABTS)、およびH₂O₂などの染色原性基質を用いてインキュベートすることで定量化する。次いで、例えば可視スペクトル分光計を用いて着色の程度を測定することによって定量を達成する。

【0229】

先のフォーマットを最初に該アッセイプレートに試料を結合させることで変化することが可能である。次いで、アッセイプレートを用いて一次抗体をインキュベートし、続いて一次抗体に対し特異性を有する標識化二次抗体を用いて結合一次抗体を検出する。

【0230】

本発明の抗体組成物はイムノプロットまたはウエスタンプロット分析において非常に有用である。ニトロセルロース、ナイロンなどの固体支持体マトリックスもしくはその組み合わせ上に免疫化したたんぱく質を同定するための高アフィニティー一次試薬として、該抗体を使用可能である。免疫沈降と併せ、続いてゲル電気泳動を行なうことで、該抗体は抗原を検出する際に使用する1工程試薬として使用可能であるが、ここで抗原を検出の際に使用する二次試薬により相反する(adverse)バックグラウンドが起こる。ウエスタンプロット法と併せて使用する免疫学に基づく検出法としては、この点で特に使用すべきと考えられる有毒な分子に対する酵素活性-、放射性標識-、または蛍光-標識化した二次抗体が挙げられる。

【0231】

V. 活性化化合物のスクリーニング方法

本発明は、さらに、TS10q23.3および活性フラグメントおよびそれをコードする核酸の、TS10q23.3活性の刺激、TS10q23.3の欠損の克服、または突然変異体TS10q23.3分子の効果のブロックのいずれかおける活性に関して化合物のスクリーニングすることにおける使用を企図する。これらのアッセイは、様々な異なる形式を用いることができ、それに関してそのスクリーニングが行われる、「活性」の種類に依存し得る。企図される機能的な「読み出し情報(read-out)」には、化合物への結合、化合物による基質、リガンド、レセプターまたは他の結合パターンへの結合の阻害、ホスフェート活性、抗ホスファターゼ活性、TS10q23.3のリン酸化、TS10q23.3の脱リン酸化、細胞-細胞間シグナル伝達の阻害または刺激、増殖、転移、細胞分裂、細胞移動、軟寒天コロニー形成、接触阻害、侵入性、血管形成、アポトーシス、腫瘍の進行または他の悪性表現型が含まれる。

【0232】

A. in vitro アッセイ

1つの態様では、本発明をTS10q23.3分子またはそのフラグメントに結合する

10

20

30

40

50

化合物のスクリーニングに適用する。ポリペプチドまたはフラグメントは溶液中で遊離状態であるか、支持固体に固定されているか、細胞内または細胞表面上で発現するかのいずれかであり得る。ポリペプチドまたは化合物のいずれかを標識し、それにより結合の測定を可能にし得る。

【0233】

別の態様では、アッセイにより、天然または人工の基質または結合パートナーに対する T S 1 0 q 2 3 . 3 の結合の阻害を測定することができる。競合結合アッセイは、試薬のうちの一つ (T S 1 0 q 2 3 . 3 、 結合パートナーまたは化合物) を標識して行うことができる。通常、ポリペプチドが標識された物質であろう。結合した標識に対するフリーの標識のレベルの量を測定し、結合または結合の阻害について測定することができる。

10

【0234】

化合物の高処理量スクリーニングのためのさらなる技術は、W O 8 4 / 0 3 5 6 4 に記載されている。大量の小さなペプチド試験化合物を、例えばプラスチックピンまたは他の表面などの固体の基面上で合成する。ペプチド試験化合物は、T S 1 0 q 2 3 . 3 と反応し、洗浄される。結合したポリペプチドを様々な方法により検出する。

【0235】

精製した T S 1 0 q 2 3 . 3 を、前述の薬物スクリーニング技術において使用するためのプレート上で直接コーティングすることができる。しかしながら、そのポリペプチドに対する非中和抗体を使用して、そのポリペプチドを固相に固定化することができる。また、反応領域 (好ましくは末端領域) を含む融合タンパク質を使用して、T S 1 0 q 2 3 . 3 活性領域を固相に連結させることができる。

20

【0236】

T S 1 0 q 2 3 . 3 の野生型または自然もしくは作製された突然変異を含む様々な細胞系を使用して、T S 1 0 q 2 3 . 3 の様々な機能上の特質について、そして候補化合物がこれらの特質に対してどのように影響を及ぼすかについて調べることができる。突然変異の作製方法が本明細書の他の箇所に記載されている。悪性へと導くか、その一因となるか、および / または悪性を引き起こす、T S 1 0 q 2 3 . 3 における自然に生ずる突然変異も記載されている。そのようなアッセイでは、化合物を適当に製剤化し、その生化学的性質を付与し、そして標的細胞と接触させる。アッセイによっては、培養細胞が必要であるかもしれない。次いで、数多くの異なる生理学的アッセイによって細胞を調べることができる。あるいは、T S 1 0 q 2 3 . 3 の機能または関係する経路を調査し得る分子解析を行うことができる。これには、タンパク質発現、酵素機能、基質利用、T S 1 0 q 2 3 . 3 を含む様々な分子のリン酸化状態、c A M P レベル、m R N A 発現 (全細胞またはポリ A R N A のディファレンシャルディスプレイ) に関するアッセイおよびその他のアッセイなどのアッセイが含まれる。

30

【0237】

B . in vivo アッセイ

本発明は、様々な動物モデルの使用も包含する。ここでは、ヒトとマウスの T S 1 0 q 2 3 . 3 の間でみられた同一性によって、それが正常に発現する動物系全体において T S 1 0 q 2 3 . 3 の機能を調べるすばらしい機会が与えられる。正常な T S 1 0 q 2 3 . 3 を発現することができない突然変異細胞系を開発し単離することによって、ヒトおよび他の動物における癌を高度に予測し得るマウスの癌モデルを作製することができる。これらのモデルは、模擬的な原発性および / または転移性腫瘍に対して腫瘍細胞の正所性 (orthotopic) または全身的投与を用いることができる。あるいは、悪性変換および / または腫瘍の進行に関与するある特定の事象の原因であると分かっている試薬を与えることにより動物において癌を誘導することができる。最後に、野生型 T S 1 0 q 2 3 . 3 を欠損しているトランスジェニック動物 (以下に記載) を癌の発生と処置のためのモデルとして用いることができる。

40

【0238】

試験化合物による動物の処置には、適当な形態の、化合物の動物への投与が含まれる。

50

投与は、口、鼻、口腔粘膜、直腸、膣、皮膚を含むがこれらに限られない臨床的または非臨床的目的で利用し得るいずれかの経路によるものである。あるいは、投与は、気管内、点滴注入、気管支点滴、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内または静脈内注射によるものであってもよい。特に企図されるのは、全身的な静脈内注射、血液またはリンパ液供給および腫瘍内注射による局所投与である。

【0239】

in vivo での化合物の効果の測定には、様々な異なった判断基準を含み得る。このような判断基準には、生存率、腫瘍負荷 (burden) または腫瘍塊の減少、腫瘍の進行の阻または遅延、腫瘍の除去、転移の阻害または阻止、活性レベルの増加、免疫エフェクタ機能の改善および食物摂取量の改善が含まれる。

【0240】

C. 合理的な薬物設計

合理的な薬物設計の目標は、生物学的に活性なポリペプチドまたは化合物の、それらが相互作用するような構造的なアナログ (アゴニスト、アンタゴニスト、インヒビター、結合パートナーなど) を製造することである。このようなアナログを作製することにより、天然の分子よりもより活性なまたはより安全な薬物を作ることが可能であり、それは変化に対する異なった感受性を有するかまたは様々な他の分子の機能に影響を及ぼす。1つのやり方においては、TS10q23.3 またはそのフラグメントに関する三次元構造を作製する。これは、X線結晶学、コンピューターモデリングまたはその両方の方法の組合せによって達成できる。別の方法である「アラニンスキャン」は、分子全体にわたるアラニンによる残基のランダムな置換と測定された機能に対する生じた影響に関係するものである。

【0241】

機能的アッセイにより選択された TS10q23.3 特異的抗体を単離した後、その結晶構造を解析することも可能である。原則として、この手段によって、後の薬物設計がそれに基づくことができるファーマコア (pharmacore) が得られる。概して、機能的、薬理学的に活性な抗体に対する抗イディオタイプ抗体を作製することによって、タンパク質結晶学を全体的に回避することができる。鏡像の鏡像として、抗イディオタイプの結合部位は、もとの抗原のアナログであると予想される。次に、抗イディオタイプを使用して、化学的または生物学的に製造したペプチドのバンクからペプチドを同定し単離することができる。次に、選択されたペプチドはファーマコアとして役立つであろう。抗イディオタイプは、抗原として抗体を使用して、抗体の製造について本明細書に記載された方法を用いて作製することができる。

【0242】

このように、改善された TS10q23.3 活性を有する、または刺激因子、インヒビター、アゴニスト、アンタゴニストまたは TS10q23.3 または TS10q23.3 機能によって影響される分子として働く薬物を設計することができる。クローンされた TS10q23.3 配列を利用することにより、十分な量の TS10q23.3 を製造して結晶学的研究を行うことができる。さらに、ポリペプチド配列に関する知識により、構造-機能間の関係をコンピューターを利用して予測することを可能にする。

【0243】

VI. TS10q23.3 に関連した悪性腫瘍の処置方法

本発明はさらに、別の態様では、癌の処置に関する。処置し得る癌のタイプは、本発明にしたがえば、TS10q23.3 が関与するもののみに限られる。関与することにより、TS10q23.3 が突然変異を起こしているかまたは異常であることは必要ですらなく、この腫瘍抑制因子の過剰発現が細胞内の他の病変を実際に克服し得る。このように、TS10q23.3 療法を用いて、脳 (グリア芽細胞腫、星状細胞腫、希突起グリオーム、上衣細胞腫)、肺、肝臓、脾臓、腎臓、リンパ節、膵臓、小腸、血液細胞、結腸、胃、胸部、子宮内膜、前立腺、精巣、卵巣、皮膚、頭および頸部、食道、骨髄、血液またはその他の組織の癌を含む、広く様々な腫瘍を処置し得ることが企図される。

10

20

30

40

50

【0244】

多くの状況では、腫瘍細胞を殺すかまたは正常な細胞死または「アポトーシス」を受けると誘導する必要はない。むしろ、有意義な処置を達成するために必要とされることは、腫瘍の成長をある程度まで遅らせることである。腫瘍の成長は完全にブロックされるかもしれないが、いくつかの腫瘍の退縮が達成されるかもしれない。「寛解」および「腫瘍負荷 (burden) の減少」などの臨床学的な用語もまた、与えられた通常の語法が企図される。

【0245】

A. 遺伝子ベースの治療

本発明者によって企図される治療態様の1つは、いくつかの癌の腫瘍形成に關与する事象において分子レベルで介入することである。具体的には、本発明者は、癌細胞に、TS10q23.3をその細胞に提供することが可能な発現構築物を提供することを意図する。ヒト、マウス、およびイヌの遺伝子はいずれも同じポリペプチドをコードしているので、これらの核酸のいずれもがヒトの治療に使用でき、同様に、同じまたは生物学的に等価なポリペプチドをコードし得る上記の遺伝子配列変異体のいずれもが使用できる。発現ベクターの詳細な議論とそこで使用される遺伝子エレメントは、参考のため本節の一部とする。特に好ましい発現ベクターは、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルスベクターである。また、リボソームで包まれた発現ベクターも好ましい。

10

【0246】

当業者は、*in vivo* および *ex vivo* の状況で遺伝子送達を如何にして適用するかについてよく理解している。ウイルスベクターについては、一般にウイルスベクターストックを調製する。ウイルスの種類とその達成できる力価によって、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} の感染性粒子を患者に送達する。相対的取り込み効率を比較することにより、同様の計算をリボソーム製剤または他の非ウイルス製剤に関して外挿し得る。薬学的に許容し得る組成物としての製剤は、以下に記載する。

