

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00		47/48	4 B 0 6 3
47/48		A 6 1 P 1/00	4 C 0 7 6
51/00		35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/00		35/04	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求（全101数） 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001 - 570845(P2001 - 570845)	(71)出願人	トーマス ジェファーソン ユニバーシテ イ アメリカ合衆国,ペンシルバニア 19107 - 6799,フィラデルフィア,ローカスト スト リート 1020
(86)(22)出願日	平成13年3月27日(2001.3.27)	(72)発明者	ワルドマン, スコット・エイ アメリカ合衆国ペンシルバニア州19003,ア ードモア,ブレッディン・ロード 119
(85)翻訳文提出日	平成14年9月27日(2002.9.27)	(72)発明者	パーク, ジェイソン アメリカ合衆国ペンシルバニア州19107,フ ィラデルフィア,ラティマー・ストリート 925
(86)国際出願番号	PCT/US01/09790	(74)代理人	弁理士 社本 一夫 (外 5 名) 最終頁に続く
(87)国際公開番号	W001/073132		
(87)国際公開日	平成13年10月4日(2001.10.4)		
(31)優先権主張番号	60/192,229		
(32)優先日	平成12年3月27日(2000.3.27)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54)【発明の名称】 消化管由来の癌細胞を同定およびターゲティングするための組成物および方法

(57)【要約】

原発性および／または転移性の胃癌または食道癌をスクリーニングおよび診断するための試薬、キットおよび方法を開示する。原発性および／または転移性の胃癌または食道癌をイメージングおよび処置するための組成物および方法を開示する。原発性および／または転移性の胃癌または食道癌を治療および予防するためのワクチン、組成物および方法を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 原発性および/または転移性の胃癌または食道癌を伴う疑いがある個体を原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞についてスクリーニングするインビトロ方法であって、個体からの腸外組織および/または体液の試料を検査して、該試料中の細胞がGCCを発現しているか判定する工程を含み、その際、GCCの発現は試料中に原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞がある可能性を指示するものである方法。

【請求項2】 細胞によるGCCの発現を、GCC遺伝子転写生成物の存在を検出することにより判定する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 細胞によるGCCの発現を、試料とGCC遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAを選択的に増幅するプライマーとを接触させるポリメラーゼ連鎖反応により判定する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 細胞によるGCCの発現を、試料とGCC遺伝子翻訳生成物に特異的に結合する抗体とを接触させる免疫アッセイにより判定する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 試料が体液である、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 試料が血液である、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 試料がリンパ組織および/またはリンパ液である、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 試料がリンパ節試料である、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 個体が胃癌または食道癌を伴うと予め診断されている、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 個体が胃癌または食道癌を伴うと以前に診断され、かつそれに対する処置を受けたことがある、請求項1に記載の方法。

【請求項11】 原発性および/または転移性の胃癌または食道癌を伴う疑いがある個体を原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞についてスクリーニングするインビトロ方法であって、個体からの腸外組織および/または体液の試料を検査して、該試料中にGCC遺伝子転写または翻訳生成物が存在するか判定する工程を含み、その際、該試料中のGCC遺伝子転写または翻訳生成

物の存在はその個体が試料中に原発性および／または転移性の胃癌または食道癌の細胞を有する可能性を指示するものである方法。

【請求項12】 個体からの腸外組織および／または体液の試料を検査して、該試料中にGCC遺伝子転写生成物が存在するか判定する工程を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項13】 GCC遺伝子転写生成物の存在を、試料とGCC遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAを選択的に増幅するプライマーとを接触させるポリメラーゼ連鎖反応により判定する、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 GCC遺伝子翻訳生成物の存在を、試料とGCC遺伝子翻訳生成物に特異的に結合する抗体とを接触させる免疫アッセイにより判定する、請求項11に記載の方法。

【請求項15】 試料が体液である、請求項11に記載の方法。

【請求項16】 試料が血液である、請求項11に記載の方法。

【請求項17】 試料がリンパ組織および／またはリンパ液である、請求項11に記載の方法。

【請求項18】 試料がリンパ節試料である、請求項11に記載の方法。

【請求項19】 個体が胃癌または食道癌を伴うと以前に診断されたことがある、請求項11に記載の方法。

【請求項20】 個体が胃癌または食道癌を伴うと以前に診断され、かつそれに対する処置を受けたことがある、請求項11に記載の方法。

【請求項21】 胃癌または食道癌の細胞を有する疑いがある患者から採取した腫瘍細胞が胃または食道の腫瘍細胞であることを確認するインビトロ方法であって、腫瘍細胞がGCCを発現するか判定する工程を含み、その際、GCCの発現は該腫瘍細胞が胃または食道の腫瘍細胞であることを指示するものである方法。

【請求項22】 腫瘍細胞によるGCCの発現を、GCC遺伝子転写生成物の存在の検出により判定する、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 腫瘍細胞によるGCCの発現を、腫瘍細胞からのmRNAまたはそれから形成されたcDNAとGCC遺伝子転写体またはそれから形成され

たcDNAを選択的に増幅するプライマーとを接触させるポリメラーゼ連鎖反応により判定する、請求項21に記載の方法。

【請求項24】 腫瘍細胞によるGCCの発現を、腫瘍細胞からのタンパク質とGCC遺伝子翻訳生成物に特異的に結合する抗体とを接触させる免疫アッセイにより判定する、請求項21に記載の方法。

【請求項25】 胃癌を伴う個体の診断方法であって、胃組織の試料を検査してGCC転写体または翻訳生成物の存在を検出する工程を含み、その際、胃試料中におけるGCC転写体または翻訳生成物の存在は胃癌を指示するものである方法。

【請求項26】 胃組織の試料を検査して該試料中にGCC遺伝子転写生成物が存在するか判定する工程を含む、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 GCC遺伝子転写生成物の存在を、試料とGCC遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAを選択的に増幅するプライマーとを接触させるポリメラーゼ連鎖反応により判定する、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 GCC遺伝子翻訳生成物の存在を、試料とGCC遺伝子翻訳生成物に特異的に結合する抗体とを接触させる免疫アッセイにより判定する、請求項26に記載の方法。

【請求項29】 食道癌を伴う個体の診断方法であって、食道組織の試料を検査してGCC転写体または翻訳生成物の存在を検出する工程を含み、その際、食道試料中におけるGCC転写体または翻訳生成物の存在は食道癌を指示するものである方法。

【請求項30】 食道組織の試料を検査して該試料中にGCC遺伝子転写生成物が存在するか判定する工程を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項31】 GCC遺伝子転写生成物の存在を、試料とGCC遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAを選択的に増幅するプライマーとを接触させるポリメラーゼ連鎖反応により判定する、請求項30に記載の方法。

【請求項32】 GCC遺伝子翻訳生成物の存在を、試料とGCC遺伝子翻訳生成物に特異的に結合する抗体とを接触させる免疫アッセイにより判定する、請求項29に記載の方法。

【請求項33】 胃癌および/または食道癌を伴う個体を診断するための、下記のいずれかを含むキット：

a) G C C 遺伝子転写体またはそれから形成された c D N A を選択的に増幅するポリメラーゼ連鎖反応プライマーを含む容器；

ならびに下記のうち1以上：

陽性 P C R アッセイ対照試料を含む容器、

陰性 P C R アッセイ対照試料を含む容器、

試料を入手および/または処理するための指示書、

P C R 診断アッセイを実施するための指示書、ならびに

P C R 診断アッセイの陽性結果および/または陰性結果を表わす写真または図；

あるいは

b) G C C 遺伝子翻訳生成物に特異的に結合する抗体を含む容器；

ならびに下記のうち1以上：

陽性免疫アッセイ対照試料を含む容器、

陰性免疫アッセイ対照試料を含む容器、

試料を入手および/または処理するための指示書、

免疫診断アッセイを実施するための指示書、ならびに

免疫診断アッセイの陽性結果および/または陰性結果を表わす写真または図。

【請求項34】 原発性および/または転移性の胃癌または食道癌に罹患している疑いがある個体を処置する方法であって、該個体に

i) S T 受容体リガンド；および

i i) 有効物質

を含む有効量の組成物を投与する工程を含む方法。

【請求項35】 S T 受容体リガンドが有効物質にコンジュゲートしている、請求項34に記載の方法。

【請求項36】 有効物質が、メトトレキサート、ドキソルビシン、ダウノルビシン、シトシンアラビノシド、エトポシド、5 - 4フルオロウラシル、メルフ

アラン、クロラムブシル、シスプラチン、ビンデシン、マイトマイシン、ブレオマイシン、ピューロチオニン、マクロモマイシン、1,4-ベンゾキノ誘導体、トレニモン、リシン、リシンA鎖、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素、クロストリジウム・パーフリンジェンスホスホリパーゼC、ウシ膀胱リボヌクレアーゼ、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、アブリン、アブリンA鎖、コブラ毒因子、ゲロニン、サポリン、モデッシン、ビスキュミン、ボルケンシン、アルカリ性ホスファターゼ、ニトロイミダゾール、メトロニダゾール、ミソニダゾール、

【化1】

^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}B , ^{32}P および ^{33}P , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , ^{193}Pt , ^{197}Hg , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , $^{81}\text{Rb}/^{81\text{M}}\text{Kr}$, ^{87}Sr , $^{99\text{M}}\text{Tc}$, ^{111}In , $^{113\text{M}}\text{In}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb および ^{206}Bi .

よりなる群から選択される、請求項34に記載の方法。

【請求項37】 原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞のラジオイメージング方法であって、検出可能な物質に結合したST受容体リガンドを含む組成物を個体に投与する工程を含む方法。

【請求項38】 検出可能な物質が

【化2】

^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}B , ^{32}P および ^{33}P , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , ^{193}Pt , ^{197}Hg , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , $^{81}\text{Rb}/^{81\text{M}}\text{Kr}$, ^{87}Sr , $^{99\text{M}}\text{Tc}$, ^{111}In , $^{113\text{M}}\text{In}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb および ^{206}Bi .

よりなる群から選択される、請求項37に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

関連特許出願の引照

本出願は、米国仮特許出願60/192,229(2000年3月27日出願)(それを本明細書に援用する)の優先権を主張する。

【0002】

本出願は、米国特許USP5,518,888(1996年5月21日発行)、USP5,601,990(1997年2月11日発行)、USP6,060,037(2000年4月26日発行)、USP5,962,220(1999年10月5日発行)およびUSP5,879,656(1999年3月9日発行)(それらを本明細書に援用する)、ならびに米国特許出願09/180,237(1997年3月12日出願)(それを本明細書に援用する)の優先権を主張する。

【0003】

発明の分野

本発明は、消化管の癌細胞、特に原発性および転移性の胃癌および食道癌を検出するためのインビトロ診断方法、ならびにそのような方法を実施するためのキットおよび試薬に関する。本発明は、消化管由来の腫瘍、特に原発性および転移性の胃および食道の腫瘍のインビボイメージングおよび処置のための化合物および方法に関する。本発明は、ターゲティングした遺伝子療法組成物、アンチセンス組成物および薬物組成物、それらを調製および使用するための方法および組成物に関する。本発明は、消化管の癌細胞、特に原発性および転移性の胃癌および食道癌に対する予防用および治療用ワクチン、ならびにそれらを調製および使用するための組成物および方法に関する。

【0004】

発明の背景

消化管由来の癌、特に原発性および転移性の胃癌および食道癌を伴う個体をスクリーニング、診断およびモニターするための試薬、キットおよび方法が求められている。由来の分からない癌が消化管由来であることを同定および確認するた

めの、また組織および癌試料を分析して消化管由来の癌を同定および確認し、かつそのような癌細胞の転移レベルを判定するための試薬、キットおよび方法が求められている。胃癌および食道癌の細胞を特異的にターゲティングする組成物が求められている。胃癌および食道癌の細胞に特異的に結合するイメージング剤が求められている。胃癌および食道癌の細胞をイメージングするための改良法が求められている。胃癌および食道癌の細胞に特異的に結合する療法薬が求められている。原発性および/または転移性の胃癌または食道癌に罹患している疑いがある個体を治療するための改良法が求められている。胃癌および食道癌を処置するためのワクチン組成物が求められている。胃癌および食道癌を治療および予防するためのワクチン組成物が求められている。胃癌および食道癌の細胞へ療法薬、アンチセンス化合物および他の薬物を特異的に運搬する療法薬が求められている。

【0005】

発明の概要

本発明はさらに、個体が消化管由来の癌、特に原発性および転移性の胃癌および食道癌を伴うか否かを判定するためのインビトロ方法に関する。本発明は、個体からの非結腸直腸組織および体液の試料を検査して、結腸以外の試料中の細胞がGCC（正常な結腸細胞、ならびに結腸直腸、胃および食道の腫瘍細胞が発現する）を発現しているか否かを判定するためのインビトロ方法に関する。結腸直腸管の外側の試料中にGCCタンパク質またはGCC遺伝子転写体が存在することは、GCC発現の指標であり、かつその個体が転移性の結腸癌（colon cancer）あるいは原発性または転移性の胃癌および/または食道癌に罹患している可能性がある証拠である。結腸直腸癌に罹患している疑いがある患者において結腸直腸管の外側の試料中にGCCタンパク質またはGCC遺伝子転写体が存在することは、その個体が転移性結腸直腸癌に罹患しているという結論を支持する。転移性結腸直腸癌の診断を下すかまたは確認することができる。胃癌または食道癌に罹患している疑いがある患者において結腸直腸管の外側の試料中にGCCタンパク質またはGCC遺伝子転写体が存在することは、その個体が原発性および/または転移性の胃癌または食道癌に罹患しているという結論を支持す

る。原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の診断を下すかまたは確認することができる。

【0006】

本発明はさらに、胃癌または食道癌である疑いがある腫瘍細胞が胃または食道に由来するか否かを判定するためのインビトロ方法に関する。本発明は、胃癌または食道癌に罹患している疑いがある個体が胃癌または食道癌に罹患しているか否かを診断するためのインビトロ方法に関する。本発明は、個体からの腫瘍試料を検査して、結腸直腸、胃または食道の腫瘍細胞が発現するGCCタンパク質をその腫瘍細胞が発現しているか否かを判定するためのインビトロ方法に関する。患者から得た試料中にGCCタンパク質またはGCC遺伝子転写体が存在することは、GCC発現の指標であり、かつその個体が胃癌または食道癌に罹患している可能性がある証拠である。胃または食道の腫瘍である疑いがある腫瘍において、GCCタンパク質またはGCC遺伝子転写体が存在することは、それらの腫瘍が胃癌または食道癌であるという結論および胃癌または食道癌の診断を支持する。

【0007】

本発明はさらに、本発明方法を実施するためのインビトロキット、ならびにそのような本発明のインビトロキットにおける構成要素として有用な試薬および組成物に関する。

【0008】

本発明はさらに、原発性および転移性の胃および食道の腫瘍のイメージング方法、ならびに原発性および転移性の胃および食道の腫瘍に罹患している疑いがある個体の処置方法であって、その個体に本発明による医薬組成物を投与する工程を含み、その際、組成物またはコンジュゲート化合物が原発性および/または転移性の胃または食道の腫瘍に罹患しているヒトの療法用または診断用として有効な量で存在する方法に関する。

【0009】

本発明はさらに、原発性および転移性の胃および食道の腫瘍細胞へ有効物質を運搬する方法であって、原発性および/または転移性の胃または食道の腫瘍を伴

う個体に、医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤、および表面にGCCリガンドを含むリポソームおよびそれに封入された有効成分を含む非コンジュゲート組成物を含む医薬組成物を投与する工程を含む方法に関する。

【0010】

本発明はさらに、GCCタンパク質の少なくとも1つのエピトープを含むタンパク質を含む死滅または不活化した胃または食道の腫瘍細胞；およびそれを含むワクチンに関する。ある態様において、死滅または不活化した細胞または粒子は、GCCタンパク質を含む。ある態様において、死滅または不活化した細胞または粒子は、ハプテン化されている。

【0011】

本発明はさらに、胃癌または食道癌に罹患している個体の処置方法、および胃癌または食道癌を発症しやすい個体の処置方法に関する。本発明方法は、そのような個体に有効量のそのようなワクチンを投与することを提供する。本発明はさらに、そのようなワクチンを免疫療法薬として利用することに関する。

【0012】

好ましい態様の説明

定義

本明細書中で用いる用語 "GCC" は、正常な結腸直腸細胞、ならびに原発性および転移性の結腸直腸癌、胃癌および食道癌の細胞が発現する細胞タンパク質を表わすものとする。正常な個体では、GCCは専ら腸細胞、特に十二指腸、小腸（空腸および回腸）、大腸、結腸（盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸およびS状結腸）および直腸の細胞にみられる。

【0013】

本明細書中で、用語 "GCC遺伝子転写体の機能性フラグメント" 中に用いる用語 "機能性フラグメント" は、全長配列をもつ核酸分子に関連した機能をもつGCC遺伝子転写体フラグメントを表わすものとする。たとえば、機能性フラグメントはオリゴヌクレオチドもしくは核酸プローブ、プライマー、アンチセンスオリゴヌクレオチドもしくは核酸分子、またはコード配列として使用できる。ヒトGCCタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、F . J . S a u v a g e

et al., 1991, J. Biol. Chem., 266: 17912 - 17918に記載されている；それらをそれぞれ本明細書に援用する。

【0014】

本明細書中で、用語“GCCタンパク質の機能性フラグメント”中に用いる用語“機能性フラグメント”は、全長配列をもつGCCタンパク質と同じ機能をもつGCCタンパク質フラグメントを意味する。たとえばGCCタンパク質の免疫原機能性フラグメントは、抗GCC抗体が認識するエピトープを含む。GCCのリガンド結合機能性フラグメントは、GCCタンパク質を認識して結合するリガンドに結合しうる構造を形成する配列を含む。

【0015】

本明細書中で用いる用語“抗GCCタンパク質抗体が認識するエピトープ”は、抗GCCタンパク質抗体が特異的に認識するエピトープを表わす。

本明細書中で用いる用語“抗体”は、完全無傷の抗体、ならびにそのFabフラグメントおよびF(ab)₂フラグメントを表わすものとする。完全無傷の抗体には、モノクローナル抗体、たとえばネズミモノクローナル抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体が含まれる。

【0016】

本明細書中で用いる用語“GCCリガンド”は、GCCタンパク質に特異的に結合する化合物を表わすものとする。GCCに結合する抗体はGCCリガンドである。GCCリガンドはタンパク質、ペプチドまたは非ペプチドであってよい。

【0017】

本明細書中で用いる用語“有効物質”は、療法薬またはイメージング剤である化合物を表わすものとする。

本明細書中で用いる用語“放射安定性”は、放射性崩壊を生じない化合物、すなわち放射性でない化合物を表わすものとする。

【0018】

本明細書中で用いる用語“療法薬”は、化学療法薬、毒素、放射線療法薬、ターゲティング剤または放射線増感剤を表わすものとする。

本明細書中で用いる用語“化学療法薬”は、細胞と接触した場合および/また

は細胞に取り込まれた場合に細胞に影響を及ぼす化合物、たとえば細胞死をもたらす、細胞分裂を阻害し、または分化を誘発する化合物を表わすものとする。

【0019】

本明細書中で用いる用語“毒素”は、細胞と接触した場合および/または細胞に取り込まれた場合に細胞死を起こす化合物を表わすものとする。

本明細書中で用いる用語“放射線療法薬”は、細胞と接触した場合および/または細胞に取り込まれた場合に細胞死を起こす放射性核種を表わすものとする。

【0020】

本明細書中で用いる用語“ターゲティング剤”は、他の化合物が結合しうる化合物または他の化合物と反応しうる化合物を表わすものとする。ターゲティング剤は、ターゲティング剤と結合した化学療法薬、毒素、酵素、放射線療法薬、抗体またはイメージング剤を細胞へ運搬するのに使用でき、および/または共投与した有効物質を変換その他の形で変化もしくは増強させるのに使用できる。ターゲティング剤は細胞へ局在化する第1物質を構成する部分を含み、これが第2物質と接触した際に、目的活性をもつ第3物質に変換されるか、または第2物質を目的活性をもつ物質に変換してもよい。その結果、局在化した物質は癌細胞が目的活性をもつ物質に曝露されるのを促進する。

【0021】

本明細書中で用いる用語“放射線増感剤”は、イオン化放射線の傷害作用に対する細胞の感受性を高める物質を表わすものとする。放射線増感剤は、より低い線量の放射線を照射してもなお療法有効線量が付与されるのを可能にする。

【0022】

本明細書中で用いる用語“イメージング剤”は、検出できる化合物を表わすものとする。

本明細書中で用いる用語“GCC結合部分”は、コンジュゲート化合物のGCCリガンド構成部分を表わすものとする。

【0023】

本明細書中で用いる用語“有効部分”は、コンジュゲート化合物の有効物質構成部分を表わすものとする。

本明細書中で用いる用語 " コンジュゲート化合物 " および " コンジュゲート組成物 " は互換性をもって用いられ、GCC結合部分および有効部分を含み、GCCに結合しうる化合物を表わすものとする。本発明によるコンジュゲート化合物は、GCCリガンドを構成する部分および有効物質を構成する部分を含む。したがって本発明のコンジュゲート化合物は、GCCに特異的に結合でき、かつ療薬またはイメージング剤である部分を含む。コンジュゲート組成物は、架橋剤および/または上記部分間のスペーサーとして用いられる分子を含むことができる。

【0024】

本明細書中で用いる用語 " 架橋剤 (cross linker , cross linking agent) " 、 " コンジュゲート剤、" 結合剤 " 、 " 縮合剤 " および " 二官能性架橋剤 " は互換性をもって用いられ、GCCリガンドと有効物質に結合することによりコンジュゲート化合物を形成するために用いられる分子基を表わすものとする。

【0025】

本明細書中で用いる用語 " 結腸直腸癌 " は、結腸直腸癌が小腸より下方の腸管 (すなわち大腸 (結腸) : 盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸およびS状結腸を含む ; ならびに直腸) の細胞の癌を特徴とする医学的状态であると定める、十分に受け入れられた医学的定義を含むものとする。さらに、本明細書中で用いる用語 " 結腸直腸癌 " は、十二指腸および小腸 (空腸および回腸) の細胞の癌を特徴とする医学的状态をさらに含むものとする。本明細書中で用いる結腸直腸癌の定義は一般の医学的定義より広いが、十二指腸および小腸の細胞もGCCを含有するのでこのように定められる。

【0026】

本明細書中で用いる用語 " 胃癌 " は、胃癌が胃細胞の癌を特徴とする医学的状态であると定める、十分に受け入れられた医学的定義を含むものとする。

本明細書中で用いる用語 " 食道癌 " は、食道癌が食道細胞の癌を特徴とする医学的状态であると定める、十分に受け入れられた医学的定義を含むものとする。

【0027】

本明細書中で用いる用語“転移”は、身体の1つの臓器または部分に由来する癌細胞が身体の他の部分へ再配置して増殖し続けるプロセスを表わすものとする。転移した細胞はその後、腫瘍を形成し、これがさらに転移する可能性がある。したがって転移は、癌が最初に起きた身体部分から身体の他の部分へ拡散することを表わす。

【0028】

本明細書中で用いる用語“転移性結腸直腸癌細胞”は、転移した結腸直腸癌細胞を表わすものとする。転移性結腸直腸癌細胞は、十二指腸、小腸（空腸および回腸）、大腸（結腸）（盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸およびS状結腸を含む）ならびに直腸以外の身体部分に局在する。