20

【0247】

様々な腫瘍のタイプについて様々な経路が企図される。経路に關する以下の節で、考えられる経路の詳細なリストを記載する。実際にはいずれかの腫瘍に対して、全身的な送達が企図される。このことは、微細なまたは転移性の腫瘍については特に重要であることがわかるであろう。分散した腫瘍の塊が見つかる場合は、様々な、直接的、局所的および領域的な手段が講じられ得る。例えば、発現ベクターを腫瘍に直接注射し得る。腫瘍床は、切除前、切除中または切除後に処置することができる。切除後は、一般に、術後に入れておいたカテーテルによってベクターを送達する。腫瘍の血管構造を利用し、維持している静脈または動脈に注入することによって腫瘍にベクターを導入することができる。より末梢の血液供給経路も利用することができる。

30

【0248】

異なる態様では、*ex vivo* 遺伝子治療が企図される。この方法は、骨髓に關連する癌の処置に特に適しているがそれに限られない。*ex vivo* の態様では、患者の細胞を取り出して少なくともある期間体外で維持する。この期間、治療を行い、その後でその細胞を患者に再導入し、うまくいけば、試料中のいかなる腫瘍細胞も殺されていると期待される。

40

【0249】

自己骨髓移植 (ABMT) は、*ex vivo* 遺伝子治療の一例である。基本的に、ABMTの背景にある概念は、患者が、その患者自身の骨髓ドナーとなるということである。即ち、通常致死投与量の放射線照射または化学療法をその患者に投与して腫瘍細胞を殺し、*ex vivo* で維持 (および多分膨張) した患者自身の細胞でもって骨髓細胞を再び生着させる。骨髓はしばしば腫瘍細胞で汚染されているので、骨髓からこれらの細胞を一掃することが望ましいからである。この目標を達成するための遺伝子治療の使用は、本発明にしたがって用いられ得るTS10q23.3とはまた別の方法である。

50

【0250】

B．免疫療法

免疫療法は、一般的に、免疫エフェクタ細胞と癌細胞を標的とし破壊する分子の使用によるものである。免疫エフェクタは、例えば、腫瘍細胞の表面上のいくつかのマーカーに対し特異的な抗体であり得る。抗体は単独で、治療のエフェクタとして働くかまたは他の細胞を編成して細胞殺傷を実際に引き起こすことができる。抗体は薬物または毒物（化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など）と共役し、単に標的剤として働くこともある。あるいは、エフェクタは腫瘍細胞標的と直接または間接的に相互作用する表面分子を運ぶリンパ球であることもある。様々なエフェクタ細胞には細胞傷害性T細胞およびNK細胞が含まれる。

10

【0251】

本発明によれば、(i)細胞の表面上で発現しないようであり、そして(ii)TS10q23.3の不在でなく存在が正常な状態と関係するといわれるならば、免疫エフェクタの標的としてTS10q23.3が働き得ることはないようである。しかし、TS10q23.3の特定の突然変異体は、抗体、抗体コンジュゲートまたは免疫エフェクタ細胞のいずれかを使用する免疫療法によって標的となり得ることは可能である。

【0252】

より可能性の高いシナリオは、免疫療法が組合せ療法の一部として、TS10q23.3を標的とする遺伝子治療とともに使用できるということである。組合せ療法のための一般的な方法は、以下に記載する。一般に、腫瘍細胞は、標的化しやすい、即ち他の大部分の細胞には存在しないマーカーを有しているはずである。多くの腫瘍マーカーが存在し、これらのうちのいずれかが本発明に関する標的化に適当であり得る。一般的な腫瘍マーカーには、胎児性癌抗原、前立腺特異的抗原、尿の腫瘍関連抗原、胎児抗原、チロシナーゼ(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、シアリルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、エストロゲンレセプター、ラミニンレセプター、erbBおよびp155が含まれる。

20

【0253】

C．タンパク質治療

別の治療方法は、TS10q23.3ポリペプチド、活性フラグメント、合成ペプチド、その模擬体または他のアナログの患者への供給である。タンパク質は、組換え発現法によって製造できるか、または十分に小さければ、自動化されたペプチドシンセサイザーによって製造することができる。製剤は、投与形態と目的に基づいて選択でき、リポソーム製剤および典型的な医薬調製物が含まれるが、これらに限られない。

30

【0254】

D．免疫療法、典型的な化学療法または放射線治療との組合せ治療

DNA傷害剤に対する腫瘍細胞の耐性は、臨床的腫瘍学における主要な問題を示している。現在の癌研究の目標の1つは、化学療法および放射線療法の効力を改善する方法を見つけることである。1つの方法は、このような典型的な治療法を遺伝子治療と結びつけることによるものである。例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ(HS-tk)遺伝子は、レトロウイルスベクター系により脳腫瘍に送達したとき、抗ウイルス剤ガンシクロビルに対する感受性をうまく誘導する(Culverら, 1992)。本発明の状況では、TS10q23.3置換療法が化学療法または放射線療法による介入と組み合わせると同様に使用し得ることが企図される。上記のように、TS10q23.3と免疫療法とを結びつけることが効果的であるとわかるであろう。

40

【0255】

細胞を殺傷、細胞増殖を阻害、転移を阻害、血管形成を阻害またはそうでなければ腫瘍細胞の悪性の表現型を逆転または減少させるために、本発明の方法と組成物を使用して、一般に「標的」をTS10q23.3発現構築物および少なくとも1つの他の試薬と接触させることができる。これらの組成物は、細胞の殺傷または細胞増殖の阻害に対し有効な合計した量で提供される。この過程は、発現構築物と試薬または因子とを同時に細胞に接

50

触させることを含むことができる。これは、細胞を両方の試薬を含む1つの組成物または薬理的製剤と接触させるか、または細胞を、1つの組成物が発現構築物を含みもう一方の組成物が試薬を含んでいる、2つの別個な組成物または製剤と同時に接触させることによって達成することができる。

【0256】

別法として、遺伝子治療の処置は、数分間～数週間の期間において、他の試薬による処理の前または後に行うことができる。他の試薬および発現構築物が別々に細胞に適用される態様では、一般に、有意な期間が各送達の期間の間で終わらず、試薬と発現構築物が、都合よく複合的効果を細胞に及ぼすことが、依然としてできるようにする。そのような場合においては、細胞を兩種とそれぞれ他の12～24時間以内に、より好ましくはそれぞれ他の約6～12時間以内に接触させ得ることが企図され、遅延時間はわずかに約12時間が最も好ましい。しかし、いくつかの場合において、処置のための期間を有意に延長することが望ましいかも知れないが、その場合それぞれの投与の間に数日(2、3、4、5、6または7)～数週間(1、2、3、4、5、6、7または8)が経過する。

10

【0257】

TS10q23.3または他の試薬の1を越える投与が望ましいであろうということも考えられる。以下に例示するような様々な組合せを用いることができる。TS10q23.3は「A」、他の試薬は「B」とする。

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

20

A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

他の組合せが企図される。再び、細胞殺傷を達成するために、両方の試薬を細胞を殺傷するに有効な合計した量で細胞に送達する。

【0258】

組合せ治療において使用するに適切な試薬または因子は、細胞に適用したときにDNA傷害を誘導するいずれかの化合物または処置方法である。そのような試薬および因子には、放射線照射、およびDNA傷害を誘導する波動、例えば、線照射、X線、UV照射、マイクロ波、放射電子などが含まれる。「化学療法剤」としても記載されている様々な化合物は機能してDNA傷害を誘導し、そのすべては、本明細書に開示した組合せ処置方法において使用することを意図する。使用することが意図される化学療法用試薬には、例えば、アドリアマイシン、5-フルオロウラシル(5FU)、エトポシド(VP-16)、カンプトテシン、アクチノマイシン-D、マイトマシシンC、シスプラチン(CDDP)および過酸化水素も含まれる。本発明はまた、照射ベースか実際の化合物であるかに関わらず、1またはそれ以上のDNA傷害剤の組合せの使用も含む。例えばX線とシスプラチンの使用またはシスプラチンとエトポシドの使用など。ある特定の態様において、TS10q23.3発現構築物と組み合わせたシスプラチンの使用は、この化合物として特に好ましい。

30

【0259】

本発明に従う癌の処置では、腫瘍細胞を発現構築物に添加した試薬と接触させることができる。これは、局所化した腫瘍部位にX線、UV光、線またはマイクロ波などの放射線を照射することによって達成することができる。あるいは、アドリアマイシン、5-フルオロウラシル、エトポシド、カンプトテシン、アクチノマイシン-D、マイトマシシンCまたはより好ましくはシスプラチン等の化合物を含む医薬組成物を患者に治療上有効量で投与することによって腫瘍細胞を試薬と接触させることができる。上記のようにTS10q23.3発現構築物と組み合わせることにより、試薬を調製して組合せ治療組成物またはキットとして使用することができる。

40

【0260】

核酸、具体的にはDNAを直接架橋する試薬は、TS10q23.3との共同性の、抗腫瘍性の組合せへと導くDNA傷害を促進すると考えられる。シスプラチンなどの試薬お

50

よび他のDNAアルキル化剤が用いられ得る。シスプラチンは、癌を処置するために広く使用されており、臨床的適用に使用される有効投与量は、全3コースについて3週間ごとに5日間20 mg/m²である。シスプラチンは、口からは吸収されないので、静脈、皮下、腫瘍内または腹腔内注射により送達しなければならない。

【0261】

DNAに傷害を与える試薬には、DNA複製、有糸分裂、および染色体分離を妨害する化合物も含まれる。そのような化学療法用化合物には、ドキソルビシンとしても知られるアドリアマイシン、エトポシド、ベラパミル、ポドフィロトキシンなどが含まれる。腫瘍の処置のために臨床的環境において広く使用されるように、これらの化合物を、アドリアマイシンについて、21日の間隔をおいて25~75 mg/m²の範囲でボラス注射により静脈内投与し、エトポシドについて35~50 mg/m²で静脈投与または静脈投与量の2倍を経口で投与する。

10

【0262】

核酸前駆体およびサブユニットの合成および忠実度を崩壊する試薬もまた、DNA傷害をもたらす。それ自体で、数多くの核酸前駆体が開発されている。特に有用なのは、詳細に渡る試験を受けた、容易に入手し得る試薬である。そのようなものとして、5-フルオロウラシル(5-FU)等の試薬は腫瘍組織によって優先的に使用され、このことが、この試薬を腫瘍細胞の標的化にとって有用なものにしている。かなり毒性であるが5-FUは、局所を含む、広範囲の担体中で適用可能であり、3~15 mg/kg/日の範囲の用量での静脈投与が一般的に使用される。

20

【0263】

DNA傷害を引き起こし、広範囲に使用されている他の因子には、線、X線として一般に知られているもの、および/または腫瘍細胞への放射性同位元素の望ましい送達が含まれる。DNA傷害因子の他の形態には、マイクロ波およびUV照射なども企図される。これら因子のすべては、DNA前駆体、DNAの複製および修復、および染色体の構築と維持において、広範囲のDNA傷害を引き起こすようである。X線の投与量範囲は、一定期間(3~4週間)の場合は1日50~200レントゲン、一回の投与量は2000~6000レントゲンである。放射性同位体の投与量範囲は非常に広く、その同位体の半減期、放射する放射線の強度およびタイプ、および腫瘍細胞による取りこみに依存する。

30

【0264】

当業者は、“Remington's Pharmaceutical Science”15版、33章、特に624~652頁によって教示される。処置する患者の状態に応じて、投与量をいくらか変えることが必要であろう。投与の責任者が、少なくとも、個々の患者にとって適当な投与量を決定する。更に、ヒトの投与については、調製物を、FDA Office of Biologics スタンドアードが要求する無菌状態、発熱原性、一般的安全性および純度の標準に適合させる。

【0265】

発明者らは、10q23関連の癌患者へのTS10q23.3発現構築物の正所性投与は、臨床性の疾患を阻止する治療上効果的な遺伝子の送達のための非常に効率的な方法であろう。同様に、化学療法または放射線療法は患者の身体の特定の冒された領域を目的とし得る。あるいは、発現構築物および/または試薬の全身送達は、ある種の状況、例えば広範囲の転移が起こっている場合に適当であり得る。

40

【0266】

TS10q23.3を標的とする治療を化学療法および放射線療法と組み合わせることに加えて、他の遺伝子治療との組合せが有利であろうということも企図される。例えば、TS10q23.3およびp53またはp16突然変異体を同時に標的化することは、改善された抗癌処置をもたらし得る。他のいずれかの腫瘍関連遺伝子は、考えられるところでは、このようにして標的化することができる。例えば、p21、Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、BCRA2、p16、FHIT、WT-1、MEN-1、MEN-I、BRCA1、VHL、FCC、MCC、ras、myc、neu、raf、erb、src、fms、jun、trk、rei、gsp、hst、bclおよびabl。

50

【0267】

TS10q23.3の処置において、前述の治療のいずれかがそれ自身有用であると思われるかもしれないということも指摘される。これに関して、化学療法および非TS10q23.3遺伝子治療の組合せを参照することは、これらの方法が別々に用いられ得るということも企図すると理解するべきである。

【0268】

E. 患者への投与のための製剤および経路

臨床的な適用を意図する場合、医薬組成物 - 発現ベクター、ウイルスストック、タンパク質、抗体および薬物 - を意図する適用に適切な形態に調製する必要があるであろう。一般に、このことは発熱原ならびにヒトまたは動物に有害となり得る他の不純物を本質的に含まない組成物の調製を必要とするであろう。

10

【0269】

適切な塩および緩衝剤を用いてベクターを安定に送達し、標的細胞に取りこませることが一般に望ましいであろう。緩衝剤は、組換え細胞を患者に導入する場合にも用いられ得る。本発明の水溶性組成物は、薬学的に許容し得る担体または水性媒体に溶解または分散させた、細胞に対する有効量のベクターを含んでいる。そのような組成物を接種物ともいう。「薬学的または薬理的に許容し得る」なる語は、動物またはヒトに投与した場合に、有害な、アレルギー性の、または他の不適当な反応を生じない分子および組成物を意味する。本明細書に使用される「薬学的に許容し得る担体」には、いずれかのおよびすべての溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張剤および吸着遅延剤などが含まれる。そのような媒体および試薬の薬学的に活性な物質に対する使用は、当技術分野においてよく知られている。いずれかの慣用の媒体または試薬が本発明のベクターまたは細胞と相容れない場合を除けば、治療用組成物におけるその使用が企図される。補足的な活性成分も組成物に入れることができる。

20

【0270】

本発明の活性な組成物には、典型的な医薬調製物が含まれる。本発明に従うこれら組成物の投与は、その経路を経て標的組織が利用できる限りいずれの慣用の経路によるものである。これには、口、鼻、口腔粘膜、直腸、膣または皮膚が含まれる。あるいは、投与は、正所性、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内または静脈内注射によるものであってよい。そのような組成物を、前掲の薬学的に許容し得る組成物として通常は投与する。

30

【0271】

活性な化合物は、非経口的または腹腔内投与することもできる。遊離塩基または薬学的に許容し得る塩としての活性化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適当に混合した水の中で調製することができる。分散液はグリセリン、ポリエチレングリコール液およびその混合物の中でおよび油中で調製することもできる。保存および使用の通常の条件下では、これらの調製物は、微生物の増殖を阻止するための保存剤を含有している。

【0272】

注射可能な使用に適切な医薬形態には、滅菌水溶液または分散液および滅菌した注射可能な溶液または分散液の即時調製のための滅菌した粉末が含まれる。いずれの場合にも、その形態は滅菌状態であり、注射器から容易に出る程度に流動性でなければならない。製造および保存の条件下で安定でなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセリン、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、適当なそれらの混合物および植物油を含んでいる溶媒または分散媒体であり得る。例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散液の場合は必要な粒径を維持することにより、および界面活性剤の使用により、適当な流動性を維持することができる。微生物の作用の阻止は、様々抗細菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チロメサルなどにより行うことができる。多くの場合においては、等張剤、例えば当または塩化ナトリウムを含有させることが好ましいであろう。注

40

50

射可能な組成物の長期間の吸収は、吸収遅延剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中で使用することにより行うことができる。

【0273】

滅菌した注射可能な溶液は、活性化合物を適当な溶媒中に必要な量で、上で列挙した様々な他の成分とともに入れた後、必要に応じ、滅菌濾過によって調製する。一般に、分散液は、様々な活性成分をベースとなる分散媒体および上記で列挙した必要な他の成分を含む滅菌ビークルに入れることによって調製する。滅菌した注射可能な溶液の調製のための滅菌した粉末の場合には、好ましい調製方法は、活性成分といずれかのさらなる所望の成分の粉末が前述のその滅菌濾過した溶液から得られる、真空乾燥および凍結乾燥技術である。

10

【0274】

本明細書に使用される、「薬学的に許容し得る担体」には、いずれかおよびすべての溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤等が含まれる。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および試薬の使用は、当分野でよく知られている。いずれかの慣用の媒体または試薬が活性成分と相容れない場合を除いて、治療用組成物におけるその使用が企図される。補足的な活性成分もその組成物に入れることができる。

【0275】

経口投与に関して、本発明のポリペプチドに賦形剤を加え、非摂取性の口洗剤および歯磨き剤の形態で使用することができる。口洗剤は、必要な量で活性成分を適当な溶媒、例えばホウ酸ナトリウム溶液 (Dobell's 溶液) に入れて調製することができる。あるいは、活性成分をホウ酸ナトリウム、グリセリンおよび炭酸水素カリウムを含む防腐性洗剤に入れることができる。活性成分を歯磨き剤 (ジェル、ペースト、粉末およびスラリーを含む) に分散させることもできる。活性成分は、水、結合剤、研磨剤、香料、発泡剤、および湿潤剤を含んでいてもよいペースト状の歯磨き剤に治療上有効な量で加えることができる。

20

【0276】

本発明の組成物は、中性のまたは塩の形態で製剤化することができる。薬学的に許容し得る塩には、酸付加塩 (タンパク質の遊離アミノ基と形成した) が含まれ、それは例えば塩酸またはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸と形成する。遊離のカルボキシル基と形成した塩は、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは水酸化鉄などの無機の塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機の塩基から誘導することもできる。

30

【0277】

製剤化の後、溶液を投与形態に適したやり方および治療上有効な量で投与する。製剤は、注射可能な溶液、薬物放出カプセルなどの様々な投与形態で容易に投与される。水溶液中での非経口投与に関しては、例えば、溶液は、必要であれば適当に緩衝化し、希釈液を十分な生理食塩水またはグルコースでまず等張させる。これらの特定の水溶液は、特に静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に適当である。これに関連して、使用することができる滅菌した水性媒体は、本明細書の開示に照らして当業者によく知られるであろう。例えば、一回の投与量を 1 mL の等張 NaCl 溶液に溶解し、1000 mL の皮下注入液に加えるかまたは意図した輸注部位に注入することができる (例えば、"Remington's Pharmaceutical Sciences" 15 版、1035 ~ 1038 および 1570 ~ 1580 頁参照)。処置する患者の状態によって、投与量の変更が幾分必要になるであろう。投与の責任者が、少なくとも、個々の患者にとって適当な投与量を決定する。更に、ヒトの投与については、調製物を、FDA Office of Biologics スタンダードが要求する無菌状態、発熱原性、一般的安全性および純度の標準に適合させる。

40

【0278】

VII. トランスジェニック動物 / ノックアウト動物

50

本発明の1つの態様では、機能的なTS10q23.3ポリペプチドまたはその変異体をコードする機能的な移植遺伝子を含んでいるトランスジェニック動物を作製する。TS10q23.3移植遺伝子を発現するトランスジェニック動物、そのような動物に由来する組換え細胞系およびトランスジェニック胚は、TS10q23.3の機能を誘導するまたは抑制する試薬をスクリーニングおよび同定するための方法において有用であり得る。本発明のトランスジェニック動物はまた、癌などの徴候を研究するための方法として使用することもできる。

【0279】

本発明の1つの態様では、TS10q23.3移植遺伝子をヒト以外の宿主に導入して、ヒトまたはネズミTS10q23.3遺伝子を発現するトランスジェニック動物を作成する。トランスジェニック動物は、移植遺伝子の発現を可能にするやりかたで、移植遺伝子をゲノムへ統合させることにより作成する。トランスジェニック動物を作成するための方法は、一般的にWagner および Hoppe (参考のために本明細書の一部とする米国特許第4,873,191号)、その全内容を参考のために本明細書の一部とするBrinsterら、1985、および“Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual”第2版(その全内容を参考のために本明細書の一部とするHogan, Beddington, Costantini および Long 編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994)に記載されている。

10

【0280】

内因性のTS10q23.3を相同的組換えにより移植遺伝子と内因性遺伝子との間で置換することが望ましいこともあり、または内因性の遺伝子が“ノックアウト”動物の調製におけるように欠失によって除かれることもある。典型的には、ゲノム配列に連結したTS10q23.3遺伝子を、マイクロインジェクションによって受精卵へ移す。マイクロインジェクションした受精卵を宿主となるメスに着床させ、子孫を移植遺伝子の発現についてスクリーニングする。トランスジェニック動物は、爬虫類、両生類、鳥類、哺乳類および魚類等の数多くの動物に由来する受精卵から作製することができる。特に好ましい態様では、TS10q23.3を過剰発現するまたは突然変異体のポリペプチドを発現するトランスジェニックマウスを作成する。あるいは、“ノックアウト”マウスにおけるTS10q23.3の不在により、TS10q23.3タンパク質の欠損がin vivo で細胞に対して有する効果についての研究を可能にする。ノックアウトマウスはまた、TS10q23.3に関連する癌の発生に関するモデルを提供する。

20

30

【0281】

上に記載したように、トランスジェニック動物およびそのような動物に由来する細胞系は、ある種の試験の実験において使用することができる。これに関して、野生型または突然変異体TS10q23.3を発現することが可能なトランスジェニック動物および細胞系を試験物質に曝露することができる。これらの試験物質を、野生型のTS10q23.3発現および/または機能を増強する、または突然変異体のTS10q23.3の発現または機能を損なわせる能力についてスクリーニングすることができる。

【実施例】

【0282】

V I I I . 実施例

以下の実施例を、本発明の好ましい態様を説明するために記載する。以下の実施例に記載された技術は、本発明の実施においてよく機能することが発明者によって発見された技術を意味することが当業者によって認識され、したがってその実施のための好ましい態様を構成すると解釈される。しかし、当業者は、本明細書の開示に照らして、開示される特定の態様に多くの変更を加えることができ、本発明の概念、精神および範囲から逸脱することなく、類似または同様の結果が得られるということを理解する。より具体的には、本明細書に記載の試薬を、化学的にもそして生理学的にも関連するある試薬で置き換えることができると同時に、同じかまたは同様の結果が達成されるということが明らかであろう。当業者に明らかなそのような同様の置換および変更はすべて、添付の請求の範囲によって定義された発明の精神、範囲および概念の内に存在すると考えられる。