【0029】

本明細書中で用いる用語“転移性胃癌細胞”は、転移した胃癌細胞を表わすものとする。転移性胃癌細胞は、胃以外の身体部分に局在する。

本明細書中で用いる用語“転移性食道癌細胞”は、転移した食道癌細胞を表わすものとする。転移性食道癌細胞は、食道以外の身体部分に局在する。

【0030】

本明細書中で用いる用語“非結腸直腸試料”および“腸外試料”は互換性をもって用いられ、結腸直腸以外の供給源からの組織または体液の試料を表わすものとする。ある好ましい態様において、非結腸直腸試料はリンパ節などの組織の試料である。ある好ましい態様において、非結腸直腸試料は由来が未確認の腺癌である腸外組織の試料である。ある好ましい態様において、非結腸直腸試料は血液試料である。

【0031】

本明細書中で用いる“由来が未確認の腺癌に罹患した個体”は、由来が明確に同定されていない腫瘍を伴う個体を表わすものとする。

本明細書中で用いる“胃癌または食道癌を発症しやすい疑いがある個体”は、胃癌または食道癌を発症する特別なリスクをもつ個体を表わすものとする。胃癌または食道癌を発症する特別なリスクをもつ個体の例は、その家族病歴が家族構成員の胃癌もしくは食道癌の平均発症率より高い個体、および/または既に胃癌

もしくは食道癌を発症し、効果的な処置を受け、したがって再発および反復のリスクに直面している個体である。

【0032】

本明細書中で用いる用語“アンチセンス組成物”および“アンチセンス分子”は互換性をもって用いられ、DNAまたはRNAにハイブリダイズして転写または翻訳が起きるのを阻害および/または阻止することにより転写または翻訳を調節する化合物を表わすものとする。アンチセンス分子には、核酸分子ならびにその誘導体および類似体が含まれる。アンチセンス分子は、アンチセンス分子が核酸分子またはその誘導体もしくは類似体であるか否かに関係なく、相補的ヌクレオチド配列が行うのと同じ様式でDNAまたはRNAにハイブリダイズする。アンチセンス分子は、その発現が癌に関連する遺伝子の転写または翻訳を阻害または阻止することができる。

【0033】

本明細書中で用いる用語“GCC免疫原”は、GCCタンパク質もしくはそのフラグメント、またはそれらもしくはそれらのハプテン化生成物を含むタンパク質、少なくとも1つのGCCエピトープを示す細胞および粒子、ならびに少なくとも1つのGCCエピトープを示すハプテン化した細胞およびハプテン化した粒子を表わすものとする。

【0034】

本明細書中で用いる用語“組換え発現ベクター”は、適切な宿主に導入した場合にそのタンパク質をコードするコード配列の発現を指令するのに必要な遺伝子エレメントを含有するプラスミド、ファージ、ウイルス粒子または他のベクターを表わすものとする。コード配列は、必要な調節配列に機能可能な状態で結合している。発現ベクターは周知であり、容易に入手できる。発現ベクターの例には、プラスミド、ファージ、ウイルスベクターおよび他の核酸分子、または宿主細胞を形質転換してコード配列の発現を促進するのに有用なビヒクルを含有する核酸分子が含まれる。

【0035】

本明細書中で用いる用語“非正統的(非相同的)転写(illegitima

te transcription) ”は、他の組織からの細胞における組織特異的遺伝子の低レベル発現またはバックグラウンド発現を表わすものとする。したがって非正統的転写現象により、他の組織における組織特異的転写体に対するmRNAのコピーが産生される。遺伝子発現の検出に用いる検出方法の感度が非正統的転写の検出に十分なほど高ければ、対照アッセイおよび/または定量アッセイおよび/または他の手段で陰性試料における非正統的転写による転写の発現レベルを差し引いて、非正統的転写による偽陽性の発生を排除しなければならない。あるいは非正統的転写により存在するGCC遺伝子転写体を検出せずに、試料中におけるGCC遺伝子発現の証拠を検出することができる。これは、非正統的転写のため存在する、バックグラウンドとして存在するGCC遺伝子転写体を検出するのに十分な感度をもたない方法を用いて達成される。

【0036】

USP 5,518,88 (1996年5月21日発行)、USP 5,601,990 (1997年2月11日発行)、USP 6,060,037 (2000年4月26日発行)、USP 5,962,220 (1999年10月5日発行) およびUSP 5,879,656 (1999年3月9日発行)、ならびに米国特許出願09/180,237 (1997年3月12日出願) は、転移した結腸直腸癌を処置、イメージング、検出、およびワクチン接種するためにST受容体をターゲティングすることに関する。原発性および転移性の胃癌および食道癌の細胞がST受容体(GCC)を発現することが今回見いだされた。したがって上記特許および特許出願に記載された組成物および方法は、原発性および転移性の胃癌および食道癌の処置、イメージング、検出、ワクチン接種に使用できる。本発明は、転移した結腸直腸癌に関連する先の発明を原発性および転移性の胃癌および食道癌の処置、イメージング、検出、ワクチン接種に適用する。

【0037】

GCC

結腸直腸、胃または食道の細胞に由来する癌はGCCを発現する。そのような腫瘍がGCCを発現することにより、このタンパク質およびそのmRNAは腸外組織および血液中に癌細胞が存在することの特異的バイオマーカーとなりうる。

実際にこの特徴により、RT-PCR分析によるGCC mRNA検出は、結腸直腸癌、胃癌または食道癌の患者の病期を判定し、再発性疾患の証拠を血中に求めるために術後の患者を追跡し、また結腸直腸癌、胃癌または食道癌を検出するための、診断検査となりうる。さらに、有効物質をインビボで腫瘍細胞へ運搬するために、有効物質にコンジュゲートしたリガンドでGCCをターゲティングすることができる。

【0038】

米国特許USP5,518,888(1996年5月21日、Waldmanに発行)、国際特許出願PCT/US94/12232(1994年10月26日出願)、米国特許出願08/467,920(1995年6月6日出願)および米国特許出願08/583,447(1996年1月5日出願)(それらをそれぞれ本明細書に援用する)には、有効化合物を運搬するためにST受容体(グアニリンシクラーゼCまたはGCCとも呼ばれる)をターゲティングすることにより転移性結腸直腸腫瘍をターゲティングしうることが開示されている。腸管の外側の細胞に結腸直腸癌のマーカーとしてのST受容体が存在すると、転移性結腸直腸腫瘍を伴う個体をスクリーニング、同定および処置できる。ST受容体を利用して、結腸直腸細胞への遺伝子療法薬およびアンチセンス化合物の運搬をターゲティングすることもできる。

【0039】

米国特許USP5,601,990(1997年2月11日、Waldmanに発行)、国際特許出願PCT/US94/12232(1994年10月26日出願)およびPCT/US97/07467(1997年5月2日出願)(それらをそれぞれ本明細書に援用する)には、腸管の外側から得た組織および体液の試料中にST受容体発現の証拠を検出することが転移性結腸直腸癌の指標になると開示されている。

【0040】

国際特許出願PCT/US97/07565(1997年5月2日出願)(本明細書に援用する)には、ST受容体と反応する抗体でターゲティングできるエピトープを含む免疫原を、予防用および治療用の抗-転移性結腸直腸癌組成物と

して有用なワクチン組成物に使用できることが開示されている。

【0041】

正常な結腸細胞のほか、原発性および転移性の結腸癌、胃癌および食道癌の細胞もGCCを発現することが見いだされた。正常な胃および食道の細胞はGCCを発現しない。したがって本発明は、原発性および転移性の胃癌および食道癌を伴う患者の診断、病期判定および術後監視のための特異的な分子診断マーカーとしてのGCCの使用を提供する。

【0042】

分子技術を用いるGCC発現検出、たとえばRT-PCR（これに限定されない）を用いて患者を診断および病期判定し、外科処置後再発および/または寛解を追跡することができ、かつ結腸癌、胃癌および食道癌の発症について正常者をスクリーニングできる。

【0043】

GCCは正常な腸細胞にのみ発現するという点で特異である。腸を内張りしている粘膜細胞は互いに密な接合により結合し、血流中への腸内容物の通過および腸内腔への血流成分の通過に対するバリヤーを形成している。したがって、GCC発現細胞が先端に位置するためそれらの細胞は循環系から隔離され、これにより身体に残りの部分から分離され、本質的に身体の“外側”にあると考えられる。したがって、身体に残りの部分は腸管の“外側”とみなされる。腸管の“外側”に投与した組成物は、正常にGCCを発現する細胞のみから隔離および分離した状態を維持する。逆に、腸管の外側の組織から採取した組織試料は、正常であればGCCを発現する細胞を含まない。

【0044】

結腸直腸癌に罹患している個体において、癌細胞はしばしばGCCを産生および表示する細胞に由来し、これらの癌細胞はGCCを産生し続ける。結腸直腸癌細胞はGCCを発現することが認められた。同様に、胃癌および食道癌の細胞もGCCを発現する。

【0045】

結腸直腸腫瘍細胞によるGCC発現は、インビトロでのスクリーニング、モニ

タリングおよび病期判定のための検出可能なターゲット、ならびにイメージングおよび処置のための有効物質を含むコンジュゲート組成物のインビボ運搬のためのターゲットを提供する。GCCは、転移性結腸直腸癌に対する予防または転移性結腸直腸癌を伴う個体の治療に使用できるワクチンのターゲットとしても使用できる。

【0046】

胃または食道の腫瘍細胞によるGCC発現は、インビトロでのスクリーニング、モニタリングおよび病期判定のための検出可能なターゲット、ならびにイメージングおよび処置のための有効物質を含むコンジュゲート組成物のインビボ運搬のためのターゲットを提供する。GCCは、原発性および転移性の胃癌および食道癌に対する予防、または原発性および転移性の胃癌および食道癌を伴う個体の治療に使用できるワクチンのターゲットとしても使用できる。

【0047】

インビトロ診断薬

本発明のある態様によれば、患者および患者試料をスクリーニング、診断および分析して腸管の外側の細胞によるGCC発現の証拠を検出するための組成物、キット、インビトロ方法が提供される。その際GCC発現は、転移性結腸直腸癌または原発性もしくは転移性の胃癌もしくは食道癌を示唆する。原発性または転移性の胃癌または食道癌を伴う疑いがある患者において、腸管の外側の細胞によるGCC発現は原発性または転移性の胃癌または食道癌の指標であり、そのような患者の診断、モニタリングおよび病期判定に利用できる。さらに本発明は、患者および患者試料をインビトロでスクリーニングおよび分析して腸管の外側の腫瘍細胞によるGCC発現の証拠を検出するのに有用な方法、組成物およびキットに関する。その際、GCCを発現する細胞の存在は、その腫瘍が結腸直腸癌または胃癌もしくは食道癌に由来することを示唆または確定する。本発明の他の態様においては、原発性または転移性の胃癌または食道癌の細胞を視覚化するのに有用な組成物、キットおよび方法が提供される。

【0048】

インビトロでのスクリーニング用および診断用の組成物、方法およびキットは

、胃癌または食道癌の高リスク群に属する個体、たとえば限局性疾患および／または転移性疾患を伴うと診断された個体、ならびに／あるいはその疾患に遺伝的関連をもつ個体のモニタリングに使用できる。インビトロでのスクリーニング用および診断用の組成物、方法およびキットは、胃癌または食道癌の治療を受けている個体および／または受けたことがある個体のモニタリングに使用して、その癌が転移しているかどうかを判定できる。インビトロでのスクリーニング用および診断用の組成物、方法およびキットは、胃癌または食道癌の治療を受けている個体および／または受けたことがある個体のモニタリングに使用して、その癌が排除されたかどうかを判定できる。インビトロでのスクリーニング用および診断用の組成物、方法およびキットは、そのほかの発症しやすい個体、すなわち遺伝子スクリーニングおよび／または家族歴により遺伝的素因があると同定された個体のモニタリングに使用できる。遺伝学的理解の進歩、ならびに技術および疫学の発達により、胃癌または食道癌の発症について個体がもつ確率の判定およびリスク評価が可能となった。家族健康歴および／または遺伝子スクリーニングを用いると、ある個体が胃癌または食道癌を含めた特定の型の癌を伴う確率を推定できる。特定の型の癌を発症する素因があると同定された個体をモニタリングまたはスクリーニングして、胃癌または食道癌の証拠を検出することができる。そのような証拠が発見されると、その疾患を克服するために早期処置を行うことができる。したがって、胃癌または食道癌を発症するリスクのある個体を同定し、そのような個体から試料を採取する。本発明は、胃癌または食道癌に罹患した血族を含めた家族病歴をもつと同定された個体のモニタリングに特に有用である。本発明は、胃癌または食道癌を伴うと診断された個体、特に腫瘍の治療を受け、摘出され、および／または他の寛解を経験した個体（胃癌または食道癌の治療を受けた個体を含む）のモニタリングにも特に有用である。

【0049】

インビトロでのスクリーニング用および診断用の組成物、方法およびキットは、腫瘍の分析に使用できる。GCC発現は細胞タイプのマーカーであり、由来が確認されておらず胃癌または食道癌由来の疑いがある腺癌の由来が胃癌または食道癌である可能性を示唆する。GCC発現の検出は、胃癌または食道癌の初期診

断の補助、またはそのような診断の確認にも利用できる。本発明の組成物、方法およびキットを用いて、胃癌または食道癌由来であると思われる腫瘍をそうであると確認できる。

【0050】

本発明のインビトロでのスクリーニング用および診断用の組成物、キットおよび方法を用いて、胃または食道からの組織試料を分析し、原発性の胃癌または食道癌を同定できる。

【0051】

本発明によれば、GCC遺伝子転写体またはタンパク質に結合する化合物が提供される。身体の正常組織は、腸管細胞以外はGCC転写体またはタンパク質をもたない。GCCの発現は細胞タイプのマーカーであり、腸外試料中の胃癌または食道癌の同定に有用である。

【0052】

本発明のある態様においては、非結腸直腸組織および体液試料または腫瘍試料をスクリーニングして、GCCタンパク質の存否を同定できる。ELISAアッセイおよびウェスタンブロット法などの方法を実施して、GCCが試料中に存在するか判定できる。

【0053】

本発明のある態様においては、非結腸直腸組織試料および体液試料または腫瘍試料をスクリーニングしてGCC遺伝子転写体の存否を検出することにより、結腸直腸管の外側の細胞がGCCを発現しているか同定できる。GCC遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAの存在は、PCR増幅、分枝鎖オリゴヌクレオチド法、ノーザンブロット法(mRNA)、サザンブロット法(cDNA)またはオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションなどの方法により判定できる。

【0054】

本発明のある態様においては、非結腸直腸組織試料または腫瘍試料からの細胞を検査して、GCCタンパク質の存否を同定できる。組織切片について免疫組織化学的ブロット法などの方法を実施して、試料中にGCCが存在するか判定でき

る。

【0055】

本発明のある態様においては、非結腸直腸組織試料または腫瘍試料からの細胞を検査してGCC遺伝子転写体の存否を検出することにより、結腸直腸管の外側の細胞にGCCが発現しているか判定できる。組織切片からの細胞中におけるGCC遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAの存在は、*in situ*ハイブリダイゼーションなどの方法により判定できる。

【0056】

非結腸直腸組織試料および体液試料中、または非結腸直腸組織試料からの細胞におけるGCCの存在は、胃癌または食道癌の可能性を示唆する。腫瘍試料中または腫瘍細胞におけるGCCの存在は、その腫瘍が胃または食道に由来する可能性を示唆する。非結腸直腸組織試料および体液試料中、または非結腸直腸組織試料からの細胞におけるGCC遺伝子転写体の存在は、胃癌または食道癌の可能性を示唆する。腫瘍試料中または腫瘍細胞におけるGCC遺伝子転写体の存在は、その腫瘍が胃または食道に由来する可能性を示唆する。

【0057】

試料は切除組織、または穿刺生検を含めた生検材料から得ることができる。外科病理学的検査のための組織切片標本は凍結でき、標準法により作製できる。組織切片についての免疫組織化学的検査および*in situ*ハイブリダイゼーション結合アッセイは、固定した細胞において実施される。腸外試料を標準法、たとえば超音波処理、機械的破壊または化学的細胞溶解（界面活性剤溶解など）によりホモジナイズできる。体液、たとえば血液、尿、リンパ液、脳脊髄液、羊水、腔液、精液および便などの試料中の腫瘍試料をスクリーニングして、それらの腫瘍が結腸直腸、胃または食道に由来するかどうかを判定することもとも考慮される。

【0058】

非結腸直腸組織試料は、結腸直腸管（すなわち小腸より下方の腸管（すなわち大腸（結腸）：盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸およびS状結腸を含む；ならびに直腸）、さらに十二指腸および小腸（空腸および回腸））以外の任意の組

織から得ることができる。結腸直腸管以外のすべての組織の正常細胞は、G C C を発現しない。したがって、G C C タンパク質またはG C C 遺伝子転写体が非結腸直腸試料中に検出されると、結腸直腸癌、胃癌または食道癌の細胞が存在する可能性が示唆される。ある好ましい態様において、組織試料はリンパ節である。

【0059】

組織試料は、生検針の使用を含めた外科的標準法により得ることができる。当業者には、G C C について検査しうる多様な被験試料が容易に理解され、組織試料を得る方法も自明であろう。

【0060】

G C C の存在をスクリーニングするために、組織試料を周知の方法、たとえば超音波処理、機械的破壊、化学的細胞溶解（界面活性剤溶解など）またはその組み合わせによりホモジナイズし、または他の形で調製できる。

【0061】

体液試料の例には、血液、尿、リンパ液、脳脊髄液、羊水、腔液および精液が含まれる。ある好ましい態様においては、体液試料として血液を用いる。体液試料から、たとえば遠心により細胞を単離できる。当業者には、G C C について検査しうる多様な被験試料が自明であろう。試料は注射器またはスワブにより体液を採取する方法などにより得ることができる。当業者には、被験試料を得るための他の方法が自明であろう。

【0062】

血液試料を用いるアッセイにおいては、血球から血漿を分離してもよい。血漿をG C C についてスクリーニングすることができる。これには、腫瘍細胞から1以上のG C C が開裂または脱落した場合に血中へ放出されたトランケート形タンパク質も含まれる。ある態様においては、血球画分を胃または食道の腫瘍細胞の存在についてスクリーニングする。ある態様においては、血球画分中に存在するリンパ球をスクリーニングする；これは、血球を溶解し、血球が抱き込んだ胃または食道の腫瘍細胞が存在した結果として存在する可能性のあるG C C タンパク質またはG C C 遺伝子転写体の存在を検出することによる。ある好ましい態様においては、試料からm R N A を単離する前に、市販の免疫カラムによりC D 3 4

+ 細胞を分離する。

【0063】

本発明の態様には、GCC遺伝子転写体を検出するヌクレオチド配列ベースの分子分析により試料がGCC発現細胞を含有するか判定する種々の方法が含まれる。このためには、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法、分枝鎖オリゴヌクレオチド法、ノーザンブロット法、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法および*in situ*ハイブリダイゼーション法を含めた幾つかの異なる方法を利用できる。

【0064】

本発明は、GCC遺伝子転写体の同定方法に用いるオリゴヌクレオチドプローブおよびプライマー、ならびにそれらの構成要素を含む診断キットに関する。

GCC遺伝子転写体を検出するためのmRNA配列ベースの方法にはポリメラーゼ連鎖反応法、分枝鎖オリゴヌクレオチド法、ノーザンおよびサザンブロット法、*in situ*ハイブリダイゼーション法ならびにオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法が含まれるが、これらに限定されない。

【0065】

本明細書に記載する方法は本発明を実施する方法を例示するためのものであり、本発明の範囲を限定するためのものではない。非結腸直腸試料中のGCC遺伝子転写体の存在を検出するための他の配列ベースの方法も、本発明により採用できるものとする。

【0066】

非結腸直腸試料に由来する遺伝子材料中のGCC遺伝子転写体を検出するための好ましい方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いる。PCR法は当業者がルーティンに実施しており、診断にそれを用いることは周知であり、受け入れられている。PCRの実施方法は、"PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Innis, M. A., et al. 編, Academic Press社, カリフォルニア州サンディエゴ(1990)に示されており、これを本明細書に援用する。PCR法の応用は"Polymerase Chain Reaction

”, Erlich, H. A., et al. 編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー (1989) に示されており、これを本明細書に援用する。USP 4, 683, 202、USP 4, 683, 195、USP 4, 965, 188 および USP 5, 075, 216 (これらを本明細書に援用する) には、PCRの実施方法が記載されている。PCRはPerkin Elmer Cetus GENE AMP RNA PCRキット、Part No. N808-0017を用いてルーティンに実施できる。

【0067】

PCR法によれば、RNAまたはDNA分子中に存在する配列にハイブリダイズする5' および3' プライマーを用意し、さらに遊離ヌクレオチド、およびプライマー間のヌクレオチド配列に相補的な塩基に遊離ヌクレオチドをフィルインして相補的DNA鎖を生成する酵素を供給することにより、DNA配列の多数のコピーを迅速生成できる。酵素はこれらのプライマーに隣接する相補配列をフィルインする。5' プライマーと3' プライマーが両方とも同一の核酸小フラグメント上のヌクレオチド配列にハイブリダイズする場合、特異的二本鎖サイズの生成物が対数的に増幅する。核酸フラグメントに単一プライマーのみがハイブリダイズする場合、直線的増幅により種々の長さの一本鎖生成物が生成する。

【0068】

PCRプライマーは、当業者が配列情報を用いてルーティンに設計できる。GCC遺伝子転写体のヌクレオチド配列をSEQ ID NO: 1に示す。この方法を実施するためには、試料中の細胞からRNAを抽出し、試験するか、あるいは周知の方法および容易に入手できる出発物質を用いてcDNAを作製するのに使用する。当業者は容易にPCRプライマーを調製できる。一組のプライマーは、一般に2種類のプライマーを含む。抽出したmRNAまたはそれから形成されたcDNAについてPCRを実施する場合、GCC遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAが存在するときは、多数コピーのmRNAまたはcDNAが形成されるであろう。それが存在しないときは、検出できる別個の生成物はPCRにより形成されないであろう。プライマーは一般に8～50ヌクレオチド、好

ましくは約15～35ヌクレオチド、より好ましくは18～28ヌクレオチドであり、GCC遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAと同一または相補的であり、したがってそれらにハイブリダイズする。好ましい態様において、プライマーはそれぞれSEQ ID NO: 1の15～35ヌクレオチド、より好ましくは18～28ヌクレオチドのフラグメントである。プライマーは増幅すべき配列にハイブリダイズしなければならない。一般的プライマーは長さ18～28ヌクレオチドであり、一般に50～60%のG+C組成をもつ。プライマーがハイブリダイズしなければならない配列にプライマー全体が相補的であることが好ましい。好ましくはプライマーは100～2000塩基対のPCR生成物を形成する。しかし50～10bp以上の生成物を形成することもできる。mRNAを鋳型として用いる場合、プライマーはmRNA配列にハイブリダイズしなければならない。cDNAを鋳型として用いる場合、プライマーはcDNA配列にハイブリダイズしなければならない。