40

50

【0283】

実施例1 - グリオーム細胞系におけるホモ接合欠失

本発明者は、第10染色体上のゲノム物質のホモ接合欠失を同定するために、正常な細胞とともに21の一連のグリオーマ細胞系および初代培養に由来するDNAを試験した。予め関連する領域のまたはその付近のおおよその位置付けのためにマーカーを選択した(図1)。分析した細胞は、Department of Neuro-Oncology U T M D A C C (L G 1 1、E F C - 2、P L - 1、P C - 1、J W、F G - 2、F G - 0、N G - 1、P H - 2、K E、P C - 3およびD 7 7)で作製され、商業的に入手可能であり(U 1 3 8、A 1 7 2、U 3 7 3、U 8 7、U 2 5 1、U 1 1 8およびT 9 8 G)、または協力者から得た(1 3 wk astro, D 5 4 - MG)。マーカーは、Research Genetics, Huntsville, AL または報告された配列から合成した。細胞系E F C - 2は、D 1 0 S 2 1 5の周辺の4つのマーカーに関係する大きなホモ接合欠失を示した(図2)。この欠失はまた、その領域に位置するY A C 7 4 6 h 6を使用するF I S Hによっても観察された。他の3つの細胞系(D - 5 4、A 1 7 2、およびL G 1 1)もまた、A F M A 0 8 6 W G 9 (A F M 0 8 6)でホモ接合欠失を示し、それによりその領域が推定の腫瘍抑制遺伝子を含んでいることを強く意味している(図2)。2組のプライマー(多重の)の存在下でP C R^{T M}反応における欠失を行い、適当な増幅条件を確認した。すべての欠失を(少なくとも)3回の反応によって確認した。この同じ領域は前立腺癌にも関係している(Grayら、1995)。細胞系におけるホモ接合欠失はまた、小細胞肺癌における3 p 2 1.3での腫瘍抑制遺伝子座を決定するために使用されている(Dalyら、1993; Kokら、1994; Weiら、1996)。

10

20

【0284】

実施例2 - 抑制されたハイブリッド細胞における10q座の維持

発明者の第2の計画は、抑制されたハイブリッドクローンにおいて維持されるが復帰変異体クローンには存在しない、第10染色体の領域を試験することであった。この解析は、第10染色体上の2つの腫瘍抑制因子座の存在を証明し、維持された領域を解析した、本発明者の以前の研究をさらに進めたものである。10qのすべてまたは一部を維持しているハイブリッドは、軟アガロースおよびヌードマウスにおいて増殖できなかった(“完全に”抑制されたクローン)。一方、挿入された染色体10qの大部分を失ったハイブリッド細胞は、軟アガロースにおいて増殖したが、非腫瘍形成性であった(“部分的に”抑制されたクローン; Steckら、1995; 図3、右側)。もとのクローンU 2 5 1 N 1 0.6、N 1 0.7およびN 1 0.8は10qのフラグメントのみ維持していることが以前に示された(Pershouseら、1993; Steckら、1995)。情報を提供する、更なるマイクロサテライトマーカーを使用して、3つの維持された領域を3つの抑制されたクローンすべてにおいて同定した; D 1 0 S 2 1 9からD 1 0 S 1 1 0までの22cM領域、D 1 0 S 1 9 2からD 1 0 S 1 8 7までの14cM領域、およびD 1 0 S 1 6 9からD 1 0 S 1 1 3 4までの18cM領域(図3)。

30

【0285】

この制限を回避するために、ハイブリッドU 2 5 1 N 1 0.7に由来するはじめに移入したネオマイシン耐性タグを付与した第10染色体を、マウスA9細胞への、マイクロ細胞が媒介する染色体の移入によって“レスキュー”した。これにより、すべてのヒトのマイクロサテライトマーカーによって、第10染色体の存在を知ることができる。この分析の基礎は、すべての“完全に”抑制されたサブクローンは共通の領域を維持しており、この領域は“部分的に”抑制されたサブクローンでは除かれているということである。第10染色体に特異的なプローブを使用するF I S Hによって測定されるとおり、N 1 0.7は維持された第10染色体のサイズにおいてかなりの不均一性を示したということは、さらに弾みをつけた。また、このレスキューに使用したハイブリッド細胞を、軟アガロース増殖についてはじめに分析したが、コロニーの形成がなかったことが示された。移入したヒト第10染色体を含むマウスハイブリッドは、すべて第10染色体の短腕を含んでいた。同じ領域が軟アガロースにおいて増殖した“部分的に”抑制されたクローン(N 1 0.5 a-j

40

50

)において維持されており (Steckら、1995)、10q腫瘍抑制遺伝子を含んでいるこの領域 (10pter - 10q11) が除かれていた。10qの維持された領域の試験は、かなりの不均一性を示した (図3)。クローンの大部分は、10q23 - 26の部分的なまたは広範な欠失のいずれかを示した。2つの領域のみが試験したすべてのサブクローンに維持された。維持されたセントロメア領域の大部分は、マーカーD10S210およびD10S219を含んでいた。しかし、これらのマーカーは、もとのN10.6および/またはN10.8クローンには存在しておらず、この領域が除かれていた (図3)。D10S215のテロメア (~4cM) 以外の領域は、D4S536のセントロメアであった。マーカーAFM086およびD10S536は、試験したすべてのクローンに維持されていた (図3、囲みの領域)。これらのマーカーは、部分的に抑制されたクローンには存在していなかった (N10.5a-j)。これらの結果は、AFM086付近の共通の領域が、表現型が抑制されているすべてのハイブリッド細胞において維持されていることを証明している。この同じ領域は、いくつかのグリオーム細胞系においては欠失している。

10

20

30

40

50

【0286】

この分析にはいくつかの制限がある。第1に、レスキューしたクローンは、生物学的活性については分析できないので、移入の間またはその後で第10染色体に起こり得るいかなる変化も測定できない。この懸念に対し部分的に取り組むために、本発明者の分析を、クローンが回収可能になればできる限りすぐに行った。さらに、染色体のこの部分の維持は *in vitro* の人工的な欠失のみを“訂正 (correct)”し得る。その結果、アレル欠失試験を行ってこの領域がグリオームと関係しているかどうかについて調べた。また、別の領域が、1つのクローン (C7) 以外のすべてのクローンがこの領域を維持していたD10S1158の分析によって示唆された。しかし、AFM086で維持された領域もまたホモ接合欠失を示し、これによりD10S1158と比較されるとおり、2つの別法に関係している。さらに、腫瘍抑制遺伝子領域が優先的に維持され、10qの残りが断片化されることに興味を持って注目する。

【0287】

実施例3 - 10qのアレル欠失分析

第10染色体に特異的なマイクロサテライトマーカーを用い、一連の53の神経膠腫試料および対応患者リンパ球からのDNAでアレル欠失分析を行った。この分析は、本発明の重要な領域もまた神経膠腫試料に関与しているか否かを決定するために行った。GBMからの試料の大部分において広範囲の欠失が観察され、38のGBMのうち30は第10染色体のほとんどもしくは完全な欠失を示した。試料を未分化星状細胞腫から採取した場合には大部分において欠失の程度は低くなったのに対し、星状細胞腫およびほとんどの寡突起膠腫では欠失を観察することは稀であった (図4、データは示していない)。この分析に用いたマーカーの大部分は10q23 - 26にマッピングされた (Gyapayら、1994)。他の分析と同様、欠失の共通の領域はほとんどのGBM試料における大きな欠失のため、納得のいくように示すことはできなかった (Fultsら、1993; Rasheedら、1995)。

【0288】

しかしながら、調べたGBM試料については、一つ (#9、図4) を除いてすべての腫瘍試料でD10S579 ~ D10S541の領域を含む欠失が認められた。さらに一つのアミノ酸のみが本発明者らの重要な領域内に欠失を示し、星状細胞腫は示さなかった。2つの寡突起膠腫は該重要な領域内に欠失を示したが、これら両者は悪性と診断されていた。この分析は幾つかの可能性を示す。第一に、本発明者らの重要な領域に関与する欠失は、低度の腫瘍ではなくGBMにおいて主として起こる。このことは、本発明者らの重要な領域中の第10q染色体上の腫瘍抑制遺伝子の喪失がGBMへの進行に伴う遺伝子変化を表していることを示唆している。この仮説を支持するものとして、低度の腫瘍でも第10q染色体上に欠失が生じるけれども、これら試料について10q上の欠失の共通の領域は同定されなかった。この観察が今度は、第10q腫瘍抑制遺伝子の欠失が主としてGBMと関連しており、10q上の欠失のすべてが腫瘍抑制遺伝子に影響を及ぼすわけではない

という示唆を支持している。領域 D 1 0 S 2 1 6 ~ D 1 0 S 5 8 7 は、Rasheedにより示唆されているように、広範な欠失を示したが、幾つかの G B M は該領域でヘテロ接合性の保持を示した（腫瘍 # 2、# 9、# 1 3、# 2 6；図 4）。また、低度の腫瘍を本分析から除外すれば、本発明者らの領域はすべての G B M で示唆される。この独立のアプローチの組み合わせは、とりわけ A F M 0 8 6 において 1 0 q 腫瘍抑制遺伝子が領域 D 1 0 S 2 1 5 ~ D 1 0 S 5 4 1 にマッピングされることを示唆している。

【 0 2 8 9 】

実施例 4 - 候補腫瘍抑制遺伝子領域のマッピング

本発明者らによって同定された重要な領域は、A F M 0 8 6 に集中し、D 1 0 S 2 1 5 および D 1 0 S 5 4 1 によって境界とされている（図 2 および 8）。この領域は比較的小さく、幾つかの個々の Y A C（7 8 7 d 7；7 4 6 h 8；9 3 4 d 3）内に含まれている。E F C - 2 中期広がり（spreads）での Y A C 7 4 6 h 8 の F I S H 染色は、Y A C が部分的に観察され、両側に隣接する Y A C が存在することから、ホモ接合性の欠失が Y A C 内に含まれることを示している。該領域中のすべてのマーカーについて細菌人工染色体（B A C）または P A C を単離した（図 8）。該領域の B A C コンティグは、該領域への B A C マッピングの末端配列から構築した。幾つかの顕著な特徴が認められた。まず、2 つの重複する B A C が同定され（4 6 b 1 2 および 2 f 2 0）、1 0 6 d 1 6 のゲノムの完全さが確認された。第二に、N o t I 部位が B A C の一方の末端に同定された。N o t I 部位の存在および S a c II、E a g I および B s s H I I を用いた同時制限消化は、1 0 6 d 1 6 内に C p G 島（island）が存在することを示唆している。

【 0 2 9 0 】

B A C 1 0 6 d 1 6 からの E c o R I 断片を用い、以前にホモ接合性の A F M 0 8 6 であることが示されている神経膠腫細胞において、サザンブロッティングによりホモ接合性欠失の程度を調べた（図 2 および 5）。右側（E c o R I 断片 1 4）は、C p G 島らしいものを含み、4 つの細胞株のうち 3 つに存在する。N o t I / E c o R I（# 3）断片を、幾つかの B A C および神経膠腫細胞株を含むサザンブロットにおいてプローブとして用いた（図 2）。テロメア側（右側）の欠失は、E F C - 2 細胞を除き、4 6 b 1 2 からのプローブを用いて検出されなかった。しかしながら、1 0 6 d 1 6 によって定められる領域（~ 6 5 k b）内に別のホモ接合性欠失が観察された。バンド 3 のホモ接合性欠失は L G 1 1 細胞および E F C - 2 細胞において観察されるが、他の神経膠腫細胞または正常な対照には観察されない。1 0 6 d 1 6（バンド 1 2）はすべての細胞において観察され（E F C - 2 は変化した移動バンドを示す）、ホモ接合性欠失が完全に 1 0 6 d 1 6 内に含まれることを示唆していた。

【 0 2 9 1 】

実施例 5 - 重要な領域内で発現された遺伝子の同定

B A C 1 0 6 d 1 6 からの E c o R I 断片を生成し、アガロースゲル電気泳動によりサイズ分離した。個々のバンドまたは同じサイズのバンドのプールを p S P L 3（GIBCO, ゲイサーズバーグ、メリーランド）にライゲートした。推定エクソンを製造業者の記載に従って同定した。2 つのエクソンが捕捉ベクター中に正しくスプライシングされた。これらエクソンは、バンドプール 2、3、4、5 およびバンド 7 からのものであった。捕捉したエクソンの配列を決定し、知られた捕捉ベクター配列により定めた。発現された配列タグ（d b E S T）データベースの B L A S T サーチを用い、5 つの潜在的な発現配列タグ（E S T）を同定した。2 つの E S T（g b / H 9 2 0 3 8、A A 0 0 9 5 1 9）を観察したところ、これらエクソンのいずれかまたは両者を含んでいた（一方の E S T は間違った方向ではあったが）。

【 0 2 9 2 】

シーケンシングプライマーを E S T から生成し、B A C 4 6 b 1 2 を鋳型として用いて推定エクソン - イントロン境界を定めるのに用いた。9 つのエクソンを同定した。E S T とゲノム鋳型との配列の相違を補正した。これらエクソンはすべて B A C 4 6 b 1 2 内に含まれていた。各エクソンに隣接するイントロン配列からプライマーを生成し、各エク

ソンのアンプリコン単位を形成した。エクソンのうちの2つは、B A C 1 0 6 d 1 6 E c o R I 配列からの捕捉エクソンに対応していた。この遺伝子の配列を図6に示す。予測されるアミノ酸の読み取りは、A T G 開始部位、T G A および T A A 終止コドンのインフレーションでの存在、配列のどこにでも3つのすべての読み取り枠で存在する複数の終止コドン、9つのスプライシング部位、および開始部位の近傍に存在するコザック配列により定められた。この403アミノ酸配列を図7および図9に示す。予測される分子量は47,122であり、pIは5.86である。

【0293】

タンパク質産物の可能な機能的役割は、幾つかのタンパク質モチーフへのその配列ホモロジーにより示唆される。残基88~98からの重要なモチーフ[*IHCKAGKGR*TG](配列番号:17)は、プロテインチロシンホスファターゼの保存された触媒ドメイン[(*I/V*)HCxAGxxR(*S/T*)G](配列番号:18)(Denuら、1996)と正確に一致する。腫瘍抑制遺伝子のホスファターゼ機能と一致する幾つかの他のモチーフが同定された。

10

【0294】

アンプリコン(遺伝子の種々の領域から生成されるPCR^{T M}産物)をランダムプライミングcDNAから生成した。アンプリコンの配列はDNA配列に対応する。非重複アンプリコンを用いて種々の臓器からの正常組織のノーザンプロットをプローブした(Clontech、パロアルト、カリフォルニア;多組織プロット)。すべてのアンプリコンにより、ノーザンプロット上の5.5~6kbの主要なバンドおよび幾つかの主要でないバンドが同定された。調べたすべての組織(心臓、脳、胎盤、肺臓、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸および末梢血リンパ球)でメッセージが発現された。

20

【0295】

実施例6 - 変異分析

変異分析を最初に2つの範囲(fronts)で行った。まず、ホモ接合性欠失を有することが示された神経膠腫細胞株を候補遺伝子の存在について分析した。図8に示すように、AFM086の欠失を示した細胞株はすべて、候補遺伝子の複数のエクソンのホモ接合性欠失を有していた。さらに、欠失は遺伝子の中央においても生じたのでエクソンBとエクソンGとの間に欠失境界(すべての細胞株において同様の欠失)を定める。遺伝子の中央に影響を及ぼす欠失はさらに、同定された遺伝子が変異の標的遺伝子を表すことを示している。

30

【0296】

配列変異の予備分析もまた一連の神経膠腫細胞株で行った。調べた神経膠腫細胞株のうち3つを除くすべてにおいて変異および/または欠失が観察された(表4)。表中の塩基番号は、全配列ではなくエクソンの配列を指すものであり、すなわちU251についてはエクソンGの98番目の塩基である。

表4

候補遺伝子において同定された変異

細胞	細胞タイプ	変異	予測される効果
1 U87	神経膠腫	スプライスジャンクション エクソンc;G+1>T	スプライシング 変異体
2 U138	神経膠腫	スプライシング部位 エクソンh;G+1>T	スプライシング 変異体
3 U251	神経膠腫	2bp付加エクソンG;98 ins TT	
4 U373	神経膠腫	フレームシフトエクソンG	
5 EFC-2	神経膠腫	—すべてのエクソン	生成物なし
6 D54	神経膠腫	—エクソンC—I	生成物なし
7 A172	神経膠腫	—エクソンC—I	生成物なし
8 LG11	神経膠腫	—エクソンB—I	生成物なし
9 T98G	神経膠腫	ミスセンスエクソンB;T46->G	leu>arg
10 KE	神経膠腫	ミスセンスエクソンB;G28->A	gly>glu
11 F60	神経膠腫	終止変異エクソンH;C202->T	終止停止
12 D77	神経膠腫	変異なし(10qについて不均質)	
13 PC-3	低度	変異なし	
14 PH-2	低度	変異なし	
15 nLnCap	前立腺	欠失エクソンA, 16-17delAA; 変異B, C53->T	サイレント

10

20

【0297】

また、エクソンの欠失は前立腺細胞株であるLnCapでも認められた。変異/欠失を示さなかった神経膠腫細胞は低度の腫瘍(PC-3およびPH-2)由来のものであり、第10染色体のアレル欠失は期待されず、これらの細胞について観察した。他の細胞(D77)は一次細胞培養であり、第10染色体は該遺伝子内の1bp多型からヘテロ接合性であることが示された。乳癌細胞株もまた変異を示した。この最初の分析は、10q腫瘍抑制遺伝子の喪失が神経膠芽細胞腫および疾患進行の重要な分子マーカーとなるとの本発明者らの結論を支持するものである。

30

IX. 参考文献

【0298】

以下の参考文献は、それらが本明細書に示したものの補足となる例示的な手順その他の詳細を提供する限りにおいて、参照のため本明細書中に引用される。

アルバローサら(Albarosa et al.), Deletion mapping of gliomas suggest the presence of two small regions for candidate tumor-suppressor genes in a 17-cM interval on chromosome 10q. *Am. J. Genet.*, 58:1260-1267, 1996.

40

バイクウォールおよびサグデン(Bauchwal and Sugden), Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes. In: *Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 117-148, 1986.

バラニーおよびメリフィールド(Barany and Merrifield), *The Peptides*, Gross and Merrifield, eds., Academic Press, New York, pp. 1-284, 1979.

ベンベニスティおよびネシフ(Benvenisty and Neshif), Direction introduction of genes into rats and expression of the genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83:9551-9555, 1986.

50

- ビアンチら(Bianchi et al.), Mutations in transcript isoforms of the neurofibromatosis 2 gene in multiple human tumor types. *Nature Genetics*, 6:185-192, 1994.
- ビグナーら(Bigner et al.), Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res.*, 48:405-411, 1988.
- ビグナーら(Bigner et al.), Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res.* 48:405-411, 1988.
- ビショップ(Bishop, J.M.), Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64:2351-248, 1991.
- ボーリングら(Boring et al.), *Cancer Statistics, 1994 CA*, 43: 7-26, 1994.
- ブリンスターら(Brinster et al.), *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 82: 4438-4442, 1985 10
- カバルディら(Capaldi et al.), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76:425, 1977
- カーターら(Carter et al.), Allelic loss of chromosome 16q and 10q in human prostate carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:8751-8755, 1990.
- チャンら(Chang et al.), Foreign gene delivery and expression in hepatocytes using a hepatitis B virus vector. *Hepatology*, 14:124A, 1991.
- チェンおよびオカヤマ(Chen and Okayama), High-efficiency transfection of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.
- コフィン(Coffin), *Retroviridae and Their Replication*. In: *Virology*, Fields et al., eds., Raven Press, New York, pp. 1437-1500, 1990. 20
- コーヘン(Cohen, P.), The discovery of protein phosphatases: From chaos and confusion to an understanding of their role in cell regulation and human disease. *Bioessays*, 61-583-588, 1994.
- コレットら(Collet et al.), Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:2021-2024, 1978.
- クーパーら(Coupar et al.), A general method for the construction of recombinant vaccinia virus expressing multiple foreign genes, *Gene*, 68: 1-10, 1988.
- カルバーら(Culver et al.), In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science*, 256: 1550-1552, 1992. 30
- ダリーら(Daly et al.), A homozygous deletion on chromosome 3 in small cell lung cancer cell line correlates with a region of tumor suppressive activity. *Oncogene* 8: 1721-1729, 1993.
- デュヌら(Denu et al.), Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* 87: 361-364, 1996.
- ダベンスキーら(Dubensky et al.), Direct transfection of viral and plasmid DNA in to the liver or spleen of mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7529-7533, 1984.
- エルアズージら(El-Azouzi et al.), Loss of distinct regions on the short arm of chromosome 17 associated with tumorigenesis of human astrocytomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 7186-7190, 1989. 40
- EP 329 822, デイビーら(Davey et al.)
- フィアロンおよびボーゲルスタイン(Fearron and Vogelstein), A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759-767, 1990.
- フェッチハイマーら(Fechheimer et al.), Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- ファーコールら(Ferkol et al.), Regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase/human factor IX gene introduced into the livers of adult rats by receptor-mediated gene transfer. *FASEB J.*, 7:1081-1091, 1993.
- フォダーら(Fodor et al.), Light-directed, spatially addressable parallel chemical 50

I synthesis. *Science*, 251: 767-773, 1991.

フォールズ(Foulds), The natural history of cancer. *J. Chronic Dis.*, 8:2-37, 1958.

フレイラー(Fraley et al.), Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: Potential for gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.

フレッシュナー(Freshner), *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 2nd ed., Oxford/New York, IRL Press, Oxford University Press, 1992.

フリードマン(Friedmann), Progress toward human gene therapy. *Science*, 244: 1275-1281, 1989. 10

フローマン(Frohman), In: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N.Y., 1990.

フジモトら(Fujimoto et al.), Loss of heterozygosity on chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *Genomics*, 4:210-214, 1989.

フルツおよびペダン(Fults & Pedone), Deletion mapping of the long arm of chromosome 10 in glioblastoma and multiforme. *Genes Chromosom. Cancer* 7:173-177, 1993.

フルツら(Fults et al.), Allelotype of human malignant astrocytoma, *Cancer Res.*, 50:5784-5789, 1990.

GB 2 202 328

ジェフターら(Gefter et al.), *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977. 20

ゴシュ ショードハリーら(Ghosh-Choudhury et al.), *EMBO J.*, 6:1733-1739, 1987.

ゴシュおよびバックハワート(Ghosh and Bachhawat), Targeting of Liposomes to Hepatocytes. In: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy using Specific Receptors and Ligands*. Wu et al., eds., Marcel Dekker, New York, pp. 87-104, 1991.

ゴディング(Goding), 1986, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2nd ed., Academic Press, Orlando, Fla., pp. 60-61, and 71-74, 1986.

ゴメス フォワら(Gomez-Foix et al.), *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.

ゴパル(Gopal), Gene transfer method for transient gene expression, stable transfection, and cotransfection of suspension cell cultures. *Mol. Cell Biol.*, 5: 1188-1190, 1985. 30

グラハムおよびプリベク(Graham and Prevec), In: *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocol*, E.J. Murray, ed., Humana Press, Clifton, NJ, 7: 109-128, 1991.

グラハムおよびファン・デル・エブ(Graham and van der Eb), A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52:456-467, 1973.

グラハムら(Graham et al.), Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977.

グレイら(Gray et al.), Loss of chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer Res.*, 55:4800-4803, 1995.

グレイら(Gray et al.), Loss of chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer Res.*, 55:4800-4803, 1995. 40

グルンハウスおよびホルヴィッツ(Grunhaus and Horwitz), Adenovirus as cloning vector. *Seminar in Virology*, 3: 237-252, 1992.

ジャパイら(Gyapay et al.), The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nat. Genet.*, 7:246-339, 1994.

ハシアら(Hacia et al.), Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nature Genetics*, 14:441-447, 1996.