【0069】

mRNAまたはcDNAを、標準PCRプロトコルに従ってプライマー、遊離ヌクレオチドおよび酵素と混和する。この混合物が一連の温度変化を受ける。GCC遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAが存在する場合、両プライマーが同一分子にハイブリダイズしたときは、プライマーおよび介在する相補配列を含む分子が対数的に増幅するであろう。増幅したDNAは、多数の周知の方法で容易に検出できる。GCC遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAが存在しない場合、PCR生成物が対数的に増幅することはない。したがってPCR法は、試料中のGCC遺伝子転写体を検出するためのきわめて容易な直接的かつ信頼性のある方法を提供する。

【0070】

PCR生成物は幾つかの周知の方法で検出できる。増幅DNAの存在を検出するための好ましい方法は、PCR反応材料をゲル電気泳動により分離し、増幅DNAが存在する場合にそれを視覚化するためにゲルを臭化エチジウムで染色するものである。増幅DNAの予想サイズのサイズ標準品をゲル上に対照として流すことが好ましい。

【0071】

RNAの回収量が異例に少なく、それから形成されるcDNAがごく少量であるような場合、1回目のPCR反応生成物についてPCR反応を実施することが望ましく、または必要である。すなわち、1回目のPCRで生成した増幅DNAの量が検出困難である場合、2回目のPCRを実施して1回目の増幅DNAの多数コピーのDNA配列を作製することができる。2回目のPCR反応には入れ子型プライマーセットを用いる。入れ子型プライマーセットは、1回目の反応に用いた5'プライマーの下流および3'プライマーの上流にハイブリダイズする。

【0072】

本発明は、GCC遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAを増幅するPCR法の実施のためのプライマーとして有用なオリゴヌクレオチドを含む。

本発明によれば、非結腸直腸組織試料中のGCC遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAの存在を検出する方法を実施するのに有用な診断キットを組み立てることができる。そのような診断キットは、PCR法の実施のためのプライマーとして有用なオリゴヌクレオチドを含む。本発明による診断キットは、増幅DNAの存在を検出するために用いる、ゲル上に標準品として流すサイズマーカーを入れた容器を含むことが好ましい。サイズマーカーは、GCC遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAの存在下でプライマーにより形成されるDNAと同一サイズである。あるキットにおける他の構成要素には、アッセイを実施するための指示書が含まれる。さらに、キットは所望により陽性および陰性の結果の外観を表わす図または写真を含むことができる。陽性および陰性対照を備えていてもよい。

【0073】

PCRアッセイは、ホモジナイズした組織試料中および体液試料の細胞中にあるGCC遺伝子転写体の検出に有用である。体液試料の血漿部分についてのPCRを用いてGCC遺伝子転写体を検出することが考慮される。

【0074】

試料がGCC発現細胞を含有するか判定するための他の方法は、試料から抽出したmRNAの分枝鎖オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション分析による。

分枝鎖オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションは、USP 5,597,909、USP 5,437,977およびUSP 5,430,138の記載に従って実施でき、これらを本明細書に援用する。これらの特許の教示およびGCC遺伝子転写体の配列に従って試薬を設計できる。

【0075】

試料がGCC発現細胞を含有するか判定するための他の方法は、非結腸直腸試料から抽出したmRNAのノーザンブロット分析による。ノーザンブロット分析を実施するための方法は当業者に周知であり、Sambrook, J., et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバーに記載されている。mRNAの抽出、mRNAの電気泳動分離、プロッティング、プローブ調製およびハイブリダイゼーションは周知の技術であり、容易に入手できる出発物質を用いてルーティンに実施できる。

【0076】

ポリdTカラムを用いてmRNAを抽出し、この材料を電気泳動により分離し、そしてたとえばニトロセルロースペーパーに移す。単離した特異的フラグメント(1または複数)から作製した標識プローブを用いて、ペーパーに固定された相補フラグメントの存在を視覚化することができる。ノーザンブロット中のmRNAの同定に有用なプローブは、GCC遺伝子転写体に相補的なヌクレオチド配列をもつ。当業者はSEQ ID NO: 1の配列情報を用いてそのようなプローブを設計し、あるいはGCC遺伝子転写体またはそれから形成されたcDNAを単離およびクローニングしてプローブとして用いることができる。そのようなプローブは、少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは30~200、より好ましくは40~100ヌクレオチドのフラグメントであり、全GCC遺伝子転写体であってもよい。

【0077】

本発明によれば、非結腸直腸試料中のGCC遺伝子転写体の存在をノーザンブロット分析により検出する方法を実施するのに有用な診断キットを組み立てるこ

とができる。そのような診断キットは、mRNAにハイブリダイズするプローブとして有用なオリゴヌクレオチドを含む。プローブは放射性標識されていてもよい。本発明による診断キットは、ゲル上に標準品として流すサイズマーカーを入れた容器を含むことが好ましい。本発明による診断キットは、プローブにハイブリダイズする陽性対照を入れた容器を含むことが好ましい。あるキットにおける他の構成要素には、アッセイを実施するための指示書が含まれる。さらに、キットは所望により陽性および陰性の結果の外観を表わす図または写真を含むことができる。

【0078】

ノーザンブロット分析は、ホモジナイズした組織試料中および体液試料の細胞中にあるGCC遺伝子転写体の検出に有用である。体液試料の血漿部分についてのPCRを用いてGCC遺伝子転写体を検出することが考慮される。

【0079】

GCC遺伝子転写体の存在を検出する他の方法は、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法による。オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法は当業者に周知である。要約すると、GCC遺伝子転写体のヌクレオチド配列にハイブリダイズする特異的ヌクレオチド配列を含む検出可能なプローブを用いる。試料からのRNAまたはそれから形成されたcDNAを、通常は濾紙などに固定する。プローブを添加し、固定された遺伝子材料にプローブが完全に相補する場合にのみハイブリダイズしうる条件下に保持する。その条件は、固定された材料にプローブの一部のみがハイブリダイズするプローブを洗い去るのに十分なほどストリンジェントである。洗浄したフィルター上にプローブが検出されたことは、相補配列を指示する。

【0080】

オリゴヌクレオチドアッセイに有用なプローブは少なくとも18ヌクレオチドの相補的DNAであり、GCC遺伝子転写体に対する完全相補配列ほどに大きくてもよい。ある好ましい態様において、本発明のプローブは30～200ヌクレオチド、好ましくは40～100ヌクレオチドである。

【0081】

当業者はSEQ ID NO: 1に開示された配列情報を用いて本発明に有用なプローブを設計できる。不完全相補的ハイブリダイゼーションによるバックグラウンド信号を最小に抑えるために、ハイブリダイゼーション条件をルーティンに最適化できる。ある好ましい態様において、プローブは全長クローンである。プローブは、少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは30~200、より好ましくは40~100ヌクレオチドのフラグメントであり、全GCC遺伝子転写体であってもよい。

【0082】

本発明は、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを実施するためのプローブとして有用な標識オリゴヌクレオチドを含む。本発明の標識プローブは、放射性標識ヌクレオチドで標識され、あるいは容易に入手できる非放射性検出システムにより検出されうる。

【0083】

本発明によれば、本発明のオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法を実施するのに有用な診断キットを組み立てることができる。そのような診断キットは、GCC遺伝子転写体の部分をコードする標識オリゴヌクレオチドを含む。本発明によるオリゴヌクレオチド診断キットの標識プローブは、放射性ヌクレオチドで標識されていることが好ましい。本発明によるオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションベースの診断キットは、好ましくは陽性および陰性対照であるDNA試料を含む。陽性対照DNA試料は、キットのプローブに対して完全相補的なヌクレオチド配列をもつ核酸分子を含むものであり、したがってプローブはアッセイ条件下でこの分子にハイブリダイズする。陰性対照DNAは、ヌクレオチド配列がキットのプローブの配列に対して部分相補的である少なくとも1つの核酸分子を含むものである。プローブはアッセイ条件下で陰性対照DNA試料にハイブリダイズしないであろう。あるキットにおける他の構成要素には、アッセイを実施するための指示書が含まれる。さらに、キットは所望により陽性および陰性の結果の外観を表わす図または写真を含むことができる。

【0084】

オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法は、ホモジナイズした組織試料

中および体液試料の細胞中にあるG C C遺伝子転写体の検出に有用である。体液試料の血漿部分についてのP C Rを用いてG C C遺伝子転写体を検出することが考慮される。

【0085】

本発明は、腫瘍試料を評価してそれらが胃または食道に由来するか否かを判定するためのインビトロキット、ならびにそれを実施するのに有用な試薬および組成物に関する。本発明のある態様において、腫瘍試料は胃もしくは食道の腫瘍または他の臓器の腫瘍を切除する外科処置を受けつつあるか、あるいはその回復期にある個体から摘出でき、あるいは生検材料であってもよい。腫瘍試料を分析して、G C C遺伝子転写体の存否を同定する。免疫組織化学的アッセイなどの方法を実施して、腫瘍試料の細胞中にG C Cが存在するか判定できる。G C Cタンパク質またはそれから形成されたc D N Aをコードするm R N Aの存在は、i n s i t uハイブリダイゼーション、免疫組織化学的方法およびi n s i t u S T結合アッセイなどの方法で判定できる。

【0086】

i n s i t uハイブリダイゼーション法は当業者に周知である。要約すると、細胞を固定し、この固定細胞に特異的ヌクレオチド配列を含む検出可能なプローブを添加する。細胞が相補的ヌクレオチド配列を含有する場合、検出可能なプローブはそれらにハイブリダイズするであろう。

【0087】

オリゴヌクレオチドアッセイに有用なプローブは少なくとも18ヌクレオチドの相補的D N Aであり、G C C遺伝子転写体に対する完全相補配列ほどに大きくてもよい。ある好ましい態様において、本発明のプローブは30～200ヌクレオチド、好ましくは40～100ヌクレオチドである。

【0088】

当業者はS E Q I D N O : 1に開示された配列情報を用いて、G C C発現細胞を同定するためのi n s i t uハイブリダイゼーション法に有用なプローブを設計できる。プローブは、好ましくはG C C遺伝子転写体に対応するヌクレオチド配列にハイブリダイズする。不完全相補的ハイブリダイゼーションによる

バックグラウンド信号を最小に抑えるために、ハイブリダイゼーション条件をルーティンに最適化できる。プローブは、好ましくは全長GCC遺伝子転写体にハイブリダイズする。プローブは、少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは30~200、より好ましくは40~100ヌクレオチドのフラグメントであり、GCC遺伝子転写体であってもよく、より好ましくはGCC遺伝子転写体の18~28ヌクレオチドフラグメントであってもよい。

【0089】

プローブは完全相補的であり、部分相補配列には十分にはハイブリダイズしない。本発明による*in situ*ハイブリダイゼーションのためには、プローブは蛍光により検出できることが好ましい。一般的方法は、プローブをビオチン修飾ヌクレオチドで標識し、次いで蛍光タグ付きアビジンで検出するものである。このようにプローブ自体が蛍光標識される必要はなく、後に蛍光マーカで検出することができる。

【0090】

本発明は、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを実施するのにプローブとして有用な標識オリゴヌクレオチドを含む。すなわち、それらはmRNA配列と完全相補的であるが、ゲノム配列ではない。本発明の標識プローブは放射性標識ヌクレオチドで標識され、あるいは容易に入手できる非放射性検出システムにより検出されうる。

【0091】

本発明は、GCC発現細胞を同定する*in situ*ハイブリダイゼーションに有用なプローブに関する。

細胞を固定し、プローブを遺伝子材料に添加する。プローブは試料中に存在する相補的核酸配列にハイブリダイズする。蛍光顕微鏡を用いてプローブをそれらの蛍光マーカにより視覚化できる。

【0092】

本発明によれば、本発明の*in situ*ハイブリダイゼーション法を実施するのに有用な診断キットを組み立てることができる。mRNA配列と完全相補的であるが、ゲノム配列ではない。たとえばmRNA配列は異なるエクソン配列を

含む。本発明による *in situ* 診断キットの標識プローブを蛍光マーカで標識することが好ましい。

【0093】

G C C を含む細胞を同定および本質的に染色するために、免疫組織化学的方法を用いることができる。そのような " 染色 " により、転移性移行を分析できる。前記のような抗 G C C 抗体を固定細胞と接触させると、細胞中に存在する G C C が抗体と反応する。抗体は検出可能に標識されており、あるいは標識された第 2 抗体または細胞を染色するプロテイン A を用いて検出される。

【0094】

本明細書に記載した腫瘍切片評価方法を用いてリンパ節および他の組織の試料について組織切片を分析し、G C C 発現細胞の存在を同定できる。試料を調製および " 染色 " して G C C 発現を検出することができる。

【0095】

胃癌または食道癌を伴う疑いがある個体または発症しやすい個体から得た非結腸直腸組織または体液の試料中の G C C の存在をそのような G C C タンパク質への曝露に応答して産生された抗体で検出することによる免疫アッセイ法を、胃癌または食道癌に罹患している個体の診断に使用できる。さらに、腫瘍試料中の G C C の存在をそのような G C C タンパク質への曝露に応答して産生された抗体で検出することによる免疫アッセイ法を用いて、胃癌または食道癌に罹患している個体を同定できる。

【0096】

抗体は好ましくはモノクローナル抗体である。抗体は好ましくはヒト細胞において形成された G C C に対して産生される。免疫アッセイは周知であり、それらの設計は当業者がルーティンに実施できる。G C C に特異的に結合し、本発明の方法およびキットに有用であるモノクローナル抗体を、当業者は標準法および容易に入手できる出発物質を用いて調製できる。モノクローナル抗体の調製方法は、Harlow, E. and D. Lane (1988) ANTIBODIES : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールド・スプリ

ング・ハーバー（本明細書に援用する）に概説され、そこにはターゲットタンパク質に特異的に結合するハイブリドーマおよびモノクローナル抗体の調製について詳細な指針が示されている。抗体の代わりに、GCC翻訳生成物に特異的に結合するFab、組換えFab、F(ab)₂、組換えF(ab)₂も本発明の範囲に含まれる。

【0097】

要約すると、GCCタンパク質をマウスに注射する。マウスの脾臓を摘出し、脾臓細胞を単離し、不死化したマウス細胞と融合させる。このハイブリッド細胞、すなわちハイブリドーマを培養し、抗体を分泌する細胞を選択する。それらの抗体を分析し、GCCに特異的に結合することが認められれば、それらを産生するハイブリドーマを培養して抗GCC特異的抗体を連続供給させる。

【0098】

抗体は好ましくはモノクローナル抗体である。抗体は好ましくはヒト細胞において形成されたGCCに対して産生される。

被験試料中のタンパク質の存在を検出する手段はルーティンであり、当業者は周知の方法を用いてタンパク質または抗体の存否を検出できる。タンパク質の存在を検出するための周知の方法の1つは、免疫アッセイである。当業者には、試料中のGCCタンパク質の存在を検出する免疫アッセイを実施するための多数の方法が自明である。

【0099】

ある態様によれば、免疫アッセイは下記を含む。試料中のタンパク質を固相支持体、たとえばプラスチック表面に結合させる。次いで、GCCに選択的に結合する検出可能な抗体を添加する。検出可能な抗体が検出されたことは、GCCの存在を指示する。検出可能な抗体は標識抗体または非標識抗体のいずれであってもよい。非標識抗体は、第1抗体に特異的に結合する第2の標識抗体、または標識プロテインA（抗体と複合体形成するタンパク質）を用いて検出できる第2の非標識抗体を用いて検出できる。種々の免疫アッセイ法がImmunoassays for the 80's, A. Voller et al. 編, University Park, 1981に記載されており、これを本明細書に援用

する。

【0100】

固相支持体を被験試料と接触させる簡単な免疫アッセイを実施できる。被験試料中に存在するタンパク質はいずれも固相に結合し、特異的な検出可能な抗体調製物により検出できる。そのような手法はドットブロット、ウェスタンブロットおよびこれらに類する他のアッセイ法の本質である。

【0101】

他の免疫アッセイ法はより複雑であるが、実際に卓越した結果を与える。代表的な好ましい免疫アッセイ法には、タンパク質検出のための”フォワード (forward)”アッセイが含まれる。この場合、固相支持体に結合した第1の抗タンパク質抗体を被験試料と接触させる。適切なインキュベーション期間後、固相支持体を洗浄して、結合していないタンパク質を除去する。次いで第2の別個の抗タンパク質抗体を添加する。これは、特異的タンパク質の第1抗体が認識しない部分に特異的である。第2抗体は好ましくは検出可能である。この検出可能な抗体を第1抗体により固相支持体に結合している特異的タンパク質と複合体形成させる第2インキュベーション期間後、固相支持体を再洗浄して、結合していない検出可能な抗体を除去する。あるいは第2抗体は検出可能でなくてもよい。この場合、第2抗体に結合する第3の検出可能な抗体を添加する。このタイプの”フォワードサンドイッチ”アッセイは、結合が起きたか判定する単純な有/無アッセイであってもよく、あるいは検出可能な抗体の量と対照において得た量の比較により定量的なものにすることもできる。そのような”二部位”または”サンドイッチ”アッセイは、Wide, Radioimmune Assay Method, Kirkham編, E. & S. Livingstone, エディンバラ, 1970, pp. 199 - 206に記載されており、これを本明細書に援用する。

【0102】

他のタイプのイムノメトリーアッセイ法は、いわゆる”同時”および”逆”アッセイである。同時アッセイは単一インキュベーション工程を伴い、この場合、固相支持体に結合した第1抗体、第2の検出可能な抗体、および被験試料を同時

に添加する。インキュベーション終了後、固相支持体を洗浄して、結合していないタンパク質を除去する。次いで固相支持体に付随する検出可能な抗体の存在を、通常の”フォワードサンドイッチ”アッセイの場合と同様に判定する。同時アッセイは、被験試料中の抗体の検出にも同様に応用できる。

【0103】

”逆”アッセイは、被験試料への検出可能な抗体の溶液の段階的添加、続いてインキュベーション期間、そして固相支持体に結合した抗体の添加、次いで追加インキュベーション期間を含む。固相支持体を常法により洗浄して、結合していないタンパク質/抗体複合体および未反応の検出可能な抗体を除去する。次いで固相支持体に結合した検出可能な抗体の測定を、”同時”および”フォワード”アッセイの場合と同様に行う。逆アッセイは、被験試料中の抗体の検出にも同様に応用できる。

【0104】

イムノメトリーアッセイの第1成分を、タンパク質を固定化するニトロセルロースその他の固相支持体に添加してもよい。被験試料中におけるGCCの存在を検出するための第1成分は、抗GCC抗体である。”固相支持体”または”支持体”とは、タンパク質を結合する任意の材料を表わすものとする。周知の固相支持体には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよびマグネタイトが含まれる。支持体の性質は、本発明の目的に関してはある程度可溶性であってもよく、不溶性であってもよい。支持体の形状は、ビーズのような球体、または試験管の内面もしくは棒の外面のような円筒形であってもよい。あるいは、シート、試験片などのように表面が平坦であってもよい。当業者には、タンパク質を結合させるための他の多数の適切な”固相支持体”が既知であり、あるいはルーティン実験を用いてそれらを確認できるであろう。好ましい固相支持体は96ウェルマイクロタイタープレートである。

【0105】

GCCの存在を検出するために、検出可能な抗GCC抗体を用いる。抗体を検出するための幾つかの方法が周知である。

抗体を検出可能に標識しうる方法のひとつは、抗体を酵素に結合させた後、その抗体を酵素免疫アッセイ (E I A) または酵素結合イムノソルベントアッセイ (E L I S A)、たとえば捕獲 E L I S A に使用することによる。次いで酵素がその基質に曝露されると基質と反応し、たとえば分光測光、蛍光測光または視覚的手段で検出できる部分を生成する。抗体を検出可能に標識するのに使用できる酵素には下記のものが含まれるが、これらに限定されない：マレイン酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ - 5 - ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ - グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼ。当業者には使用できる他の酵素が自明であろう。

【0106】

抗体を検出可能に標識できる他の方法は放射性同位体によるものであり、次いでこれをラジオイムノアッセイ (R I A) に用いる (たとえば Work, T. S. et al., Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, North Holland Publishing Company, ニューヨーク, 1978 参照; 本明細書に援用する)。放射性同位体は、ガンマ計数器もしくはシンチレーション計数器またはオートラジオグラフィーを用いる手段などで検出できる。本発明の目的に特に有用な同位体は、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S および ^{14}C である。好ましくは同位体は ^{125}I である。当業者には、同様に使用できる他の放射性同位体が自明であろう。

【0107】

抗体を蛍光化合物で標識することもできる。蛍光標識抗体を適切な波長の光で照射すると、その蛍光のためその存在を検出できる。最も一般的に用いられる蛍光標識用化合物には、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o - フタルデヒドおよびフル

オレサミンが含まれる。当業者には、同様に使用できる他の蛍光化合物が自明であろう。

【0108】

抗体を蛍光発光金属、たとえば¹⁵²Euまたは他のランタニド系列で検出可能に標識することもできる。ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)またはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)などの金属キレート基を用いて、これらの金属をタンパク質特異的抗体に結合させることができる。当業者には、同様に使用できる他の蛍光発光金属および他の金属キレート基が自明であろう。

【0109】

抗体を化学発光化合物への結合により検出可能に標識することもできる。化学発光標識抗体の存在は、化学反応の経過中に発せられるルミネセンスの存在を検出することにより判定される。特に有用な化学発光標識用化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、テロマチックアクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルである。当業者には、同様に使用できる他の化学発光化合物が自明であろう。

【0110】

同様に生物発光化合物を用いて抗体を標識できる。生物発光は生物系にみられる一種の化学発光であり、この場合、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を高める。生物発光タンパク質の存在は、ルミネセンスの存在を検出することにより判定される。標識のために重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンである。当業者には、同様に使用できる他の生物発光化合物が自明であろう。

【0111】

タンパク質特異的な抗体、フラグメントまたは誘導体の検出は、たとえば検出可能な標識が放射性ガンマ線放出体である場合はシンチレーション計数器により行うことができる。あるいは、たとえば標識が蛍光物質である場合は、検出は蛍光光度計により行うことができる。酵素標識の場合、検出は酵素の基質を用いる比色法により行うことができる。基質の酵素反応の程度を同様に調製した標準品と対比した視覚比較により検出を行うこともできる。当業者には、同様に使用で

きる他の適切な検出方法が自明であろう。

【0112】

あるロットの抗体の結合活性は周知の方法で測定できる。当業者は、ルーティン実験により各測定のための操作可能な最適アッセイ条件を決定できるであろう。

【0113】

陽性および陰性対照を実施でき、その場合、被験アッセイと並行して実施するアッセイにそれぞれ既知量のGCCタンパク質を添加し、およびGCCタンパク質を添加しない。当業者は適切な対照を実施するのに必要な知識をもっているであろう。さらに、キットはアッセイを実施するための指示書を含んでもよい。さらに、キットは所望により陽性および陰性の結果の外観を表わす図または写真を含むことができる。

【0114】

GCCを陽性対照用試薬としてルーティンに調製できる。当業者にはGCCタンパク質を産生および単離しうる多様な方法が自明であろう。

抗体組成物とは、タンパク質の検出に必要な抗体または抗体類を表わす。たとえば被験試料中のGCCを検出するために用いる抗体組成物は、GCCに結合する第1抗体、およびそれぞれ第1または第2抗体に結合する第2または第3の検出可能な抗体を含む。