ハーランドおよびウェイントロップ(Harland and Weintraub), Translation of mammalian mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by antisense RNA. 50

- J. Cell Biol., 101: 1094-1099, 1985.
- ヘンソンら(Henson et al.), The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. *Ann. Neurol.*, 36:714-721, 1994.
- ハーブストラ(Herbst et al.), Loss of heterozygosity for 10q22-qter in malignant melanoma progression. *Cancer Res.*, 54:3111-3114, 1994.
- ハーモナットおよびムジツスカ(Hermonat and Muzycska), Use of adenoassociated viruses as a mammalian DNA cloning vector: Transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.
- ハースドーフアー(Hersdorffer et al.), *DNA Cell Biol.*, 9:713-723, 1990.
- ハーツおよびジェラード(Herz and Gerard), *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 90:2812-2816, 1993. 10
- ホーウィッチら(Horwich, et al.), Synthesis of hepadnavirus particles that contain replication-defective duck hepatitis B virus genomes in cultured HuH7 cells. *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.
- ハンター(Hunter, T.), Cooperation between oncogenes. *Cell*, 64:249-270, 1991.
- イトマン(Ittmann), Allelic loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 56:2143-2147, 1996.
- ジェームズら(James et al.), Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res.*, 48:5546-5551, 1988.
- ジョンソンら(Johnson et al.), "Peptide Turn Mimetics" IN: *Biotechnology And Pharmacy*, Pezzuto et al., eds., Chapman and Hall, New York, 1993. 20
- ジョーンズおよびシェンク(Jones and Shenk), *Cell*, 13:181-188, 1978.
- カムら(Kamb et al.), A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 264:436-440, 1984.
- カネダら(Kaneda et al.), Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science*, 243:375-378, 1989.
- カールボムら(Karlbohm et al.), Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. *Hum. Genet.*, 92:169-174, 1993.
- カールソンら(Karlsson et al.), *EMBO J.*, 5:2377-2385, 1986. 30
- カトーら(Kato et al.), Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver. *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- キンメルマンら(Kimmelman et al.), Loss of heterozygosity of chromosome 10p in human gliomas. *Genomics* 34:250-254, 1996.
- クラインら(Klein et al.), High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327:70-73, 1987.
- コックら(Kok et al.), A homozygous deletion in a small cell lung cancer cell line involving a 3p21 region with a marked instability in yeast artificial chromosomes, *Cancer Res.* 54:4183-4187, 1994.
- コミヤら(Komiya et al.), Allelic losses at loci on chromosome 10 are associated with metastasis and progression of human prostate cancer. *Genes Chromo. Cancer* 17:245-253, 1996. 40
- クワーら(Kwoh et al.), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86: 1173, 1989.
- カイトおよびドゥーリトル(Kyte and Doolittle), *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- ル・ギャル・ラ・サルら(Le Gal La Salle et al.), *Science*, 259:988-990, 1993.
- リーら(Lee et al.), Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science*, 235:1394-1399, 1987.
- レビンら(Levin et al.), Neoplasms of the central nervous system. In: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 4th ed., DeVita et al., eds., J.B. Lippincott C 50

- o., Philadelphia, 1993.
- レブレロら (Levrero et al.), *Gene*, 101: 195-202, 1991.
- マセジャクおよびサーナウ (Macejak and Sarnow), *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 2nd ed., Hogan et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- マンら (Mann et al.), Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell*, 33:153-159, 1983.
- マーコウィッツら (Markowitz et al.), *J. Virol.*, 62:1120-1124, 1988.
- メリフィールド (Merrifield), *Science*, 232:341-347, 1986
- モリタら (Morita et al.), Common regions of deletion on chromosomes 5q, 6q, and 10q in renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 51:5817-5820, 1991. 10
- マリガン (Mulligan), *Science*, 260:926-932, 1993.
- ムラカミら (Murakami et al.), Suppression of the malignant phenotype of human prostate cancer cell line PPC-1 by introduction of normal fragments of human chromosome 10. *Cancer Res.*, 56:2157-2160, 1996.
- マイヤーズ (Myers), EP 0273085
- ニコラスおよびルービンシュタイン (Nicolas and Rubinstein), In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988.
- ニコラウおよびシェン (Nicolau and Sene), Liposome-mediated DNA transfer in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982. 20
- ニヘイら (Nihei et al.), Localization of a metastasis suppressor gene(s) for rat prostatic cancer to the long arm of human chromosome 10. *Genes Chromosom. Cancer*, 14:112-119, 1995.
- ニシら (Nishi et al.), Differential expression of two types of the neurofibromatosis type 1 gene transcripts related to neural differentiation. *Oncogene*, 6:1555-1559, 1991.
- パスカインドら (Paskind et al.), Dependence of moloney murine leukemia virus production on cell growth. *Virology*, 67:242-248, 1975.
- PCT/US87/00880 30
- PCT/US89/01025
- ピースら (Pease et al.), Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:5022-5026, 1994.
- パイファーら (Peiffer et al.), Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Res.*, 55:1922-1926, 1995.
- ペルチエおよびソーネンバーグ (Pelletier and Sonenberg), *Nature*, 334:320-325, 1988
- .
- ペラレスら (Perales et al.), Gene transfer in vivo: Sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:4086-4090, 1994. 40
- パーサハウスら (Pershouse et al.), Analysis of the functional role of chromosome 10 loss in human glioblastomas. *Cancer Res.* 53:5043-5050, 1993.
- ピーターセンら (Petersen et al.), Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 13q, and 17p. *Brit. J. Cancer* 75:79-86, 1997.
- ピグナンら (Pignon et al.), *Hum. Mutat.*, 3: 126-132, 1994.
- ラッシャーら (Racher et al.), *Biotechnology Techniques*, 9:169-174, 1995.
- ラゴットら (Ragot et al.), *Nature*, 361:647-650, 1993.
- ランサムら (Ransom et al.), Correlation of cytogenetic analysis and loss of heter 50

- ozygosity studies in human diffuse astrocytomas and mixed oligo-astrocytomas. *Genes Chromosom. Cancer* 5:357-374, 1992.
- ラシードら(Rasheed et al.), Loss of heterozygosity for 10q loci in human gliomas. *Genes Chromo. Cancer*, 5:75-82, 1992.
- ラシードら(Rasheed et al.), *Oncogene*, 11:2243-2246, 1995.
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 15th ed., pp. 1035-1038 and 1570-1580.
- レンベルら(Rempel et al.), Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res.*, 53:2386-2392, 1993.
- リッチら(Rich et al.), *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993. 10
- リッジウェイ(Ridgeway), *Mammalian Expression Vectors*, In: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez et al., eds., Stoneham: Butterworth, pp. 467-492, 1988.
- リトランドら(Ritland et al.), Region-specific loss of heterozygosity on chromosome 19 is related to the morphologic type of human glioma. *Genes. Chromo. Cancer*, 12:277-282, 1995.
- ローゼンフェルトら(Rosenfeld et al.), In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell*, 68:143-155, 1992.
- ローゼンフェルトら(Rosenfeld et al.), *Science*, 252:431-434, 1991. 20
- ルーら(Roux et al.), A versatile and potentially general approach to the targeting of specific cell types by retroviruses: Application to the infection of human cells by means of major histocompatibility complex class I and class II antigens by mouse ecotropic murine leukemia virus-derived viruses. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
- ルビオら(Rubio et al.), Analysis of the neurofibromatosis 2 gene in human ependyomas and astrocytomas, *Cancer Res.*, 54:45-47, 1994.
- ラッセルおよびルービンシュタイン(Russell and Rubinstein), *Tumors of the neuroepithelial origin*, In: *Pathology of Tumors of the Nervous System*, 5th ed., Williams and Wilkins, eds., pp. 82-219, 1989. 30
- サムブルックら(Sambrook et al.), In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- サンチェスら(Sanchez et al.), Tumor suppression and apoptosis of human prostate carcinoma mediated by a genetic locus within human chromosome 10pter-q11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, pp. 2551-2556, 1996.
- サーバーら(Sarver, et al.), *Science*, 247:1222-1225, 1990.
- シェックおよびクーンズ(Scheck and Coons), Expression of the tumor suppressor gene DCC in human gliomas. *Cancer Res.*, 53:5605-5609, 1993.
- シューメーカーら(Shoemaker et al.), Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy. *Nature Genetics* 14:450-456, 1996. 40
- ソノダら(Sonoda et al.), *Cancer Res.*, 55:2166-2168, 1995.
- ステックら(Steck et al.), Evidence for two tumor suppressive loci on chromosome 10 involved in glioblastomas. *Genes Chromosom. Cancer* 712:255-261, 1995.
- ステックら(Steck et al.), Evidence for two tumor suppressive loci on chromosome 10 involved in glioblastomas, *Genes Chromosom. Cancer*, 12:255-261, 1995.
- ステュワートおよびヤング(Stewart and Young), *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.
- ストラトフォード - ペリコーディットおよびペリコーディット(Stratford-Perricaudet and Perricaudet), Gene transfer into animals: the promise of adenovirus. In: *Hum* 40 50

- an Gene Transfer, O. Cohen-Haguenaer et al., eds., John Libbey Eurotext, France, pp. 51-61, 1991.
- ストラトフォード - ペリコーディットら (Stratford-Perricaudet et al.), Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector. *Hum. Gene Ther.*, 1:241-256, 1990.
- タムら (Tam et al.), *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.
- テミン (Temin), Retrovirus vectors for gene transfer: Efficient integration into and expression of exogenous DNA in vertebrate cell genome. In: *Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 149-188, 1986.
- トライバスら (Trybus et al.), Distinct areas of allelic loss on chromosomal regions 10p and 10q in human prostate cancer. *Cancer Res.* 56:2263-2267, 1996. 10
- ツール - カスパら (Tur-Kaspa et al.), Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes. *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- U.S. 4,873,191, ワグナーおよびホップ (Wagner and Hoppe)
- U.S. 5,279,721
- ヴァーマスら (Varmus et al.), *Cell*, 25:23-36, 1981.
- フォン・ダイムリンクら (von Deimling et al.), Deletion mapping of chromosome 19 in human gliomas. *Int. J. Cancer*, 57:676-680, 1994.
- ブレルら (Voullaire et al.), A functional marker centromere with no detectable alpha-satellite, satellite III, or CENP-B protein: activation of a latent centromere? *Am. J. Hum. Genet.*, 52:1153-1163. 20
- ワグナーら (Wagner et al.), *Science*, 260:1510-1513, 1993.
- ウォーカーら (Walker et al.), *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89:392-396 1992.
- ウェイら (Wei et al.), Construction of a 600-kilobase cosmid clone contig and generation of a transcriptional map surrounding the lung cancer tumor suppressor gene (TSG) locus on human chromosome 3p21.3: progress toward the isolation of a lung cancer TSG. *Cancer Res.* 56:1487-1494, 1996.
- ウェインバーグ (Weinberg), Positive and negative controls on cell growth. *Biochemistry*, 28:8263-8269, 1989. 30
- WO 88/10351, ジンジェラスら (Gingeras et al.)
- WO 89/06700, ミラーら (Miller et al.)
- WO 90/07641, filed December 21, 1990.
- ウォンら (Wong et al.), Appearance of b-lactamase activity in animal cells upon liposome mediated gene transfer, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- ウォンら (Wong et al.), Increased expression of the EGF receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 6899-6903, 1987.
- ウーおよびウー (Wu and Wu), *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.
- ウーおよびウー (Wu and Wu), Evidence for targeted gene delivery to HepG2 hepatoma cells in vitro. *Biochemistry*, 27:887-892, 1988. 40
- ウーおよびウー (Wu and Wu), Receptor-mediated in vitro gene transfections by a soluble DNA carrier system. *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- ウーら (Wu et al.), *Genomics*, 4:560, 1989.
- ヤマグチら (Yamaguchi et al.), Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:484-488, 1994.
- ヤンら (Yang et al.), In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:9568-9572, 1990.
- ゼレニンら (Zelenin et al.), High-velocity mechanical DNA transfer of the chloram 50

phenicol acetyltransferase gene into rodent liver, kidney and mammary gland cells in organ explants and in vivo. FEBS Lett., 280:94-96, 1991.

【 図 1 】

1/27

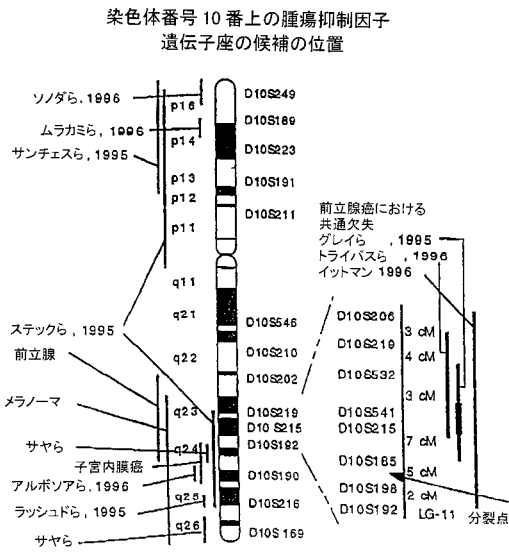


FIG. 1

【 図 2 】

2/27

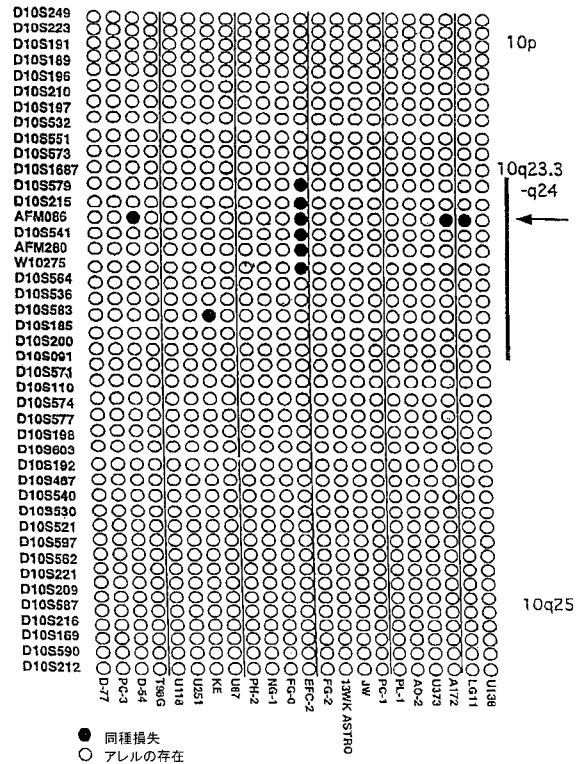


FIG. 2

【 図 3 】

3/27

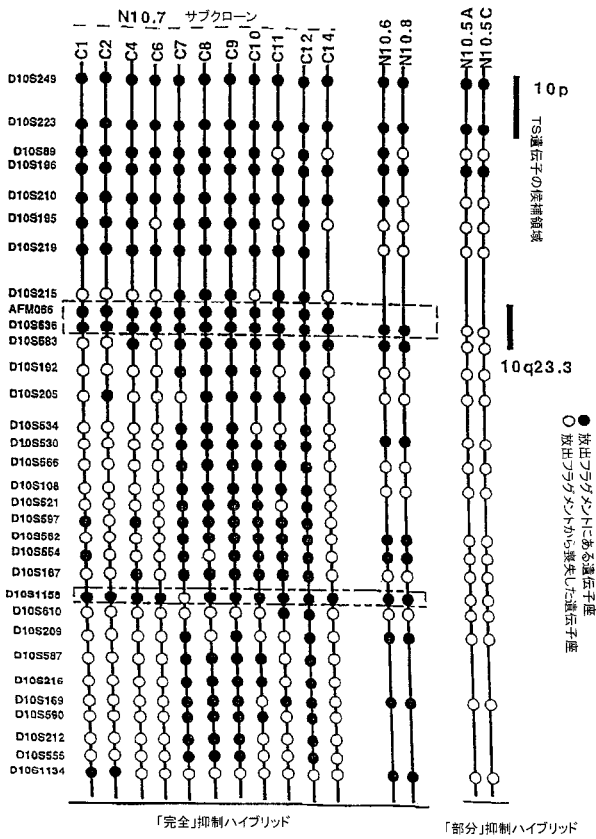


FIG. 3

【 図 5 】

5/27

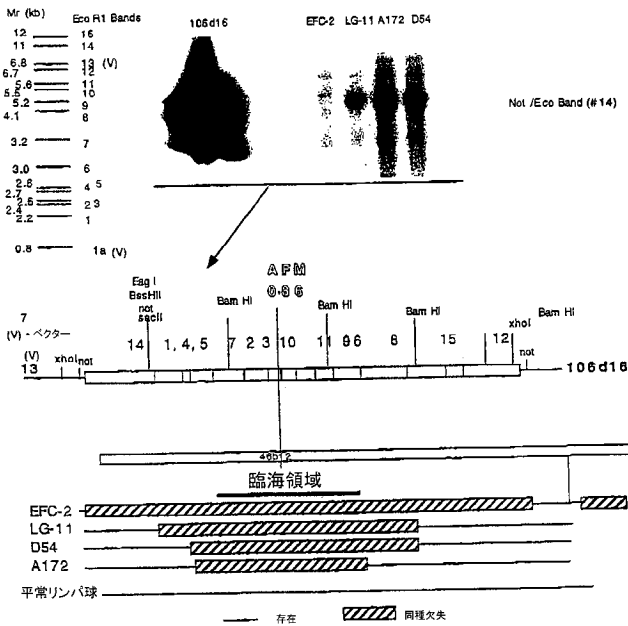


FIG. 5

【 図 4 】

4/27

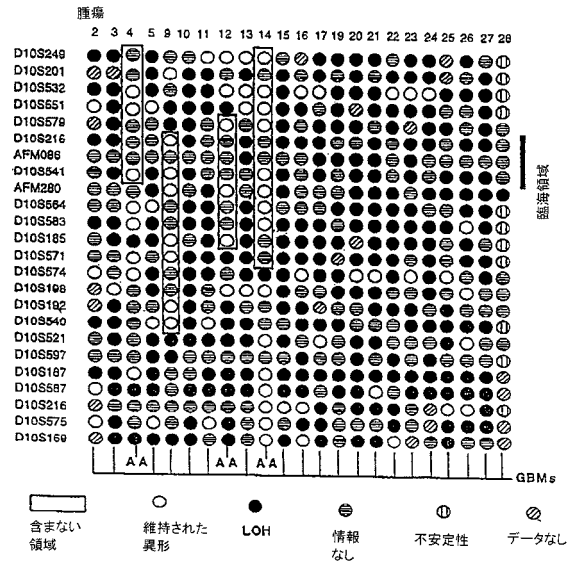


FIG. 4

【 図 6 】

6/27

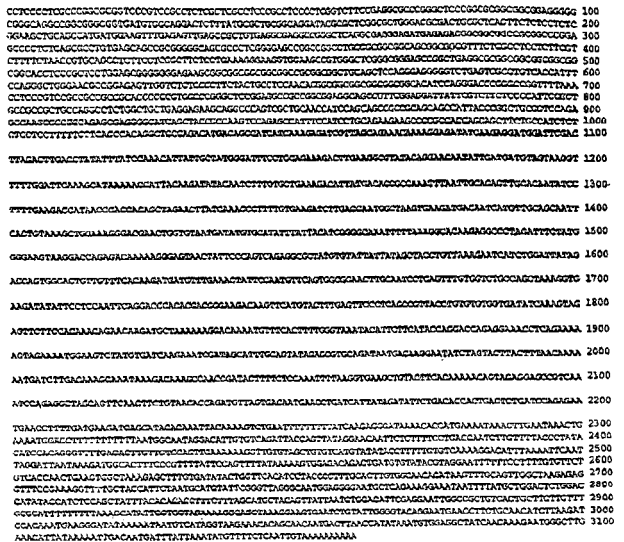


FIG. 6

【 9 - 7 】

15/27

СМ. РЕ. Ф. 2. 1/28	1/29/97	10.01.98	11/00	11/00	11/00	11/00	11/00	11/00	11/00	11/00	11/00	11/00	11/00
6 С6.1. ЛХ	1120	1230	1340	1450	1560	1670	1780	1890	1900	1910	1920	1930	1940
7 С6.1. ЛХ													
8 С6.1. ЛХ													
9 С6.1. ЛХ													
10 С6.1. ЛХ													
11 С6.1. ЛХ													
12 С6.1. ЛХ													
13 С6.1. ЛХ													
14 С6.1. ЛХ													
15 С6.1. ЛХ													
16 С6.1. ЛХ													
17 С6.1. ЛХ													
18 С6.1. ЛХ													
19 С6.1. ЛХ													
20 С6.1. ЛХ													
21 С6.1. ЛХ													
22 С6.1. ЛХ													
23 С6.1. ЛХ													
24 С6.1. ЛХ													
25 С6.1. ЛХ													
26 С6.1. ЛХ													
27 С6.1. ЛХ													
28 С6.1. ЛХ													
29 С6.1. ЛХ													
30 С6.1. ЛХ													
31 С6.1. ЛХ													
32 С6.1. ЛХ													
33 С6.1. ЛХ													
34 С6.1. ЛХ													
35 С6.1. ЛХ													
36 С6.1. ЛХ													
37 С6.1. ЛХ													
38 С6.1. ЛХ													
39 С6.1. ЛХ													
40 С6.1. ЛХ													
41 С6.1. ЛХ													
42 С6.1. ЛХ													
43 С6.1. ЛХ													
44 С6.1. ЛХ													
45 С6.1. ЛХ													
46 С6.1. ЛХ													
47 С6.1. ЛХ													
48 С6.1. ЛХ													
49 С6.1. ЛХ													
50 С6.1. ЛХ													
51 С6.1. ЛХ													
52 С6.1. ЛХ													
53 С6.1. ЛХ													
54 С6.1. ЛХ													
55 С6.1. ЛХ													
56 С6.1. ЛХ													
57 С6.1. ЛХ													
58 С6.1. ЛХ													
59 С6.1. ЛХ													
60 С6.1. ЛХ													
61 С6.1. ЛХ													
62 С6.1. ЛХ													
63 С6.1. ЛХ													
64 С6.1. ЛХ													
65 С6.1. ЛХ													
66 С6.1. ЛХ													
67 С6.1. ЛХ													
68 С6.1. ЛХ													
69 С6.1. ЛХ													
70 С6.1. ЛХ													
71 С6.1. ЛХ													
72 С6.1. ЛХ													
73 С6.1. ЛХ													
74 С6.1. ЛХ													
75 С6.1. ЛХ													
76 С6.1. ЛХ													
77 С6.1. ЛХ													
78 С6.1. ЛХ													
79 С6.1. ЛХ													
80 С6.1. ЛХ													
81 С6.1. ЛХ													
82 С6.1. ЛХ													
83 С6.1. ЛХ													
84 С6.1. ЛХ													
85 С6.1. ЛХ													
86 С6.1. ЛХ													
87 С6.1. ЛХ													
88 С6.1. ЛХ													
89 С6.1. ЛХ													
90 С6.1. ЛХ													
91 С6.1. ЛХ													
92 С6.1. ЛХ													
93 С6.1. ЛХ													
94 С6.1. ЛХ													
95 С6.1. ЛХ													
96 С6.1. ЛХ													
97 С6.1. ЛХ													
98 С6.1. ЛХ													
99 С6.1. ЛХ													
100 С6.1. ЛХ													

FIG. 9 (cont.)