【0115】

GCCの存在について試料を検査するために、たとえば下記に述べるような標準イムノメトリーアッセイを実施できる。GCCの特異的部分を認識する第1抗GCC抗体を、ある体積の緩衝液中において96ウェルマイクロタイタープレートに添加する。プレートを結合が起きるのに十分な期間インキュベートした後、PBSで洗浄して、結合していない抗体を除去する。次いでプレートをPBS/BSA溶液でブロックして、試料タンパク質がマイクロタイタープレートに非特異的に結合するのを防ぐ。次いで被験試料をウェルに添加し、プレートを結合が起きるのに十分な期間インキュベートする。ウェルをPBSで洗浄して、結合していないタンパク質を除去する。第1抗体により認識されないGCC部分を認識

する標識 - 抗G C C抗体をウェルに添加する。プレートが結合が起きるのに十分な期間インキュベートした後、P B Sで洗浄して、結合していない標識 - 抗G C C抗体を除去する。次いで、結合している標識 - 抗G C C抗体の量を標準法により測定する。

【0116】

被験試料中のG C Cの検出に有用なキットは、抗G C C抗体を入れた容器、および対照を入れた容器（1又は複数）を含む。対照には、G C Cを含有しない1つの対照試料、および/またはG C Cを含有する他の対照試料が含まれる。キットに用いる抗G C C抗体は検出可能に標識されていれば検出できる。検出可能な抗G C C抗体が標識されていない場合、それをたとえば第2の抗体またはプロテインAにより検出でき、あるキットではこれらを別個の容器に入れて提供してもよい。あるキットにおける追加の構成要素には、固体支持体、緩衝液、およびアッセイを実施するための指示書が含まれる。さらに、キットは所望により陽性および陰性の結果の外観を表わす図または写真を含むことができる。

【0117】

免疫アッセイ法は、ホモジナイズした組織試料中、および体液試料、たとえば体液試料の血漿部分または細胞中にあるG C Cの検出に有用である。

ウェスタンブロット法は、非結腸直腸組織または体液中におけるG C Cの存在を検出することにより、胃癌または食道癌に罹患している個体の診断を補助するのに有用である。ウェスタンブロット法は、癌に罹患している個体からの腫瘍試料中におけるG C Cの存在を検出するのにも使用できる。ウェスタンブロット法は、試料中にG C Cが存在すればそれに結合する検出可能な抗G C C抗体を用い、これによりその試料中にこの受容体が存在することを指示する。

【0118】

ウェスタンブロット法は、Sambrook, J., et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバーに記載されており、これを本明細書に援用する。これは免疫アッセイ法に類似し、本質的な相異は、試料

を抗体に曝露する前に試料中のタンパク質をゲル電気泳動により分離し、次いで分離したタンパク質を抗体でプローブする点である。ある好ましい態様において、マトリックスはSDS-PAGEゲルマトリックスであり、マトリックス中の分離したタンパク質を濾紙などのキャリアーに移した後、抗体でプローブする。前記の抗GCC抗体をウェスタンブロット法にも使用できる。

【0119】

一般に試料をホモジナイズし、界面活性剤、たとえばTriton-Xを用いて細胞を溶解する。次いでこの材料をSambrook, J., et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバーの標準法により分離する。

【0120】

ウェスタンブロット法による被験試料中のGCCの検出に有用なキットは、抗GCC抗体を入れた容器、および対照を入れた容器（1又は複数）を含む。対照には、GCCを含有しない1つの対照試料、および/またはGCCを含有する他の対照試料が含まれる。キットに用いる抗GCC抗体は検出可能に標識されていれば検出できる。検出可能な抗GCC抗体が標識されていない場合、それをたとえば第2の抗体またはプロテインAにより検出でき、あるキットではこれらを別個の容器に入れて提供してもよい。あるキットにおける追加の構成要素には、アッセイを実施するための指示書が含まれる。さらに、キットは所望により陽性および陰性の結果の外観を表わす図または写真を含むことができる。

【0121】

ウェスタンブロット法は、ホモジナイズした組織試料中、および体液試料、たとえば体液試料の血漿部分または細胞中にあるGCCの検出に有用である。

インビボイメージングおよび療法薬

本発明のある態様によれば、個体における原発性および/または転移性の胃または食道の腫瘍を検出、イメージングまたは処置するための組成物およびインビボ方法が提供される。

【0122】

本発明のコンジュゲート組成物を腸管の外側に投与すると、たとえば循環系に投与した場合、それらは腸管を内張りする細胞とは分離された状態を維持し、腸管の外側にあるGCC発現細胞にのみ結合する。本発明のコンジュゲート組成物は正常細胞には結合しないが、原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞には結合する。こうして、腸管の外側に投与したコンジュゲート組成物の有効部分が、GCC発現細胞、たとえば原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞へ運搬される。

【0123】

本発明に有用な療法用および診断用医薬組成物は、GCC発現細胞を特異的にターゲティングするコンジュゲート化合物を含有する。これらのコンジュゲート化合物はGCCに結合する部分を含み、これは身体の腸管細胞以外の正常組織の細胞には結合しない。他の組織はGCCを発現しないからである。

【0124】

正常な結腸直腸細胞と異なり、GCCを発現する癌細胞は腸管の外側に投与した物質、たとえば循環系に投与した物質に接近できる。正常組織中の唯一のGCCは腸粘膜細胞の頂端側細胞膜中に存在するので、腸管の外側に投与されるターゲティングした癌化学療法薬およびイメージング剤からは腸粘膜バリアーによって効果的に隔離される。こうして、本発明のコンジュゲート化合物を腸管の外側に導入することにより、たとえばコンジュゲート化合物を含む医薬組成物を循環系に投与することにより、これらの化合物で原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞をターゲティングできる。

【0125】

当業者は、原発性および/または転移性の胃癌または食道癌に罹患している疑いがある個体を同定できる。胃癌または食道癌を伴うと診断された個体において、転移を疑い、転移した細胞の根絶を積極的に試みるのは異例ではなく、場合によっては標準療法である。本発明は、イメージングのための医薬組成物および方法を提供する。これにより原発性および転移性の疾患をより精確に診断できる。さらに本発明は、原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞を特異

的にターゲティングおよび排除するための療法薬を含む医薬組成物および方法を提供する。さらに本発明は、原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞を特異的に排除するための療法薬を含む医薬組成物および方法を提供する。

【0126】

本発明のコンジュゲート組成物を含む医薬組成物は、原発性および/または転移性の胃または食道の腫瘍に罹患している個体を診断または処置するのに使用できる。

【0127】

本発明は、コンジュゲート組成物中のGCC結合部分の利用に依存する。GCC結合部分は、本質的にコンジュゲート組成物の、GCCに対するリガンドとして作用する、したがってGCCに特異的に結合する部分である。コンジュゲート組成物は、GCC結合部分と結合した有効部分をも含む；有効部分は、細胞のイメージング、ターゲティング、中和、または死滅に有用な有効物質である。

【0128】

本発明によれば、GCC結合部分はコンジュゲート組成物のGCCリガンド部分である。ある態様において、GCCリガンドは抗体である。

ある好ましい態様において、コンジュゲート化合物は抗GCC抗体を含むGCC結合部分を含む。

【0129】

GCC結合部分として用いるGCCリガンドは可能な限り小さいことが好ましい。たとえばGCCリガンドは非ペプチド低分子または低分子ペプチド、好ましくは25アミノ酸未満、より好ましくは20アミノ酸未満のものである。ある態様において、コンジュゲート組成物のGCC結合部分を構成するGCCリガンドは15アミノ酸未満である。10アミノ酸未満を含むGCC結合ペプチド、また5アミノ酸未満を含むGCC結合ペプチドを、本発明によるGCC結合部分として使用できる。GCC結合部分として用いられる、より大きな分子を含むものも本発明の範囲に含まれ、これにはGCCに特異的に結合する抗体などの分子が含まれるが、これらに限定されない。

【0130】

G C C 結合部分として用いられる G C C リガンドは、多様な既知のコンビナトリアルライブラリースクリーニング法、たとえば本明細書の実施例 1 に示す方法で同定できる。

【0131】

ペプチドおよび非ペプチド組成物の両方を試験してそれが G C C リガンドであるか否かを判定し、コンジュゲート組成物を試験してそれが G C C 結合活性をもつか否かを判定するアッセイ法を使用できる。G C C に特異的に結合する組成物は、G C C に結合することが分かっている抗体を用いる競合結合アッセイにより同定できる。競合結合アッセイ法は薬理学における標準法であり、入手しやすい出発物質を用いて当業者が容易に実施できる。

【0132】

G C C は合成、組換え、または天然源からの単離により調製できる。

たとえば固相合成を用いる場合、保護または誘導体化したアミノ酸を保護されていないカルボキシル基またはアミノ基により不活性固体支持体に結合させる。次いでこのアミノ基またはカルボキシル基の保護基を選択的に除去し、適切に保護された相補的（アミノまたはカルボキシル）基をもつ、配列中の次のアミノ酸を混和し、既に固体支持体に結合している残基と反応させる。次いでこの新たに付加されたアミノ酸残基からアミノ基またはカルボキシル基の保護基を除去し、次のアミノ酸（適切に保護されたもの）を添加し、以下同様に操作する。目的アミノ酸がすべて適切な配列で結合した後、残りの末端基および側鎖基の保護基（および固体支持体）を逐次または同時に除去すると、最終ペプチドが得られる。本発明のペプチドは、好ましくはベンジル化またはメチルベンジル化されたアミノ酸を含まない。合成の途中でそのような保護基部分を用いてもよいが、ペプチドの使用前にそれらを除去する。他の箇所に記載するように、コンホメーションを維持するために分子内結合を形成する追加反応が必要な場合もある。

【0133】

G C C に対する抗体をルーティンに調製し、本発明により G C C リガンド同定のための競合アッセイに、またはコンジュゲート化合物の出発物質として使用できる。

【0134】

本発明によれば、有効部分は療法薬またはイメージング剤であってよい。GCCリガンドで癌細胞を特異的にターゲティングしうること、およびそのようなリガンドを多様な有効物質とコンジュゲートしうることの利点が、当業者には自明であろう。

【0135】

GCC結合部分にコンジュゲートした場合にGCC発現細胞、たとえば胃癌または食道癌の細胞へ特異的に運搬される有効部分として有用な化学療法薬は、一般に化学合成により製造される低分子化学物質である。化学療法薬には細胞毒性および細胞分裂抑制薬物が含まれる。化学療法薬には、トランスフォーミング状態から分化状態への反転など他の作用を細胞に及ぼすもの、または細胞複製を阻害するものも含まれる。化学療法薬の例には、一般的な細胞毒性および細胞分裂抑制薬物、たとえば下記のものが含まれる：メトトレキセート（アメトプテリン）、ドキソルビシン（アドリマイシン）、ダウノルビシン、シトシンアラビノシド、エトポシド、5-フルオロウラシル、メルファラン、クロラムブシル、および他のナイトロジェンマスタード（たとえばシクロホスファミド）、シスプラチン、ビンデシン（および他のビンカアルカロイド）、マイトマイシン、およびレオマイシン。他の化学療法薬には下記のものが含まれる：ピューロチオニン（purothionin、オオムギ粉オリゴペプチド）、マクロモマイシン、1,4-ベンゾキノン誘導体およびトレニモン（trenimon）。

【0136】

毒素は有効部分として有用である。毒素をGCC結合部分とコンジュゲートさせると、コンジュゲート組成物はGCC結合部分によりGCC発現細胞、たとえば胃癌または食道癌の細胞へ特異的に運搬され、毒素部分が細胞を死滅させる。毒素は一般に、細菌、植物などを含めた種々の生物の複雑な有毒産物である。毒素の例には下記のものが含まれるが、これらに限定されない：リシン（ricin）、リシンA鎖（リシン毒素）、シュードモナス（Pseudomonas）外毒素（PE）、ジフテリア毒素（DT）、クロストリジウム・パーフリンジェンス（Clostridium perfringens）ホスホリパーゼC（

PLC)、ウシ膀胱リボヌクレアーゼ(BPR)、アメリカヤマゴボウ(pokeweed)抗ウイルスタンパク質(PAP)、アブリン(abrin)、アブリンA鎖(トウアズキ毒素)、コブラ毒因子(CVF)、ゲロニン(gelonin; GEL)、サポリン(saporin; SAP)、モデッシン(modeccin)、ビスキュミン(viscumin)およびボルケンシン(volkessin)。上記のようにタンパク質毒素をGCC結合ペプチドと共に用いる場合、コンジュゲート組成物は組換えDNA法により製造できる。要約すると、キメラ遺伝子上にGCCリガンドと毒素の両方をコードする組換えDNA分子を構築できる。このキメラ遺伝子が発現すると、GCC結合部分と有効部分を含む融合タンパク質が産生される。タンパク質毒素は非ペプチド結合によりGCC結合ペプチドとコンジュゲート化合物を形成するのにも有用である。

【0137】

さらに、有効物質を癌の処置に利用するための他の方法がある。たとえば、GCC結合部分および有効酵素である有効部分を含有するコンジュゲート組成物を製造できる。GCC結合部分はコンジュゲート組成物を腫瘍細胞へ特異的に局在化させる。この酵素により有効薬物に変換されうる不活性プロドラッグを患者に投与する。腫瘍に局在化したプロドラッグのみが酵素により有効薬物に変換される。酵素/プロドラッグ対の例には、アルカリ性ホスファターゼ/リン酸エトポシドが含まれる。そのような例では、アルカリ性ホスファターゼをGCC結合性リガンドにコンジュゲートさせる。コンジュゲートした化合物を投与すると、癌細胞に局在化する。リン酸エトポシド(プロドラッグ)と接触すると、リン酸エトポシドは化学療法薬エトポシドに変換され、癌細胞に取り込まれる。

【0138】

放射線増感剤は、放射線に対する細胞の感受性を高める物質である。放射線増感剤の例には、ニトロイミダゾール、メトロニダゾール(metronidazole)、ミソニダゾール(misonidazole)が含まれる(参照: DeVita, V. T. Jr., Harrison's Principles of Internal Medicine, p. 68, McGraw-Hill Book社, ニューヨーク, 1983; 本明細書に援用する)。有効部分と

して放射線増感剤を含むコンジュゲート化合物を投与すると、原発性および／または転移性の胃癌または食道癌の細胞に局在化する。この個体を放射線照射すると、放射線増感剤が”励起”され、細胞を死滅させる。

【0139】

放射線療法またはイメージング操作に有用な医薬組成物中に放射性核種を使用できる。

放射線療法において毒素として有用な放射性核種の例には、下記のものが含まれる：

【0140】

【化3】

^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb および ^{212}Bi

【0141】

当業者が使用する他の放射性核種には、下記のものが含まれる：

【0142】

【化4】

^{32}P および ^{33}P , ^{71}Ge ,

^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , ^{193}Pt , ^{197}Hg ,

【0143】

全ベータマイナスおよび／またはオージェエミッター。若干の好ましい放射性核種には ^{90}Y 、 ^{131}I 、 ^{211}At 、および ^{212}Pb ／ ^{212}Bi が含まれる。

本発明によれば、有効部分はイメージング剤であってもよい。イメージング剤は有用な診断手段であり、かつ癌細胞の位置を同定するのに用いられる手段である。イメージングは当業者に周知の多数の方法で実施でき、そのような方法に有用な適切なイメージング剤を周知の手段でGCCリガンドにコンジュゲートさせることができる。イメージングはたとえばラジオシンチグラフィー、核磁気共鳴イメージング(MRI)またはコンピュータ断層撮影(CTスキャン)により実施できる。最も一般的に用いられる放射性核種イメージング剤には、放射性ヨウ

素およびインジウムが含まれる。CTスキャンによるイメージングには、重金属、たとえば鉄キレートを使用できる。MRIスキャンにはガドリニウムまたはマンガンのキレートを使用できる。さらに、酸素、窒素、鉄、炭素またはガリウムの陽電子エミッターを用いる陽電子放射断層撮影法(PET)も可能である。イメージング法に有用な放射性核種の例には、下記のものが含まれる：

【0144】

【化5】

^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{81}Rb / $^{81\text{M}}\text{Kr}$, $^{87\text{M}}\text{Sr}$, $^{99\text{M}}\text{Tc}$, ^{111}In , $^{113\text{M}}\text{In}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb および ^{206}Bi .

【0145】

コンジュゲート組成物は非免疫原性であるか、または免疫原性がきわめて低いことが好ましい。したがって、GCC結合部分は低分子で免疫原性が少ないかまたは非免疫原性のペプチドまたは非ペプチドであることが好ましい。GCC結合部分は、ヒト化もしくは霊長類化された抗体、またはヒト抗体であってよい。

【0146】

GCCリガンドは、当業者が多大な実験なしに容易に実施しうる多様な周知の方法で有効物質にコンジュゲートされる。GCCリガンドを有効物質にコンジュゲートさせるために用いられる方法は、GCCリガンドおよび有効物質の分子の性質に依存する。GCCリガンドと有効物質をコンジュゲートさせて単一分子を形成した後、そのコンジュゲート分子がそれらの部分の活性を保持しているかを確認するためにアッセイを行うことができる。前記の競合結合アッセイ法を用いて、GCC結合部分がコンジュゲート化合物としてその結合活性を保持することを確認できる。同様に、有効物質の各タイプについての種々のアッセイ法を用いて、有効部分の活性を試験することができる。放射性核種はコンジュゲーションに関係なくそれらの活性、すなわち放射能を保持する。毒素、薬物およびターゲティング剤などの有効物質に関しては、非コンジュゲート形のこれらの化合物の活性を証明する標準アッセイ法を用いて、活性が保持されていることを確認できる。

【0147】

コンジュゲーションは、GCCリガンドと有効物質の間で直接行ってもよく、あるいは結合用の中間分子基をGCCリガンドと有効物質の間に付与してもよい。架橋剤は、各部分に結合部位を付与することによりコンジュゲーションを促進するのに特に有用である。架橋剤は、一方が他方の活性を妨害するのを防ぐために、これらの部分を互いに分離するスペーサーとして作用する追加分子基を含むことができる。

【0148】

当業者は周知の方法を用いてGCCリガンドを化学療法薬にコンジュゲートさせることができる。たとえばMagerstadt, M., *Antibody Conjugates and Malignant Disease* (1991) CRC Press, 米国Boca Raton, pp. 110-152 (本明細書に援用する) には、種々の細胞分裂抑制薬物を抗体のアミノ酸にコンジュゲートさせる方法が教示されている。そのような反応は、適切なリンカーを用いてGCCリガンド(抗GCC抗体を含む)に化学療法薬をコンジュゲートさせるのに適用できる。癌の処置に現在用いられている大部分の化学療法薬は、タンパク質と直接架橋できる官能基をもつ。たとえばメトトレキセート、ドキソルビシン、ダウノルビシン、シトシンアラビノシド、シスプラチン、ビンデシン、マイトマイシンおよびブレオマイシン上には遊離アミノ基があり、一方メトトレキセート、メルファランおよびクロラムブシル上には遊離カルボン酸基がある。これらの官能基、すなわち遊離アミノ基および遊離カルボン酸基は、多様なホモ二官能性およびヘテロ二官能性架橋剤のターゲットであり、これらの薬物を抗体の単一遊離アミノ基に直接架橋させることができる。たとえば遊離アミノ基をもつGCCリガンドを、遊離アミノ基をもつ有効物質、たとえばメトトレキセート、ドキソルビシン、ダウノルビシン、シトシンアラビノシド、シスプラチン、ビンデシン、マイトマイシンおよびブレオマイシン、またはアルカリ性ホスファターゼ、またはタンパク質もしくはペプチドベースの毒素に架橋するための方法のひとつは、好ましくは炭素鎖スペーサーをもつホモ二官能性スクシンイミジルエステル、たとえばスベリン酸ジスクシンイミジル(Pierce社、イリノイ州ロックフォード)を用いる。開裂性のコンジュゲート化合物が必要な場合、3, 3

’ - ジチオビス (スルホスクシンイミジルプロピオナート ; P i e r c e 社) を用いて同プロトコルを使用する。

【0149】

ペプチドまたはタンパク質であるGCCリガンドをペプチドベースの有効物質、たとえば毒素にコンジュゲートさせるためには、標準ペプチド合成または組換えDNA法により、GCCリガンドおよび毒素を単一の融合タンパク質として製造できる。標準ペプチド合成または組換えDNA法は両方とも当業者がルーティンに実施できる。あるいは、2種類のペプチド、すなわちGCCリガンドペプチドとペプチドベースの毒素を別個のペプチドとして製造および/または単離し、そして架橋剤によりコンジュゲートさせることもできる。化学療法薬を含有するコンジュゲート組成物に関しては、GCC結合ペプチドの受容体結合機能を保持しつつこの分子の単一遊離アミノ基を修飾できることを、GCC結合ペプチドと毒素のコンジュゲーションに利用できる。

【0150】

当業者は周知の方法を用いてGCCリガンドを放射性核種にコンジュゲートさせることができる。たとえばMagerstadt, M. (1991), Antibody Conjugates and Malignant Disease, CRC Press, フロリダ州Boca Raton; およびBarchel, S. W. and Rhodes, B. H. (1983) Radioimaging and Radiotherapy, Elsevier, ニューヨーク州ニューヨーク (それぞれを本明細書に援用する) には、種々の療法用および診断用放射性核種を抗体のアミノ酸にコンジュゲートさせる方法が教示されている。

【0151】

本発明は、本発明のコンジュゲート化合物および医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤を含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は当業者が配合できる。適切な医薬用キャリアーは、この分野の標準参考文献であるRemington's Pharmaceutical Sciences, A. Osolに記載されており、これを本明細書に援用する。本発明方法を実施するに際

し、本発明のコンジュゲート化合物を単独で、または他の診断薬、療法薬または添加剤と組み合わせて使用できる。そのような添加剤には、賦形剤、たとえば着色剤、安定剤、浸透圧調節剤および抗菌薬が含まれる。医薬組成物は好ましくは無菌であり、かつ発熱物質を含有しない。

【0152】

本発明のコンジュゲート組成物は、たとえば医薬的に許容できる非経口ビヒクルと共に液剤、懸濁液剤または乳剤として配合できる。そのようなビヒクルの例は、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンである。リポソームも使用できる。ビヒクルは、等張性を維持する添加剤（たとえば塩化ナトリウム、マンニトール）および化学的安定性を維持する添加剤（たとえば緩衝剤および保存薬）を含有してもよい。配合物は常法により滅菌される。たとえば注射による投与に適した非経口組成物は、1.5重量%の有効成分を0.9%塩化ナトリウム溶液に溶解することにより調製される。

【0153】

本発明による医薬組成物は、1回量または多数回量として投与できる。本発明の医薬組成物は、個々の療法薬として、または他の療法と組み合わせて投与できる。本発明の療法薬を通常の療法と組み合わせて、逐次または同時に投与できる。

【0154】

本発明の医薬組成物は、コンジュゲート化合物をターゲット細胞に到達させる任意の手段で投与できる。ある態様において、投与経路には静脈内、動脈内、腹腔内、腫瘍が存在する臓器の血液供給中への局所投与、または腫瘍自体への直接投与よりなる群から選択されるものが含まれる。静脈内投与が好ましい投与様式である。これを注入ポンプの補助により達成してもよい。コンジュゲート化合物は、術中スプレーのほか、クモ膜下（髄腔内）、脳室内、定位（*stereotactically*）、肝内（たとえば門脈を経て）、吸入により、および胸膜内に投与できる。