【 9 - 9 】

17/27

СМ. РЕ. Ф. 2. 1/28	1/29/97	10.01.98	11/00	11/00	11/00	11/00	11/00	11/00	11/00	11/00	11/00	11/00	11/00
6 С6.1. ЛХ	1120	1230	1340	1450	1560	1670	1780	1890	1900	1910	1920	1930	1940
7 С6.1. ЛХ													
8 С6.1. ЛХ													
9 С6.1. ЛХ													
10 С6.1. ЛХ													
11 С6.1. ЛХ													
12 С6.1. ЛХ													
13 С6.1. ЛХ													
14 С6.1. ЛХ													
15 С6.1. ЛХ													
16 С6.1. ЛХ													
17 С6.1. ЛХ													
18 С6.1. ЛХ													
19 С6.1. ЛХ													
20 С6.1. ЛХ													
21 С6.1. ЛХ													
22 С6.1. ЛХ													
23 С6.1. ЛХ													
24 С6.1. ЛХ													
25 С6.1. ЛХ													
26 С6.1. ЛХ													
27 С6.1. ЛХ													
28 С6.1. ЛХ													
29 С6.1. ЛХ													
30 С6.1. ЛХ													
31 С6.1. ЛХ													
32 С6.1. ЛХ													
33 С6.1. ЛХ													
34 С6.1. ЛХ													
35 С6.1. ЛХ													
36 С6.1. ЛХ													
37 С6.1. ЛХ													
38 С6.1. ЛХ													
39 С6.1. ЛХ													
40 С6.1. ЛХ													
41 С6.1. ЛХ													
42 С6.1. ЛХ													
43 С6.1. ЛХ													

【 図 1 1 - 1 】

23/27

FIG. 11A

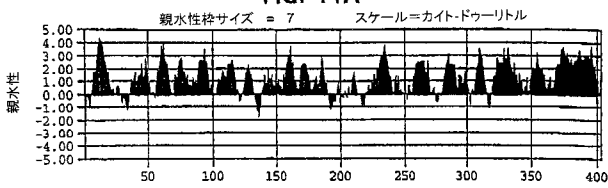


FIG. 11B

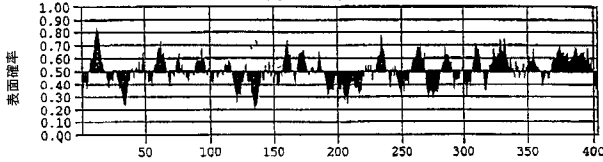


FIG. 11C

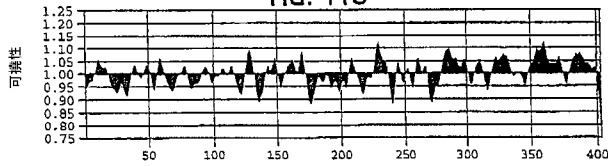
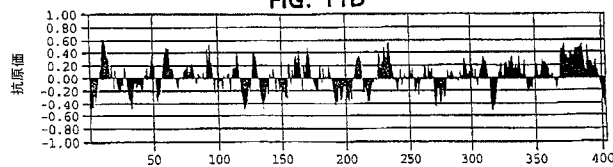


FIG. 11D



【 図 1 1 - 2 】

24/27

FIG. 11E

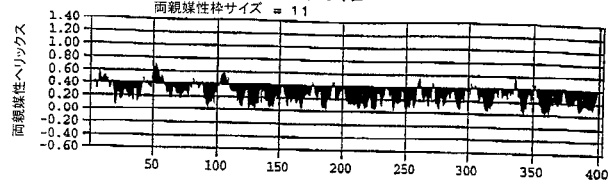


FIG. 11F

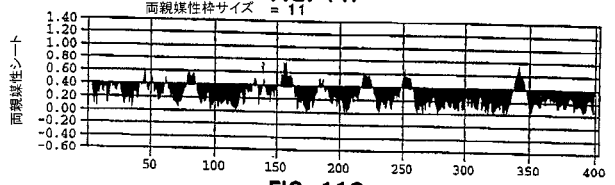
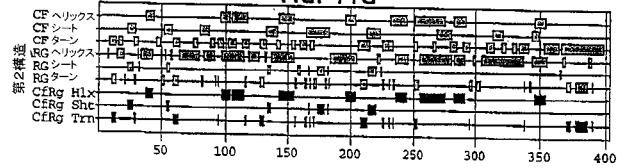


FIG. 11G



【 図 1 2 - 1 】

25/27

FIG. 12A

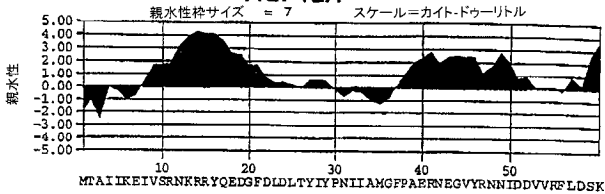


FIG. 12B

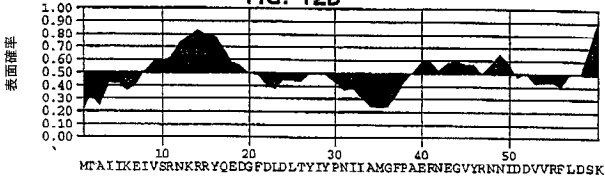
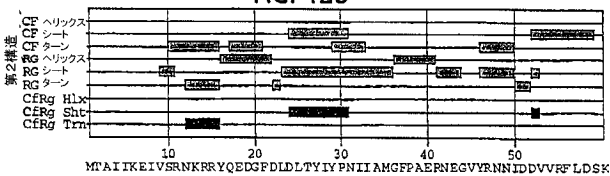


FIG. 12C



【 図 1 2 - 2 】

26/27

FIG. 12D

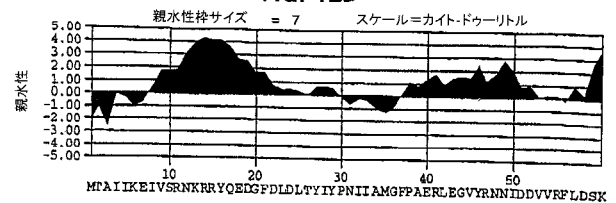


FIG. 12E

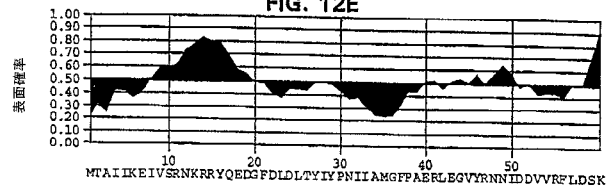
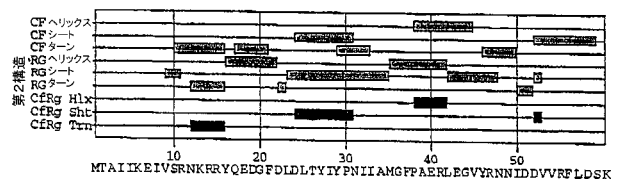
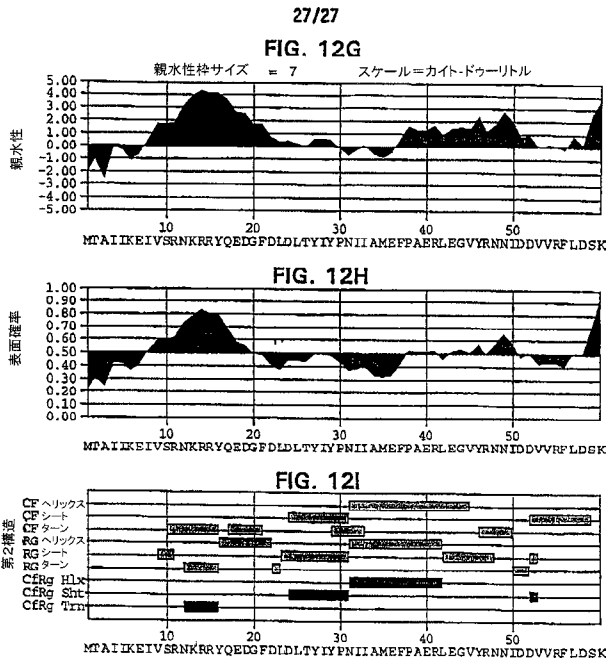


FIG. 12F



【 図 1 2 - 3 】



【 配 列 表 】

2010259438000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 22 年 7 月 16 日 (2010.7.16)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

T S 1 0 q 2 3 . 3 と 称 する 腫 瘍 抑 制 因 子 を コー ド する 単 離 ポリ ペ プ チ ド。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N	37/00 (2006.01)	G 0 1 N	37/00	1 0 2
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	

(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 100142929

弁理士 井上 隆一

(72)発明者 ステック, ピーター

アメリカ合衆国 7 7 4 0 1 テキサス州ベレアー、ホリー 5 4 2 1 番

(72)発明者 パーズハウス, マーク・エイ

アメリカ合衆国 7 7 0 2 5 テキサス州ヒューストン、マクダームド 4 0 6 5 番

(72)発明者 ジャサー, サーマー・エイ

アメリカ合衆国 7 7 0 3 1 テキサス州ヒューストン、クリスティン 9 4 1 1 番

(72)発明者 ヤング, ダブリュー・ケイ・アルフレッド

アメリカ合衆国 7 7 0 0 5 テキサス州ヒューストン、バイロン 4 1 4 1 番

(72)発明者 タブティジャン, ショーン・ブイ

アメリカ合衆国 8 4 1 0 3 ユタ州ソルト・レイク・シティ、イースト・ファースト・アベニュー・
ナンバー 3、5 5 7 番

F ターム(参考) 2G045 AA26 AA40 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37 DA78

FB02 FB03 FB15

4B024 AA01 AA12 BA21 BA56 CA02 CA04 CA09 DA02 EA02 HA12

HA17

4B063 QA01 QA19 QQ43 QQ79 QR32 QR55 QS32

4B064 AG27 CA20 CC24 DA05 DA14

4B065 AA90X AA90Y AB04 AC14 BA08 CA25 CA44 CA46

4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 DA27 NA14 ZB262

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA01 DA76 EA22 EA51 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2010259438A5	公开(公告)日	2011-09-08
申请号	JP2010139230	申请日	2010-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	美瑞德生物工程公司		
申请(专利权)人(译)	Rijientsu董事会, 德州系统的通用名称 无数的遗传学公司		
[标]发明人	ステックピーター パーズハウスマークエイ ジャサーサーマーエイ ヤングダブリューケイアルフレッド タブティジャンションブイ		
发明人	ステック,ピーター パーズハウス,マーク・エイ ジャサー,サーマー・エイ ヤング,ダブリュー・ケイ・アルフレッド タブティジャン、ション・ブイ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/52 C07K16/24 C12N5/10 C12Q1/68 C12Q1/02 A61P35/00 A61K38/00 A61K48/00 G01N33/574 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/15 G01N33/50 C12P21/08		
CPC分类号	A01K2217/075 A61K38/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 C07K14/4703 C12N9/16 C12N2799/021		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/52 C07K16/24 C12N5/00.102 C12Q1/68.A C12Q1/02 A61P35/00 A61K37 /02 A61K48/00 G01N33/574.A G01N33/53.M G01N37/00.102 G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045 /DA36 2G045/DA37 2G045/DA78 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB15 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA21 4B024/BA56 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024 /HA12 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS32 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA90X 4B065 /AA90Y 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/DA27 4C084 /NA14 4C084/ZB262 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 小林智彦 渡边真一 井上隆一		
优先权	08/791115 1997-01-30 US		
其他公开文献	JP2010259438A JP5202583B2		

摘要(译)

要解决的问题: 提供诊断和治疗与肿瘤抑制因子TS10q23.3相关的癌症的方法。解决方案: 分离的多肽具有编码肿瘤抑制因子的特定氨基酸序列。单克隆抗体与肿瘤抑制因子免疫结合。杂交瘤细胞产生单克隆抗体。分离的核酸或其互补序列包括编码肿瘤抑制因子, 其等位基因变体或突变体的区域。癌症诊断方法包括测量肿瘤抑制因子表达的步骤。治疗癌症的方法包括在肿瘤抑制因子被肿瘤细胞摄取条件下使肿瘤细胞与肿瘤抑制因子接触的步骤。Z