【0155】

投与量は下記のような要因に応じて異なる：有効部分の性質；コンジュゲート

組成物の性質；薬物動態特性；投与の様式および経路；レシピエントの年齢、健康状態および体重；症状の性質および程度；併用処置の種類；ならびに処置の頻度。

【0156】

コンジュゲート化合物は1以上のGCC分子を含む細胞を特異的にターゲティングするので、化学療法薬または毒素を含むコンジュゲート化合物は、コンジュゲートしていない有効物質としてそれらの化学療法薬または毒素を投与する場合に使用する量より少ない用量で、好ましくは最高100倍少ない量の有効物質を含有する用量で投与される。ある態様においては、化学療法薬または毒素を含むコンジュゲート化合物は、コンジュゲートしていない有効物質として投与される化学療法薬または毒素の用量より10～100倍少ない量の有効物質を含有する用量で投与される。適切な用量を判定するために、化合物の量を重量ではなくモルで測定することが好ましい。この方法では、異なるGCC結合部分の重量変動が計算に影響を及ぼすことがない。本発明のコンジュゲート組成物においてGCC結合部分と有効部分が1：1の比率であるとすれば、コンジュゲートしていない化合物の投与モル数と比較して少ないモル数、好ましくは最高100倍少ないモル数のコンジュゲート化合物を投与すればよい。

【0157】

一般に化学療法薬コンジュゲートを多数回の分割量で静脈内投与する。

一般に、静脈内最高20g/回のメトトレキセートがコンジュゲートしていない形で投与される。メトトレキセートを本発明のコンジュゲート化合物の有効部分として投与する場合、用量は10～100倍少なくなる。たとえば各コンジュゲート化合物が1つのGCC結合部分に対して1モルのメトトレキセートをコンジュゲートしているとすれば、コンジュゲート化合物の全投与量中には約0.2～2.0gのメトトレキセートが存在し、したがって投与される。ある態様においては、コンジュゲート化合物の全投与量中に約200mg～2gのメトトレキセートが存在し、したがって投与される。

【0158】

イメージング剤として有用な医薬組成物中において放射性同位体である有効部

分に結合したGCC結合部分を含むコンジュゲート組成物を投与するために、各GCC結合部分が1つの放射性有効部分に結合しているものとする。放射性同位体の投与量はその放射性同位体に依存する。当業者は、有効部分として用いるその放射性核種の比放射能およびエネルギーに基づいて、コンジュゲート化合物の投与量を容易に決定できる。一般に1回当たり0.1～100ミリキュリー、好ましくは1～10ミリキュリー、最も一般的には2～5ミリキュリーのイメージング剤が投与される。たとえばGCC結合部分および放射性部分を含むコンジュゲート化合物を含むイメージング剤として有用な本発明による医薬組成物は、0.1～100ミリキュリー、ある態様において好ましくは1～10ミリキュリー、ある態様において好ましくは2～5ミリキュリー、ある態様においてより好ましくは1～5ミリキュリーを含む。投与量の例には下記のものが含まれる：¹³¹I = 1回当たり0.1～100ミリキュリー、ある態様において好ましくは1～10ミリキュリー、ある態様においては2～5ミリキュリー、ある態様においては約4ミリキュリー；¹¹¹In = 1回当たり0.1～100ミリキュリー、ある態様において好ましくは1～10ミリキュリー、ある態様においては1～5ミリキュリー、ある態様においては約2ミリキュリー；^{99m}Tc = 1回当たり0.1～100ミリキュリー、ある態様において好ましくは5～75ミリキュリー、ある態様においては10～50ミリキュリー、ある態様においては約27ミリキュリー。Wessels B.W. and R.D. Rogus (1984) Med. Phys., 11: 638およびKwok, C.S., et al. (1985) Med. Phys., 12: 405 (両者を本明細書に援用する)には、診断用および療法用コンジュゲートに関する詳細な用量計算が示されており、放射性コンジュゲート化合物を含有する本発明の医薬組成物の調製に際してこれを採用できる。

【0159】

本発明の1態様は、原発性および/または転移性の胃癌または食道癌に罹患している疑いがある個体の処置方法に関する。そのような個体は、医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤ならびにGCC結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含む医薬組成物をその個体に投与することにより処置でき、

その際、有効部分は放射安定性療法薬である。本発明のある態様において医薬組成物は、医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤、ならびにG C C結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含み、その際、有効部分は放射安定性有効物質であり、G C C結合部分は抗体である。本発明のある態様において医薬組成物は、医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤、ならびにG C C結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含み、その際、有効部分は放射安定性療法薬である。本発明のある態様において医薬組成物は、医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤、ならびにG C C結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含み、その際、有効部分は下記よりなる群から選択される放射安定性有効物質である：メトトレキセート、ドキソルビシン、ダウノルビシン、シトシンアラビノシド、エトポシド、5 - 4フルオロウラシル、メルファラン、クロラムブシル、シスプラチン、ビンデシン、マイトマイシン、プレオマイシン、ピューロチオニン、マクロモマイシン、1, 4 - ベンゾキノ誘導体、トレニモン、リシン、リシンA鎖、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素、クロストリジウム・パーフリンジェンスホスホリパーゼC、ウシ脾臓リボヌクレアーゼ、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、アブリン、アブリンA鎖、コブラ毒因子、ゲロニン、サポリン、モデッシン、ビスキュミン、ボルケンシン、アルカリ性ホスファターゼ、ニトロイミダゾール、メトロニダゾールおよびミソニダゾール。処置される個体は、転移した胃癌または食道癌を伴うと診断され、あるいは原発性の胃癌または食道癌を伴うと診断され、まだ何らかの転移が検出されていない場合は前向処置を受けていてもよい。本発明の医薬組成物は、療法有効量のコンジュゲート組成物を含有する。療法有効量は、その個体に致死的な副作用を与えることなく癌細胞に細胞毒性または細胞分裂抑制作用を及ぼすのに有効な量である。

【0160】

本発明の1態様は、原発性および/または転移性の胃癌または食道癌に罹患している疑いがある個体の処置方法に関する。そのような個体は、医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤ならびにG C C結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含む医薬組成物をその個体に投与することにより処置でき、

その際、有効部分は放射性である。本発明のある態様において医薬組成物は、医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤、ならびに G C C 結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含み、その際、有効部分は放射性有効物質であり、G C C 結合部分は抗体である。本発明のある態様において医薬組成物は、医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤、ならびに G C C 結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含み、その際、有効部分は下記よりなる群から選択される放射性物質である：

【 0 1 6 1 】

【化 6】

^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re ,
 ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{32}P および ^{33}P , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr ,
 ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , ^{193}Pt , ^{197}Hg , ^{32}P and ^{33}P , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn ,
 ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , ^{193}Pt , ^{197}Hg ,

【 0 1 6 2 】

全ベータマイナスおよび/またはオージェエミッター。処置される個体は、転移した癌を伴うと診断され、あるいは局在性癌を伴うと診断され、まだ何らかの転移が検出されていない場合は前向処置を受けていてもよい。本発明の医薬組成物は、療法有効量のコンジュゲート組成物を含有する。療法有効量は、その個体に致死的な副作用を及ぼすことなく原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞に細胞毒性または細胞分裂抑制作用を引き起こすのに有効な量である。本発明の組成物を原発性腫瘍中へ腫瘍内注射してもよい。

【 0 1 6 3 】

本発明の 1 態様は、原発性または転移性の胃癌または食道癌に罹患している疑いがある個体において、放射線イメージング法により原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞を検出する方法に関する。個体は、原発性の胃または食道の腫瘍を伴う疑いがあってもよく、G C C に結合するイメージング剤を個体に投与することによりその診断を確認できる。胃または食道における局在化を検出することにより、腫瘍をイメージングできる。個体は、転移した胃癌または食道癌に罹患していると診断され、医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤

ならびにG C C結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物（有効部分は放射性である）を含む医薬組成物をその個体に投与し（好ましくは静脈内投与による）、局在化した放射能の蓄積または凝集の存在（G C Cを含む細胞の存在を指示する）を検出することにより、その転移した胃癌または食道癌の細胞を検出できる。本発明のある態様において医薬組成物は、医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤、ならびにG C C結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含み、その際、有効部分は放射性有効物質であり、G C C結合部分は抗体である。本発明のある態様において医薬組成物は、医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤ならびにG C C結合部分および有効部分を含むコンジュゲート化合物を含み、その際、有効部分は下記よりなる群から選択される放射性物質である：放射性重金属、たとえば鉄キレート、放射性ガドリニウムまたはマンガンキレート、酸素、窒素、鉄、炭素またはガリウムの陽電子エミッター、

【0164】

【化7】

^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co ,

^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{81}Rb / ^{81}mKr , ^{87}mSr , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb および ^{206}Bi .

【0165】

処置される個体は、転移した胃癌または食道癌を伴うと診断され、あるいは局在性の胃癌または食道癌を伴うと診断され、まだ検出されていない何らかの転移が存在する場合に前向処置を受けていてもよい。本発明の医薬組成物は、療法有効量のコンジュゲート組成物を含有する。診断有効量は、その個体に致死的な副作用を及ぼすことなく、G C Cを含む細胞のある身体部位を検出できる量である。

【0166】

光学的イメージングおよび療法

本発明のある態様によれば、G C C結合部分を光活性化したイメージング剤または療法薬にコンジュゲートさせる。Maier A., et al., Lasers in Surgery and Medicine, 26:461-4

66(2000)(本明細書に援用する)には、光力学的療法の例が示されている。QLT社(ブリティッシュコロンビア州バンクーバー)は、GCCリガンドに結合しうる感光性有効物質を販売している。そのようなコンジュゲート化合物を光力学的療法およびイメージングプロトコルに用いて、GCC結合したコンジュゲート物質を活性化し、こうして腫瘍細胞へターゲティングすることができる。ある態様においては、コンジュゲート化合物を術中スプレーとして適用し、次いで光照射して、GCC発現細胞に結合している化合物を活性化する。

【0167】

ある態様において、光力学的物質は発蛍光団またはポルフィリン類である。ポルフィリンの例には、ヘマトポルフィリン誘導体(HPD)およびポルフィマーナトリウム(porphimer sodium)(Photofrin;登録商標)が含まれる。第2世代の感光剤はBPDベルテポルフィン(verteporfin)である。ある態様において、発蛍光団はテトラメチルロタミンである。レーザーは一般にポルフィリンを活性化するのに用いられる主な光源である。発光ダイオード(LED)および蛍光光源も場合により用いられる。

【0168】

ある態様においては、光力学的物質をGCCのN末端でGCC結合させる。

術中スプレーのほか、コンジュゲート化合物をクモ膜下(髄腔内)、脳室内、定位(stereotactically)、肝内(たとえば門脈を経て)、吸入により、および胸膜内に投与できる。

【0169】

胃癌または食道癌の細胞全般をターゲティングした薬物運搬

本発明の他の態様は、GCCを含む細胞、たとえば原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞へ療法薬を運搬するGCCリガンドを含む非コンジュゲート組成物およびコンジュゲート組成物に関する。ある態様において、療法薬は薬物または毒素、たとえば下記のものである:メトトレキセート、ドキソルビシン、ダウノルビシン、シトシンアラビノシド、エトポシド、5-フルオロウラシル、メルファラン、クロラムブシル、シスプラチン、ビンデシン、マイトマイシン、ブレオマイシン、ピューロチオニン、マクロモマイシン、1,4-ベ

ンゾキノン誘導体、トレニモン、リシン、リシンA鎖、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素、クロストリジウム・パーフリンジェンスホスホリパーゼC、ウシ膵臓リボヌクレアーゼ、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、アブリン、アブリンA鎖、コブラ毒因子、ゲロニン、サポリン、モデッシン、ビスキュミン、ボルケンシン、アルカリ性ホスファターゼ、ニトロイミダゾール、メトロニダゾールおよびミソニダゾール。遺伝子材料を癌細胞へ運搬して、免疫系がターゲティングしうる抗原を産生させ、あるいは細胞を死滅させるかまたはその増殖を阻害するタンパク質を産生させる。ある態様においては、GCCリガンドを用いて、欠損している内因性遺伝子の代替となる核酸分子をコードする核酸または療法タンパク質をコードする核酸を運搬する。ある態様においては、本発明の組成物を遺伝子療法プロトコルに使用し、遺伝子欠損の補充に必要および/または望まれる遺伝子材料を個体へ運搬する。

【0170】

ある態様においては、GCCリガンドを運搬ビヒクルと結合させ、またはそれに取り込ませ、これによりその運搬ビヒクルを特異的ターゲティング運搬ビヒクルに変換する。たとえばGCC結合ペプチドをウイルス粒子の外部に組み込ませ、そのウイルスをGCC保有細胞特異的ウイルスにすることができる。同様に、ウイルスのコートタンパク質が活性GCC結合ペプチドを含有する融合タンパク質として産生され、これがウイルス粒子の外側に露出するかまたは他の形で接近可能となるように工学的に処理し、これによりそのウイルスをGCC保有細胞特異的ウイルスにすることもできる。ある態様においては、GCCリガンドをリボソームに組込ませ、または他の形で取り込ませ、その際GCCリガンドがリボソームの外側に露出するかまたは他の形で接近可能となり、これによりそのリボソームをGCC保有細胞へ特異的にターゲティングさせることもできる。

【0171】

本発明のこの態様におけるコンジュゲート組成物または非コンジュゲート組成物中の有効物質は、薬物、毒素または核酸分子である。核酸はRNAまたは好ましくはDNAである。ある態様において核酸分子は、細胞中に存在すると望ましくないタンパク質の産生が阻害されるアンチセンス分子であるか、あるいはその

アンチセンス配列をコードする。ある態様において核酸分子は、細胞中に存在すると望ましくないタンパク質の産生が阻害されるリボザイムをコードする。ある態様において核酸分子は、細胞において産生されるのが望ましいタンパク質またはペプチドをコードする。ある態様において核酸分子は、ターゲティングした細胞中で欠失している遺伝子の機能性コピーをコードする。核酸分子は、細胞におけるコード配列発現に必要な調節エレメントに機能可能な状態で結合していることが好ましい。

【0172】

リボソームは脂質からなる小胞である。GCC保有細胞において発現するのが望まれるタンパク質をコードする遺伝子構築体を、これらの小胞の中心に導入する。この小胞の外殻がGCCリガンドを含む。Liposomes, Vol. 1, 2, 3, CRC Press社, フロリダ州Boca Raton (本明細書に援用する) には、外殻に抗体を含有するリボソーム封入有効物質の調製が示されている。本発明においては、GCCリガンド、たとえば抗GCC抗体を外殻と結合させる。内側の有効物質と共にGCCリガンドをリボソームのマトリックス中に含む非コンジュゲート組成物には、GCCリガンドが好ましくは抗体である組成物が含まれる。

【0173】

ある態様においては、癌細胞への正常コピー数のp53腫瘍サプレッサー遺伝子の運搬が、GCCリガンドを用いてこの遺伝子療法薬をターゲティングさせることにより達成される。p53腫瘍サプレッサー遺伝子の変異は、多くの癌の発症に主要な役割を果たすと思われる。この疾患を克服する方法のひとつは、変異型のこの遺伝子を発現している癌細胞へ正常コピー数のこの遺伝子を運搬するものである。正常なp53腫瘍サプレッサー遺伝子を含む遺伝子構築体を、GCCリガンドを含むリボソームに取り込ませる。この組成物は腫瘍へ運搬される。GCCリガンドは正常遺伝子を含有するリボソームを特異的にターゲティングおよび方向づけして、p53腫瘍サプレッサー遺伝子の変異により生じた病変を補正する。遺伝子構築体の作製は当業者が容易になしうる。本発明によれば、本発明のGCCリガンドを用いることにより、そのような構築体を特異的にターゲティ

ングさせることができる。本発明の組成物は、運搬ビヒクルと結合したGCCリガンド、たとえば抗GCC抗体、および腸管の細胞において産生することが望まれるタンパク質のコード配列がその細胞における発現に必要な調節配列に結合した遺伝子構築体を含む。腸管の細胞が取り込むためには、組成物を経口または浣腸により投与する。これにより組成物は腸管に進入し、GCCを含む細胞と接触する。運搬ビヒクルはGCCリガンドによりGCCと結合し、ビヒクルが細胞にインターナリゼーションされ、あるいは他の形で有効物質 / 遺伝子構築体が細胞に取り込まれる。インターナリゼーションされると、構築体はその個体に療法効果をもたらすことができる。

【0174】

アンチセンス

本発明は、アンチセンス化合物を胃癌または食道癌の細胞へ特異的に運搬し、これにより望ましくない遺伝子発現が起きている細胞における遺伝子発現を停止させ、そのような発現が起きていない細胞には不都合な影響を及ぼさない手段を提供することにより胃癌または食道癌の細胞を予防および治療するのに有用な、組成物、キットおよび方法を提供する。

【0175】

本発明のコンジュゲート組成物は、胃癌または食道癌の細胞を含めたGCC発現細胞をターゲティングするのに有用である。本発明のコンジュゲート組成物は非結腸直腸由来の細胞には結合しない。GCCを含まない非結腸直腸細胞は、本発明のコンジュゲート組成物を取り込まない。正常な結腸直腸細胞はGCCを含み、本発明組成物を取り込むであろう。本発明は、アンチセンス組成物を胃癌または食道癌の細胞へ運搬する組成物および方法を提供する。

【0176】

本発明は、正常および癌性の結腸直腸細胞ならびに原発性および / または転移性の胃癌または食道癌の細胞を化合物の有効部分に曝露し、それらの細胞のみがコンジュゲート化合物により影響される、細胞特異的方法を提供する。GCC結合部分は正常および癌性の結腸直腸細胞ならびに原発性および / または転移性の胃癌または食道癌の細胞に結合する。コンジュゲート化合物がこれらの細胞に結

合するとインターナリゼーションされ、分子のアンチセンス部分を含めたコンジュゲート化合物の運搬が行われる。正常な結腸直腸細胞中にコンジュゲート化合物が存在してもそれらの細胞には影響を与えない。コンジュゲート化合物の有効部分を構成するアンチセンス分子が相補的である癌関連遺伝子は、発現していないからである。しかし結腸直腸癌細胞の場合、コンジュゲート化合物の有効部分を構成するアンチセンス分子が相補的である癌遺伝子が発現している。結腸直腸癌細胞中にコンジュゲート化合物が存在すると、癌細胞の転写または翻訳を阻害または阻止する作用をし、トンラスフォームした表現型はこれにより減少し、または排除される。

【0177】

本発明を利用して、原発性および/または転移性の結腸直腸癌、胃癌または食道癌を克服し、正常な結腸細胞中にトンラスフォームした表現型が出現するのを阻止できる。したがって本発明は治療にも予防にも利用できる。

【0178】

当業者は、胃癌または食道癌に罹患している疑いがある個体を容易に同定できる。胃癌または食道癌を伴うと診断された個体において、転移を疑い、転移細胞の根絶を積極的に試みるのは標準療法である。本発明は、原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞を特異的にターゲティングおよび排除するための医薬組成物および方法を提供する。さらに本発明は、原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞を特異的に排除するための療法薬を含む医薬組成物および方法を提供する。

【0179】

本発明は、コンジュゲート組成物中にGCC結合部分を使用することに依存する。GCC生成物結合部分は本質的にコンジュゲート組成物の一部であり、GCCに対するリガンドとして作用し、したがってこれらの受容体の特異的に結合する。コンジュゲート組成物は、GCC結合部分と結合した有効部分をも含有する；有効部分は、その発現が癌に関連する遺伝子の転写または翻訳による発現を阻害または阻止するのに有用なアンチセンス組成物である。

【0180】

本発明によれば、有効部分はアンチセンス組成物である。特に、コンジュゲート化合物の有効部分を構成するアンチセンス分子は胃癌または食道癌の細胞のDNAまたはRNAにハイブリダイズし、そのDNAまたはRNAの転写または翻訳が起きるのを阻害および/または阻止する。アンチセンス組成物は核酸分子、その誘導体または類似体であってよい。アンチセンス組成物の化学的性質は、発現を阻害または他の形で阻止すべきDNAまたはRNAに相補的な、核酸分子もしくは修飾核酸分子、またはDNAまたはRNA分子を模倣した官能基をもつ非核酸分子がもつ性質であってよい。アンチセンス組成物は、その発現が胃癌または食道癌に関係する遺伝子、すなわち癌関連遺伝子の転写または翻訳を阻害または阻止する。

【0181】

点変異の挿入、およびK-rasおよびH-rasの欠失が多くの腫瘍において同定されている。癌遺伝子HER-2/ERBB-2、HER-1/ERBB-1、HRAS-1、C-MYCおよび抗-癌遺伝子p53、RB1の変化の特性は複雑である。

【0182】

ラットモデルにおける化学的発癌により、転写調節および増殖を仲介する癌遺伝子fosにおける点変異が証明された。参照：Alexander, R J, et al., N-メチル-N-ニトロソ尿素により誘導されたラット結腸腫瘍における癌遺伝子変化, American Journal of the Medical Sciences, 303(1):16-24, 1992, 1月; これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

【0183】

ラットモデルにおける化学的発癌により、癌遺伝子ablにおける点変異が証明された。参照：Alexander, R J, et al., N-メチル-N-ニトロソ尿素により誘導されたラット結腸腫瘍における癌遺伝子変化, American Journal of the Medical Sciences, 303(1):16-24, 1992年1月。

【0184】

MYCは、転写および増殖の調節において役割をもつ癌遺伝子である。mycに対するエキソンIIの翻訳開始領域に相補的な15塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドを、結腸直腸癌細胞と共にインキュベートした。このアンチセンス分子は結腸直腸癌細胞の増殖をdos依存性様式で阻害した。興味深いことに、このオリゴヌクレオチドの取込みは低かった(0.7%)。正常な第5染色体を結腸直腸癌細胞に移した場合もmyc発現が調節され、増殖が低下した。これらのデータは、mycの調節に重要な腫瘍サプレッサー遺伝子がこの染色体に含まれることを示唆する。

【0185】

新規タンパク質チロシンホスファターゼG1が同定された。結腸直腸腫瘍細胞においてこのタンパク質をコードするmRNAの検査により、これはこれらの細胞において点変異および欠失を受け、これらの細胞の増殖特性において役割をもつ可能性があることが明らかになった。Takekawa, M., et al., タンパク質チロシンホスファターゼG1遺伝子の染色体位置決定およびヒト結腸癌細胞における異常転写体の特性解明, F E B S Letters, 339(3): 222-8, 1994年2月21日;これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

【0186】

ガストリンは、PKAが仲介するサイクリックAMP依存性機序により、結腸癌細胞の増殖を調節する。特定のクラスのPKAの調節サブユニットに対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドが、結腸癌細胞においてサイクリックAMPの増殖促進作用を阻害した。参照: Bold, R J, et al., ヒト結腸癌の実験的遺伝子療法, Surgery, 116(2): 189-95; 考察195-6, 1994年8月、およびYokozaki, H., et al., サイクリックAMP依存性プロテインキナーゼのRIアルファサブユニットを欠如するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドはヒト癌細胞の増殖阻害を誘発する, Cancer Research, 53(4): 868-72, 1993年2月15日;これら両者を本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考

文献も本明細書に援用する。

【0187】

CRIPTOは大部分の結腸直腸癌腫瘍において発現する上皮増殖因子関連遺伝子である。CRIPTO mRNAの5'末端に対するアンチセンスホスホリチオエートオリゴデオキシヌクレオチドは、インビトロおよびインビボでCRIPTO発現を有意に低下させ、結腸直腸腫瘍細胞の増殖を阻害した。Ciardello, F., et al., アンチセンスRNAおよびオリゴデオキシヌクレオチドによるヒト結腸癌細胞におけるCRIPTO発現および腫瘍形成性の阻害, *Oncogene*, 9(1): 291-8, 1994年1月; これら両者を本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

【0188】

多くの癌細胞がトランスフォーミング増殖因子アルファを分泌する。TGF α mRNAに対する23ヌクレオチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、結腸直腸癌細胞のDNA合成および増殖の両方を阻害した。Sizeland, AM, Burgess, AW, アンチセンストランスフォーミング増殖因子アルファオリゴヌクレオチドはオートクリン刺激による結腸直腸癌細胞系の増殖を阻害する, *Molecular Biology of the Cell*, 3(11): 1235-43, 1992年11月; これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

【0189】

オリゴヌクレオチド、その誘導体および類似体を含めたアンチセンス組成物、コンジュゲーションプロトコル、ならびに転写および翻訳の阻害のためのアンチセンス方式は、全般的に下記に記載されている; *Antisense Research and Applications*, Crooke, S. and B. Lebleu編, CRC Press社, フロリダ州Boca Raton, 1993; *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Blackburn, G. and M.J. Gait編, IRL Press, Oxford University Press社, ニュー

ヨーク, 1990; および *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Eckstein, F. 編, IRL Press 社, Oxford University Press 社, ニューヨーク, 1991; これらをそれぞれ本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

【0190】

本発明のアンチセンス分子は、結腸直腸癌遺伝子のフラグメントに相補的な配列を含む。参照: Ulrich et al., EMBO J., 1986, 5: 2503; これを本明細書に援用する。

【0191】

本発明のコンジュゲート組成物中の有効部分を構成することができるアンチセンス組成物には、ホモピリミジン類から形成されるオリゴヌクレオチドが含まれる; これはDNA二重らせんの主溝中のホモプリンの局部伸長を認識してこれらに結合し、三重らせんを形成する。参照: Helen, C. and Toulme, J. J., アンチセンス、センスおよび抗遺伝子核酸による特異的な遺伝子発現調節, Biochem. Biophys. Acta, 1049: 99-125, 1990; これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。三重らせんの形成は、その遺伝子がRNAポリメラーゼにより転写を受ける能力を妨害するであろう。myc 特異的オリゴヌクレオチドを用いて三重らせん形成が観察された。参照: Cooney, M., et al., Science, 241: 456-459; これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

【0192】

イントロンとエキソンの境界にある配列に相補的なDNAまたはRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、それらの遺伝子の新たに生成する核RNA転写体が転写のためにmRNAに成熟するのを阻止することができる。

【0193】

特定の遺伝子に相補的なアンチセンスRNAは、tat 遺伝子に対するmRNAとハイブリダイズしてその翻訳を阻止できる。アンチセンスRNAを、インビ

トロ合成した”そのまま使用できる”RNAとして細胞に供給してもよく、あるいは細胞中へ安定に形質転換したアンチセンス遺伝子として供給し、これが転写に際してアンチセンスRNAを生成してもよい。mRNAとのハイブリダイゼーションの結果、ハイブリダイズした分子がRNase Hで分解され、および/または翻訳複合体の形成が阻害される。いずれの場合も本来の遺伝子の生成物を産生できない。

【0194】

DNAまたはRNAのアンチセンス配列を細胞へ運搬できる。これらの分子が特異的配列を認識する能力を損なうことなく、その安定性を延長し、機能を改善するために、幾つかの化学修飾が開発された。これらには下記のものが含まれる：DNaseによる分解に対するそれらの抵抗性を高めること：ホスホトリエステル、メチルホスホナート、ホスホロチオエート、アルファ-アノマーが含まれる；種々のインターカレーション剤、たとえばプソラレン(pсорален)類への共有結合によりターゲットに対するそれらの親和性を高めること；およびポリリシンを含めた種々の基へのコンジュゲーションにより細胞による取込みを高めること。これらの分子は、mRNA中にコードされる特異的配列を認識し、それらのハイブリダイゼーションにより翻訳を阻止し、これらのメッセージの破壊を増加させる。

【0195】

本発明のコンジュゲート組成物は、新生トランスフォーメーションを引き起こす遺伝子の発現を終止させるための特異的かつ有効な手段を提供する。GCCはリガンド誘発性エンドサイトーシスを受け、コンジュゲート化合物を細胞の細胞質へ運搬できる。

【0196】

GCC結合部分は、アンチセンス組成物、たとえば応答誘発活性をもつ核酸に直接コンジュゲートする。たとえばMYCに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、抗GCC抗体に直接コンジュゲートする。CD4受容体に結合するペプチドを用いてこれが実施された。参照：Cohen, JR編, Oligodeoxynucleotides : Antisense Inhibitors

of Gene Expression. Topics in Molecular and Structural Biology, CRC Press社, Boca Raton, 1989;これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。正確な主鎖およびその合成は特定されておらず、十分に確立した技術から選択できる。合成には化学的コンジュゲーション、またはFMO C化学を用いる固相合成によるキメラ分子の直接合成を伴う。参照: Haralambidis, J., et al. (1987) Tetrahedron Lett., 28: 5199 - 5202;これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。あるいはペプチド - ペプチド核酸コンジュゲートを、固相合成によるペプチド - 核酸キメラとして、固相合成により直接合成できる。Nielsen, PE, et al. (1994), DNA鋳型鎖に結合したペプチド核酸による配列特異的転写停止, Gene, 149: 139 - 145;これを本明細書に援用し、そこに引用されたすべての参考文献も本明細書に援用する。

【0197】

ある態様においては、ポリリシンを核酸への非共有結合様式で本発明のコンジュゲート組成物に複合体形成させ、細胞の細胞質へのこれらの分子の運搬を高めるのに使用できる。さらに、ペプチドおよびタンパク質をポリリシンに共有結合様式でコンジュゲートさせ、このコンジュゲートを複合体非共有結合様式で核酸と複合体形成させて、特異性および細胞への核酸の取込み効率をさらに高めることができる。このように、確立した方法でGCCリガンドをポリリシンに化学的にコンジュゲートさせる。ポリリシン - GCC - 1 翻訳生成物リガンドコンジュゲートを任意の核酸と複合体形成させることができる。たとえば、ポリリシン - オロソムコイドコンジュゲートを用いて、オロソムコイド受容体を発現している肝癌細胞に遺伝子含有プラスミドを特異的に発現させた。この方法を用いて全遺伝子またはオリゴヌクレオチドを運搬できる。たとえば、これは望ましくない遺伝子(たとえばMYC、ras)の発現を終止させ、あるいは喪失または欠失した遺伝子(たとえばhMSH2、hMLH1、hPMS1およびhPMS2)の機能を代替する可能性をもつ。

【0198】

好ましい態様によれば、Mycはコンジュゲート組成物中のアンチセンス分子により発現が阻害される遺伝子として作用する。GCC結合部分は、エキソンIの翻訳開始領域に相補的な15塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドをmycへ運搬するために用いられる。MYCに対する15塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドはCollins, JF, Herman, P, Schuch, C, Bagby, GC, Jr., Journal of Clinical Investigation, 89(5):1523-7, 1999年5月の報告に従って合成される。ある態様においては、先に報告されたようにコンジュゲート組成物をポリリシンにコンジュゲートさせる。Wu, GY and Wu, CH(1988), インビトロでのHepG2肝癌細胞へのed遺伝子運搬の証明, Biochem. 27:887-892;これを本明細書に援用する。

【0199】

コンジュゲート組成物を、キメラ分子として固相合成により直接合成できる。ピコモルまたはナノモル濃度のこのコンジュゲートがインビトロで結腸直腸細胞においてMYC合成を抑制する。

【0200】

アンチセンス分子は、好ましくは長さ5～50ヌクレオチド、より好ましくは5～25ヌクレオチド、ある態様においては10～15ヌクレオチドのヌクレオチド配列にハイブリダイズする、すなわち相補的である。

【0201】

さらに、本発明方法を達成する前記において同定した配列内の不適正塩基対であって、その不適正塩基対配列が癌遺伝子配列に実質的に相補的なものも、本発明の範囲内であるとみなされる。癌遺伝子配列に対する実質的相補性をもたらす不適正塩基対は、本発明の開示によれば当業者に自明であろう。これらのオリゴ体を修飾してもよく、修飾しなくてもよい。

【0202】

胃癌または食道癌が局在および/または転移している場合、療法用の組成物および方法を用いてそれらの癌を克服できる。個体に療法有効量のコンジュゲート

化合物を投与する。療法有効量は、その個体に致死的な副作用を与えることなく癌細胞に細胞毒性または細胞分裂抑制作用を及ぼすのに有効な量である。療法有効量のコンジュゲート組成物を投与された個体は、療法有効量を投与されなかった個体がもつリスクと比較して、胃癌または食道癌を排除する機会が増す。

【0203】

局在性の胃癌または食道癌を処置するために、療法有効量のコンジュゲート組成物をその局在性腫瘍と接触するように投与する。たとえばコンジュゲート化合物を経口または腫瘍内投与できる。経口用または直腸用の製剤は Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, 1990, Mack Publishing 社, ペンシルベニア州イーストンに記載されており、これを本明細書に援用する。

【0204】

本発明による医薬組成物は、1回量または多数回量として投与できる。本発明の医薬組成物は、個々の療法薬として、または他の療法薬と組み合わせて投与できる。本発明の療法薬を通常の療法と組み合わせて、逐次または同時に投与できる。

【0205】

本発明は、哺乳動物においてアンチセンス化合物を正常および癌性の結腸直腸細胞、ならびに胃癌または食道癌の細胞へ運搬し、癌遺伝子の発現を阻害する方法に関する。本方法は、癌細胞のDNAまたはmRNAのある領域に相補的な配列をもつアンチセンスオリゴヌクレオチドにコンジュゲートしたGCC結合部分を含む有効量のコンジュゲート組成物を、哺乳動物に投与することを含む。

【0206】

コンジュゲート化合物を、意図する投与経路および標準的医療に関して選択した医薬的に許容できるキャリアーとの混合物として哺乳動物に投与できる。投与量は、患者の体重および臨床状態との関連で設定される。本発明のコンジュゲート組成物は、哺乳動物が未分化細胞および/または異常な表現型の細胞を含まなくなるのに十分な期間投与される。療法においては、トランスフォームした細胞が増殖するのを阻害するのに十分な期間治療を延長し、患者の癌を処置および克

服するためにコンジュゲート組成物を他の化学療法薬と組み合わせて投与してもよい。

【0207】

本発明のコンジュゲート化合物を単独で、または他の化合物と組み合わせて本発明方法に使用できる。投与量は、同様に患者の年齢、体重および臨床状態などの要因に依存するであろう。参照：Gennaro, Alfonso編, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, 1990, Mack Publishing社, ペンシルベニア州イーストン。

【0208】

治療用および予防用ワクチン

本発明は、原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞に対して個体を保護するための、ならびに原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞をもつ個体を治療するための、予防用および治療用ワクチンに関する。

【0209】

本発明によれば、GCCはそれに対する防御または治療のための免疫応答を誘発しうるターゲットとして作用する。具体的には、GCCに対する免疫応答を誘発するワクチンを提供する。本発明には下記のワクチン技術が含まれるが、これらに限定されない：

1) DNAワクチン、すなわちGCC由来の少なくとも1つのエピトープをコードするDNAを個体の細胞に投与し、そこでエピトープが発現し、免疫応答のターゲットとして作用する；

2) 感染性ベクター仲介ワクチン、たとえば組換えアデノウイルス、ワクシニア、サルモネラ (Salmonella) およびBCG；これらにおいて、ベクターはGCCタンパク質由来の少なくとも1つのエピトープをコードする遺伝子情報を保有し、したがって感染性ベクターが個体に投与されるとエピトープが発現し、免疫応答のターゲットとして作用する；

3) 死細胞または不活化ワクチン；a) GCCタンパク質由来の少なくとも1つのエピトープを提示する死細胞または不活化したウイルス粒子を含み、そして

b) 個体に投与された際に免疫応答のターゲットとして作用する；

4) ハプテン化した死細胞または不活化ワクチン； a) G C C タンパク質由来の少なくとも1つのエピトープを提示する死細胞または不活化したウイルス粒子を含み、 b) 免疫原性を高めるためにハプテン化され、そして c) 個体に投与された際に免疫応答のターゲットとして作用する；

5) サブユニットワクチン、すなわち G C C タンパク質由来の少なくとも1つのエピトープを含むタンパク質分子を含有するワクチン；ならびに

6) ハプテン化したサブユニットワクチン； a) G C C タンパク質由来の少なくとも1つのエピトープを含むタンパク質分子を含有し、かつ b) 免疫原性を高めるためにハプテン化されている。

【0210】

本発明は、それに対する治療用および予防用免疫応答を誘発しうる免疫原エピトープを含むタンパク質またはコードする核酸分子を個体に投与することに関する。それらのエピトープは、一般に少なくとも6～8アミノ酸の長さである。したがって本発明のワクチンは、G C C タンパク質由来の少なくとも6～8アミノ酸の長さのタンパク質、またはそれをコードする核酸を含む。本発明のワクチンは、少なくとも10～1000アミノ酸の長さのタンパク質、またはそれをコードする核酸を含むことができる。本発明のワクチンは、少なくとも25～500アミノ酸の長さのタンパク質、またはそれをコードする核酸を含むことができる。本発明のワクチンは、少なくとも50～400アミノ酸の長さのタンパク質、またはそれをコードする核酸を含むことができる。本発明のワクチンは、少なくとも100～300アミノ酸の長さのタンパク質、またはそれをコードする核酸を含むことができる。

【0211】

本発明は、原発性および/または転移性の胃癌または食道癌の細胞をもつことが分かっている個体を処置するための組成物および方法に関する。原発性および/または転移性の胃癌または食道癌は、当業者が本明細書に記載の方法または当技術分野で受け入れられている臨床および実験室病理学的プロトコルを用いて診断できる。本発明は、原発性および/または転移性の胃癌または食道癌に罹患し

ていると診断された個体の処置に有用な免疫療法ワクチンを提供する。本発明の免疫療法ワクチンは、他の療法と組み合わせて投与できる。

【0212】

本発明は、胃癌または食道癌を発症しやすい疑いがある個体において原発性および/または転移性の胃癌または食道癌を阻止するための組成物および方法に関する。そのような個体には、その家族病歴が家族構成員の胃癌もしくは食道癌の平均発症率より高い個体、および/または既に胃癌もしくは食道癌を発症し、効果的な処置を受け、したがって再発および反復のリスクに直面している個体が含まれる。そのような個体には、胃癌または食道癌（局在性の胃癌または食道癌のみ、または局在性かつ転移性のものが含まれる）を伴うと診断され、切除その他の処置を受けた個体が含まれる。本発明のワクチンは、原発性および転移性の胃癌または食道癌を阻止および克服するために、発症しやすい個体に予防的に投与できる。

【0213】

本発明は、そのようなワクチンの有効成分である組成物または有効成分を構成するのに必要な組成物、有効成分を含有するそのような組成物を製造する方法、ならびにワクチンを製造および使用する方法に関する。

【0214】

G C Cのアミノ酸およびヌクレオチド配列をSEQ ID NO: 1として示す。

本発明は、G C C遺伝子転写体またはそのフラグメントを含む組換えベクター（発現ベクターを含める）に関する。本発明は、G C Cタンパク質またはその機能性フラグメントをコードするヌクレオチド配列を含む組換えベクター（発現ベクターを含める）に関する。

【0215】

本発明は、そのようなベクターを含む宿主細胞、およびそのような組換え細胞を用いてG C Cタンパク質を製造する方法に関する。

本発明は、単離したG C C遺伝子転写体、および単離したG C Cタンパク質、およびそれらのタンパク質に特異的な単離した抗体、およびそれらの抗体を産生

するハイブリドーマに関する。

【0216】

本発明は、単離したGCCおよびその機能性フラグメントに関する。したがって本発明のある態様は、GCCの少なくとも1つのエピトープを含む単離したタンパク質に関する。

【0217】

本発明のある態様は、それらの免疫原性を高めるためにハプテン化された単離した前記タンパク質に関する。すなわち本発明のある態様は、少なくとも1つのGCCエピトープを含むハプテン化されたタンパク質に関する。

【0218】

したがって本発明のある態様は、少なくとも1つのGCCエピトープを含むタンパク質をコードする単離した核酸分子に関する。

裸のDNAワクチンがPCT/US90/01515に記載されており、これを本明細書に援用する。他にはリポソーム仲介DNA伝達、マイクロインジェクティルを用いるDNA運搬(USP4,945,050、1990年7月31日、Sanfordらに発行；これを本明細書に援用する)、およびエレクトロポレーションを用いるDNA運搬の利用が教示されている。それぞれの場合、DNAは細菌において産生され、単離され、処置すべき動物に投与されるプラスミドDNAであってよい。プラスミドDNA分子は動物細胞により取り込まれ、そこで目的タンパク質をコードする配列が発現する。こうして産生されたタンパク質は、その動物に治療または予防効果を与える。

【0219】

治療用および/または予防用の免疫作用を個体に及ぼす核酸分子を個体の細胞へ運搬するための、ウイルスベクターを含めたベクターその他の手段も周知である。ワクシニアウイルスベクターを用いる組換えワクチンは、たとえばUSP5,017,487(1991年5月21日、Stunnenbergらに発行；これを本明細書に援用する)に開示されている。

【0220】

場合により、患者から得た腫瘍細胞を死滅させ、または不活化し、ワクチン製

剤として投与する。Berd et al. , 1986年5月, Cancer Research , 46 : 2572 - 2577、およびBerd et al. , 1991年5月, Cancer Research , 51 : 2731 - 2734 (これらを本明細書に援用する) には、腫瘍細胞ベースのワクチン製剤の製造および使用が記載されている。本発明のある態様によれば、黒色腫細胞の代わりに胃癌または食道癌の細胞を用いて、Berdらの文献に記載された方法および技術を適用する。

【0221】

たとえば実験用試薬またはサブユニットワクチンの成分として有用な単離した翻訳生成物およびそのフラグメントの製造および使用は周知である。当業者は、GCC遺伝子転写体、またはGCCもしくはそのフラグメントをコードするその特異的部分を単離できる。単離すると、標準法および容易に入手できる出発物質を用いて、その核酸分子を発現ベクターに挿入できる。

【0222】

組換え発現ベクターは、GCCもしくはそのフラグメントをコードする核酸分子をコードするかまたはGCCもしくはそのフラグメントを含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。本発明の組換え発現ベクターは、宿主を形質転換して、本発明の単離タンパク質を製造するための組換え発現系を作製するのに有用である。

【0223】

本発明は、GCCタンパク質もしくはそのフラグメントをコードするかまたはGCCもしくはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含有する組換え発現ベクターを含む宿主細胞に関する。タンパク質産生のために周知の組換え発現系に用いる宿主細胞は周知であり、容易に入手できる。宿主細胞の例には、細菌細胞、たとえば大腸菌 (E. coli)、酵母細胞、たとえばサッカロミセス・セレビシエ (S. cerevisiae)、昆虫細胞、たとえばS. frugiperda、ヒト以外の哺乳動物の組織培養細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、およびヒト組織培養細胞、たとえばHeLa細胞が含まれる。

【0224】

本発明は、本発明のタンパク質をコードする核酸配列を含む組換え発現ベクターを含む、ヒト以外のトランスジェニック哺乳動物に関する。組換えタンパク質の産生に有用なヒト以外のトランスジェニック哺乳動物は周知であり、トランスジェニック動物の作製に必要な発現ベクターおよび技術も周知である。一般にトランスジェニック動物は、GCCもしくはそのフラグメントをコードするかまたはGCCもしくはそのフラグメントを含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列が哺乳動物細胞特異的プロモーターに機能可能な状態で結合した組換え発現ベクターを含む。これによりコード配列は哺乳動物細胞においてのみ発現し、こうして発現した組換えタンパク質を動物の乳汁から回収する。

【0225】

ある態様においてたとえば、当業者は周知の技術を用いてそのようなDNA分子を、本明細書に記載するような周知の発現系に用いる市販の発現ベクターに挿入することができる。

【0226】

GCCもしくはその機能性フラグメントをコードするかまたはGCCもしくはその機能性フラグメントを含むタンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターを用いて、適合する宿主を形質転換し、次いでこの外来DNAの発現が起きる条件下で宿主を培養および維持する。こうして産生された本発明のタンパク質を、適宜、当業者に既知のとおり培養物から細胞溶解により、または培地から回収する。GCCもしくはそのフラグメントまたはそれを含むタンパク質を、そのタンパク質に特異的に結合する抗体を用いて精製する方法は周知である。特定のタンパク質に特異的に結合する抗体を用いて、周知の技術および容易に入手できる出発物質により、天然源からこのタンパク質を精製できる。そのような抗体を用いて、組換えDNA法によりタンパク質を製造する際に得られる材料からこのタンパク質を精製することもできる。本発明は、1又はそれより多くのGCC-1翻訳生成物もしくはそのフラグメントまたはそれを含むタンパク質上に存在するエピトープに結合する抗体に関する。GCC上に存在するエピトープに結合する抗体は、アフィニティークロマトグラフィーなど周知の方法でこのタンパク

質を天然源または組換え発現系のいずれから単離および精製するのにも有用である。免疫アフィニティー法は、一般にWaldman et al., 1991, Methods of Enzymol., 195:391-396に記載されており、これを本明細書に援用する。抗体は、試料中のそのようなタンパク質の存在を検出し、細胞がそのタンパク質を発現しているかどうかを判定するのに有用である。抗体の調製、ならびに完全無傷の抗体、FabフラグメントおよびF(ab)₂フラグメントのタンパク質構造、ならびにそのような分子をコードする遺伝子配列の組立ては周知であり、たとえばHarlow, E. and D. Lane (1988) ANTIBODIES: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバーに記載されており、これを本明細書に援用する。

【0227】

本発明のある態様においては、ヒト以外のトランスジェニック動物を作製する。本発明によるトランスジェニック動物は、GCCもしくはそのフラグメントまたはそれを含むタンパク質をコードするヌクレオチドを、哺乳動物特異的プロモーターの調節制御下に含む。当業者は、標準法、たとえばUSP 4,873,191 (1989年10月10日、Wagnerに発行)およびUSP 4,736,866 (1988年4月12日、Lederに発行) (両者を本明細書に援用する)に教示される方法を用いて、GCCもしくはそのフラグメントまたはそれを含むタンパク質を産生するトランスジェニック動物を作製できる。好ましい動物はヤギおよびげっ歯類、特にラットおよびマウスである。

【0228】

これらのタンパク質を組換え法で製造するほか、自動ペプチド合成装置を用いてGCCもしくはそのフラグメント(もしくはそのフラグメント)またはそれを含むタンパク質を製造することもできる。そのような技術は当業者に周知であり、置換基をもつ誘導体がDNAコードによるタンパク質産生では得られない場合には有用である。

【0229】

ある態様において、サブユニットワクチンを構成するタンパク質、または死細胞もしくは不活化ワクチンの細胞もしくは粒子をハプテン化して、免疫原性を高めることができる。場合により、ハプテン化は、GCCもしくはそのフラグメントまたはそれを含むタンパク質に、より大きな分子構造体をコンジュゲーションするものである。場合により、有効なワクチン製剤を製造する手段として患者から得た腫瘍細胞を死滅させてハプテン化する。GCCもしくはそのフラグメントまたはそれを含むタンパク質を形成および表示する遺伝子情報を付与した他の細胞、たとえば細菌または真核細胞を死滅させ、有効ワクチン成分として用いる場合、それらの細胞をハプテン化して免疫原性を高める。ハプテン化は周知であり、容易に実施できる。

【0230】

細胞全般、特に腫瘍細胞のハプテン化方法は、Berd et al. , 1986年5月, Cancer Research , 46:2572-2577、およびBerd et al. , 1991年5月, Cancer Research , 51:2731-2734に記載されており、これを本明細書に援用する。他のハプテン化プロトコルはMiller et al. , 1976, J. Immunol. , 117(5:1):1591-1526に示されている。

【0231】

本発明によるハプテン化したGCC免疫原の製造に用いるのに適したハプテン化組成物および方法には、下記の米国特許に記載されるものが含まれ、これらをそれぞれ本明細書に援用する：USP 5,037,645(1991年8月6日, Strahilevitzに発行)；USP 5,112,606(1992年5月12日, Shiosakaraに発行)；USP 4,526,716(1985年7月2日, Stevensに発行)；USP 4,329,281(1982年5月11日, Christensonらに発行)；およびUSP 4,022,878(1977年5月10日, Grossに発行)。ペプチドワクチン、および本発明のGCC免疫原の修飾に適用できるペプチド免疫原性増強方法も、Francis et al. , 1989, Methods of Enzymol. , 178:659-676に記載されており、これを本明細書に援用する。S

ad et al. , 1992 , Immunology , 76 : 599 - 603 (本明細書に援用する) には、ゴナドトロピン放出ホルモンをジフテリアトキソイドにコンジュゲートすることによる免疫療法ワクチンの製造方法が教示されている。GCC免疫原を同様にコンジュゲートさせて、本発明の免疫療法ワクチンを製造できる。MacLean et al. , 1993 , Cancer Immunolo. Immunother. , 36 : 215 - 222 (本明細書に援用する) には、免疫療法ワクチンを製造するためのコンジュゲーション法が記載されており、これを本発明の免疫療法ワクチンの製造に適用できる。ハプテンはキーホールリンペットヘモシアニンであり、これをGCC免疫原にコンジュゲートさせることができる。

【0232】

本発明のある態様によるワクチンは、GCC免疫原と共に医薬的に許容できるキャリアーを含む。医薬配合物は周知であり、そのようなタンパク質を含む医薬組成物は当業者がルーティンに配合できる。医薬的に許容できる適切なキャリアーは、この分野の標準参考文献であるRemington's Pharmaceutical Sciences , A. Osolに記載されており、これを本明細書に援用する。本発明は、医薬的に許容できるキャリアーおよびGCC免疫原を含む注射用医薬組成物に関する。GCC免疫原は、好ましくは無菌であり、無菌の医薬キャリアーと混和される。

【0233】

たとえばある態様においては、GCCもしくはそのフラグメント（もしくはそのフラグメント）またはそれを含むタンパク質を、医薬的に許容できるビヒクルと一緒に液剤、懸濁液剤、乳剤または凍結乾燥粉末として配合できる。そのようなビヒクルの例は、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンである。リポソームおよび非水性ビヒクル、たとえば固定油も使用できる。ビヒクルまたは凍結乾燥粉末は、等張性を維持する添加剤（たとえば塩化ナトリウム、マンニトール）および化学的安定性を維持する添加剤（たとえば緩衝剤および保存薬）を含有してもよい。配合物は常法により滅菌される。

【0234】

注射用組成物は、GCC免疫原を希釈剤、たとえば無菌水、電解質/デキストロース、植物性脂肪油、脂肪エステル、またはポリオール、たとえばプロピレングリコールおよびポリエチレングリコール中に含むことができる。注射剤は無菌でありかつ発熱物質を含まないものでなければならない。

【0235】

本発明のワクチンは、認識および免疫原応答誘発のために免疫原物質を身体の免疫系に提示しうる任意の手段で投与できる。医薬組成物を非経口的に、すなわち静脈内、皮下、筋肉内に投与できる。

【0236】

投与量は、各物質の薬力学的特性、ならびにその投与様式および経路；レシピエントの年齢、健康状態および体重；症状の性質および程度、併用処置の種類、処置の頻度、ならびに目的とする効果など、既知の要因に応じて異なるであろう。防御または療法に有効な免疫応答を誘発する量の免疫原を運搬させる。当業者はその範囲および最適投与量をルーティン方法で容易に決定できる。

【0237】

以下の実施例は説明のためのものであり、本発明を限定するためのものではない。

【0238】

実施例

前記のように、GCC結合部分はGCCリガンドであり、抗体、タンパク質、ポリペプチド、ペプチドまたは非ペプチドであってよい。ペプチドおよび非ペプチドGCCリガンドは周知の技術で同定できる。

【0239】

この10年で、受容体とリガンド、たとえばGCCと抗GCC抗体の特異的な高親和性相互作用は、リガンドの三次元コンホメーション空間、およびリガンド結合に関与する分子領域の相補的三次元立体配置に基づくことが認められるようになった。さらに、多様な天然アミノ酸、非天然アミノ酸および有機分子のアレイを、直線構造は天然リガンドに関係ないがコンホメーション空間が天然リガン

ドの三次元構造に似た立体配置にオーガナイズでき、したがって高い親和性および特異性で受容体が認識することが認められるようになった。さらに、当業者がこれらの天然アミノ酸、非天然アミノ酸および有機化合物のアレイの大規模ライブラリーを形成し、受容体の天然リガンドと無関係であるがその受容体と高い親和性および特異性で相互作用する各化合物を予想同定しうる技術が文献に記載されている。したがって、GCC抗体と構造的には関係がないがGCCに特異的かつ緊密に結合しうる天然アミノ酸、非天然アミノ酸または有機化合物のアレイを当業者が同定するのは比較的容易な作業である。

【0240】

ペプチドであるGCCリガンドを同定するために、当業者はランダムペプチドライブラリーをスクリーニングするためのいずれか周知の方法を、GCCに結合するペプチドの同定に使用できる。最も基本的な方法においては、ターゲットに結合するペプチドを単離して配列決定する。ある方法では、各ランダムペプチドを、そのランダムペプチドのコード配列を含む核酸分子に結合させる。それぞれコード配列が結合したランダムペプチドをGCCと接触させ、GCCに結合していないペプチドを除去する。次いで、このGCCに結合したペプチドのコード配列を含む核酸分子を用いてそのペプチドのアミノ酸配列を決定し、そのペプチドを大量に製造する。固体支持体上にペプチドライブラリーを調製することもでき、その際、支持体上の空間位置は特定の合成に対応し、したがって特定のペプチドに対応する。そのような方法ではしばしば写真平板法様の工程を用いて多様なペプチドライブラリーを固体支持体上に作製し、支持体上の空間アドレスにより配列を決定できる。

【0241】

固体支持体上の有機化合物ライブラリーの作製法は、非ペプチド化合物、たとえばオリゴヌクレオチドおよび糖類のコンビナトリアルライブラリー作製にも利用できる。固体支持体上のペプチドライブラリーの場合と同様に、支持体上の空間位置は特定の合成に対応し、したがって特定の化合物に対応する。そのような方法ではしばしば写真平板法様の工程を用いて多様な化合物ライブラリーを固体支持体上に作製し、支持体上の空間アドレスから化合物を製造した合成スキーム

を判定できる。合成スキームが同定されると、その化合物の構造を知ることができる。

【0242】

Gallop et al., 1994, J. Medical Chemistry, 37: 1233 (本明細書に援用する) には、ランダムペプチドライブラリーをスクリーニングし、そのようなライブラリーからターゲットタンパク質に結合するペプチドを同定するための種々の方法のうち幾つかが概説されている。当業者はこれらの教示に従って、ペプチドでありかつGCC特異的結合部分として有用であるGCC特異的リガンドを同定できる。

【0243】

ファージ粒子上に表示されるペプチドおよびタンパク質は、Gallopら(前掲)に記載されている。細菌の感染に用いるバクテリオファージの表面タンパク質をコードする遺伝子にランダム核酸アレイを挿入して、ランダムヌクレオチドアレイによりコードされるペプチドを表面に発現するファージを生成することができる。ペプチドを表示するこれらのファージを利用して、それらのペプチドが特定のタンパク質、受容体、抗体などに結合しうるか判定できる。ペプチドの同定は、そのペプチドを発現するファージから得た組換えDNAの配列決定により実施できる。この方法で1ライブラリー中に多数アレイのペプチドを得ることができる(最高 10^9 個のユニークペプチド)。この方法を用いて、血小板上のフィブリノーゲン受容体に結合するがこの受容体の天然リガンドとは配列相同性のない新規な結合ペプチドが同定された(Smith et al., 1993, Gene, 128: 37; 本明細書に援用する)。同様に、この方法はMHCクラスII受容体に結合するペプチド(Hammer et al., 1993, Cell, 74: 197; 本明細書に援用する)およびカペロニン受容体に結合するペプチド(Blond-Elguindi et al., 1993, Cell, 75: 717; 本明細書に援用する)の同定に応用された。

【0244】

プラスミド上に表示されるペプチドはGallopら(前掲)に記載されている。この方法で、ペプチドライブラリーをコードするランダムオリゴヌクレオチ

ドを特定のプラスミド上に発現させることができる；その発現は特定のプロモーター（たとえば *lac* オペロン）の制御下にある。これらのペプチドは、*Lac* タンパク質に結合した融合タンパク質として、*lac* オペロンの制御下に発現する。この融合タンパク質はプラスミド上の *lac* オペレーターに特異的に結合し、したがってそのランダムペプチドはそれをコードする特異的 DNA エLEMENT と結合する。この方法で、融合タンパク質に結合した DNA の PCR により、ペプチドの配列を演繹できる。溶液相中のこれらのタンパク質をスクリーニングして、それらが特定の受容体に結合するか判定できる。この方法を用いて、特定の酵素に対する新規な基質が同定された (Schatz, 1993)。

【0245】

前記方法の変法であって、同様に Gallop ら (前掲) に記載される、プラスミド上のペプチドライブラリーをコードするランダムオリゴヌクレオチドを無細胞系で発現させうる方法も使用できる。この方法では、ランダムオリゴヌクレオチドアレイを含む分子 DNA ライブラリーを構築し、次いでこれを細菌のインビトロ転写 / 翻訳系で発現させることができる。リガンドの同定は、目的 mRNA を含有する新生鎖ペプチド / ポリソーム複合体を、受容体を含むアフィニティー樹脂上で精製し、次いで RT-PCR で増幅させた後に配列決定することにより行われる。この方法を用いると、大規模ライブラリーを形成できる (最高 10^{11} 個の組換え体)。ダイノルフィンに対して特異的に形成された抗体を認識するペプチドがこの方法で同定された (Cull et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 1865; 本明細書に援用する)。

【0246】

受容体に対してスクリーニングするためのペプチドライブラリーを化学合成により形成できる。たとえば、Gallop ら (前掲) に記載される多重ペプチド合成方法を用いて、多数の多様なペプチドが同時形成された。ある応用例では、ポリアクリルアミドマイクロタイタープレート上で標準的固相 Merrifield 合成によりランダムペプチドを形成し (マルチピン (multipin) 合成)、次いで受容体結合に対して競合する能力について標準的競合結合アッセイ

によりスクリーニングする (Wang et al., 1993, Bioorg. Med. Chem. Lett., 3: 447; 本明細書に援用する)。実際に、この方法でサブスタンスP受容体に対する新規な結合ペプチドが同定された (Wangら, 前掲)。同様に、固体支持体樹脂のバッグを順に各種アミノ酸と共にインキュベートして種々のペプチドのアレイを形成する "ティーバッグ" 法を用いる多重ペプチド合成により、ペプチドライブラリーを構築できる (Gallopら, 前掲)。この方法を用いて、インテグリン受容体に結合するペプチド (Ruggeri et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 5708; 本明細書に援用する) およびニューロペプチドY受容体に結合するペプチド (Beck-Sickinger et al., 1990, Int. J. Peptide Protein Res., 36: 522; 本明細書に援用する) が同定された。

【0247】

一般に、コンビナトリアルライブラリーの形成および有用性は下記に依存する：(1) 多様な構築ブロックアレイを形成する方法、(2) 目的とする機能をもつアレイメンバーの同定方法、および(3) そのメンバーの構造をデコンボリューションする方法。これらの条件を満たす幾つかの方法が決定された。

【0248】

以下に、本発明によるGCCリガンドの同定方法に使用できるライブラリー形成方法を記載する：

前記方法の変法を用い、一組の化学構築ブロックのメンバー、たとえばアミノ酸を可能なすべての組合わせで互いに結合させることにより、多様な分子種のライブラリーを形成できる (Gallopら, 前掲)。ある方法では、固体支持体上で生長しつつあるアミノ酸鎖に、活性化したモノマーの混合物を各サイクルで結合させる。これは多価合成系である。

【0249】

スプリット合成は、各反応において単一構築ブロックのみを含有する生長しつつある鎖をインキュベートすることを伴う (Gallopら, 前掲)。結合後、すべての反応からの樹脂を混合し、次の結合工程に各反応物を配分する。これら

の方法で、スクリーニングのための $n \times$ 個の異なるペプチドの確率的コレクションが得られる。ここで n は構築ブロック数、 x は反応サイクル数である。

【0250】

あるいは、1又はそれより多くの位置に既知のアミノ酸を含有するが残りはランダムである分子アレイを形成できる (Gallopら、前掲)。これらは限定されたライブラリーを与え、これスクリーニングして目的活性をもつメンバーを求める。これらのメンバーが同定されると構造を決定し、特定されたアミノ酸を含む他の位置と共にこの構造を再生し、スクリーニングする。この反復法により最終的に、受容体のコンホメーション結合ポケットを認識するのに最適なペプチドが得られる。

【0251】

さらに、アレイはペプチド形成アミノ酸に限定されず、線状および非線状の有機分子アレイに拡大できる (Gordon et al., 1994, J. Medical Chemistry, 37:1385; 本明細書に援用する)。実際に、ランダムアレイの無機構築ブロックのライブラリーを形成するためにこの方法を用いて、7回膜貫通受容体に結合するリガンドが同定された (Zuckermann et al., 1994, J. Med. Chem., 37:2678; 本明細書に援用する)。

【0252】

合成後に修飾して側鎖基および結合を変更し、それらと受容体の相互作用を調べるための " デザイナー " アレイを得ることができるライブラリーが、現在構築中である (Osteresh et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:11138; 本明細書に援用する)。 " ライブラリーからライブラリー " を形成するこの方法をペプチドライブラリーの完全メチル化に適用し、グラム陽性細菌に対する選択的抗微生物活性をもつ化合物が得られた。

【0253】

特異的なアミノ酸構造アレイではなく、薬理学的モチーフのアレイを発現するライブラリーも構築できる (Sepetov et al., 1995, Pro

c . Natl . Acad . Sci . USA , 92 : 5426 ; 本明細書に援用する)。この方法は、受容体に対する特異的親和性をもつ構造モチーフを同定するためのものであり、構造活性関係を規定するライブラリーを用いてこれをさらに詳細に修飾できる。モチーフライブラリーを検索して”ライブラリーのライブラリー”を形成するこの方法を用いると、初期ライブラリー検査においてスクリーニングに必要な成分メンバー数が少なくなる。

【0254】

以下に、ランダムに形成された分子のライブラリーから本発明によるGCCリガンドを同定する方法を記載する：

受容体と相互作用するライブラリー成分を、固体支持体に固定化した受容体への結合により同定できる（Gordonら、前掲）；

それらを、溶液相中のコグネイト受容体への結合に対して天然リガンドと競合する能力により同定することもできる（Gordonら、前掲）；

それらの成分を固体支持体に固定化した場合、成分を可溶性受容体に結合させることにより同定できる（Gordonら、前掲）。

【0255】

受容体を結合するライブラリーメンバーが同定されると、構造を同定して作業に用いる、または他の類似体を開発して構造活性関係を研究するのに用いる大量を形成するために、そのメンバーの構造をデコンボリューション（演繹）しなければならない。以下に、本発明による潜在GCCリガンドと同定された分子の構造を演繹するためのデコンボリューション方法を記載する。

【0256】

ペプチドライブラリーをバクテリオファージ粒子の表面に発現させることができる（Gallopら、前掲）。受容体と相互作用するペプチドが同定されると、ファージからそのDNAを単離し、PCRによりその配列を決定することにより、その構造を演繹できる。

【0257】

Lac オペロンの制御下でプラスミド上に発現したライブラリーをデコンボリューションできる。これらのペプチドは、そのペプチドをコードするプラスミ

ド上のlacオペロンと特異的に相互作用するlac Iタンパク質と融合しているからである(Gallupら、前掲)。lac Iタンパク質に結合したプラスミドを単離し、PCRによりヌクレオチドおよびペプチドの配列を演繹することにより、構造を演繹できる。

【0258】

プラスミド上に発現するライブラリーを、転写/翻訳系を用いて無細胞系で発現させることもできる(Gallupら、前掲)。このパラダイムでは、受容体と相互作用するタンパク質を、それが結合しているリボソームおよびmRNAと共に単離する。このペプチドの配列を、結合しているmRNAのRT-PCRにより演繹する。

【0259】

ライブラリー構築体を写真平板法と連結し、支持体アレイ内のその位置を判定することにより、ライブラリーのいずれのメンバーの構造も演繹することができる(Gallupら、前掲)。メンバーの精確な位置により構造情報を演繹できるので、この方法はポジショナルアドレスビリティ(positional addressability)と呼ばれる。

【0260】

ライブラリーを同定可能な他の分子のアレイで標識することにより、ライブラリーのメンバーを同定することもできる(Ohlmeyer et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:10922、本明細書に援用する；およびGallupら、前掲)。この方法は、ペプチドとその配列をコードするファージプラスミドを結合させる前記方法の変法である。ある方法は、そのペプチドの逐次合成歴をコードするヌクレオチドのアレイを用いる。たとえば、生長しつつあるペプチドにヌクレオチドを逐次結合させ、PCRにより復号して、結合したペプチドの構造を求めることができる。あるいは、そのペプチドの逐次合成歴をコードする有機低分子のアレイを、配列決定可能な標識として使用できる。たとえば生長しつつあるペプチドにヌクレオチドを逐次結合させ、PCRにより復号して、結合したペプチドの構造を求めることができる。あるいは、そのライブラリーメンバーの逐次合成歴をコードする有機低分子

のアレイを配列決定可能な標識として使用できる。

【0261】

最後に、アミノ酸配列分析によりライブラリーのメンバーの構造を直接決定できる。

以下の特許（それぞれ本明細書に援用する）には、ランダムペプチドまたは非ペプチドライブラリーの作製方法、およびそれらのライブラリーをスクリーニングしてターゲットタンパク質に結合する化合物を同定する方法が記載されている。本発明に用いるGCCは、これらの特許に従って形成およびスクリーニングされるペプチドおよび非ペプチドリガンドの同定に用いられるターゲットとなりうる。

【0262】

USP5,270,170（1993年12月14日、Schatzらに発行）およびUSP5,338,665（1994年8月16日、Schatzらに発行）（両者を本明細書に援用する）は、ペプチドライブラリーおよびスクリーニング方法に関するものであり、これらを用いてGCCリガンドを同定できる。

【0263】

USP5,395,750（1995年3月7日、Dillonらに発行；本明細書に援用する）は、予め定めた抗原に結合するタンパク質の製造方法に関する。これらの方法を用いてGCCリガンドを製造できる。

【0264】

USP5,223,409（1993年6月29日、Ladnerらに発行；本明細書に援用する）は、新規な結合タンパク質を目的とした開発に関する。その開示に従ってそれらのタンパク質を製造およびスクリーニングして、GCCリガンドを同定できる。

【0265】

USP5,366,862（1994年12月22日、Ventonらに発行；本明細書に援用する）は、有用なペプチドの形成およびスクリーニング方法に関する。そこに記載の方法を用いてGCCリガンドを同定できる。

【0266】

USP 5, 340, 474 (1994年8月23日、Kauvarらに発行) ならびにUSP 5, 133, 866、USP 4, 963, 263およびUSP 5, 217, 869 (これらをそれぞれ本明細書に援用する) を用いて、GCCリガンドを同定できる。

【0267】

USP 5, 405, 783 (1995年4月11日、Pirrungらに発行; 本明細書に援用する) は、ポリマーアレイの大規模写真平板法固相合成に関する。その教示を用いてGCCリガンドを同定できる。

【0268】

USP 5, 143, 854 (1992年9月1日、Pirrungらに発行; 本明細書に援用する) は、ポリペプチドの大規模写真平板法固相合成およびその受容体結合スクリーニングに関する。

【0269】

USP 5, 384, 261 (1995年1月24日、Winklerらに発行; 本明細書に援用する) は、機械的に指示したフローパターンを用いるきわめて大規模な固定化ポリマー合成に関する。そのような方法はGCCリガンドの同定に有用である。

【0270】

USP 5, 221, 736 (1993年1月22日、Coolidgeらに発行; 本明細書に援用する) は、免疫アフィニティー法を用いるペプチドおよびオリゴヌクレオチドの逐次合成に関する。そこに記載の方法を用いてGCCリガンドを同定できる。

【0271】

USP 5, 412, 087 (1995年5月2日、McGallらに発行; 本明細書に援用する) は、オリゴヌクレオチドその他の生物ポリマーを空間アドレス指定可能な状態で表面に固定化することに関する。そこに記載の方法を用いてGCCリガンドを同定できる。

【0272】

USP 5, 324, 483 (1994年6月28日、Codyらに発行; 本明

細書に援用する)は、多重同時合成のための装置に関する。そこに開示される装置および方法を用いて多重の化合物を製造し、スクリーニングして、GCCリガンドを同定できる。

【0273】

USP5,252,743(1993年10月12日、Barrettらに発行;本明細書に援用する)は、抗リガンドを空間アドレス指定可能な状態で表面に固定化することに関する。そこに記載の方法および組成物を用いてGCCリガンドを同定できる。

【0274】

USP5,424,186(1995年6月13日、Foderらに発行;本明細書に援用する)は、きわめて大規模な固定化ポリマー合成に関する。そこに記載のオリゴヌクレオチド合成方法を用いてGCCリガンドを同定できる。

【0275】

USP5,420,328(1995年5月30日、Campbellらに発行;本明細書に援用する)は、ホスホナートエステルの合成方法に関する。こうして製造されるホスホナートエステルをスクリーニングして、GCCリガンドである化合物を同定できる。

【0276】

USP5,288,514(1994年2月22日、Ellmanらに発行;本明細書に援用する)は、固体支持体上でのベンゾジアゼピン化合物の固相およびコンビナトリアル合成に関する。それらの方法および化合物を用いてGCCリガンドを同定できる。

【0277】

前記のように、GCCリガンドは抗体およびそのフラグメントであってもよい。実際に、これらの受容体のユニークな決定因子に対して産生された抗体はそのタンパク質(このタンパク質のみ)を認識し、その結果、新規な診断薬および療法薬をこのユニークなマーカーへ指向させるのに使用できる特異的ターゲティング分子として作用しうる。さらに、これらの抗体を用いて生物試料中のGCCまたはそのフラグメントの存在を同定できる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Thomas Jefferson University
Waldman, Scott A.
Park, Jason
Schulz, Stephanie

<120> Compositions And Methods For Identifying And Targeting Cancer Cells Of Alimentary Canal Origin

<130> TJU2469

<150> 60/192,229

<151> 2000-03-27

<160> 2

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 3787

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (118)..(3336)

<400> 1

tggagtgaggc tgagggactc cactagaggc tgtccatctg gattccctgc ctccctagga 60

gccccaacaga gcaaagcaag tgggcacaag gagtatggtt ctaacgtgat tgggggtc 117

atg aag acg ttg ctg ttg gac ttg gct ttg tgg tca ctg ctc ttc cag 165
Met Lys Thr Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln
1 5 10 15

ccc ggg tgg ctg tcc ttt agt tcc cag gtg agt cag aac tgc cac aat 213
Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn
20 25 30

ggc agc tat gaa atc agc gtc ctg atg atg ggc aac tca gcc ttt gca 261
Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala
35 40 45

gag ccc ctg aaa aac ttg gaa gat gcg gtg aat gag ggg ctg gaa ata 309
Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile
50 55 60

gtg aga gga cgt ctg caa aat gct ggc cta aat gtg act gtg aac gct 357
Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala
65 70 75 80

act ttc atg tat tcc gat ggt ctg att cat aac tca ggc gac tgc cgg 405
Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg
85 90 95

agt agc acc tgt gaa ggc ctc gac cta ctc agg aaa att tca aat gca 453
Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala
100 105 110

caa cgg atg ggc tgt gtc ctc ata ggg ccc tca tgt aca tac tcc acc 501
Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr
115 120 125

ttc cag atg tac ctt gac aca gaa ttg agc tac ccc atg atc tca gct Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala 130 135 140	549
gga agt ttt gga ttg tca tgt gac tat aaa gaa acc tta acc agg ctg Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu 145 150 155 160	597
atg tct cca gct aga aag ttg atg tac ttc ttg gtt aac ttt tgg aaa Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys 165 170 175	645
acc aac gat ctg ccc ttc aaa act tat tcc tgg agc act tcg tat gtt Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val 180 185 190	693
tac aag aat ggt aca gaa act gag gac tgt ttc tgg tac ctt aat gct Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala 195 200 205	741
ctg gag gct agc gtt tcc tat ttc tcc cac gaa ctc ggc ttt aag gtg Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val 210 215 220	789
gtg tta aga caa gat aag gag ttt cag gat atc tta atg gac cac aac Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn 225 230 235 240	837
agg aaa agc aat gtg att att atg tgt ggt ggt cca gag ttc ctc tac Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr 245 250 255	885
aag ctg aag ggt gac cga gca gtg gct gaa gac att gtc att att cta Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu 260 265 270	933
gtg gat ctt ttc aat gac cag tac ttg gag gac aat gtc aca gcc cct Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro 275 280 285	981
gac tat atg aaa aat gtc ctt gtt ctg acg ctg tct cct ggg aat tcc Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser 290 295 300	1029
ctt cta aat agc tct ttc tcc agg aat cta tca cca aca aaa cga gac Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp 305 310 315 320	1077
ttt cgt ctt gcc tat ttg aat gga atc ctc gtc ttt gga cat atg ctg Phe Arg Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Val Phe Gly His Met Leu 325 330 335	1125
aag ata ttt ctt gaa aat gga gaa aat att acc acc ccc aaa ttt gct Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala 340 345 350	1173
cat gcc ttc agg aat ctc act ttt gaa ggg tat gac ggt cca gtg acc His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr 355 360 365	1221
ttg gat gac tgg ggg gat gtt gac agt acc atg gtg ctt ctg tat acc Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr 370 375 380	1269
tct gtg gac acc aag aaa tac aag gtt ctt ttg acc tat gat acc cac	1317

Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His 385 390 395 400	
gta aat aag acc tat cct gtg gat atg agc ccc aca ttc act tgg aag Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys 405 410 415	1365
aac tct aaa ctt cct aat gat att aca ggc cgg ggc cct cag atc ctg Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Ile Leu 420 425 430	1413
atg att gca gtc ttc acc ctc act gga gct gtg gtg ctg ctc ctg ctc Met Ile Ala Val Phe Thr Leu Thr Gly Ala Val Val Leu Leu Leu Leu 435 440 445	1461
gtc gct ctc ctg atg ctc aga aaa tat aga aaa gat tat gaa ctt cgt Val Ala Leu Leu Met Leu Arg Lys Tyr Arg Lys Asp Tyr Glu Leu Arg 450 455 460	1509
cag aaa aaa tgg tcc cac att cct cct gaa aat atc ttt cct ctg gag Gln Lys Lys Trp Ser His Ile Pro Pro Glu Asn Ile Phe Pro Leu Glu 465 470 475 480	1557
acc aat gag acc aat cat gtt agc ctc aag atc gat gat gac aaa aga Thr Asn Glu Thr Asn His Val Ser Leu Lys Ile Asp Asp Asp Lys Arg 485 490 495	1605
cga gat aca atc cag aga cta cga cag tgc aaa tac gtc aaa aag cga Arg Asp Thr Ile Gln Arg Leu Arg Gln Cys Lys Tyr Val Lys Lys Arg 500 505 510	1653
gtg att ctc aaa gat ctc aag cac aat gat ggt aat ttc act gaa aaa Val Ile Leu Lys Asp Leu Lys His Asn Asp Gly Asn Phe Thr Glu Lys 515 520 525	1701
cag aag ata gaa ttg aac aag ttg ctt cag att gac tat tac acc cta Gln Lys Ile Glu Leu Asn Lys Leu Leu Gln Ile Asp Tyr Tyr Thr Leu 530 535 540	1749
acc aag ttc tac ggg aca gtg aaa ctg gat acc atg atc ttc ggg gtg Thr Lys Phe Tyr Gly Thr Val Lys Leu Asp Thr Met Ile Phe Gly Val 545 550 555 560	1797
ata gaa tac tgt gag aga gga tcc ctc cgg gaa gtt tta aat gac aca Ile Glu Tyr Cys Glu Arg Gly Ser Leu Arg Glu Val Leu Asn Asp Thr 565 570 575	1845
att tcc tac cct gat ggc aca ttc atg gat tgg gag ttt aag atc tct Ile Ser Tyr Pro Asp Gly Thr Phe Met Asp Trp Glu Phe Lys Ile Ser 580 585 590	1893
gtc ttg tat gac att gct aag gga atg tca tat ctg cac tcc agt aag Val Leu Tyr Asp Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu His Ser Ser Lys 595 600 605	1941
aca gaa gtc cat ggt cgt ctg aaa tct acc aac tgc gta gtg gac agt Thr Glu Val His Gly Arg Leu Lys Ser Thr Asn Cys Val Val Asp Ser 610 615 620	1989
aga atg gtg gtg aag atc act gat ttt ggc tgc aat tcc att ttg cct Arg Met Val Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Cys Asn Ser Ile Leu Pro 625 630 635 640	2037
cca aaa aag gac ctg tgg aca gct cca gag cac ctc cgc caa gcc aac Pro Lys Lys Asp Leu Trp Thr Ala Pro Glu His Leu Arg Gln Ala Asn	2085

645	650	655	
atc tct cag aaa gga gat gtg tac agc tat ggg atc atc gca cag gag Ile Ser Gln Lys Gly Asp Val Tyr Ser Tyr Gly Ile Ile Ala Gln Glu 660 665 670			2133
atc att ctg cgg aaa gaa acc ttc tac act ttg agc tgt cgg gac cgg Ile Ile Leu Arg Lys Glu Thr Phe Tyr Thr Leu Ser Cys Arg Asp Arg 675 680 685			2181
aat gag aag att ttc aga gtg gaa aat tcc aat gga atg aaa ccc ttc Asn Glu Lys Ile Phe Arg Val Glu Asn Ser Asn Gly Met Lys Pro Phe 690 695 700			2229
cgc cca gat tta ttc ttg gaa aca gca gag gaa aaa gag cta gaa gtg Arg Pro Asp Leu Phe Leu Glu Thr Ala Glu Glu Lys Glu Leu Glu Val 705 710 715 720			2277
tac cta ctt gta aaa aac tgt tgg gag gaa gat cca gaa aag aga cca Tyr Leu Leu Val Lys Asn Cys Trp Glu Glu Asp Pro Glu Lys Arg Pro 725 730 735			2325
gat ttc aaa aaa att gag act aca ctt gcc aag ata ttt gga ctt ttt Asp Phe Lys Lys Ile Glu Thr Thr Leu Ala Lys Ile Phe Gly Leu Phe 740 745 750			2373
cat gac caa aaa aat gaa agc tat atg gat acc ttg atc cga cgt cta His Asp Gln Lys Asn Glu Ser Tyr Met Asp Thr Leu Ile Arg Arg Leu 755 760 765			2421
cag cta tat tct cga aac ctg gaa cat ctg gta gag gaa agg aca cag Gln Leu Tyr Ser Arg Asn Leu Glu His Leu Val Glu Glu Arg Thr Gln 770 775 780			2469
ctg tac aag gca gag agg gac agg gct gac aga ctt aac ttt atg ttg Leu Tyr Lys Ala Glu Val Val Lys Ser Leu Lys Glu Lys Gly Phe Val Glu 785 790 795 800			2517
ctt cca agg cta gtg gta aag tct ctg aag gag aaa ggc ttt gtg gag Leu Pro Arg Leu Val Val Lys Ser Leu Lys Glu Lys Gly Phe Val Glu 805 810 815			2565
ccg gaa cta tat gag gaa gtt aca atc tac ttc agt gac att gta ggt Pro Glu Leu Tyr Glu Glu Val Thr Ile Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly 820 825 830			2613
ttc act act atc tgc aaa tac agc acc ccc atg gaa gtg gtg gac atg Phe Thr Thr Ile Cys Lys Tyr Ser Thr Pro Met Glu Val Val Asp Met 835 840 845			2661
ctt aat gac atc tat aag agt ttt gac cac att gtt gat cat cat gat Leu Asn Asp Ile Tyr Lys Ser Phe Asp His Ile Val Asp His His Asp 850 855 860			2709
gtc tac aag gtg gaa acc atc ggt gat gcg tac atg gtg gct agt ggt Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly 865 870 875 880			2757
ttg cct aag aga aat ggc aat cgg cat gca ata gac att gcc aag atg Leu Pro Lys Arg Asn Gly Asn Arg His Ala Ile Asp Ile Ala Lys Met 885 890 895			2805
gcc ttg gaa atc ctc agc ttc atg ggg acc ttt gag ctg gag cat ctt Ala Leu Glu Ile Leu Ser Phe Met Gly Thr Phe Glu Leu Glu His Leu 900 905 910			2853

cct ggc ctc cca ata tgg att cgc att gga gtt cac tct ggt ccc tgt 2901
 Pro Gly Leu Pro Ile Trp Ile Arg Ile Gly Val His Ser Gly Pro Cys
 915 920 925
 gct gct gga gtt gtg gga atc aag atg cct cgt tat tgt cta ttt gga 2949
 Ala Ala Gly Val Val Gly Ile Lys Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly
 930 935 940
 gat acg gtc aac aca gcc tct agg atg gaa tcc act ggc ctc cct ttg 2997
 Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Leu
 945 950 955 960
 aga att cac gtg agt ggc tcc acc ata gcc atc ctg aag aga act gag 3045
 Arg Ile His Val Ser Gly Ser Thr Ile Ala Ile Leu Lys Arg Thr Glu
 965 970 975
 tgc cag ttc ctt tat gaa gtg aga gga gaa aca tac tta aag gga aga 3093
 Cys Gln Phe Leu Tyr Glu Val Arg Gly Glu Thr Tyr Leu Lys Gly Arg
 980 985 990
 gga aat gag act acc tac tgg ctg act ggg atg aag gac cag aaa ttc 3141
 Gly Asn Glu Thr Thr Tyr Trp Leu Thr Gly Met Lys Asp Gln Lys Phe
 995 1000 1005
 aac ctg cca acc cct cct act gtg gag aat caa cag cgt ttg caa 3186
 Asn Leu Pro Thr Pro Pro Thr Val Glu Asn Gln Gln Arg Leu Gln
 1010 1015 1020
 gca gaa ttt tca gac atg att gcc aac tct tta cag aaa aga cag 3231
 Ala Glu Phe Ser Asp Met Ile Ala Asn Ser Leu Gln Lys Arg Gln
 1025 1030 1035
 gca gca ggg ata aga agc caa aaa ccc aga cgg gta gcc agc tat 3276
 Ala Ala Gly Ile Arg Ser Gln Lys Pro Arg Arg Val Ala Ser Tyr
 1040 1045 1050
 aaa aaa ggc act ctg gaa tac ttg cag ctg aat acc aca gac aag 3321
 Lys Lys Gly Thr Leu Glu Tyr Leu Gln Leu Asn Thr Thr Asp Lys
 1055 1060 1065
 gag agc acc tat ttt taaacctaaa tgagggtataa ggactcacac aaattaaaat 3376
 Glu Ser Thr Tyr Phe
 1070
 acagctgcac tgaggccagg caccctcagg tgcctgaaa gcttactttc ctgagacctc 3436
 atgaggcaga aatgtcttag gcttggtgc cctgtttgga ccattggactt tctttgcatg 3496
 aatcagatgt gttctcagtg aaataactac cttccactct ggaaccttat tccagcagtt 3556
 gttccaggga gcttctacct ggaaaagaaa agaatttcat ttattttttg tttgtttatt 3616
 tttatcgttt ttgtttactg gctttccttc tgtattcata agatttttta aattgtcata 3676
 attatatattt aaatacccat cttcattaaa gtatatattaa ctcataattt ttgcagaaaa 3736
 tatgctatat attaggcaag aataaaagct aaaggtttcc caaaaaaaaa a 3787

<210> 2
 <211> 1073
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln
1 5 10 15

Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn
20 25 30

Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala
35 40 45

Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile
50 55 60

Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala
65 70 75 80

Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg
85 90 95

Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala
100 105 110

Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr
115 120 125

Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala
130 135 140

Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu
145 150 155 160

Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys
165 170 175

Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val
180 185 190

Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala
195 200 205

Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val
210 215 220

Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn
225 230 235 240

Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr
245 250 255

Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu
 260 265 270
 Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
 275 280 285
 Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
 290 295 300
 Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
 305 310 315 320
 Phe Arg Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Val Phe Gly His Met Leu
 325 330 335
 Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala
 340 345 350
 His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr
 355 360 365
 Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
 370 375 380
 Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
 385 390 395 400
 Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
 405 410 415
 Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Ile Leu
 420 425 430
 Met Ile Ala Val Phe Thr Leu Thr Gly Ala Val Val Leu Leu Leu Leu
 435 440 445
 Val Ala Leu Leu Met Leu Arg Lys Tyr Arg Lys Asp Tyr Glu Leu Arg
 450 455 460
 Gln Lys Lys Trp Ser His Ile Pro Pro Glu Asn Ile Phe Pro Leu Glu
 465 470 475 480
 Thr Asn Glu Thr Asn His Val Ser Leu Lys Ile Asp Asp Asp Lys Arg
 485 490 495
 Arg Asp Thr Ile Gln Arg Leu Arg Gln Cys Lys Tyr Val Lys Lys Arg
 500 505 510

Val Ile Leu Lys Asp Leu Lys His Asn Asp Gly Asn Phe Thr Glu Lys
 515 520 525
 Gln Lys Ile Glu Leu Asn Lys Leu Leu Gln Ile Asp Tyr Tyr Thr Leu
 530 535 540
 Thr Lys Phe Tyr Gly Thr Val Lys Leu Asp Thr Met Ile Phe Gly Val
 545 550 555 560
 Ile Glu Tyr Cys Glu Arg Gly Ser Leu Arg Glu Val Leu Asn Asp Thr
 565 570 575
 Ile Ser Tyr Pro Asp Gly Thr Phe Met Asp Trp Glu Phe Lys Ile Ser
 580 585 590
 Val Leu Tyr Asp Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu His Ser Ser Lys
 595 600 605
 Thr Glu Val His Gly Arg Leu Lys Ser Thr Asn Cys Val Val Asp Ser
 610 615 620
 Arg Met Val Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Cys Asn Ser Ile Leu Pro
 625 630 635 640
 Pro Lys Lys Asp Leu Trp Thr Ala Pro Glu His Leu Arg Gln Ala Asn
 645 650 655
 Ile Ser Gln Lys Gly Asp Val Tyr Ser Tyr Gly Ile Ile Ala Gln Glu
 660 665 670
 Ile Ile Leu Arg Lys Glu Thr Phe Tyr Thr Leu Ser Cys Arg Asp Arg
 675 680 685
 Asn Glu Lys Ile Phe Arg Val Glu Asn Ser Asn Gly Met Lys Pro Phe
 690 695 700
 Arg Pro Asp Leu Phe Leu Glu Thr Ala Glu Glu Lys Glu Leu Glu Val
 705 710 715 720
 Tyr Leu Leu Val Lys Asn Cys Trp Glu Glu Asp Pro Glu Lys Arg Pro
 725 730 735
 Asp Phe Lys Lys Ile Glu Thr Thr Leu Ala Lys Ile Phe Gly Leu Phe
 740 745 750
 His Asp Gln Lys Asn Glu Ser Tyr Met Asp Thr Leu Ile Arg Arg Leu
 755 760 765
 Gln Leu Tyr Ser Arg Asn Leu Glu His Leu Val Glu Glu Arg Thr Gln

770	775	780
Leu Tyr Lys Ala Glu Arg Asp Arg Ala Asp Arg Leu Asn Phe Met Leu 785 790 795 800		
Leu Pro Arg Leu Val Val Lys Ser Leu Lys Glu Lys Gly Phe Val Glu 805 810 815		
Pro Glu Leu Tyr Glu Glu Val Thr Ile Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly 820 825 830		
Phe Thr Thr Ile Cys Lys Tyr Ser Thr Pro Met Glu Val Val Asp Met 835 840 845		
Leu Asn Asp Ile Tyr Lys Ser Phe Asp His Ile Val Asp His His Asp 850 855 860		
Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly 865 870 875 880		
Leu Pro Lys Arg Asn Gly Asn Arg His Ala Ile Asp Ile Ala Lys Met 885 890 895		
Ala Leu Glu Ile Leu Ser Phe Met Gly Thr Phe Glu Leu Glu His Leu 900 905 910		
Pro Gly Leu Pro Ile Trp Ile Arg Ile Gly Val His Ser Gly Pro Cys 915 920 925		
Ala Ala Gly Val Val Gly Ile Lys Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly 930 935 940		
Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Leu 945 950 955 960		
Arg Ile His Val Ser Gly Ser Thr Ile Ala Ile Leu Lys Arg Thr Glu 965 970 975		
Cys Gln Phe Leu Tyr Glu Val Arg Gly Glu Thr Tyr Leu Lys Gly Arg 980 985 990		
Gly Asn Glu Thr Thr Tyr Trp Leu Thr Gly Met Lys Asp Gln Lys Phe 995 1000 1005		
Asn Leu Pro Thr Pro Pro Thr Val Glu Asn Gln Gln Arg Leu Gln 1010 1015 1020		
Ala Glu Phe Ser Asp Met Ile Ala Asn Ser Leu Gln Lys Arg Gln 1025 1030 1035		

Ala Ala Gly Ile Arg Ser Gln Lys Pro Arg Arg Val Ala Ser Tyr
1040 1045 1050

Lys Lys Gly Thr Leu Glu Tyr Leu Gln Leu Asn Thr Thr Asp Lys
1055 1060 1065

Glu Ser Thr Tyr Phe
1070

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/09790
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; G01N 33/53, 33/574; A61K 39/00, 39/38 US CL : 435/ 6, 7.1, 7.23, 975; 424/ 184.1, 193.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/ 6, 7.1, 7.23, 975; 424/ 184.1, 193.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN, WEST, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LONDON et al. Signal transduction pathways via guanylin and uroguanylin in stomach and intestine. Amer.J.Physio. 1997, Vol. 273, pages G93-G105, especially pages G93-94, and Fig. 5.	1-28,33
Y	US 5,601,990 A (WALDMAN) 11 February 1997 (11.02.1997), cols 3-4, 7-8, 7 and 20.	1-28,33
Y	US 5,879,656 A (WALDMAN) 09 March 1999 (09.03.1999), entire article, especially column 8, lines 3-10, and lines 47-49, and claims.	1-28, 33-38
A	LI et al. Peptide-regulated guanylate cyclase pathways in rat colon: in situ localization of GCA, GCC, and guanylin mRNA. Amer.J.Physio. 1993, Vol. 265, pages G394-G402, entire article, especially page G394.	1-38
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" documents member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 June 2001 (02.06.2001)		Date of mailing of the international search report 12 JUL 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized official Gary B. Nickol, Ph.D. Telephone No. 703-308-0196

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト [*] (参考)
A 6 1 P 35/00		C 1 2 Q 1/68	A
35/04		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/68		A 6 1 K 49/02	B
			C

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

(72)発明者 シュルツ, ステファニー
アメリカ合衆国ペンシルバニア州19380,
ウエスト・チェスター, ハワード・ロード
117

Fターム(参考) 4B024 AA12 BA36 BA54 CA04 DA06
EA04 GA11 HA14
4B063 QA19 QQ03 QQ08 QQ58 QR32
QR55 QR62 QS25 QS34
4C076 AA95 CC27 CC41 EE59
4C084 AA19 MA05 NA13 ZA661
ZB261
4C085 HH03 KA29 KB02 KB03 KB05
KB07 KB09 KB10 KB11 KB15
KB17 KB18 KB19 LL18

专利名称(译)	用于鉴定和靶向胃肠来源的癌细胞的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2003528628A	公开(公告)日	2003-09-30
申请号	JP2001570845	申请日	2001-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	托马斯杰弗逊大学		
申请(专利权)人(译)	托马斯杰弗逊大学		
[标]发明人	ワルドマンスコットエイ パークジェイソン シュルツステファニー		
发明人	ワルドマン,スコット・エイ パーク,ジェイソン シュルツ,ステファニー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/196 A61K31/407 A61K31/4164 A61K31/475 A61K31/513 A61K31/519 A61K31/7034 A61K31/704 A61K31/7048 A61K31/7068 A61K31/711 A61K33/24 A61K38/00 A61K38/43 A61K38/46 A61K39/00 A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61K51/00 A61P1/00 A61P35/00 A61P35/04 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/6886 G01N33/566 G01N33/574 C12Q1/68		
CPC分类号	A61K31/7034 A61K31/7048 A61P1/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/04 A61K47/6871 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57407 G01N33/57419 G01N33/57446 A61K9/127 A61K39/0011 A61K39/001102 A61K51/1075 C07K16/3046 C07K16/40 C12N15/113 G01N2333/988		
FI分类号	A61K45/00 A61K47/48 A61P1/00 A61P35/00 A61P35/04 C12Q1/68.A C12N15/00.ZNA.A A61K49/02.B A61K49/02.C		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/BA54 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ58 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4C076/AA95 4C076/CC27 4C076/CC41 4C076/EE59 4C084/AA19 4C084/MA05 4C084/NA13 4C084/ZA661 4C084/ZB261 4C085/HH03 4C085/KA29 4C085/KB02 4C085/KB03 4C085/KB05 4C085/KB07 4C085/KB09 4C085/KB10 4C085/KB11 4C085/KB15 4C085/KB17 4C085/KB18 4C085/KB19 4C085/LL18		
优先权	60/192229 2000-03-27 US		
其他公开文献	JP2003528628A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于筛选和诊断原发性和/或转移性胃癌或食道癌的试剂，试剂盒和方法。公开了用于成像和治疗原发性和/或转移性胃癌或食道癌的组合物和方法。公开了用于治疗 and 预防原发性和/或转移性胃癌或食道癌的疫苗，组合物和方法。

